

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθύντρια: Καθηγήτρια Μαρία Παπαχατζή-Καλμαντή

ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ
ΣΤΗΝ ΚΑΘΑΡΣΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΕΛΟ
ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ ΠΑΙΔΙΩΝ
ΜΕ ΚΑΚΟΗΘΕΙΕΣ.
Επίδραση της Αμιφοστίνης

Διδακτορική διατριβή
της
Βασιλικής Ν. Δανηλάτου
Ιατρού

Επιβλέπουσα: Μαρία Παπαχατζή-Καλμαντή
Καθηγήτρια Παιδιατρικής

Ηράκλειο Κρήτης
2001

Στην οικογένειά μου,

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ABBREVIATIONS	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Μεταμόσχευση μυελού των οστών	14
1.1 Ανίχνευση της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου στο μόσχευμα	15
1.2 Κάθαρση μυελού των οστών	17
1.3 Μέθοδοι κάθαρσης: Αρνητική επιλογή	19
1.3.1 Φυσικές μέθοδοι	19
1.3.2 Φαρμακολογικές μέθοδοι	20
1.3.3 Ανοσολογικές μέθοδοι	22
1.3.4 Ολιγονουκλεοτίδια αντιθέτου σημασίας (antisense oligonucleotides)	25
1.3.5 Μακράς διάρκειας καλλιέργειες μυελού	25
1.3.6 Επαγωγή της ανοσολογικής ρύθμισης	26
1.4 Θετική επιλογή	30
1.5 Ex vivo έκπτυξη (expansion)	33
1.6 Επαγωγή διαφοροποίησης	33
1.7 Συνδυασμοί μεθόδων κάθαρσης	34
2. Φωτοδυναμική θεραπεία	36
2.1 Φωτοευαισθητοποιητές	38
2.2 Μεροκυανίνη 540 (MC 540)	42
2.3 Φωτοχημικές αντιδράσεις	46
2.4 Φως και συστήματα διανομής	49
2.5 Εφαρμογές της ΦΔΘ στους συμπαγείς όγκους	51
2.5.1 Φωτοδιαγνωστική απεικόνιση	51
2.5.2 Φωτοδυναμική θεραπεία	51
2.6 Εφαρμογές της ΦΔΘ στην κάθαρση μυελού των οστών	54
2.6.1. Προκλινικά δεδομένα	54
2.6.2 Κλινικά δεδομένα	57
3. Κυτταροπροστασία	58
3.1 Ιστορική αναδρομή	59
3.2 Κυτταροπροστατευτικές ουσίες	59
3.2.1 DDTC	60
3.2.2 Sodium Thiosulfate (STS)	60
3.2.3 Γλουταθειόνη	61
3.2.4 Mesna	61
3.2.5 Θειορεδοξίνη	61
3.2.6 Org 2766	61
3.2.7 Δεξραζοξάνη (ICRF-187)	61
3.3 Αμφοστίνη	62
3.3.1 Φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική	62
3.3.2 Μηχανισμοί κυτταροπροστασίας	63
3.3.3 Προκλινικές μελέτες	64

3.3.4 Κλινικές μελέτες	66
3.3.5 Αμιφοστίνη και κάθαρση μυελού των οστών	67
3.3.6 Αιμοποιητικές δράσεις της Αμιφοστίνης	68
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	71
1.1. Κύτταρα	71
1.2 Αντιδραστήρια	73
1.3 Πηγή φωτός	73
1.4 Φωτοευαισθητοποίηση	74
1.5 Καλλιέργειες προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων	75
1.6 Στατιστική ανάλυση	76
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
2.1 Κύτταρα λευχαιμικής σειράς HL-60	77
2.2 Φυσιολογικά πρόδρομα κύτταρα μυελού	77
2.3 Πρόδρομα κύτταρα μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση	80
2.4 Λευχαιμικά κύτταρα μυελού	82
2.5 Λευχαιμικά κύτταρα περιφερικού αίματος	85
2.6 Κύτταρα μυελού νευροβλαστώματος	85
2.7 Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα	86
2.8 Δράση της Αμιφοστίνης στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων	94
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	97
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	106
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	107
SUMMARY	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα: Βασιλική
Επίθετο: Δαηλάτου
Όνομα πατέρα: Νικόλαος
Διεύθυνση: Εθν. Αντιστάσεως 10, Τσαλικάκι Γαζίου
71414, Ηράκλειο Κρήτης
ΤΗΛ: +3 081 313297
FAX: +3 081 392778
+3 01 8643140

Τόπος γεννήσεως: Αθήνα
Ημερομηνία γεννήσεως: 3 Αυγούστου 1971
Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμος
Ξένες γλώσσες: Αγγλικά, Γαλλικά
Επάγγελμα: Ιατρός
Άδεια εξασκήσεως επαγγέλματος: Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών # 5253
7 Φεβρουαρίου 1996

ΣΠΟΥΔΕΣ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

Σεπτ. 1989-Ιαν. 1996: Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης
Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς (7.61/10)

Μάρτ. 1996-Μάρτ. 1998: Εκπόνηση Υπηρεσίας Υπαίθρου
Π.Ι. Βασ. Ανωγείων, Κ.Υ. Μοιρών, Ηράκλειο Κρήτης

Ιούλ. 1997: Παρακολούθηση στην Κλινική
Παιδιατρικής Αιματολογίας/Ογκολογίας του
Strong Memorial Hospital, Rochester, New York

Ιούν-Ιούλ. 1999: Παρακολούθηση στο Εργαστήριο Μονάδας
Μεταμόσχευσης Μυελού Stem Cell Research,
Children's Hospital of Philadelphia

Μαΐος 1998- Οκτ. 2000: Ειδικότητα Παιδιατρικής, Βενιζέλειο Νοσοκομείο
Ηρακλείου Κρήτης

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

Φεβ.- Μάιος 1996: Βασική Ανοσολογία, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης
Νοεμβ.-Δεκ. 1998: Πρόγραμμα Επαγγελματικής Κατάρτισης “Χρήση Η/Υ και
προγραμμάτων γραφείου” (Windows ’98- Word ’97- Excel ’97)
Φεβ.- Μάιος 1999: Ανοσολογία, Τμήμα Παθολογίας,
Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΟΥΜΕΝΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

1999-2001. Ερευνητικό Πρόγραμμα με Κ.Α. 1246 “ Εx νίνο κάθαρση μυελού για
αυτόλογη μεταμόσχευση σε παιδιά με αιματολογικές κακοήθειες”
Έγκριση από την Επιτροπή Ερευνών Πανεπιστημίου Κρήτης,
αριθμός απόφασης 134/16-2/99

ΒΡΑΒΕΙΟ

1998: “Οδυσσέας Καλλιγιάννης”
9^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο Κρήτης
Τίτλος: “Ο ρόλος της Αμιφοστίνης κατά την ex νίνο κάθαρση μυελού των οστών με
φωτοδυναμική θεραπεία”.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΙ ΣΥΛΛΟΓΟΙ

- Μέλος Ιατρικού Συλλόγου Ηρακλείου Κρήτης
- Μέλος Ελληνικής Παιδιατρικής Εταιρείας
- Αντεπιστέλλον μέλος Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας
- Μέλος της Ευρωπαϊκής Αιματολογικής Εταιρείας

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. E. Λυδάκη, E. Δημητρίου, B. Δαηηλάτου, Θ. Παπάζογλου, E. Μπολωνάκη, E. Στειακάκη, M. Καλμαντή. Φωτοδυναμική θεραπεία στην κάθαρση μυελού παιδιών με νεοπλασία. Επίδραση κυτταροπροστατευτικών ουσιών στα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα. Παιδιατρική 1997; 60 (2): 267-278.
2. V. Danilatou, E. Lydaki, H. Dimitriou, T. Papazoglou, M. Kalmanti. Bone marrow purging by photodynamic treatment in children with acute leukemia. Cytoprotective effect of Amifostine. Leukemia Res. 2000; 24: 427-435.
3. V. Danilatou, M. Kalmanti. Current approaches on ex vivo purging for autologous transplantation: Could they help? A review. Haema 2000; 3 (3): 159-175.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

A) ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. E. Δημητρίου, E. Στειακάκη, X. Ματσούκα, E. Χατζηδάκη, E. Μπολωνάκη, E. Λυδάκη, B. Δαηηλάτου, A. Μακρυγιαννάκης, E. Κουμαντάκης, M. Καλμαντή. Η απομόνωση CD34+ κυττάρων ομφαλίου λώρου και η ex vivo έκπτυξή τους αποδίδει ικανό αριθμό αιμοποιητικών κυττάρων για μεταμόσχευση. 8^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 1996, Αγ. Νικόλαος, σελ. 207.
2. E. Δημητρίου, E. Στειακάκη, X. Ματσούκα, E. Χατζηδάκη, E. Μπολωνάκη, E. Λυδάκη, B. Δαηηλάτου, A. Μακρυγιαννάκης, E. Κουμαντάκης, M. Καλμαντή. In vitro έκπτυξη CD34+ κυττάρων ομφαλίου λώρου και δυνατότητα χρησιμοποίησης τους για μεταμόσχευση. Αιματολογικό Διήμερο 1996, Ιωάννινα, σελ. 49.
3. E. Λυδάκη, E. Δημητρίου, B. Δαηηλάτου, Θ. Παπάζογλου, *W.Q.Liu*, M. Καλμαντή. Φωτοδυναμική θεραπεία στην κάθαρση μυελού παιδιών με αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους. In vitro επίδραση στην επιβίωση νεοπλασματικών και φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων. 35^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1997, Αγ. Πελαγία, Κρήτη, σελ. 245.
4. B. Δαηηλάτου, E. Λυδάκη, E. Δημητρίου, Θ. Παπάζογλου, M. Καλμαντή. Φωτοακτινοβόληση κυττάρων μυελού παρουσία Μεροκυανίνης 540 από παιδιά με οξείες λευχαιμίες in vitro. Επίδραση ανθρώπινης λευκωματίνης (A. Λ) και Αμφοστίνης (WR-

2721) στην επιβίωση των φυσιολογικών πρόδρομων και προγονικών κυττάρων. 35^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1997, Αγ. Πελαγία, Κρήτη, σελ. 246.

5. B. Δαηλάτου, E. Λυδάκη, E. Δημητρίου, Θ. Παπάζογλου, M. Καλμαντή. Ενίσχυση της MC 540 φωτοδυναμικής θεραπείας με Αμιφοστίνη κατά την ex vivo κάθαρση του μυελού. 36^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1998, Πάφος, Κύπρος, σελ. 137.

6. E. Δημητρίου, E. Μπολωνάκη, E. Στειακάκη, X. Ματσούκα, B. Δαηλάτου, X. Γιαννακοπούλου, M. Καλμαντή. Επίπεδα διαλυτού υποδοχέα τρανσφερίνης (sTfR) σε παιδιά με αναιμία. 36^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1998, Πάφος, Κύπρος, σελ. 140.

7. E. Δημητρίου, E. Στειακάκη, E.A. Μαρκάκη, B. Δαηλάτου, E. Μπολωνάκη, Σ. Στεφανάκη, X. Γιαννακοπούλου, X. Ματσούκα, M. Καλμαντή. Επίπεδα διαλυτού υποδοχέα τρανσφερίνης (sTfR) σε παιδιά με αναιμία. 9^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 1998, Ηράκλειο Κρήτης, σελ. 274.

8. E. Δημητρίου, E. Στειακάκη, E.A. Μαρκάκη, E. Μπολωνάκη, B. Δαηλάτου, X. Ματσούκα, X. Γιαννακοπούλου, M. Καλμαντή. Επίπεδα διαλυτού υποδοχέα τρανσφερίνης (sTfR) και sTfR/log φερριτίνης (δείκτης sTfR-F) σε αναιμίες της παιδικής ηλικίας. 37^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 1999, Θεσσαλονίκη, σελ. 29.

9. M. Καλμαντή, B. Δαηλάτου. Θειόλες-Αμιφοστίνη. Πειραματικά δεδομένα. Στρογγυλό Τραπέζι: Νεότερες εξελίξεις στην αντιμετώπιση των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων. Θεραπευτικά πρωτόκολλα Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας. Ημερίδα για τα Μυελοδυσπλαστικά Σύνδρομα και Σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας 1999, Αθήνα.

10. E. Δημητρίου, B. Δαηλάτου, Γ. Μαρτιμιανάκη, E. Στειακάκη, E. Μπολωνάκη, M. Καλμαντή. Η Αμιφοστίνη (WR-2721) ως διαφοροποιητικός παράγοντας σε καλλιέργειες αίματος ομφαλίου λώρου και μυελού παιδιών με κακοήθη και μη αιματολογικά νοσήματα. 10^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο 1999, Ρόδος, σελ. 199-200.

11. A. Σχοινάκη, B. Δαηλάτου, Γ. Ζαμπετάκης, Θ. Τσεκουρά, Σ. Στεφανάκη, A. Τσιλιμιγκάκη. Δηλητηριάσεις στα παιδιά. 38^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο 2000, Κως, σελ. 256.

12. B. Δαηλάτου, E. Αποστόλου, Σ. Μάρακα, Σ. Στεφανάκη, A. Σχοινάκη, Θ. Τσεκουρά, A. Τσιλιμιγκάκη. Κληρονομική έλλειψη του παράγοντα C4 του συμπληρώματος. 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο 2000, Ρέθυμνο, σελ. 244.

B) ΞΕΝΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. *E. Lydaki, H. Dimitriou, Th. Papazoglou, V. Danilatou, M. Kalmanti.*

Enhancement of Merocyanine 540 phototherapy of neoplastic cells by human albumin. Implications for bone marrow purging.

a) International Society of Pediatric Oncology (SIOP) XXIXth Meeting : Instabul Turkey 1997; 29(5):395, P-39.

b) XIVth Meeting Int Soc Haem, 1997, Stockholm, Sweden, Abstracts:93,P-139.

2. *V. Danilatou, E. Lydaki, H. Dimitriou, M.Kalmanti.* Ex vivo purging using MC 540 photoirradiation therapy enhanced by Amifostine (WR-2721).

a). 24th Ann Meeting European Group for BMT, Courmayeur, Italy, Bone Marrow Transplantation 1998; 21(1): 32, S9.

b). 4th Congress of European Haematology Association, Barcelona, Haematologica 1999; 84: 211.

c). ECCO, Vienna, EJC 1999; 35 (supp4): S113.

3. *E. Lydaki, V. Danilatou, H. Dimitriou, Th. Papazoglou, M. Kalmanti.* Ex vivo purging using MC 540 mediated photoirradiation enhanced by human albumin or Amifostine.

4th Int Symp Predict Onc&Therap, Cancer Detection and Prevention: 1998; 22 (suppl 1):631, S237-8, 1998.

4. *H. Dimitriou, V. Danilatou, E. Stiakaki, G. Martimianaki, E. Bolonaki, M. Kalmanti.* Amifostine (WR-2721) as differentiating agent, in cultures of cord blood and bone marrow from children with malignant and other hematological diseases.

EBMT Working Party on Pediatric Diseases Third Meeting. Instabul, Turkey 2000: 46.

5. *V. Danilatou, E. Lydaki, H. Dimitriou, Th. Papazoglou, M. Kalmanti.* Amifostine enhances the antileukemic action of Merocyanine 540 during ex vivo bone marrow purging with Laser phototherapy.

EHA. Frankfurt, Germany 2001.

6. *V. Danilatou, E. Lydaki, H. Dimitriou, Th. Papazoglou, M. Kalmanti.* Cytoprotection of normal bone marrow and progenitor cells by Amifostine, during MC 540 phototreatment in pediatric malignancies.

EHA. Frankfurt, Germany 2001.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ (ABBREVIATIONS)

AMMO: Αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών
ASTA-Z-7557: Μαφoσφαμίδη
ATP: Adenosine triphosphate
BFU-E: Burst forming unit-erythroid
BPD: Benzoporphyrin derivatives, παράγωγα βενζοπορφυρίνης
BSO: DL-Βουθειονίνη-S,R- σουλφοξιμίνη
BNP-7787: Dimesna
CR1: 1η πλήρη ύφεση
CFU-L: Colony forming unit-leukemia
CFU-GM: Colony forming unit- granulocyte/macrophage
CFU-C: Colony forming unit-cells
CFU-E: Colony forming unit-erythroid
CFU-Meg: Colony forming unit-megacaryocyte
CFU-S: Colony forming unit-spleen
CFU-F: Colony forming unit-fibroblast
CFU-GEMM: Colony forming unit cell-granulocyte/ erythroid/ megacaryocyte/
macrophage
CIK: Cytokine-induced killer cell
CMV: Cytomegalovirus
CD: Cluster differentiation
DBP: Dibutyl phtalate
DDTC: Disodium diethyl-dithio-carbamate
DNA: Deoxyribonucleic acid
DFS: disease free survival
ET-18-OCH3: Εδελφοσίνη
FACS: Fluorescence activated cell sorting
FDA: Food & Drug Association , Αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων
GvHD: Graft versus host disease, αντίδραση μοσχεύματος κατά ξενιστή
GSH: Γλουταθειόνη, ανηγμένη μορφή
GSSG: Γλουταθειόνη, οξειδωμένη μορφή
G-CSF: Granulocyte- colony stimulating factor
HLA: Human Leucocyte Antigen
4-HC: 4-hydroxy-cyclophosphamide
HPD: Hematoporphyrin derivatives, παράγωγα αιματοπορφυρίνης
HSV: Herpes simplex virus
HTLV: Human T-cell leukemia virus
HGPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
Ig: Immunoglobulin, Ανοσοσφαιρίνη
IL: Ιντερλευκίνη
ICRF-187: Dexrazoxane
IFN: Interferon

LAK: Lymphokine activated killer cell

Laser: Light amplification by stimulated emission of radiation

LDL: Low-density-lipoprotein

LDH: Lactic dehydrogenase

Log: Λογάριθμος

LTC-IC: Long term culture-initiating cells

LFS: leukemia free survival

MACS: Magnetic activated cell sorting

MDR: Multiple drug resistance

MA: Μονοκλωνικά αντισώματα

ΜΑΣ: Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο

MHC: Major histocompatibility complex

MIP-1a: Macrophage inhibitory protein-1a

ΜΜΟ: Μεταμόσχευση μυελού των οστών

MC 540: Merocyanine 540

Mesna: 2-mercapto-ethane sulphonate sodium

Mg+ ΑΤΡαση: ΑΤΡαση μαγνησίου

MIF: Macrophage inhibition factor

NHL: Non-Hodgkin Lymphoma

NK: Natural killer

Na+ -K+ ΑΤΡαση: ΑΤΡ αση νατρίου-καλίου

NM: Nitrogen mustard

NSCLC: Non-small cell lung cancer cell

ΟΑΛ: Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία

ΟΑ: Ολιγονουκεοτίδια

ΟΜΑ: Οξεία μυελογενής λευχαιμία

OS: Overall survival, συνολική επιβίωση

Ph+: κύτταρα θετικά για το χρωμόσωμα Philadelphia

PCR: polymerase chain reaction

PNA: peanut agglutinin

PFS: progression free survival

RCA: Ricin A

RNA: Ribonucleic acid

Rh-123: Rhodamine 123

SBA: soybean agglutinin

SE: Standard error, σταθερό σφάλμα

STS: Sodium thiosulphate

TGF : Transforming growth factor

TCR: T-cell receptor

TNF: Tumor necrosis factor

VP-16: Ετοποσίδη

ΦΔΘ: Φωτοδυναμική θεραπεία

ΧΜΑ: Χρόνια μυελογενής λευχαιμία

WR-2721: Αμιφοστίνη, προφάρμακο

WR-1065: Αμιφοστίνη, δραστικός μεταβολίτης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κάθαρση (purging) του μυελού των οστών κατά την αυτόλογη μεταμόσχευση, σε πολλές περιπτώσεις βελτιώνει την επιβίωση ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες ή συμπαγείς όγκους, καθώς μειώνει την πιθανότητα υποτροπών από υπολειμματικά νεοπλασματικά κύτταρα στο μόσχευμα. Άλλοτε όμως έχει κατηγορηθεί για καθυστέρηση στην εγκατάσταση του μυελικού μοσχεύματος ή ακόμη και αποτυχία της αιμοποιητικής αποκατάστασης του ασθενούς μετά την μεταμόσχευση. Η φωτοδυναμική θεραπεία, δηλαδή η χρήση φωτοευαισθητοποιού χρωστικής σε συνδυασμό με φως, έχει χρησιμοποιηθεί την τελευταία εικοσαετία ως μέθοδος κάθαρσης, αλλά η μονοχρωματική ακτινοβολία (Laser) έχει μελετηθεί σχετικά πρόσφατα και περιορισμένα. Η μέθοδος παρουσιάζει σχετική εκλεκτικότητα για τα κακοήθη κύτταρα, αλλά η ανάγκη για προστασία των φυσιολογικών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων παραμένει.

Πρόσφατα στη διδακτορική διατριβή της παιδίατρου αιματολόγου/ογκολόγου Ε. Λυδάκη μελετήθηκε η ανθρώπινη λευκωματίνη ως κυτταροπροστατευτική ουσία των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων. Διαπιστώθηκε όμως ότι η ανθρώπινη λευκωματίνη προστατεύει τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα λευχαιμικά κύτταρα από τη βλαπτική επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας, καθιστώντας την ουσία αυτή ακατάλληλη για χρήση στην κάθαρση του μυελού.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αποτέλεσαν το έναυσμα για αξιολόγηση της επίδρασης της Αμιφοστίνης, (μιας κυτταροπροστατευτικής ουσίας που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία), στη φωτοδυναμική θεραπεία με Μεροκυανίνη 540 και μονοχρωματική ακτινοβολία (Laser) σε κύτταρα λευχαιμικής σειράς, κακοήθη κύτταρα μυελού και περιφερικού αίματος από παιδιά με οξείες λευχαιμίες και νευροβλάστωμα και σε φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση καθώς και από αντίστοιχης ηλικίας και φύλου φυσιολογικούς μάρτυρες.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιστικών Καλλιιεργειών της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας/Ογκολογίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου σε συνεργασία με το Τμήμα Laser και Εφαρμογών του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας.

Στην ολοκλήρωση της έρευνας αυτής συμμετείχαν πολλοί συνεργάτες, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά: Τον κ. Θεόδωρο Παπάζογλου φυσικό, για την πολύτιμη συνεισφορά του σε ότι αφορά τα Lasers και τους Γιώργο Φιλιππίδη και Γιάννη Ζαχαράκη, φυσικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές, για την συνέπεια και φιλότιμη προσφορά τους στο στάδιο της φωτοακτινοβόλησης. Τον Καθηγητή Φυσικής κ. Κωνσταντίνο Φωτάκη, διευθυντή

του Τμήματος Laser και Εφαρμογών του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας και μέλους της Τριμελούς Επιτροπής της διατριβής μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Την κ. Ευαγγελία Λυδάκη παιδίατρο αιματολόγο-ογκολόγο, για την ανεκτίμητη καθοδήγηση της, ιδιαίτερα στα πρώτα δύσκολα βήματα και τις πολύτιμες συμβουλές της, ως επιστήμονας αλλά και ως φίλη. Την κ. Ελένη Δημητρίου, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας Ογκολογίας, επιστημονική υπεύθυνη του Εργαστηρίου Ιστικών Καλλιιεργειών της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας-Ογκολογίας του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και μέλους της Τριμελούς Επιτροπής της διατριβής μου, για την συμπαράστασή της και την σημαντική βοήθεια που μου πρόσφερε στις δύσκολες στιγμές. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κ. Ανδρονίκη Φασουλάκη, παρασκευάστρια, για τη συνεπή και φιλότιμη συμμετοχή της και την ιατρό-ερευνήτρια Χρυσούλα Περδικιογιάννη για την επίσης ανεκτίμητη προσφορά της σε στιγμές αδυναμίας. Ευχαριστώ και τον αγαπητό φίλο Σωτήρη Ιωαννίδη, μαθηματικό και μεταπτυχιακό φοιτητή, για την συνεισφορά του ιδιαίτερα σε κάποιες δύσκολες και ατελείωτες ώρες μπροστά στον υπολογιστή και την ηθική του συμπαράσταση στις απογοητεύσεις μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αδελφό μου Διονύση Δανηλάτο, πολιτικό μηχανικό, για την προθυμία του και την πολύτιμη βοήθεια του σε ότι αφορά τον υπολογιστή και θα ήθελα να αφιερώσω το έργο αυτό στην οικογένειά μου που πάντα με στηρίζει με αγάπη και υπομονή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά την Καθηγήτρια Παιδιατρικής και Διευθύντρια της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας/Ογκολογίας κ. Μαρία Καλμαντή, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και μου ανέθεσε τη μελέτη αυτή, κατευθύνοντας με οξυδέρκεια τον σχεδιασμό της. Ο δυναμισμός, η διορατικότητα και εμπειρία με την οποία σχεδίασε αυτό το ερευνητικό έργο, η ηθική και υλική υποστήριξη που μου πρόσφερε και το ενδιαφέρον της, ήταν για μένα μία πολύτιμη εμπειρία μέσα από την οποία αποκόμισα σημαντικές γνώσεις.

Τελειώνοντας, ως επίλογο αισθάνομαι την βαθιά ανάγκη να μιλήσω για τα παιδιά που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη. Για τα παιδιά αυτά, που αναγκάστηκαν να ωριμάσουν νωρίτερα από τα αντίστοιχα της ηλικίας τους, καθώς βρέθηκαν ξαφνικά αντιμέτωπα με το θάνατο. Στην μάχη που δίνουν εύχομαι να προσφέρω μία μικρή κονταριά. Ιδιαίτερα οι γονείς τους, βιώνουν αγωνίες και πόνο από τους πιο βαθείς της ανθρώπινης ψυχής. Συμπολεμιστές, γονείς και παιδιά, με μοναδικό όπλο την Υπομονή και την Ελπίδα. Τους ευχαριστώ θερμά και εύχομαι η μελέτη αυτή να αποτελέσει έστω και μία ελάχιστη συμβολή μελλοντικά στη θεραπεία κατά του καρκίνου στα παιδιά.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Η μεταμόσχευση μυελού των οστών (MMO) και η θεραπεία με επανέγχυση περιφερικών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων αποτελούν εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για πολλές αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους [1-4]. Η αλλογενής MMO αποτελεί θεραπεία εκλογής και έχει βελτιώσει την επιβίωση από λευχαιμίες όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) στην 1^η πλήρη ύφεση (CR1) και άλλες κακοήθειες. Δυστυχώς, μόνο το ένα τρίτο των ασθενών αυτών έχουν έναν HLA-συμβατό δότη ή την κατάλληλη ηλικία (κάτω των 45 ετών). Επίσης, η αλλογενής MMO έχει σοβαρές και δυνητικά θανατηφόρες επιπλοκές, όπως η αντίδραση μοσχεύματος κατά του ξενιστή (graft versus host disease, GvHD), η βλάβη οργάνων και οι ιογενείς λοιμώξεις [1, 5-8]. Η αυτόλογη MMO (AMMO) ξεπερνά το πρόβλημα εύρεσης συμβατού δότη, που είναι χρονοβόρο και έχει υψηλό κόστος, ενώ επίσης συμπεριλαμβάνει και μεγαλύτερους ασθενείς (έως 65 ετών) και είναι πιο καλά ανεκτή με μικρότερη θνησιμότητα [7, 9, 10]. Το κύριο πρόβλημα με την AMMO είναι ο υψηλός ρυθμός υποτροπών. Κυρίως ενοχοποιείται η έλλειψη της δράσης του μοσχεύματος έναντι του όγκου (graft versus tumor effect). Έχει παρατηρηθεί ότι ο ρυθμός υποτροπών είναι σημαντικά υψηλότερος σε μεταμόσχευση μυελού από μονοωογενή δίδυμα ή κεκαθαμένων από T- κύτταρα (T-cell depleted) μοσχευμάτων σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Επίσης έχει παρατηρηθεί μικρότερος αριθμός υποτροπών σε ασθενείς που έλαβαν αλλογενή μοσχεύματα και παρουσίασαν αντίδραση μοσχεύματος κατά ξενιστή [11-14]. Δύο είναι οι πιθανές πηγές υπεύθυνες για την υποτροπή μετά από

ΑΜΜΟ: α) κακοήθη κλωνογονικά κύτταρα που επανεγχύνονται με το μόσχευμα, β) ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος στον ξενιστή λόγω ανεπαρκούς εκρίζωσης της νόσου με το προπαρασκευαστικό σχήμα θεραπείας. Είναι εξαιρετικά δύσκολο να εκτιμηθεί η πηγή της υποτροπής με τις συνήθεις μεθόδους, για το λόγο αυτό πολλές προσπάθειες έχουν γίνει τόσο για *in vivo*, όσο και για *ex vivo* κάθαρση του μυελού από τα κακοήθη κύτταρα.

1.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΠΟΜΕΝΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟ ΜΟΣΧΕΥΜΑ

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ανίχνευσης των κακοήθων κυττάρων στο μόσχευμα [15, 16]. Η ιστολογική εξέταση και η κυτταρομετρία ροής είναι χρήσιμες για διήθηση μεγαλύτερη του 1 έως 5 % των κυττάρων. Η υβριδοποίηση αποτυπώματος Southern (Southern blot hybridization) έχει το πλεονέκτημα ότι απαιτεί μικρό αριθμό κυττάρων (περίπου 10^6) αλλά μπορεί να ανιχνεύσει μόνο 1 στα 100 κύτταρα. Έχει εφαρμοστεί στην γονοτυπική αναγνώριση των T- και B-κυτταρικών λεμφωμάτων που δεν εκφράζουν επιφανειακή ή κυτταρική ανοσοσφαιρίνη (Ig). Σε μία μελέτη 104 ασθενών με μη-Hodgkin λέμφωμα (NHL), ανιχνεύτηκε η παρουσία κυκλοφορούντων κυττάρων λεμφώματος στο περιφερικό αίμα. Η επίπτωση των θετικών αποτελεσμάτων κατά την διάγνωση ήταν 34% για τα χαμηλής κακοήθειας λεμφώματα και μόνο 8% για τα ενδιάμεσης κακοήθειας, ενώ ήταν υψηλότερη (48%) κατά την υποτροπή. Παραδόξως, βρέθηκαν DNA αναδιατάξεις σε περίπου 10% των ασθενών κλινικά ελεύθερων νόσου και αυτή η ανίχνευση παρουσίαζε φτωχή συσχέτιση με επακόλουθες υποτροπές. Δεν είναι γνωστό εάν αυτό οφείλεται στον πολύ μικρό αριθμό καρκινικών κυττάρων ή στην ανάπτυξη κάποιου βαθμού ανοσολογικού ελέγχου από τον ξενιστή [17]. Η υβριδοποίηση in situ με φθορισμό (fluorescence in situ hybridization, FISH) έχει περίπου 1% ευαισθησία, είναι γρήγορη, σχετικά απλή ποσοτική μέθοδος και μπορεί να ανιχνεύσει κύτταρα σε μεσόφαση (μη-διαιρούμενα κύτταρα) [15, 18]. Σε μία πρόσφατη μελέτη από 23 ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα ανιχνεύτηκε τρισωμία 9 σε 81.8% των μοσχευμάτων περιφερικού αίματος και συσχετίστηκε με την υποτροπή μετά την μεταμόσχευση [19]. Σε μία άλλη μελέτη, 21 ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία

μεταμοσχεύτηκαν με αυτόλογα προγονικά κύτταρα περιφερικού αίματος. Βρέθηκε μία άμεση συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των κυττάρων θετικών για το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph+), στο μόσχευμα πριν και στον μυελό μετά την μεταμόσχευση, ενδεικτικό της επανέγχυσης κακοήθων κυττάρων υπεύθυνων για την υποτροπή [20]. Η μέθοδος *fluorescence-activated cell sorter (FACS)* βασίζεται στη χρήση αντι-ιδιοτυπικών αντισωμάτων που ανιχνεύουν φαινοτυπικά διαφορετικά καρκινικά κύτταρα, αλλά έχει μικρή ευαισθησία επειδή ένα μικρό ποσοστό φυσιολογικών λεμφοκυττάρων εκφράζει τους συγκεκριμένους ιδιότυπους. Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την ανίχνευση κυττάρων λεμφώματος και Β-κυτταρικής λευχαιμίας [15]. Οι *ανοσοϊστοχημικές τεχνικές* χρησιμοποιούν επίσης αντισώματα έναντι ειδικών επιθηλιακών αντιγόνων κυτταροσκελετού και μεμβράνης και εφαρμόζονται στην ανίχνευση μικρομεταστάσεων σε ασθενείς με καρκίνους επιθηλιακής προέλευσης [21, 22]. Οι *λευχαιμικές καλλιέργειες (in vitro clonogenic assays, CFU-L)* αποτελούν μία άλλη μέθοδο ανίχνευσης της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου. Οι αποικίες από λευχαιμικά βλαστικά κύτταρα έχουν τον ίδιο φαινότυπο με τα κύτταρα του περιφερικού αίματος και του μυελού των ασθενών [23]. Φαίνεται ότι τα λευχαιμικά κύτταρα αποτελούν ένα ετερογενή πληθυσμό με ένα πολύ μικρό ποσοστό κυττάρων που έχουν υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό και που μπορεί να είναι υπεύθυνα για την διατήρηση των βλαστικών κυττάρων in vivo [24, 25]. Η ετερογένεια των λευχαιμικών κυττάρων αντανακλά σε διαφορετικές απαιτήσεις σε καλλιεργητικά υλικά και μπορεί να ερμηνευτεί από διαφορές στην ωρίμανση των λευχαιμικών κυττάρων ή στο επίπεδο διαφοροποίησης [26, 27]. Η ανάπτυξη των λευχαιμικών κλώνων γίνεται σύμφωνα με ένα μοντέλο ανάλογο με αυτό της φυσιολογικής αιμοποίησης. Έτσι υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ των αυτοανανεούμενων και διαφοροποιούμενων κυττάρων [28]. Η παρουσία αυτών των κλωνογονικών λευχαιμικών κυττάρων στο μόσχευμα μπορεί να σχετίζεται με την υποτροπή μετά την μεταμόσχευση. Παρόλο που είναι δύσκολες τεχνικά, οι λευχαιμικές καλλιέργειες παρέχουν την δυνατότητα να μελετηθούν η ικανότητα πολλαπλασιασμού, οι απαιτήσεις σε αυξητικούς παράγοντες και η ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στα φάρμακα [24, 29, 30]. Οι Miller και συν. συσχέτισαν την ευαισθησία των υπολειπόμενων CFU-L στην 4-υδροξυ-κυκλοφωσφαμίδη (4-HC) in vitro με την κλινική απάντηση και την συχνότητα υποτροπής [29]. Υγρές καλλιέργειες για την αναγνώριση

υπολειμματικής νόσου έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλους τύπους καρκίνου, π.χ. του μαστού. Η μέθοδος φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από τις ανοσοϊστοχημικές τεχνικές, εντούτοις η αναγνώριση της ικανότητας αυτών των κυττάρων για μετάσταση, θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω [31].

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) έχει την ικανότητα να φτιάχνει πολλαπλά αντίγραφα αλληλουχιών DNA [32]. Έχει βελτιώσει την ευαισθησία ανίχνευσης σε 1 στα 10^6 κύτταρα [18]. Εντούτοις είναι τεχνικά δύσκολη, χρονοβόρα, με φτωχά ποσοτικά και πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Δεν είναι γνωστό, εάν τα υπολειμματικά κακόηθη κύτταρα που ανιχνεύονται με PCR, είναι κλωνογονικά και υπεύθυνα για την υποτροπή [32]. Οι Gribben και συν. έδειξαν ότι η παρουσία θετικής PCR στο μόσχευμα μετά από ανοσολογική κάθαρση σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό υποτροπών και αντίθετα αρνητική PCR, με μεγαλύτερη επιβίωση ελεύθερης νόσου μετά από AMMO [36, 37]. Καθώς άλλες μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν μία τέτοια συσχέτιση, περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για να βελτιωθεί η ανίχνευση και να εκτιμηθεί η κλινική σημασία της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου.

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι περισσότερες λευχαιμίες δεν έχουν ένα ειδικό δείκτη, οι τεχνικές γονιδιακής σήμανσης (gene-marking techniques) χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της πηγής της υποτροπής. Με έκθεση του μυελού πριν την έγχυση σε ένα ρετροϊό -μεταφορέα του ειδικού γονιδίου δείκτη, δείχτηκε ότι η παρουσία υπολειμματικών κυττάρων στο μόσχευμα μπορεί να ευθύνεται για την υποτροπή καθώς το γονίδιο δείκτης ανιχνεύτηκε κατά την υποτροπή [38-41]. Οι Kurh και συν. μεταβίβασαν ένα δείκτη στα λευχαιμικά κύτταρα μέσω ενός ρετροϊού ώστε να ανιχνεύσουν και να μετρήσουν με ανταγωνιστική φωλιασμένη PCR (competitive nested PCR) τα υπολειμματικά κύτταρα σε μοντέλα μεταμόσχευσης μυελού σε ποντίκια. Έγινε με επιτυχία ανίχνευση 1 στα 10^5 κύτταρα in vivo [42]. Αυτές οι παρατηρήσεις αποτελούν μία ισχυρή ένδειξη ότι η εκρίζωση των κακόηθων κυττάρων από το μόσχευμα μπορεί να έχει μέγιστη κλινική σημασία.

1.2 ΚΑΘΑΡΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Ο ρόλος της κάθαρσης έχει αμφισβητηθεί κυρίως λόγω της έλλειψης μεγάλων προοπτικών τυχαιοποιημένων μελετών. Το κύριο πρόβλημα είναι ο μεγάλος αριθμός ασθενών που απαιτείται για να αποκτηθούν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Επίσης, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι αδύνατον με τις υπάρχουσες μεθόδους να διακριθούν ποιές από τις περιπτώσεις των υποτροπών οφείλονται σε υπολειπόμενη νόσο του ξενιστή και ποιες σε υπολειπόμενη νόσο του μοσχεύματος. Η βιβλιογραφία σχετικά με την κάθαρση του μυελού είναι τεράστια και ο ρόλος της έχει συζητηθεί εκτενώς σε πολλές ανασκοπήσεις [43-49]. Ένα τυπικό μόσχευμα μυελού περιέχει 10^{10} - 10^{11} εμπύρηνια κύτταρα. Οι κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης υπολειμματικών νεοπλασματικών κυττάρων έχουν ως όριο ανίχνευσης ένα στα 100 κύτταρα, γεγονός που σημαίνει ότι ένας μυελός που χαρακτηρίζεται σε ύφεση μπορεί να περιέχει 10^8 έως 10^9 νεοπλασματικά κύτταρα [50].

Μερικοί ερευνητές ισχυρίζονται ότι η κάθαρση είναι μη αναγκαία, καθώς δεν βελτιώνει την επιβίωση και καθυστερεί την αιμοποιητική αποκατάσταση μετά την μεταμόσχευση [51, 52]. Οι Williams και συν. σε μία αναδρομική μελέτη ελέγχου ανά περίπτωση (case-matched) χρησιμοποίησαν δεδομένα από το Ευρωπαϊκό Αρχείο Λεμφώματος-Μεταμοσχεύσεων Μυελού (EBMT Lymphoma Registry). Μελετήθηκαν 270 ασθενείς με μη Hodgkin λέμφωμα (NHL) που έλαβαν καθαρμένο αυτόλογο μόσχευμα, ενώ 224 ασθενείς έλαβαν μη καθαρμένο μόσχευμα. Δεν βρέθηκε καμία διαφορά στον χρόνο εγκατάστασης, στην απάντηση στην AMMO και στη θνησιμότητα από επιπλοκές της μεταμόσχευσης μεταξύ των δύο ομάδων. Η συνολική επιβίωση (overall survival, OS), η επιβίωση ελεύθερη προόδου της νόσου (progression free survival, PFS) και ο ρυθμός υποτροπών βρέθηκε παρόμοιος μεταξύ των δύο ομάδων [53]. Είναι ενδιαφέρον ότι βρέθηκε μία σημαντική βελτίωση της συνολικής επιβίωσης για τους ασθενείς με χαμηλής κακοήθειας λέμφωμα που έλαβαν καθαρμένο μόσχευμα ($p=0.001$). Οι Chao και συν. σε μία μελέτη 50 ασθενών με οξεία μη λεμφοβλαστική λευχαιμία, αναφέρουν πενταετή επιβίωση ελεύθερη νόσου (disease free survival, DFS) 32% για την ομάδα που έλαβε μη καθαρμένο αυτόλογο μόσχευμα ($n=20$ ασθενείς) έναντι 57% για την ομάδα με καθαρμένο μυελό ($n=30$ ασθενείς, $p=0.36$). Ο ρυθμός υποτροπής ήταν αντίστοιχα 62% και 28% ($p=0.06$) [54]. Παρατηρήθηκε μία βελτίωση στην DFS και τον ρυθμό υποτροπών αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά, πιθανώς

επειδή η σύγκριση έγινε με ιστορική ομάδα ελέγχου και λόγω των διαφορετικών χρόνων παρακολούθησης. Οι Gorin και συν. αναφέρουν ότι η AMMO έχει καλύτερη έκβαση όταν πραγματοποιείται εντός 150 ημερών από την επίτευξη της πρώτης πλήρους ύφεσης και πρότειναν ότι η κάθαρση με μαφוסφαμίδη μειώνει το ποσοστό υποτροπών σε αυτές τις περιπτώσεις [55]. Σε μία άλλη μελέτη με 263 ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ) σε CR1 που υποβλήθηκαν σε AMMO, η 4ετής επιβίωση ελεύθερη λευχαιμίας (leukemia free survival, LFS) ήταν σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα όπου έγινε κάθαρση του μυελού με μαφוסφαμίδη (63% vs. 34%, $p=0.05$) και η πιθανότητα υποτροπών χαμηλότερη (23% vs. 55%, $p=0.005$). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν ευνοϊκότερα για τους ασθενείς που μεταμοσχεύτηκαν εντός 6μήνου από την επίτευξη της CR1. Παρόλα αυτά, ο χρόνος εγκατάστασης του μοσχεύματος ήταν παρατεταμένος και ο αριθμός των λοιμώξεων αυξημένος στην ομάδα με κάθαρση του μυελού [56].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι Gribben και συν. σε μία μελέτη 114 ασθενών με NHL αναφέρουν ότι η ανίχνευση υπολειμματικής νόσου στο μόσχευμα είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας στην πρόγνωση της υποτροπής [36]. Γενικά θεωρείται ότι υποτροπή σε προηγούμενη θέση του όγκου οφείλεται σε υπολειμματική νόσο στον οργανισμό, ενώ παραμένοντα νεοπλασματικά κύτταρα στο μόσχευμα τείνουν να υποτροπιάζουν σε νέες θέσεις. Αυτό βεβαίως δεν αποτελεί κανόνα, καθώς θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το μικροπεριβάλλον και οι συνθήκες της εγκατάστασης (homing) μπορεί να ευθύνονται για την εμφάνιση υποτροπών σε προηγούμενες θέσεις. Σε μία πρόσφατη αναφορά περιστατικού μη Hodgkin λεμφώματος, έχει προταθεί, ότι η εμφάνιση πνευμονικής υποτροπής μετά από AMMO μπορεί να οφείλεται σε επανέγχυση κακοήθων κυττάρων [57]. Αντίθετα σε μία άλλη αναφορά περιστατικού ασθενούς με Ph (+) ΟΛΛ που μεταμοσχεύτηκε στη δεύτερη ύφεση με αυτόλογο μόσχευμα που περιείχε υπολειμματικά κύτταρα, παρέμεινε κλινικά σε ύφεση για περισσότερο από 48 μήνες. Παρατηρήθηκε μάλιστα μία παράδοξη αρνητικοποίηση των κυττάρων του μυελού για την μετάθεση bcr/abl στην PCR ανάλυση, 30 μήνες μετά [58]. Μία πιθανή εξήγηση, θα μπορούσε να είναι η τοξικότητα του DMSO ή της κρυοκατάψυξης στα κακοήθη κύτταρα ή ακόμη και η επαγωγή της ανοσολογικής επιτήρησης της κακοήθειας από τον οργανισμό.

1.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΘΑΡΣΗΣ: ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ

1.3.1. Φυσικές μέθοδοι

Οι φυσικές μέθοδοι είναι απλές, με σχετικά χαμηλό κόστος, αλλά καταστρέφουν μόνο ένα μικρό ποσοστό κακοήθων κυττάρων. Για το λόγο αυτό, συνήθως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους. Ο διαχωρισμός με κλίση πυκνότητας (density gradient separation) βασίζεται στις διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ νεοπλασματικών και φυσιολογικών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε για να μειώσει τον αριθμό των κυττάρων των προϊόντων λευκαφαίρεσης επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα μείωση κατά 1 έως 2 log των νεοπλασματικών κυττάρων [59]. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους κάθαρσης π.χ. ανοσομαγνητικό διαχωρισμό ώστε να μειώσει το κόστος τους και να ενισχύσει την αποτελεσματικότητά τους [59, 60]. Ο διαχωρισμός επίπλευσης αντιθέτου ροής (counterflow elutriation) βασίζεται επίσης σε διαφορές μεγέθους και πυκνότητας των κυττάρων και παρουσιάζει εξαιρετική επιβίωση των κυττάρων που σχηματίζουν αποικίες (colony-forming cells) [61]. Οι λεκτίνες, όπως η συγκολλητίνη σόγιας (soybean agglutinin, SBA) και φυστικίου (peanut agglutinin, PNA), συνδέονται με ώριμα κύτταρα της ερυθράς, μυελικής και λεμφικής σειράς καθώς και με μερικά κακοήθη κύτταρα αλλά όχι με τα προγονικά κύτταρα της αιμοποίησης. Έχουν χρησιμοποιηθεί για εμπλουτισμό των CD34+ κυττάρων, σε προϊόντα μοσχεύματος μυελού [62]. Σύνδεση της λεκτίνης PNA σε μία τοξίνη την ριτσίνη (ricin A chain, RCA) παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι κυττάρων του μυελώματος [63].

Η κάθαρση με υπερθερμία βασίζεται στην σχετικά μεγαλύτερη ευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων στην θερμότητα σε σχέση με τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα [64, 65]. Τα κύτταρα που βρίσκονται μέσα στον κυτταρικό κύκλο είναι πιο ευαίσθητα και υφίστανται μορφολογικές αλλαγές της δομής τους, όπως αδρανοποίηση ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τον θάνατο των νεοπλασματικών κυττάρων κατά την υπερθερμία. Έχει επίσης υποτεθεί ότι η έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών (heat shock protein) παίζει κάποιο ρόλο [65]. Η γολαρατίδη, ένας αναστολέας της S φάσης του κυτταρικού κύκλου των φυσιολογικών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με υπερθερμία, με αποτέλεσμα 4 log μείωση των λευχαιμικών κυττάρων και

ταυτόχρονη προστασία κατά 1 log των φυσιολογικών προγονικών κυττάρων (CFU-GM) [66].

1.3.2 Φαρμακολογικές μέθοδοι

Η χημική κάθαρση του μυελού των οστών βασίζεται στην διαφορετική ευαισθησία των κακοήθων και φυσιολογικών προγονικών κυττάρων στα διάφορα φάρμακα. Σκοπός αυτών των μεθόδων είναι να εξαφανίσουν τα υπολειπόμενα νεοπλασματικά κύτταρα, επιτρέποντας παράλληλα ικανοποιητική επιβίωση των φυσιολογικών αιμοποιητικών προβαθμίδων [67]. Τα *παράγωγα κυκλοφωσφαμίδης*, όπως η 4-υδροξυ-κυκλοφωσφαμίδη (4-HC) και η μαφοσφαμίδη (ASTA-Z-7557), είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα, κυρίως στην οξεία μυελογενή λευχαιμία [68-70]. Τα αρχέγονα μητρικά κύτταρα (stem cells) είναι πιο ανθεκτικά στην δράση της 4-HC από τα δεσμευμένα προγονικά. Σε μια κλινική μελέτη φάσης I αποδείχτηκε ότι παρά την αναστολή των CFU-C επιτεύχθηκε ικανοποιητική αιμοποιητική αποκατάσταση [69]. Το περιεχόμενο του μυελού σε CFU-GM, μετά από κάθαρση με 4-HC, σχετίζεται με το χρόνο αιμοποιητικής αποκατάστασης μετά από AMMO [71]. Οι Douay και συν. μελέτησαν την ευαισθησία διαφόρων υποπληθυσμών των αρχέγονων κυττάρων στην μαφοσφαμίδη και βρήκαν ότι η διατήρηση 0-5% των όψιμων CFU-GM είναι ικανοποιητική και ισοδυναμεί με περίπου το ήμισυ του πληθυσμού των αρχέγονων κυττάρων, που είναι απαραίτητα για την μακρόχρονη αιμοποιητική αποκατάσταση [72]. Είναι γνωστό ότι υπάρχει μία ετερογένεια στην ευαισθησία των προγονικών κυττάρων στην μαφοσφαμίδη μεταξύ των ασθενών. Προκειμένου να βελτιωθεί η αντιλευχαιμική δράση με την καλύτερη επιβίωση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων για κάθε ασθενή, χρησιμοποιήθηκε μία εξατομικευμένη δόση [70, 73]. Μερικές μελέτες αναφέρουν καθυστέρηση στην εγκατάσταση του μοσχεύματος μετά από κάθαρση με μαφοσφαμίδη και αυξημένο αριθμό λοιμώξεων [56] ενώ άλλες υποστηρίζουν ότι αυτά οφείλονται εν μέρει στην τοξικότητα του προπαρα-σκευαστικού σχήματος θεραπείας. Η χορήγηση χημειοθεραπευτικών παραγόντων βλάπτει τα αιμοποιητικά κύτταρα και το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, καθιστώντας αυτά τα κύτταρα πιο ευάλωτα στους παράγοντες κάθαρσης, με επακόλουθη καθυστέρηση της εγκατάστασης [72, 74].

Πρόσφατα έχει δειχτεί ότι η χρήση κυτταροκινών όπως ο tumor necrosis factor (TNF- α) και η ιντερλευκίνη 2 (IL-2) μπορεί να προστατεύσουν τα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα από την κυτταροτοξικότητα της 4-HC, χωρίς να επηρεάσουν την αντιλευχαιμική της δράση σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές [75]. Επιπλέον οι ιντερλευκίνες 3 και 6 (IL-3, IL-6) ενισχύουν την αποτελεσματικότητα της ex vivo κάθαρσης με 4-HC επάγοντας την απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) [76].

Η ετοποσίδη (VP-16), ένα ημισυνθετικό παράγωγο της ποδοφυλλοτοξίνης, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί [77] αλλά φαίνεται λιγότερο αποτελεσματική στην εκρίζωση των λευχαιμικών κυττάρων και είναι πιο τοξική για τα φυσιολογικά κύτταρα συγκριτικά με την μαφוסφαμίδη [78]. Ο συνδυασμός VP-16 και μαφוסφαμίδης έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, με 4 log μείωση των λευχαιμικών κυττάρων [79]. Πρόσφατα οι Motta και συν. συνέκριναν την δράση της μουστάρδας (NM) και της ετοποσίδης σε προϊόντα λευκαφαίρεσης με την μαφוסφαμίδη [80]. Επιτεύχθηκε περισσότερο από 5 log θανάτωση λευχαιμικών κυτταρικών σειρών. Παρατήρησαν ότι οι προβαθμίδες της μεγακαρυο-κυτταρικής σειράς είναι πιο ευαίσθητες στην δράση του συνδυασμού NM/VP-16 από την μαφוסφαμίδη, καθιστώντας την τελευταία περισσότερο κατάλληλη και με ευρύτερο θεραπευτικό παράθυρο. Τέλος δεν βρέθηκε καμία διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ μυελού και προϊόντων αφαίρεσης παρά την διαφορετική κινητική και την κατάσταση του κυτταρικού κύκλου μεταξύ των δύο προϊόντων, γεγονός που επιτρέπει την εφαρμογή φαρμακολογικής κάθαρσης και στα προϊόντα αφαίρεσης.

Το dibutyl phthalate (DBP) είναι ένας νέος παράγοντας που επάγει την απόπτωση των λευχαιμικών κυττάρων [81]. Τα αλκυλ-λυσσοφωσφολιπίδια (ET-18-OCH₃, εδελοσίνη) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί [82, 83] χωρίς σημαντική καθυστέρηση στην αιμοποιητική αποκατάσταση [82]. Η κυτταροτοξική τους δράση έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων δεν είναι απολύτως γνωστή, αλλά φαίνεται ότι στόχος είναι η κυτταρική μεμβράνη. Τέλος η ειλατίνη, ένα νέο αλκαλοειδές, είναι αποτελεσματικό έναντι λευχαιμικών κυττάρων [84].

1.3.3 Ανοσολογικές μέθοδοι

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (MA) έχουν χρησιμοποιηθεί στην αναγνώριση των επιφανειακών αντιγόνων των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων και των προγονικών τους προβαθμίδων [85]. Μπορούν επίσης να ανιχνεύσουν με ειδικότητα κύτταρα λευχαιμίας, λεμφώματος και συμπαγών όγκων. Η χρήση τους στην κάθαρση του μυελού βασίζεται στην ειδική έκφραση επιφανειακών αντιγόνων στα κύτταρα του όγκου. Για παράδειγμα, κύτταρα οξείας μυελογενούς λευχαιμίας εκφράζουν μερικά μυελοειδή αντιγόνα, τα οποία εκφράζονται επίσης σε μερικά φυσιολογικά δεσμευμένα κύτταρα της μυελικής σειράς, αλλά όχι στα αρχέγονα κύτταρα [86] επιτρέποντας στα τελευταία να εγκαταστήσουν αιμοποίηση μετά από ανοσολογική κάθαρση του μοσχεύματος.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα δεν είναι κυτταροτοξικά, για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται με συμπλήρωμα [36, 87-95], ανοσοτοξίνες [96-98] ή ανοσομαγνητικά σφαιρίδια [34, 89, 99-103] για να καταστρέψουν τα νεοπλασματικά κύτταρα. Οι Gribben και συν. [36] χρησιμοποίησαν αντι-B1 (αντι-CD20), αντι-B5 και αντι-J5 (αντι-CD10) με συμπλήρωμα και πέτυχαν μείωση κατά 3-6 log σε 114 ασθενείς με μη Hodgkin λέμφωμα, παρότι αναφέρουν αποτελεσματική κάθαρση μόνο στο ήμισυ των ασθενών. Οι Ball και συν. [87], σε μία κλινική μελέτη 30 ασθενών με OML, χρησιμοποίησαν PM-81 (αντι-CD15) και AML-2-23 (αντι-CD14) με συμπλήρωμα. Τα αντισώματα αυτά είναι αποτελεσματικά, σε περισσότερο από το 95% των ασθενών με OML. Αναφέρουν συνολική τριετή επιβίωση 23% και επιβίωση ελεύθερη υποτροπών 18% για τους ασθενείς που μεταμοσχεύτηκαν στην 2^η και 3^η ύφεση. Σε μία άλλη κλινική μελέτη 75 ασθενών με υψηλού κινδύνου OML χρησιμοποιήθηκε μίγμα αντισωμάτων έναντι των B-κύτταρων (CD9, CD10, CD19, CD20) και έναντι των T-κυττάρων (CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8). Παρατηρήθηκε καλύτερη επιβίωση ελεύθερη νόσου και μειωμένος ρυθμός υποτροπών για την ομάδα που υπεβλήθη σε κάθαρση (52 ασθενείς) έναντι της άλλης ομάδας (23 ασθενείς), όταν η μεταμόσχευση έγινε στην 1^η πλήρη ύφεση ($p=0.04$ και $p=0.005$ αντίστοιχα) [88]. Το κύριο πρόβλημα στην ανοσολογική κάθαρση είναι η ετερογένεια των λευχαιμικών κυττάρων [97, 104-106]. Έχει προταθεί ότι επικρατεί κάποιου βαθμού ιεραρχία μεταξύ των λευχαιμικών βλαστών, παρόμοια με αυτή που συμβαίνει στη φυσιολογική αιμοποίηση και που αντανακλά ένα επίπεδο διαφοροποίησης. Υπάρχει ποικιλότητα στην έκφραση των επιφανειακών αντιγόνων, όχι μόνο μεταξύ των ασθενών και των διαφορετικών υποτύπων των κακοηθειών, αλλά και

ενδοατομική ετερογένεια. Αυτή η παρατήρηση αφορά κυρίως ασθενείς με ΟΜΛ. Οι λευχαιμικοί βλάστες μπορεί να χάσουν ενίοτε την φαινοτυπική έκφραση μερικών αντιγόνων, αντιπροσωπεύοντας διάφορα στάδια στο μονοπάτι διαφοροποίησης. Για να αποφευχθεί αυτό το πρόβλημα, οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούν μείγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων [87-90, 92, 93, 99-101, 103] και πολλαπλούς κύκλους θεραπείας.

Επιπρόσθετα, το συμπλήρωμα έχει μερικά μειονεκτήματα, όπως η μη ειδική λύση και η αναποτελεσματικότητα έναντι μερικών νεοπλασματικών κυττάρων [16, 100]. Τα αίτια της αποτυχίας του συμπληρώματος μπορεί να είναι: α) τροποποίηση της δομής μετά την σύνδεση του MA με το επιφανειακό αντιγόνο με επακόλουθο περιορισμό της λύσης του συμπληρώματος, β) χαμηλή έκφραση του αντιγόνου από τα κύτταρα όγκου, γ) ενδογενής αντίσταση των κυττάρων όγκου [100, 107]. Αυτή η αντίσταση μπορεί να οφείλεται στην παρουσία ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος, όπως ο παράγων επιτάχυνσης της διάσπασης του συμπληρώματος (decay-accelerating factor), ο ομόλογος περιοριστικός παράγων (homologous restriction factor) και η πρωτεΐνη συμπαραγόντας της μεμβράνης (membrane cofactor protein) [108].

Η συνδυασμένη χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων με μία τοξίνη, όπως η ριτσίνη, καταστρέφει τα λευχαιμικά κύτταρα με ελάχιστη βλάβη των φυσιολογικών προγονικών κυττάρων [96]. Οι Uckun και συν. σε μία προκλινική μελέτη, μελέτησαν την δράση της ανοσοτοξίνης B43-PAP (pokeweed antiviral protein) έναντι των Β-κυττάρων στη κάθαρση φρέσκων λευχαιμικών κυττάρων από 10 ασθενείς με Β-ΟΛΛ. Επιτεύχθηκε περισσότερο από 99.96% καταστροφή των λευχαιμικών κυττάρων με ικανοποιητική επιβίωση των φυσιολογικών. Η μέθοδος αυτή προτάθηκε όχι μόνο για *ex vivo* αλλά και για *in vivo* κάθαρση [97].

Η χρήση των ανοσομαγνητικών σφαιριδίων έχει αποδειχτεί ανώτερη του συμπληρώματος [100]. Τα ανοσομαγνητικά σφαιρίδια συνδέονται είτε άμεσα με το κύτταρο- στόχο [102] είτε μέσω ενός δεύτερου MA [99, 101, 103] και τα κύτταρα που σχηματίζουν ροζέτες μπορούν να διαχωριστούν κατά την έκθεση του διαλύματος σε μαγνητικό πεδίο. Οι Canals και συν. σε μία κλινική μελέτη 37 παιδιών με ΟΛΛ πρόσφατα αναφέρουν μείωση κατά 2 log για τα Β-ΟΛΛ και μείωση κατά 2.7 log για τα Τ-ΟΛΛ κύτταρα. Παραταύτα, παρατήρησαν μία ποικίλη μη-ειδική κυτταρική απώλεια,

μεταξύ 1.7 και 40.5%. Η επιβίωση για τα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα ήταν 45.4% για τα μονοπύρρηνα κύτταρα, 65% για τα CFU-GM και 58.4% για τα CD34+ κύτταρα. Παρατηρήθηκε μία εκλεκτική απώλεια των πιο ώριμων κυττάρων [103]. Οι Atta και συν. αναφέρουν σε μία άλλη μελέτη με 14 ασθενείς, μείωση κατά 3 log των bcr-abl + ΟΛΛ κυττάρων με ανοσομαγνητική κάθαρση [34]. Η μείωση που επιτυγχάνεται με την ανοσομαγνητική κάθαρση των φρέσκων λευχαιμικών κυττάρων (2 log) είναι πολύ μικρότερη από αυτή που παρατηρείται στις λευχαιμικές κυτταρικές σειρές (5 log) και η διαφορά αυτή μπορεί να εξηγείται από την ετερογένεια και την φαινοτυπική ποικιλότητα των λευχαιμικών βλαστών [101]. Προκειμένου να ενισχυθεί η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε και διπλή κάθαρση με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό και συμπλήρωμα [108]. Η ανοσομαγνητική κάθαρση είναι εύκολη, πιο ειδική, χαμηλού κόστους και έχει το πλεονέκτημα ότι απομακρύνει κύτταρα χωρίς να τα λύει, αποφεύγοντας έτσι την καταστροφική γεινίαση ζώντων φυσιολογικών κυττάρων με νεκρά υπολείμματα και προσφέροντας τη δυνατότητα να μελετηθεί το απομακρυνθέν κυτταρικό διάλυμα.

1.3.4 Ολιγονουκλεοτίδια αντιθέτου σημασίας (antisense oligonucleotides)

Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (ΟΛ) που είναι συμπληρωματικά (antisense) σε ειδικές ανώμαλες αλληλουχίες DNA, έχουν χρησιμοποιηθεί ως παράγοντες κάθαρσης. Το φωσφοροθειοϊκό OL1p53 έχει χρησιμοποιηθεί κατά την ex vivo κάθαρση μυελού από 9 ασθενείς με ΟΜΛ και μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ) [109]. Το p53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο με λειτουργίες όπως η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Η τεχνική αυτή έχει ελάχιστη τοξική δράση στα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα. Ολιγονουκλεοτίδια αντιθέτου σημασίας έχουν παραχθεί έναντι των γονιδίων bcr-abl, c-myb, c-myc και bcl-2. Η μετάθεση Φιλαδέλφεια (Ph, bcr-abl) είναι συχνή στην χρόνια μυελογενή λευχαιμία και έχει αδρανοποιηθεί από ΟΛ [68, 110, 111]. Δυσνητικά προβλήματα με αυτή τη μέθοδο είναι η γρήγορη αποδόμηση των ΟΛ από

ενδογενείς νουκλεάσες και η περιορισμένη ενσωμάτωση στα κύτταρα-στόχους. Η στρεπτολυσίνη-O έχει χρησιμοποιηθεί για τη διευκόλυνση της ενσωμάτωσης των ΟΛ στα κύτταρα [111]. Ένα σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η ετερογένεια έκφρασης του παθολογικού γονιδίου μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα ριβοζύμια αποτελούν μία άλλη μέθοδο σήμανσης του RNA [112, 113]. Διαθέτουν ενζυμική δράση και αδρανοποιούν τον στόχο RNA διασπώντας τον. Οι φορείς-αδενοϊοί βελτίωσαν την αποτελεσματικότητα και εκλεκτικότητα μεταφοράς γονιδίων στα κύτταρα-στόχους [114, 115].

1.3.5 Μακράς διάρκειας καλλιέργειες μυελού

Οι μακράς διάρκειας καλλιέργειες μυελού (long-term bone marrow cultures) εκμεταλλεύονται τις βιολογικές διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών αρχέγονων κυττάρων και των λευχαιμικών βλαστών, ώστε να καταστρέψουν τα υπολειπόμενα νεοπλασματικά κύτταρα. Παρουσία των κυττάρων του στρώματος, τα φυσιολογικά προγονικά κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν εις βάρος των λευχαιμικών. Τα κύτταρα στρώματος (adherent cells) μπορούν να επάγουν και να διατηρήσουν μακροχρόνια αιμοποίηση χωρίς την προσθήκη εξωγενών αυξητικών παραγόντων. Τα κύτταρα μυελού υφίστανται απόπτωση απουσία αυξητικών παραγόντων. Αυτό σημαίνει ότι τα κύτταρα του στρώματος μπορεί να παρέχουν τις απαραίτητες κυτταροκίνες και μόρια προσκόλλησης για την αιμοποίηση. Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα λευχαιμικά κύτταρα δεν μπορούν να επιβιώσουν επειδή χρειάζονται την προσθήκη εξωγενών παραγόντων [116, 117]. Η πρώτη κλινική εφαρμογή καλλιεργείων μακράς διάρκειας αφορούσε 20 ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Οι Eaves και συν. μεταμόσχευσαν επιτυχώς τους ασθενείς αυτούς με αυτομοσχεύματα Ph(-), παρόλο που μερικοί ασθενείς υποτροπίασαν αργότερα [118].

Έχει προταθεί ότι μπορεί να προκύψουν τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα από λευχαιμικά [119]. Εκτεταμένη έρευνα γίνεται ώστε να διευκρινιστεί η βιολογία των φυσιολογικών και λευχαιμικών κυττάρων. Οι Coutinho και συν. μεταμόσχευσαν 9 ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ) με αυτομοσχεύματα μετά από κάθαρση με long-term culture-initiating cells [120]. Η χρήση αρνητικών ρυθμιστών της αιμοποίησης όπως η ανασταλτική πρωτεΐνη των μακροφάγων (macrophage inhibitory

protein-1α, MIP-1α) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει την καταστροφή Ph + κυττάρων ΧΜΛ [121]. Η κατάσταση του κυτταρικού κύκλου των αρχέγονων προγονικών κυττάρων με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό μπορεί να μπλοκαρισθεί από κυτταροκίνες όπως η MIP-1α και TGF-β αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο με τα αντίστοιχα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Η χρήση των αναστολέων της αιμοποίησης (MIP-1α , TGF-β , TNF-α) αποτελεί μία νέα ιδέα στην προστασία των φυσιολογικών αρχέγονων κυττάρων στην κάθαρση του μυελού [122,123].

1.3.6 Επαγωγή της ανοσολογικής ρύθμισης

Έχει παρατηρηθεί ότι ο ρυθμός των υποτροπών είναι μεγαλύτερος μετά από T-κυτταρική αφαίρεση από τα αλλογενή μοσχεύματα μυελού καθώς και μετά από μεταμόσχευση μυελού από μονοωγενή δίδυμα, σε σχέση με αλλογενή μεταμόσχευση στην οποία εμφανίζεται αντίδραση μοσχεύματος κατά ξενιστή. Επίσης, ασθενείς που έλαβαν αλλομόσχευμα χωρίς T-κυτταρική αφαίρεση και παρουσιάζουν GvHD έχουν μικρότερη πιθανότητα υποτροπής συγκριτικά με αυτούς που δεν παρουσιάζουν. Η σοβαρότητα του GvHD σχετίζεται θετικά με την αντιλευχαιμική δράση και η παρουσία ταυτόχρονα οξέως και χρόνιου GvHD ενέχει το μικρότερο ποσοστό υποτροπής [12, 13]. Αυτή η αντιλευχαιμική δράση του αλλογενούς μοσχεύματος είναι γνωστή ως δράση μοσχεύματος κατά της λευχαιμίας (graft versus leukemia) και οφείλεται εν μέρει στα T-λεμφοκύτταρα που έχουν μία άμεση κυτταρολυτική δράση και επάγουν την παραγωγή κυτταροκινών όπως IL-2, TNF-α και IFN-γ [124]. Ο ρόλος του ανοσολογικού συστήματος στην αντίσταση κατά της νεοπλασίας δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Έχει προταθεί η υπόθεση ότι η υποτροπή μετά από αλλογενή μεταμόσχευση μπορεί ενίοτε να οφείλεται σε διαφυγή από την ανοσολογική επιτήρηση του οργανισμού [125]. Η έρευνα έχει στραφεί στην εκμετάλλευση του ανοσολογικού συστήματος, καθώς φαίνεται ότι παίζει ένα ρόλο-κλειδί στην εξάλειψη των λευχαιμικών κυττάρων [126]. Η χρήση των κυτταροκινών και δραστικών κυττάρων (effector cells) σε λογικό αριθμό θα μπορούσε να επιτεύξει δράση του μοσχεύματος έναντι του όγκου [127]. Είναι γνωστό ότι η IL-2 έχει αντιλευχαιμική δράση. Η χορήγηση της in vivo σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση με αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων διεγείρει τα

περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα του αίματος έναντι των λευχαιμικών, μέσω παραγωγής κυττάρων-φυσικών φονέων (natural killer, NK) [128]. Με τον ίδιο τρόπο, επώαση με IL-2 περιφερικών μονοπυρήνων κυττάρων από ασθενείς με ΧΜΛ μετά από αλλογενή ΜΜΟ ενεργοποιεί τα NK-κύτταρα και μειώνει την πιθανότητα υποτροπής [129]. Τα NK-κύτταρα είναι μη περιορισμένα από το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) και μπορούν να ασκήσουν την λυτική τους δράση, χωρίς την συμμετοχή του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων (TCR). Επώαση με IL-2 ενεργοποιεί επίσης ένα υποπληθυσμό των NK-κυττάρων, τα κύτταρα φονείς-ενεργοποιημένα από τα λεμφοκύτταρα (lymphokine-activated killer cells, LAK). Αναστέλλουν ένα μικρό ποσοστό των φυσιολογικών προγονικών κυττάρων αλλά η δράση τους είναι πιο εκσεσημασμένη έναντι των λευχαιμικών [130]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δράση των LAK-κυττάρων που επάγονται μέσω της IL-2, είναι αποτελεσματική και έναντι χημειοανθεκτικών κυτταρικών νεοπλασματικών σειρών [131].

Οι Beaujean και συν. μεταμόσχευσαν 5 ασθενείς με φτωχής πρόγνωσης ΟΛΛ μετά από επώαση του αυτομοσχεύματος με IL-2 για 10 ημέρες, με ικανοποιητική αιμοποιητική αποκατάσταση. Όλοι οι ασθενείς υποτροπίασαν, πιθανώς λόγω των φτωχών προγνωστικών παραγόντων της νόσου τους [132]. Σε μία άλλη κλινική μελέτη φάσης I, επώαση με IL-2, μυελού των οστών και περιφερικών προγονικών κυττάρων για 24 ώρες, από ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες, δεν επηρέασε το αιμοποιητικό δυναμικό τους [133]. Οι Silva και συν. [134], πέτυχαν την παραγωγή NK-κυττάρων μετά από κάθαρση του μυελού με IL-2 και 4-HC, παρά την τοξική δράση της τελευταίας στα NK-κύτταρα [135]. Αυτή η παρατήρηση είναι σημαντική καθώς ο συνδυασμός της φαρμακευτικής κάθαρσης και της ανοσοθεραπείας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά.

Από την άλλη πλευρά, τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν μία ετερογένεια στην ευαισθησία τους στην λυτική δράση των NK και LAK κυττάρων [129, 130]. Έχει αναγνωριστεί ένας νέος πληθυσμός με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, τα κύτταρα-φονείς επαγόμενα από κυτταροκίνες (cytokine-induced killer, CIK). Οι Scheffold και συν. κατάφεραν να επάγουν CIK κύτταρα, από περιφερικά μονοπύρηνα κύτταρα ασθενών με ΧΜΛ, μετά από επώαση με IFN- γ την ημέρα 0, IL-1, IL-2 και MA έναντι του CD3 την ημέρα 1. Απομονώθηκε ένας πληθυσμός, CD56⁺ CD3⁺, αντιπροσωπευτικός των CIK κυττάρων. Η κυτταροτοξική δράση των κυττάρων αυτών εκτείνεται και στα

LAK-ανθεκτικά ΧΜΛ κύτταρα. Κατάφεραν να μειώσουν κατά 3 τάξεις μεγέθους τα K562 και ΧΜΛ κύτταρα [136]. CIK κύτταρα, έχουν επίσης παραχθεί με την χρήση διπλοειδικών αντισωμάτων και παρουσιάζουν ενισχυμένη δράση, μετά από επώαση με IL-2. Διπλοειδικά αντισώματα έναντι του CD3 (TCR) και ενός επιφανειακού αντιγόνου που εκφράζεται από το κύτταρο-στόχο (π.χ. CD10 ή CD13) ενεργοποιεί τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα έναντι των κυττάρων του όγκου [137].

Πρόσφατα προτάθηκε μία ενδιαφέρουσα νέα μέθοδος που εκμεταλλεύεται τα πλεονεκτήματα και της αλλογενούς και της αυτόλογης μεταμόσχευσης [138]. Μίγμα αυτόλογου μυελού και HLA συμβατού μυελού μεταμοσχεύτηκε σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Αναφέρεται χαμηλή επίπτωση GvHD, αποκατάσταση με μερικό μικτό χμαιορισμό και χαμηλό ρυθμό υποτροπής.

Η χρήση των κυτταροκινών, κυρίως *in vivo* έχει μερικά μειονεκτήματα. Έχουν μικρό χρόνο ημιζωής στην κυκλοφορία καθώς και αρκετές παρενέργειες, όπως πυρετό, εξάνθημα, υπόταση, ενώ έχει ενοχοποιηθεί και για καθυστέρηση της αιμοποιητικής αποκατάστασης [139]. Οι Tam και συν. μετέφεραν το γονίδιο της IL-2 σε προγονικά κύτταρα και μελέτησαν την αντιλευχαιμική της δράση σε αυτομεταμοσχευμένα ποντίκια μετά από θανατηφόρο ακτινοβολία. Παρατήρησαν αντιλευχαιμική δράση στο 50% των ποντικών, στα οποία εγχύθηκαν λευχαιμικά κύτταρα, αλλά ταυτόχρονη αναστολή της αιμοποιητικής αποκατάστασης [140]. Τέλος, μία διαφορετική μέθοδος είναι ο συνδυασμός μιας κυτταροκίνης (π.χ. IL-6) με μία τοξίνη (π.χ. εξωτοξίνη της Ψευδομονάδος). Με τη μέθοδο αυτή καταστρέφονται εκλεκτικά όλα τα κακοήθη κύτταρα που εκφράζουν τον αντίστοιχο υποδοχέα κυτταροκίνης και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τις χημειοανθεκτικές περιπτώσεις [141].

Πρόσφατα, τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν στην *in vivo* κάθαρση κυττάρων μυελογενούς λευχαιμίας και λεμφώματος [142-145]. Χρησιμοποιούνται είτε ως ασύζευκτα είτε ως συνεζευγμένα με φάρμακα, ανοσοτοξίνες και ραδιονουκλίδια. Τα αντι-CD33 και αντι-CD45 είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιημένα στην ΟΜΛ. Τα ασύζευκτα MA δρουν επάγοντας την κυτταρική κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισωματική απάντηση ή άμεσα μέσω ενδοκυτταρικών σημάτων που επάγουν την απόπτωση και αναστολή της ανάπτυξης ή διαφοροποίησης [142]. Η σύζευξη του αντι-CD33 MA με ένα αντιβιοτικό που προκαλεί διάσπαση της διπλής

έλικας του DNA, την καλικάμυκίνη, απομάκρυνε επιτυχώς τα ΟΜΛ βλαστικά κύτταρα από το μυελό και το περιφερικό αίμα σε 8 από τους 40 ασθενείς που μελετήθηκαν [146]. Παρόλο που, το αντιγόνο CD33 εκφράζεται επίσης στα φυσιολογικά BFU-E και CFU-GM, η χρήση του αντι-CD33 με την ανοσοτοξίνη ριτσίνη διατήρησε την ικανότητα των CD34 θετικών κυττάρων να εγκαταστήσουν μακροχρόνια πολυδύναμη αιμοποίηση [98]. Μια άλλη τεχνική, είναι η χρήση MA σημασμένων με ραδιενεργό ιώδιο (¹³¹ I) ώστε να μεταφερθούν μεγαλύτερες δόσεις ακτινοβολίας στους αιμοποιητικούς ιστούς και να εκριζωθούν τα κακοήθη κύτταρα in vivo [142-145, 147]. Το αντίσωμα αντι-CD20 (Rituxan, Rituximab) είναι ένα χμιαϊκό αντίσωμα ποντικού/ανθρώπου, που έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία των Β-κυτταρικών λεμφωμάτων [139].

CAMPATH-1 (CD52) αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την κάθαρση από T-λεμφοκύτταρα και την ελάττωση του GvHD. Το CD52, είναι μία επιφανειακή κυτταρική γλυκοπρωτεΐνη, που εκφράζεται στα φυσιολογικά και κακοήθη λεμφοκύτταρα. Τα CD52 αντισώματα είναι αποτελεσματικά στην θεραπεία της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας [139, 148-150].

1.4 ΘΕΤΙΚΗ ΕΠΙΛΟΓΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει εκτεταμένη μελέτη για την αναγνώριση του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου που διατηρεί την μακρόχρονη αιμοποίηση, εντούτοις δεν έχει γίνει εφικτή η ακριβής αναγνώρισή του. Το CD34 αντιγόνο, είναι μία γλυκοζυλιωμένη διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που εκφράζεται σε περίπου 1.5% των μονοκυττάρων μυελού και λιγότερο του 0.1% των περιφερικών κυττάρων του αίματος. Η λειτουργία του δεν είναι απολύτως γνωστή. Πιστεύεται ότι συμμετέχει στην προσκόλληση των αρχέγονων κυττάρων στο στρώμα και στην εγκατάσταση (homing) στο μυελό, ενώ η φωσφορυλίωση από τη πρωτεϊνική κινάση, ενεργοποιεί ένα σήμα «καταρράκτη» για την επακόλουθη μεταφορά σημάτων στο κυτταρόπλασμα. Πιθανώς να συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση γονιδίων που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση κατά την αιμοποίηση, διατηρώντας με αυτό τον τρόπο τα αρχέγονα κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας [151, 152]. Έχει προταθεί ότι υπάρχει ένα πιο αρχέγονο CD34 αρνητικό κύτταρο που μπορεί να διατηρήσει την αιμοποίηση *in vivo* [153].

Την τελευταία δεκαετία, η κινητοποίηση περιφερικών προγονικών κυττάρων χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στη θέση της αυτόλογης μεταμόσχευσης μυελού [2, 154-156]. Παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα: α) δεν απαιτείται γενική αναισθησία, β) είναι εφαρμόσιμη σε ασθενείς που έχουν ακτινοβοληθεί ή υπάρχει πιθανότητα διήθησης του μυελού με καρκινικά κύτταρα, γ) γρηγορότερη κινητική εγκατάστασης του μοσχεύματος [157], και δ) μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε βοηθητικά κύτταρα όπως τα LAK κύτταρα συγκριτικά με του μυελού [158]. Ο ρόλος αυτών των κυττάρων στην δράση του μοσχεύματος κατά του ξενιστή είναι γνωστός. Επίσης, υπάρχει θεωρητικά μικρότερος κίνδυνος για διήθηση συγκριτικά με το μυελό [159], αν και έχει παρατηρηθεί κινητοποίηση καρκινικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα [160-162]. Εντούτοις, σε ένα πειραματικό μοντέλο, η κινητοποίηση κλωνογονικών κυττάρων λεμφώματος στο αίμα ήταν ελάχιστη και ανίκανη να προκαλέσει νόσο στους ξενιστές [163].

Υπάρχουν φυσικές μέθοδοι που εκμεταλλεύονται τις διαφορές στο μέγεθος και την πυκνότητα, μεταξύ των ώριμων και αρχέγονων κυττάρων [59, 164, 165]. Χρησιμοποιούν υλικά με κλίση πυκνότητας για να μειώσουν τον αριθμό λευκοκυττάρων από τα

μοσχεύματα και ταυτόχρονα να αυξήσουν την περιεκτικότητα τους σε CD34+ κύτταρα. Συνήθως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους, όπως ανοσολογικές. Με στόχο τη βέλτιστη ποιότητα των περιφερικών μοσχευμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι. Η *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα συνεζευγμένο με φλουοροχρώμιο και παρέχει κυτταρικά διαλύματα υψηλής καθαρότητας και απόδοσης (recovery), αλλά μπορεί να επεξεργαστεί μόνο μικρό αριθμό κυττάρων και γι' αυτό δεν είναι κατάλληλη για κλινική χρήση [152, 164]. Η *στήλη αβιδίνης (avidin-column, CEPRATE SC Stem Cell concentration)*, είναι μία συσκευή εγκεκριμένη από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (FDA), που περιέχει σφαιρίδια πολυακρυλαμίδης καλυμένα με αβιδίνη, που κατακρατούν τα σημασμένα με βιοτυνιλιωμένο αντίσωμα CD34+ κύτταρα. Τα CD34+ κύτταρα απελευθερώνονται από την στήλη, με ήπια ανακίνηση των σφαιριδίων [152, 160]. Έχει αναφερθεί, καταστροφή κυττάρων πολλαπλούν μυελώματος κατά 3 log, με την μέθοδο αυτή [160]. Μία αντίστοιχη μέθοδος χρησιμοποιεί σωματίδια σιδήρου-δεξτράνης για σήμανση (μικροσφαιρίδια) και ισχυρό μαγνητικό πεδίο για κυτταρικό διαχωρισμό (*Magnetic Activated Cell Sorting, MACS*) [152, 166, 167]. Το νεώτερο σύστημα Miltenyi χρησιμοποιεί MACS υπερ-παραμαγνητικά μικροσφαιρίδια, τα οποία έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι πολύ μικρά και βιοδιασπώμενα, και συνεπώς δεν διαταράσσουν την κυτταρική λειτουργία. Η τεχνολογία MACS έχει άριστη καθαρότητα και απόδοση κυτταρικού διαχωρισμού, είναι πολύ γρήγορη, αλλά και ακριβή. Η σήμανση των κυττάρων μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση. Οι άμεσες μέθοδοι χρησιμοποιούν αντίσωμα που συνδέεται με το κύτταρο-στόχο και το υλικό, π.χ. τα κύτταρα καλυμένα με αβιδίνη. Οι άμεσες μέθοδοι έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα στην επιλογή. Οι έμμεσες μέθοδοι χρησιμοποιούν ένα δεύτερο αντίσωμα που μεσολαβεί στη σύνδεση των σημασμένων κυττάρων στο υλικό.

Μία άλλη έμμεση μέθοδος ανοσοπροσρόφησης, είναι ο *ανοσομαγνητικός διαχωρισμός με ISOLEX* (Baxter) [168, 169]. Χρησιμοποιεί παραμαγνητικά σωματίδια (Dynabeads) και αντι-ανθρώπινο αντίσωμα ποντικού που συνδέεται με τα CD34+ κύτταρα. Ένα δεύτερο αντίσωμα προβάτου έναντι του ποντικού (sheep antimouse IgG) που καλύπτει τα σφαιρίδια συνδέεται με τα CD34+ κύτταρα. Τα μη σημασμένα κύτταρα απομακρύνονται

με την έκθεση σε μαγνητικό πεδίο. Τέλος, τα CD34+ κύτταρα απελευθερώνονται από τα σφαιρίδια με την χρήση ενός παράγοντα (peptide-releasing agent).

Έχει αναφερθεί υψηλή καθαρότητα των CD34+ κυττάρων με την μέθοδο αυτή (85.9%) με μέση απόδοση (yield) 48.1% [168] και διορθωμένη απόδοση κάθαρσης 2.3 log για κύτταρα πολλαπλούν μυελώματος και συμπαγών όγκων. Σε μία άλλη μελέτη επιτεύχθηκε μείωση κατά 2.9 log κυττάρων καρκίνου του μαστού [169]. Πρόσφατα, κατασκευάστηκε μία συσκευή δεύτερης γενιάς ISOLEX 300i (Nexell Therapeutics) με βελτιωμένη απόδοση μετά από αλλαγές στο λογισμικό και το διαθέσιμο σετ υλικών, που εγκρίθηκε από τον FDA. Αυτό το σύστημα έχει επίσης το πλεονέκτημα της δυνατότητας ταυτόχρονης αρνητικής και θετικής επιλογής.

Υπάρχει μία σχετική ανησυχία για την έκφραση CD34+ κυττάρων σε μερικές κακοήθειες π.χ. λευχαιμίες [152, 155], καθώς επίσης έχει δειχθεί κάποιος βαθμός αλληλεπίδρασης των CD34+ και καρκινικών κυττάρων και σύνδεσης μεταξύ τους [168]. Πάντως η επιλογή CD34+ κυττάρων δεν έχει αποδειχτεί ότι επηρεάζει την επιβίωση ελεύθερη νόσου ούτε θετικά ούτε αρνητικά [139].

Παρόλα αυτά τα προβλήματα, η θετική επιλογή είναι μία υποσχόμενη τεχνική με αποτελεσματικότητα στον εμπλουτισμό των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και ικανοποιητική κάθαρση των νεοπλασματικών κυττάρων. Το προϊόν έχει μικρό όγκο και λιγότερες επιπλοκές από την τοξικότητα του υλικού συντήρησης (DMSO), καθιστώντας το κατάλληλο κυρίως για τα παιδιά [152, 168].

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η μέτρηση των CFU-GM και CD 34+ κυττάρων στα περιφερικά μοσχεύματα αντανακλά το αιμοποιητικό δυναμικό. Η μέτρηση των CD 34+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής [170], είναι μία σταθερή, γρήγορη μέθοδος και σχετίζεται θετικά με τον αριθμό των CFU-GM. Θεωρητικά ένα αιμοποιητικό αρχέγονο κύτταρο μπορεί να υποστηρίξει την μακρόχρονη αιμοποίηση μετά από μεταμόσχευση. Πολλοί παράγοντες, όπως οι συνθήκες του “homing”, η ισορροπία μεταξύ αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης των αρχέγονων κυττάρων και πιθανώς η δράση της προηγηθείσας χημειοθεραπείας καθιστούν αυτή την θεωρία ανέφικτη [171]. Πρόσφατα το όριο των $15-20 \times 10^4$ CFU-GM/kg και $1-2 \times 10^6$ CD34+/kg έχει καθιερωθεί ως το κατώτερο όριο κάτω από το οποίο μη αποδεκτή καθυστέρηση εγκατάστασης του μοσχεύματος μπορεί να συμβεί. Υπάρχει μία δοσοεξαρτώμενη σχέση με τον χρόνο

αιμοποιητικής αποκατάστασης. Τέλος έχει προταθεί ότι η μέτρηση με κυτταρομετρία ροής των μονοπυρήνων κυττάρων του αίματος, που βρίσκονται σε κατάσταση σύνθεσης του DNA, αντανακλά τον πληθυσμό των αυτοανανεούμενων αρχέγονων κυττάρων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά [172].

1.5 EX VIVO ΕΚΠΤΥΞΗ (EXPANSION)

Πολλά προβλήματα εξακολουθούν να υπάρχουν ακόμη και με τα περιφερικά μοσχεύματα και την επιλογή CD34+ κυττάρων. Σε μερικούς ασθενείς η κινητοποίηση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων παρουσιάζει δυσκολίες, ιδιαίτερα σε αυτούς που έχουν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία [154]. Υπάρχει επίσης πάντα ο κίνδυνος της συμμετοχής καρκινικών κυττάρων. Ανεξάρτητα από τον αριθμό των CD34+ κυττάρων που εγχύονται, υπάρχει πάντα μία καθυστέρηση, τουλάχιστον 7 έως 10 ημερών, της εγκατάστασης του μοσχεύματος. Για την αποφυγή αυτών των προβλημάτων, οι νέες ερευνητικές προσπάθειες κατευθύνονται στην έκπτυξη της αιμοποιητικής ικανότητας του μοσχεύματος. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι όπως οι καλλιέργειες ελεύθερες στρώματος με την προσθήκη κυτταροκινών [173] και βιοαντιδραστικά συστήματα (bioreactors) [174] με συνεχή έγχυση φρέσκου υλικού και κυτταροκινών παρουσία αλλογενούς στρώματος. Υπάρχει ένδειξη ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα καταστρέφονται με αυτές τις μεθόδους. Διάφοροι βαθμοί έκπτυξης των προγονικών κυττάρων έχουν επιτευχθεί, αλλά ο αριθμός των CD34+ κυττάρων μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Τα πιο ώριμα δεσμευμένα προγονικά κύτταρα, που είναι απαραίτητα για την πρόιμη αποκατάσταση της αιμοποίησης, έχουν εκπτυχθεί, αλλά όχι τα πιο αρχέγονα μητρικά κύτταρα. Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να κατανοηθεί η βιολογία των κυττάρων αυτών ώστε να πολλαπλασιαστούν [175].

1.6 ΕΠΑΓΩΓΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Είναι γνωστό ότι ένα ποσοστό λευχαιμικών βλαστών, το οποίο δεν πολλαπλασιάζεται και βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας (quiescence), είναι ανθεκτικό στην κυτταροτοξική θεραπεία. Ιδιαίτερα στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ), η παθογενετική βλάβη

εντοπίζεται σε ένα πρώιμο στάδιο ανάπτυξης του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, που οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και διακοπή της διαφοροποίησης [104]. Παρόλα αυτά μπορεί να συμβεί κάποιος βαθμός διαφοροποίησης, κυρίως παρουσία συγκεκριμένων κυτοκινών. Σε καλλιέργειες μακράς διάρκειας, ένα ποσοστό λευχαιμικών βλαστών διαφοροποιήθηκε σε ώριμα κοκκιοκύτταρα [119]. Οι διάφοροι αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες, όπως οι IL-1, IL-3, GM-CSF και G-CSF μπορούν να αυξήσουν το ποσοστό των πολλαπλασιαζόμενων OMA βλαστών [176]. Η 1,25-διυδροξυ-βιταμίνη D₃ και το ρετινοϊκό οξύ μπορούν επίσης, να επάγουν τη διαφοροποίηση σε κύτταρα οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου [177, 178]. Ο συνδυασμός ρετινοϊκού οξέος και γ-ιντερφερόνης έχουν έντονη ανασταλτική δράση στην αυτο-ανανέωση των OMA-CFU-L [179]. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να χρησιμοποιηθούν κατά την ex vivo κάθαρση του μυελού, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με ανοσολογικές τεχνικές. Οι διαφοροποιητικοί παράγοντες μπορεί να υπερπηδήσουν το πρόβλημα της χαμηλής αντιγονικής έκφρασης στους όγκους, καθώς έχουν την ικανότητα να οδηγήσουν τα λευχαιμικά κύτταρα στο διαφοροποιητικό μονοπάτι. Με τον τρόπο αυτό, τα κακοήθη κύτταρα υπόκεινται σε επιθυμητές φαινοτυπικές αλλαγές, και γίνονται ευαίσθητα στην ανοσολογική σήμανση και θεραπεία [180].

1.7 ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΜΕΘΟΔΩΝ ΚΑΘΑΡΣΗΣ

Από τις παραπάνω μελέτες προκύπτει ότι διάφορα προβλήματα πρέπει να αντιμετωπιστούν. Η τοξικότητα έναντι των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση συνδυασμού μεθόδων κάθαρσης, που έχουν αθροιστική δράση στην καταστροφή των νεοπλασματικών κυττάρων. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να αποφευχθεί η δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα διαφόρων παραγόντων στο αιμοποιητικό δυναμικό του μοσχεύματος. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός 4-HC και μονοκλωνικών αντισωμάτων αποφεύγει αποτελεσματικά την υπερβολική τοξικότητα έναντι των LAK κυττάρων που παρατηρείται από την 4-HC, ενώ επιτυγχάνεται ικανοποιητική αντιλευχαιμική δράση [135]. Επίσης σε μία προκλινική μελέτη, επιτεύχθηκε εκρίζωση όλων των λευχαιμικών κυττάρων από 12 ασθενείς με T-ΟΛΛ

[181]. Επιπλέον, είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση ανθεκτικών στη χημειοθεραπεία (MDR) κυττάρων [182]. Σε μία άλλη μελέτη, η συνδυασμένη χρήση ετοποσίδης, κυτοσίνης-αραβινοσίδης και αντι-CD33 με συμπλήρωμα είχε συνεργική δράση στην καταστροφή HL-60 και K562 κυττάρων λευχαιμικών σειρών, ενώ επιβίωσε ικανοποιητικός αριθμός προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων από ασθενείς με οξεία μη-λεμφοκυτταρική λευχαιμία [183].

Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ο συνδυασμός δύο χημειοθεραπευτικών παραγόντων [79, 80, 184] ή φυσικών μεθόδων (π.χ. υπερθερμία) με άλλα φάρμακα [185, 186]. Μία ενδιαφέρουσα μελέτη, συνδύασε τη χρήση μη τοξικών δόσεων του αλκυλ-λυσοφωσφολιπιδίου ET-18-OCH₃ με μη θανατηφόρα θερμότητα. Το ET-18-OCH₃ έχει ανοσορρυθμιστική δράση, καθώς επάγει τη έκφραση πρωτεϊνών (heat shock protein) στα ανθεκτικά K562 κύτταρα αυξάνοντας την ευαισθησία τους στη λύση από NK κύτταρα [186].

Τέλος, ο συνδυασμός μίας θετικής και μίας αρνητικής μεθόδου επιλογής βελτιώνει την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων από το μόσχευμα [187-189]. Διαχωρισμός με κλίση πυκνότητας των CD34 κυττάρων από προϊόντα αφαίρεσης μαζί με θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα εκριζώνει τα κακοήθη κύτταρα από ασθενείς με NHL χωρίς να επηρεάζει την αιματολογική αποκατάσταση [187]. Διπλός θετικός και αρνητικός ανοσομαγνητικός διαχωρισμός οδήγησε σε κάθαρση κατά 4.7 log κυττάρων καρκίνου του μαστού [188]. Πρόσφατα, ένας συνδυασμός CD34 ανοσομαγνητικού διαχωρισμού και μόλυνσης κυττάρων καρκίνου του μαστού με το γονίδιο αυτοκτονίας-αδενοϊού GAL-TEK πέτυχε καταστροφή των κακοήθων κυττάρων κατά 5 έως 7 log με περισσότερο από 70% επιβίωση των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων [190].

2. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η φωτοδυναμική θεραπεία (ΦΔΘ) στηρίζεται στη χορήγηση φωτο-ευαισθητοποιών χρωστικών, είτε *in vitro* είτε *in vivo*, που δεν είναι τοξικές για τα φυσιολογικά κύτταρα. Οι ουσίες αυτές προσλαμβάνονται εκλεκτικά από τα κακοήθη κύτταρα και παρουσία οξυγόνου εκτείνονται σε φως κατάλληλου μήκους κύματος που διεγείρει τα μόρια της χρωστικής με αποτέλεσμα την επαγωγή μιας ποικιλίας φωτοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν σε κυτταρική καταστροφή [191-193]. Η ΦΔΘ έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα στην θεραπεία του καρκίνου και αποτελεί μία εντυπωσιακή εναλλακτική λύση στο οπλοστάσιο κατά του καρκίνου.

Η φωτοθεραπεία και φωτοχημειοθεραπεία είναι είδη θεραπευτικής που χρονολογούνται από τα αρχαία χρόνια. Οι ρίζες της φωτοθεραπείας ξεκινούν από την προϊστορική περίοδο. Πολλοί πρωτόγονοι πολιτισμοί είχαν αναγνωρίσει τις ζωογόνες ιδιότητες του φωτός και λάτρευαν τον ήλιο ως θεότητα. Ο Ιπποκράτης μελέτησε την ηλιοθεραπεία στα ταξίδια του στην Αίγυπτο και την εισήγαγε εμπειρικά στο θεραπευτήριο της Κω [194].

Στην Ευρώπη η φωτοθεραπεία επανακαλύφθηκε στα τέλη του 19ου αιώνα από το Δανό ιατρό Niels Ryberg Finsen, που χρησιμοποίησε υπεριώδες φως στη θεραπεία της κοινής πέμφιγος, για την οποία τιμήθηκε και με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής.

Οι φωτοευαισθητοποιητές βρίσκονται σε αφθονία στη φύση. Πολλές παραδοσιακές μορφές θεραπευτικής εκμεταλλεύονται τις αντιμυκητιασικές και βακτηριοστατικές ιδιότητες ουσιών που βρίσκονται σε εκχυλίσματα φυτών. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν το ηλιακό φως, σε συνδυασμό με φύλλα ενός φυτού που συγγενεύει με το μαϊντανό, (που περιέχουν τη χρωστική 8-μεθοξυ ψωραλένιο), στη θεραπεία της λεύκης [195]. Σε κείμενα του 13ου αιώνα του Ibn El Bitar υπάρχουν απλές οδηγίες δοσιμετρίας φωτός. Το 1947, ο El Mofly επανέφερε τη φωτοθεραπεία στη Δυτική Ιατρική. Στις αρχές του 1970 ο συνδυασμός υπεριώδους ακτινοβολίας Α (UV-A) και 8-μεθοξυ ψωραλένιου (PUVA) άρχισε να εφαρμόζεται στη θεραπεία της λεύκης, της ψωρίασης, της ακμής, του μικροβιακού εκζέματος και άλλων δερματικών παθήσεων.

Στις αρχές του προηγούμενου αιώνα, ο Raab μελέτησε την αδρανοποίηση του παραμηκυλλίου, από το συνδυασμό των χρωστικών ηωσίνης και ακριδίνης με φώς. Η ΦΔΘ ερπητικών, δερματικών και οφθαλμικών λοιμώξεων με ακριδίνη, προφλαβίνη και

κυανού του μεθυλενίου, αρχικά προκάλεσε ενθουσιασμό, αλλά αργότερα τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ενθαρρυντικά.

Η εφαρμογή της ΦΔΘ στους συμπαγείς όγκους ξεκίνησε στις αρχές του προηγούμενου αιώνα με την εφαρμογή ηωσίνης σε δερματικούς καρκίνους [196]. Το 1924 οι Policard και συν. παρατήρησαν για πρώτη φορά κακοήθεις ιστούς που φθόριζαν λόγω ενδογενών πορφυρινών. Το 1942 οι Auler και Banzer παρατήρησαν ότι οι όγκοι από πειραματόζωα φθορίζουν μετά από συστηματική χορήγηση αιματοπορφυρίνης (HP). Το 1960, οι Lipson και συν. παρασκεύασαν ένα μίγμα πορφυρινών με βελτιωμένες ιδιότητες, τα παράγωγα αιματοπορφυρίνης (HPD) και κατάφεραν να πραγματοποιήσουν ενδοσκοπική διάγνωση καρκίνων του αναπνευστικού και του ανώτερου πεπτικού. Με την ανάπτυξη κατάλληλων Laser και οπτικών ινών ως συστημάτων μεταφοράς το ενδιαφέρον για εφαρμογή της ΦΔΘ τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία του καρκίνου εντάθηκε. Οι Dougherty και συν. στα τέλη του 1970 έκαναν τις πρώτες κλινικές μελέτες. Έως σήμερα χιλιάδες ασθενείς με καρκίνο έχουν υποβληθεί σε ΦΔΘ. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι έχει καλύτερα λειτουργικά και αισθητικά αποτελέσματα καθώς είναι λιγότερο ακρωτηριαστική από τη χειρουργική και μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική λύση σε περιπτώσεις που η χειρουργική θεραπεία δε μπορεί να εφαρμοστεί. Επίσης καθώς η τοξικότητα της δεν είναι αθροιστική, μπορεί να εφαρμοστεί σε επαναληπτικές δόσεις. Παρουσιάζει εκλεκτικότητα και περιορισμένες συστηματικές παρενέργειες. Έχει σχετικά χαμηλό κόστος. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα είναι η αποτελεσματικότητα έναντι πολυανθεκτικών καρκινικών κυττάρων (multi-drug resistant) που εκφράζουν το γονίδιο της P-γλυκοπρωτεΐνης [197, 198].

Τέλος, η εξωσωματική φωτοχημειοθεραπεία (PUVA), εφαρμόστηκε αρχικά από τον Edelson και συν. το 1987, στη θεραπεία του δερματικού T-κυτταρικού λεμφώματος [199]. Η θεραπεία αυτή φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενη και στην αντιμετώπιση άλλων νοσημάτων όπως κοινή πέμφιγα, συστηματική σκλήρυνση, ρευματοειδής αρθρίτιδα και πρόληψη απόρριψης του μοσχεύματος [194].

Η ΦΔΘ στη μεταμόσχευση του μυελού των οστών έχει τουλάχιστον πέντε εφαρμογές: 1) αδρανοποίηση (κάθαρση) καρκινικών κυττάρων από το μόσχευμα [191], 2) προφύλαξη από GvHD στην αλλογενή μεταμόσχευση, 3) θεραπεία οξέος και χρόνιου GvHD [200], 4) πρόληψη αλλο-ευαισθητοποίησης και απόρριψης μοσχεύματος [201] σε ασθενείς με

πολλαπλές μεταγγίσεις αίματος [202], 5) πρόληψη λοιμώξεων που σχετίζονται με μεταγγίσεις σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς [194].

2.1 ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

Οι φωτοευαίσθητοποιητές είναι ουσίες που έχουν την ιδιότητα να απορροφούν ενέργεια με τη μορφή φωτονίων, όταν διεγερθούν από φως κατάλληλου μήκους κύματος και να μεταφέρουν αυτή την ενέργεια σε μόρια οξυγόνου. Με τον τρόπο αυτό παράγονται τοξικά προϊόντα, όπως μονήρες οξυγόνο (singlet oxygen, $^1\text{O}_2$) και ελεύθερες ρίζες. Τα μόρια αυτά προκαλούν βλάβη σε κυτταρικά συστατικά, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα [196].

Φωτοευαίσθητοποιητές βρίσκονται διαδεδομένοι στη φύση, όπως για παράδειγμα η αιμοσφαιρίνη και η χλωροφύλλη. Στη ΦΔΘ ο φωτοευαίσθητοποιητής χορηγείται στον ασθενή ενδοφλέβια και μετά από κατάλληλο χρόνο, ακτινοβολείται η πάσχουσα περιοχή. Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού φωτοευαίσθητοποιητή [193] είναι τα ακόλουθα:

1) Η χρωστική πρέπει να διαλύεται και να παραμένει σταθερή στα υδατικά διαλύματα, σε φυσιολογικό pH, ώστε να επιτρέπεται η κυκλοφορία του και η εκλεκτική συγκέντρωσή του στα κύτταρα. Χρωστικές, όπως τα παράγωγα αιματοπορφυρίνης, οι ροδαμίνες και η μεροκυανίνη 540 είναι διαλυτές σε υδατικά διαλύματα.

2) Είναι σημαντικό να προσλαμβάνεται και να κατακρατείται εκλεκτικά από τα κακοήθη κύτταρα. Βέβαια, είναι ουτοπικό να ψάχνει κανείς μία ουσία που να προσλαμβάνεται αποκλειστικά και μόνο από νεοπλασματικά κύτταρα. Για παράδειγμα, μία ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία των συμπαγών όγκων, η φωτοφρίνη, προσλαμβάνεται τόσο από τους καρκινικούς ιστούς, όσο και από το ήπαρ, σπλήνα, νεφρούς και άλλους φυσιολογικούς ιστούς [203]. Συνήθως, παρατηρείται πιο έντονη κατακράτηση σε ιστούς πλούσιους σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος [204]. Με την επίδραση ακτινοβολίας όμως, παρατηρείται εκλεκτική καταστροφή των καρκινικών ιστών. Ο μηχανισμός αυτής της εκλεκτικής απάντησης, δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Σε μερικές περιπτώσεις, εξηγείται από τη σχετικά υψηλότερη συγκέντρωση της χρωστικής στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς. Μία άλλη θεωρία, προτείνει ότι στη περιοχή του όγκου παρατηρείται διαφυγή της

χρωστικής από τα κατεστραμμένα αγγεία και τη φτωχή λεμφική παροχέτευση. Ένας πιο ειδικός μηχανισμός πρόσληψης είναι μέσω λιποπρωτεΐνης. Έχει παρατηρηθεί αυξημένη ενδοκύττωση της χρωστικής από τα νεοπλασματικά κύτταρα μέσω του υποδοχέα LDL (low-density lipoprotein). Εκείνο που διαφέρει ανάμεσα στους διάφορους ιστούς, είναι ο χρόνος που επιτυγχάνεται η μέγιστη συγκέντρωση της χρωστικής. Για παράδειγμα η ροδαμίνη 123 (Rh-123) μεταβολίζεται γρήγορα από τους φυσιολογικούς ιστούς και με βραδύτερο ρυθμό από τους καρκινικούς. Έτσι υπάρχει ένα “χρονικό παράθυρο” στο οποίο μπορεί να εφαρμοστεί με ασφάλεια φωτοδυναμική θεραπεία [193].

3) Πρέπει να υπάρχει κάποιος ενδοκυτταρικός στόχος και κάποια μορφή παθητικής ή ενεργητικής μεταφοράς της χρωστικής μέσα στο κύτταρο.

4) Για τη μέγιστη αποτελεσματικότητα, το φάσμα απορρόφησης της χρωστικής θα πρέπει να συμπίπτει με το μήκος κύματος της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που εφαρμόζεται.

5) Δεν πρέπει να έχει σημαντική συστηματική τοξικότητα.

6) Ουσίες που έχουν υψηλή απόδοση ενέργειας όταν διεγερθούν (quantum yield), είναι κατάλληλες για ΦΔΘ, ενώ ουσίες με υψηλή ενέργεια φθορισμού (fluorescence yield) είναι πιο κατάλληλες για διαγνωστική απεικόνιση.

Η ταυτόχρονη έκθεση των κυττάρων στη χρωστική και σε φως κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση του όγκου του κυττάρου. Παρατηρούνται μικρές προσεκβολές στην επιφάνεια και τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού [205]. Η διαδικασία είναι οξυγονοεξαρτώμενη. Με την απορρόφηση ενέργειας, ο φωτο-ευαισθητοποιητής περνά από τη βασική κατάσταση ηρεμίας σε ένα πρώτο επίπεδο διέγερσης (singlet state) και ακολούθως μετά από μια υψηλή κβαντική απόδοση, μεταπίπτει στη διεγερμένη κατάσταση (triplet state) [196, 206]. Η διεγερμένη μορφή μπορεί να πάρει μέρος σε δύο τύπους αντιδράσεων: α) μπορεί να αντιδράσει απευθείας με κάποιο υπόστρωμα και να μεταφέρει ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα τη δημιουργία ριζών και ιόντων, που αλληλεπιδρούν με το οξυγόνο και σχηματίζουν οξειδωτικά προϊόντα (αντιδράσεις τύπου I), β) μπορεί να μεταφέρει ενέργεια απευθείας στο οξυγόνο και να σχηματίσει μονήρες οξυγόνο, το οποίο με τη σειρά του αντιδρά με υποστρώματα πλούσια σε ηλεκτρόνια, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, προκαλώντας κυτταρική βλάβη και θάνατο (αντιδράσεις τύπου II). Το

μονήρες οξυγόνο έχει πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (της τάξης των 10^{-6} sec), και συνεπώς μπορεί να προκαλέσει βλάβη μόνο στις δομές με τις οποίες γειτνιάζει.

Στο κυτταρικό επίπεδο, ως στόχοι της φωτοδυναμικής θεραπείας έχουν αναφερθεί η πλασματική μεμβράνη, τα μιτοχόνδρια, ο πυρήνας και τα λυσοσώματα [207-209] καθώς και ενδοκυτταρικά ένζυμα [210]. Όμως, *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι η αγγείωση του όγκου αποτελεί κύριο στόχο της ΦΔΘ με επακόλουθο τη νέκρωση.

Τα παρασκευάσματα αιματοπορφυρίνης (hematoporphyrin derivatives, HPD) είναι από τους γνωστότερους και πιο συχνά χρησιμοποιούμενους φωτοευαισθητοποιητές. Πρόκειται για μίγμα μονομερών, διμερών και ολιγομερών εστέρων και αιθέρων της αιματοπορφυρίνης. Το νεώτερο μίγμα Photofrin II περιέχει το πιο ενεργό συστατικό αιθέρα της δισαιματοπορφυρίνης [192, 211, 212]. Παρουσιάζει πέντε κύματα απορρόφησης φωτός στα 402, 507, 540, 573 και 624 nm και από αυτή την άποψη αποτελεί ιδανικό παράγοντα για την *in vivo* ΦΔΘ όγκων, αφού το μέγιστο μήκος κύματος διεισδύει ικανοποιητικά τους ιστούς.

Ο μηχανισμός σύνδεσης των πορφυρινών στους καρκινικούς ιστούς δεν είναι γνωστός. Πιθανώς να ευθύνεται κάποιου βαθμού ισορροπία ανάμεσα στα υδρόφιλα και υδρόφοβα τμήματα των χρωστικών [213]. Τα συστατικά HPD με τη μικρότερη πολικότητα και συνεπώς τα πιο υδρόφοβα, προσλαμβάνονται πιο έντονα από τα κύτταρα [214]. Προτείνονται δύο μηχανισμοί εισόδου στα κύτταρα, είτε με παθητική διάχυση είτε με πινοκύτωση από τα μακροφάγα [215]. Ο ρόλος των μακροφάγων του όγκου στη πρόσληψη των φωτοευαισθητοποιητών φαίνεται να είναι σημαντικός. Λευχαιμικά κύτταρα, που έχουν διαφοροποιηθεί προς μακροφάγα, προσλαμβάνουν πιο έντονα χρωστικές [216].

Το φωτοδυναμικό φαινόμενο και η θανάτωση των κυττάρων *in vitro* και *in vivo*, εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή, τη δόση ακτινοβολίας και την επαρκή συγκέντρωση ενδοκυτταρικού οξυγόνου [217]. Όταν η φωτοφρίνη επωάζεται με τα κύτταρα για μικρό χρονικό διάστημα, συνδέεται χαλαρά με τη κυτταρική μεμβράνη και με δομές σε γειτνίαση με το κυτταρόπλασμα, ενώ πιο μεγάλοι χρόνοι έκθεσης επιτρέπουν στη χρωστική να εισέλθει μέσα στα λιπίδια. Στη δεύτερη περίπτωση, το φωτοδυναμικό φαινόμενο είναι ταχύτερο και απαιτεί μικρότερη συγκέντρωση οξυγόνου καθώς η διαλυτότητα και η διάχυση του οξυγόνου στα λιπίδια είναι καλύτερη [218]. Η

σύνθεση των λιπιδίων της μεμβράνης και κυρίως η χοληστερόλη παίζουν ρόλο στη σύνδεση της χρωστικής [219]. Κατά τη φωτοακτινοβόληση παράγεται μονήρες οξυγόνο [220] που προσβάλλει την κυτταρική μεμβράνη [221], τα μιτοχόνδρια [222], τα μικροσώματα, τα υπεροξεισώματα [210] και το DNA [208]. Η φωτοφρίνη επιδρά στον ενεργειακό μεταβολισμό των κυττάρων παρουσία ή απουσία φωτός. Έχει παρατηρηθεί, μείωση της δραστηριότητας του κυτοχρώματος C και αυξημένη γλυκόλυση παρουσία φωτοφρίνης στο σκοτάδι, που θα μπορούσε να είναι μία αντισταθμιστική απάντηση στην αναστολή της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης των μιτοχονδρίων. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, δείχνουν ότι η φωτοφρίνη επηρεάζει τη δομή των μιτοχονδρίων. Ακτινοβόληση με φως, αναστέλλει και τα δύο ενεργειακά μονοπάτια, τη γλυκόλυση και την οξειδωτική φωσφορύλιωση, οδηγώντας σε μειωμένη παραγωγή ATP, που σχετίζεται με την απώλεια της βιωσιμότητας του κυττάρου. Επίσης η παρουσία ανασταλτών του ενεργειακού μεταβολισμού, ενισχύει τη κυτταροτοξική δράση της φωτοφρίνης, γεγονός που στηρίζει την υπόθεση ότι το ενεργειακό έλλειμμα μπορεί να είναι υπεύθυνο για την παρατηρούμενη κυτταροτοξικότητα [223].

Έχουν γίνει πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες, σε φυσιολογικούς και καρκινικούς ιστούς για την μελέτη της κατανομής και της συμπεριφοράς της φωτοφρίνης κατά τη φωτοακτινοβόληση [203, 213, 222, 224- 226]. Κλινικές δοκιμές φάσης III βρίσκονται σε εξέλιξη για διάφορους τύπους συμπαγών όγκων όπως, κύστεως, μαστού, εγκεφάλου, γαστρεντερικού σωλήνα, κεφαλής/τραχήλου, πνεύμονα, δέρματος και άλλων [192, 196, 206, 227, 228]. Δεν παρουσιάζει σημαντική τοξικότητα και μεταλλαξιογόνο δράση [229] εκτός από μία παρατεταμένη φωτοευαισθησία [203].

Άλλες ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στη ΦΔΘ είναι τα παράγωγα βενζοπορφου-ρίνης (BPD, βερτεπορφίνη) [192], οι φθαλοκυανίνες [230-234], οι χλωρίνες [235, 236], τα παράγωγα ροδαμίνης [237], λιπαρά οξέα που περιέχουν πυρένια {π.χ. 12-(1-πυρένιο) δωδεκανοϊκό οξύ, P12} [238]. Ο συνδυασμός φθαλοκυανινών με λιποσώματα που έχουν σημαθεί με αντισώματα αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου [239]. Η μεροκυανίνη 540 έχει χρησιμοποιηθεί στην *ex vivo* κάθαρση του μυελού από νεοπλασματικά κύτταρα.

2.2 ΜΕΡΟΚΥΑΝΙΝΗ 540 (MC540)

Η μεροκυανίνη 540 (5-[(3-σουλφοπρόπυλ-2(3H)-βενζοξιαζολυδίνη)-2-βουτενυλιδίνιο]-1,2-διβουτυλ-2-θειοβαρβιτουρικό οξύ) είναι ένα αρνητικά φορτισμένο ετεροκυκλικό χρωμοφόρο με μοριακό βάρος 570 daltons. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ως πρόσθετο σε φωτογραφικά διαλύματα. Στα μέσα της δεκαετίας του '70 άρχισε να χρησιμοποιείται για την καταγραφή διαμεμβρανικών δυναμικών σε κύτταρα και λιποσώματα [240, 241].

Η MC540 σχηματίζει συσσωματώματα στο νερό και σε μη πολικούς διαλύτες. Στην μεθανόλη και άλλους οργανικούς διαλύτες με μέτρια πολικότητα, η MC540 υπάρχει ως μονομερές.

Η ιδιότητα που έχει αυτή η χρωστική, όσον αφορά τη διαφορετική συγγένεια και εκλεκτική φωτοτοξικότητα στους διάφορους τύπους φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων και ιών, έχει χρησιμοποιηθεί στις ακόλουθες βιοϊατρικές εφαρμογές: 1) αναγνώριση λευχαιμικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα, 2) ανάλυση των ιδιοτήτων της κυτταρικής μεμβράνης, 3) εξωσωματική κάθαρση αυτομοσχευμάτων μυελού των οστών σε ύφεση και 4) αδρανοποίηση ιών [240].

Απουσία πλάσματος, ορού ή πρωτεϊνών του ορού, όπως η αλβουμίνη, η MC540 συνδέεται με όλους τους τύπους κυττάρων [242]. Λόγω του αρνητικού φορτίου της δεν μπορεί να διαπεράσει την ακέραιη κυτταρική μεμβράνη. Αρχικά συνδέεται με την εξωτερική στιβάδα της λιπιδικής διπλοστιβάδας της μεμβράνης. Η παρουσία πρωτεϊνών του ορού στο υλικό των κυττάρων, επιτρέπει ένα διαχωρισμό σε κύτταρα με θέσεις σύνδεσης υψηλής και χαμηλής συγγένειας, πιθανώς λόγω της παρουσίας υδρόφοβων θέσεων σύνδεσης που δρουν ανταγωνιστικά. Έτσι συνδέεται με μεγάλη συγγένεια με ηλεκτρικά διεγερόμενα κύτταρα, όπως νευρικά και μυικά [205], μερικά ανώριμα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, λευχαιμικά και κύτταρα λεμφώματος [240, 243]. Μη διεγερόμενα κύτταρα, όπως οι ινοβλάστες, μυοβλάστες και ηπατοκύτταρα, καθώς και τα ώριμα περιφερικά κύτταρα του αίματος, παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια για την MC540. Επίσης τα διεγερμένα λεμφοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα και αιμοπετάλια συνδέουν πιο έντονα τη χρωστική από τα αντίστοιχα μη διεγερμένα. Ερυθροκύτταρα μολυσμένα με το πλασμάδιο της ελονοσίας, επίσης συνδέουν

περισσότερο χρωστική, ενώ κύτταρα “ghosts” από τα δρεπανοκύτταρα συνδέουν λιγότερο χρωστική από τα αντίστοιχα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα [240].

Έχουν βρεθεί διαφορές στις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, όπως διαφορές σε γλυκοπρωτεΐνες, υποδοχείς, ανοσολογικούς και αντιγονικούς δείκτες, στη μεταφορά φαρμάκων, στην παθητική διαβατότητα ουσιών και σε επίπεδα ενζύμων. Η σύνδεση της MC540 στα λευχαιμικά κύτταρα είναι διαφορετική από αυτή των ηλεκτρικά διεγερσιμων κυττάρων και πιθανώς αντανακλά μία αποτυχία ωρίμανσης της μεμβράνης [243].

Η κατανομή της χρωστικής στα κύτταρα μπορεί να είναι είτε ομοιόμορφη είτε στικτή. Σε μερικά κύτταρα όπως ηλεκτρικά κύτταρα του χελιού ή πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς στη φάση απώλειας του πυρήνα (προερυθροβλάστης), η κατανομή της χρωστικής είναι ασύμμετρη.

Οι Valinsky, Easton και Reich, το 1978, ήταν οι πρώτοι ερευνητές που προσπάθησαν να χρησιμοποιήσουν αυτή τη χρωστική για τη διάγνωση της λευχαιμίας από κύτταρα του περιφερικού αίματος. Παρατήρησαν ότι η κλινική υποτροπή της νόσου μπορούσε να ανιχνευθεί στο αίμα έως 15 εβδομάδες πριν την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων [243]. Παρόλα αυτά η μέθοδος δεν βρήκε κλινική εφαρμογή γιατί παρουσιάζει κλινικές δυσκολίες. Πρόσφατα, οι Ryatt και συν. [244] χρησιμοποίησαν την MC540, σε συνδυασμό με κυτταρομετρία ροής, για την αναγνώριση των αρχέγονων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Πρότειναν ότι κάποια σχέση πρέπει να υπάρχει ανάμεσα στη δομή της μεμβράνης του αιμοποιητικού κυττάρου και το στάδιο ωρίμανσης. Η MC540 συνδέεται με τη λιπιδική διπλοστιβάδα με δύο πιθανούς προσανατολισμούς: ένα παράλληλο και ένα κάθετο στο επίπεδο της μεμβράνης. Τα μόρια που έχουν παράλληλη τοποθέτηση σχηματίζουν διμερή [241, 245]. Παρατήρησαν πιο έντονη χρώση των κυττάρων στα οποία μονομερή της MC540 έχουν προσανατολισμό κάθετο στη μεμβράνη σε αντίθεση με κύτταρα χαμηλού φθορισμού όπου μονομερή ή διμερή χρωστικής έχουν προσανατολισμό παράλληλο με το επίπεδο της μεμβράνης. Για να επιτύχει προσανατολισμό κάθετο στο επίπεδο της διπλοστιβάδας, η MC540 πρέπει να έχει πρόσβαση στο εσωτερικό της, κάτι που ευνοείται από τα λιπίδια με χαλαρή δομή.

Ο μηχανισμός σύνδεσης της MC 540, εκλεκτικά σε ορισμένα κύτταρα, δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Μελέτες σε μονόστιβα κυστίδια δείχνουν τη χρωστική να εντοπίζεται στην

υδρόφιλη περιοχή (πολική κεφαλή) των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης [246]. Πειράματα κατανομής δύο φάσεων, δείχνουν ότι η χρωστική σχηματίζει στοιχειομετρικά σύμπλοκα με φωσφολιπίδια και ασβέστιο [205]. Επίσης βρέθηκαν ομοιότητες μεταξύ των ιδιοτήτων σύνδεσης της MC540 και της N-ε-dansyl-L-lysine (φθορίζων ανιχνευτής μεμβρανών, probe), οπότε η MC540 πιθανώς συνδέεται με τμήματα της μεμβράνης ελεύθερα χοληστερόλης [247, 248]. Η χοληστερόλη, δε φαίνεται να επηρεάζει τις φωτοφυσικές ιδιότητες της MC540, αλλά πρέπει να παίζει ένα έμμεσο ρόλο στο φωτοδυναμικό φαινόμενο καθώς επηρεάζει τη σύνδεση της χρωστικής με το κύτταρο [246]. Επίσης οι λιποπρωτεΐνες του ορού φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο. Παρουσία LDL (low-density lipoprotein) αυξάνεται η πρόσληψη της MC540, τόσο από τα φυσιολογικά όσο και από τα νεοπλασματικά κύτταρα, αν και η πρόσληψη αυτή δεν φαίνεται να μεσολαβείται απευθείας από τους LDL υποδοχείς [249]. Πειράματα με λιποσώματα, έχουν αποδείξει ότι η χρωστική προτιμά λιποσώματα με ακόρεστα λιπίδια, καθώς και τα λιποσώματα μικρότερου μεγέθους. Τέλος, έχει προταθεί η υπόθεση ότι η χρωστική προτιμά διαταραγμένα τμήματα της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Πολλές μελέτες τονίζουν τη σημασία των λιπιδίων της εξωτερικής στιβάδας της μεμβράνης για τη σύνδεση της MC540. Φυσιολογικά τα φωσφολιπίδια στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη κατανέμονται ασύμμετρα, με τη φωσφατιδυλ-χολίνη και σφιγγομυελίνη κατανεμημένες στην εξωτερική στιβάδα και την φωσφατιδυλ-σερίνη και αιθανολαμίνη στην εσωτερική. Αυτή η ασυμμετρία διατηρείται με μία ATP-εξαρτώμενη αμινοφωσφολιπιδική τρανσλοκάση (flippase), μαζί με την αλληλεπίδραση της σπεκτρίνης με τα ανιονικά φωσφολιπίδια της εσωτερικής στιβάδας. Επειδή τα λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλ-χολίνης και σφιγγομυελίνης είναι πιο κορεσμένα από τις αντίστοιχες ακυλ-αλυσίδες της φωσφατιδυλ-σερίνης και αιθανολαμίνης, η εξωτερική στιβάδα είναι πιο σφιχτά δομημένη από την εσωτερική. Έτσι, επεξεργασία των ερυθροκυττάρων με χημικούς παράγοντες που διαταράσσουν αυτή την ασυμμετρία, όπως η γλωροπρομαζίνη και η νευραμινιδάση, οδηγούν σε αυξημένη σύνδεση της MC540 στα κύτταρα αυτά [250]. Είναι πολύ πιθανό ότι το ίδιο ισχύει και για τα λευχαιμικά κύτταρα, αν και συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα δεν υπάρχουν ακόμη. Για παράδειγμα η αύξηση του περιεχομένου πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, σε κύτταρα της λευχαιμικής σειράς L1210, δεν επηρέασε σημαντικά τη σύνδεσή τους με την MC540. Αυτό δεν αποκλείει το ρόλο των

πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη ρύθμιση της σύνδεσης. Πιθανώς η κατανομή των λιπιδίων στη κυτταρική μεμβράνη να είναι πιο σημαντική από τη σύνθεσή τους [248].

Σε μία μελέτη πάντως, έγινε προσπάθεια να μελετηθεί ο ρόλος του φορτίου, της ρευστότητας και της υδροφοβικότητας της μεμβράνης στη σύνδεση της χρωστικής και στην ευαισθησία των κυττάρων στη φωτοακτινοβόληση. Βρέθηκε ότι τα κύτταρα των συμπαγών όγκων είναι πιο ευαίσθητα στη φωτοακτινοβόληση όσο πιο ηλεκτραρνητικά είναι. Το ίδιο όμως δεν ισχύει και για τα κύτταρα λεμφώματος και λευχαιμίας. Επίσης, η μεταβολή της ρευστότητας και υδροφοβικότητας της μεμβράνης δεν επηρεάζει καθόλου τις ιδιότητες σύνδεσης, κάτι που επίσης δεν ισχύει στις μελέτες με τα λιποσώματα [251]. Πιθανώς λοιπόν, να ενέχονται διαφορετικοί μηχανισμοί σύνδεσης μεταξύ των διαφόρων τύπων κυττάρων. Η διαφορετική ευαισθησία των κυττάρων στη δράση της ΦΔΘ πρέπει να οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων, όπως οι διαφορές στην πυκνότητα και την κατανομή των θέσεων σύνδεσης υψηλής συγγένειας για τον φωτοευαισθητοποιητή, καθώς και διαφορές της ενδογενούς ευαισθησίας στα φωτοτοξικά προϊόντα που παράγονται από τα διεγερμένα μόρια της χρωστικής [252].

Μία άλλη χρήση της φωτοακτινοβόλησης με MC540 είναι η αδρανοποίηση ιών που φέρουν κάψα, όπως ο ιός του απλού έρπητα-1 (HSV-1), ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο ανθρώπινος ιός της T-κυτταρικής λευχαιμίας-λεμφώματος (HTLV-1), ο ιός της ανοσολογικής ανεπάρκειας (HIV-1) και ο ιός Friend της ερυθρολευχαιμίας [253-256]. Η φωτοαδρανο-ποίηση των ιών γίνεται μέσω αναστολής της προσκόλλησης και διείσδυσης του ιού στο κύτταρο, καθώς και βλαβών στις πρωτεΐνες της κάψας και τον πυρήνα [254]. Η MC540 έχει επίσης αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram (+) και Gram (-) βακτηριδίων [257]. Έχει χρησιμοποιηθεί σε προκλινικές μελέτες για την αποστείρωση παραγώγων του αίματος [194]. Τα αρχέγονα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα, τα ερυθροκύτταρα, ο παράγων VIII και ο παράγων von Willebrand δεν καταστρέφονται [254], αλλά τα αιμοπετάλια είναι ευαίσθητα στη φωτοακτινοβόληση [194]. Επίσης, ερυθροκύτταρα μολυσμένα με το πλασμώδιο της ελονοσίας καταστρέφονται με MC540 φωτόλυση [258]. Η MC540, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σχετική ασφάλεια, καθώς δεν παρουσιάζει σημαντική μεταλλαξιογόνο δράση [259] και συστηματική τοξικότητα [194].

2.3 ΦΩΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι μηχανισμοί φωτοοξειδωσης της MC540, περιλαμβάνουν κυρίως αντιδράσεις τύπου II [260-262]. Το μονήρες οξυγόνο ανιχνεύεται δύσκολα στα κυτταρικά συστήματα, καθώς αντιδρά πολύ γρήγορα με τα βιολογικά συστατικά. Οι Kalyanagaman και συν., χρησιμοποιώντας οξυμετρία σήμανσης spin, παρατήρησαν κατανάλωση οξυγόνου κατά τη MC540 φωτοακτινοβόληση σε ακόρεστα λιποσώματα, όχι όμως και σε κορεσμένα [260]. Αυτή η παρατήρηση προτείνει την υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπιδίων ως πιθανό παθογενετικό μηχανισμό κατά τη καταστροφή της μεμβράνης. Η αναστολή από αζίδιο και η ενίσχυση της κατανάλωσης οξυγόνου από οξείδιο του δευτερίου (D_2O), σημαίνει ότι το μονήρες οξυγόνο αποτελεί το κύριο μεσάζοντα στην υπεροξειδωση των λιπιδίων. Οι αντιδράσεις αυτές συμμετέχουν στην αδρανοποίηση μεμβρανικών ενζύμων, όπως η Na^+-K^+ ATPase, Mg^{+2} -ATPase, 5'-νουκλεοτιδάση σε λευχαιμικά κύτταρα [261]. Αντίθετα ενδοκυτταρικά ένζυμα, όπως η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) και η μαλαϊκή αφυδρογονάση δεν επηρεάζονται ακόμη και όταν η μεμβράνη έχει καταστραφεί. Συνεπώς η μεμβράνη αποτελεί κύριο στόχο της φωτοδυναμικής θεραπείας. Άλλοι συγγραφείς προτείνουν ότι η βλάβη από το μονήρες οξυγόνο μπορεί να μη περιορίζεται στη μεμβράνη, αλλά να δρα και σε κυτταροπλασματικούς ή εξωκυτταρικούς στόχους [262].

Οι Davila και συν. [245] πρότειναν δύο εναλλακτικούς μηχανισμούς για τη δράση της φωτοακτινοβόλησης με MC540: α) παραγωγή τοξινών από τη χρωστική που προκύπτουν από την επίδραση του μονήρους οξυγόνου στην MC540, β) παραγωγή θερμικής ενέργειας από την trans-cis φωτοϊσομερίωση της χρωστικής γύρω από τον κεντρικό διπλό δεσμό [263]. Οι δομικές αλλαγές, που συμβαίνουν κατά τη φωτοϊσομερίωση, προκαλούν διάσπαση της μεμβράνης, επιτρέποντας τη διέλευση ιόντων και τη θανάτωση του κυττάρου. Η συμμετοχή της θερμικής ενέργειας όμως, φαίνεται να μην είναι τόσο σημαντική. Η φωτοαδρανοποίηση των κυττάρων με MC540 απαιτεί μια λανθάνουσα περίοδο, γεγονός που είναι συμβατό με μηχανισμό πολλαπλών βλαβών. Δηλαδή, η διαδικασία θανάτωσης των κυττάρων, συμβαίνει μέσω διαφορετικών μηχανισμών και σταδίων.

Όπως αναφέρθηκε ήδη, δύο τύποι αντιδράσεων μπορούν να λάβουν χώρα κατά το φωτοδυναμικό φαινόμενο. Οι αντιδράσεις τύπου I και II μπορεί να συμβούν ταυτόχρονα, και ο βαθμός στον οποίο συμβαίνουν, εξαρτάται από τον φωτοευαισθητοποιητή, το υπόστρωμα και τη συγκέντρωση οξυγόνου. Σε συνθήκες σχετικής υποξίας καθώς και παρουσία αναγωγικών ουσιών, όπως είναι οι θειόλες [255, 264] και το ασκορβικό οξύ [262] ευνοούνται οι αντιδράσεις τύπου I (μέσω ελεύθερων ριζών).

Η δράση της MC540 φωτοαδρανοποίησης των κυττάρων φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τον κυτταρικό κύκλο και έτσι μπορεί να συμπληρώσει άλλες μεθόδους κάθαρσης, όπως φάρμακα, αντισώματα και λεκτίνες. Εξάλλου οι λεκτίνες και τα αντισώματα αντιδρούν με πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, ενώ η MC540 με τη λιπιδική διπλοστιβάδα της μεμβράνης, επιτρέποντας το συνδυασμό των μεθόδων αυτών, εφόσον δρουν σε διαφορετικά επίπεδα [252].

Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η MC540 ΦΔΘ επάγει την απόπτωση σε λευχαιμικά και άλλα κακοήγη κύτταρα [265-267]. Καθώς όμως άλλες κυτταρικές σειρές δεν παρουσιάζουν ενδείξεις απόπτωσης, φαίνεται ότι ο αποπτωτικός μηχανισμός δεν είναι ο αποκλειστικός μηχανισμός πρόκλησης βλάβης στην MC540 φωτοακτινοβόληση των κυττάρων.

Ενίσχυση του φωτοδυναμικού φαινομένου

Γνωρίζοντας τη συμμετοχή των οξειδωτικών διαδικασιών στο φωτοδυναμικό φαινόμενο, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει με στόχο την ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας της μεθόδου έναντι των λευχαιμικών κυττάρων. Είναι γνωστή η συμμετοχή του σιδήρου στις οξειδωτικές διαδικασίες. Ο σίδηρος είναι σημαντικός για τον ενεργειακό μεταβολισμό και τη σύνθεση DNA σε όλα τα κύτταρα. Αποθηκεύεται στη φερριτίνη, μία πολυμερή πρωτεΐνη που μπορεί να δεσμεύσει έως 4500 ιόντα σιδήρου στη μορφή τρισθενούς σιδήρου. Η φερριτίνη έχει δύο σημαντικές λειτουργίες: α) παρέχει σίδηρο για ζωτικές λειτουργίες και β) συνδέει Fe^{+3} και είναι χηλωτικός παράγοντας, καταστέλλοντας την παραγωγή βλαπτικών ελεύθερων ριζών που καταλύεται μέσω του σιδήρου.

Χορήγηση εξωγενούς σιδήρου σε λευχαιμικά κύτταρα ενισχύει την ευαισθησία τους στην MC540 φωτοακτινοβόληση. Επίδραση όμως του σιδήρου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά, πιθανώς μέσω επαγωγής της σύνθεσης της

φερριτίνης, η οποία δεσμεύει το σίδηρο [268]. Παρόμοια, έκθεση των κυττάρων για μικρό χρονικό διάστημα σε αιμίνη (σιδηρο-πρωτοπορφυρίνη IX), που αποτελεί πηγή σιδήρου, οδηγεί σε μείωση της αντίστασης ενώ μακρόχρονη έκθεση επάγει την αντίσταση των κυττάρων στη ΦΔΘ [269]. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική, διότι μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου κατά την *ex vivo* κάθαρση του μυελού από κακοήθη κύτταρα. Χρόνια λύση ερυθροκυττάρων στο μυελό, λόγω οξειδωτικού στρες, μπορεί να εφοδιάζουν τα υπολειπόμενα καρκινικά κύτταρα με μία αποθήκη αιμίνης, που ρυθμίζει θετικά την παραγωγή φερριτίνης και τα καθιστά ανθεκτικά στη θεραπεία.

Άλλες ουσίες που φαίνεται να ενισχύουν τη ΦΔΘ είναι τα σαλικυλικά [270, 271]. Το φαινόμενο αυτό εκ πρώτης όψεως είναι παράδοξο, καθώς τα σαλικυλικά ως αντιοξειδωτικές ουσίες, θα περίμενε κανείς να έχουν κυτταροπροστατευτική δράση. Ο μηχανισμός που δρουν δεν είναι ακριβώς γνωστός. Πιθανώς προκαλούν διαταραχές στη ροή ιόντων, αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες της μεμβράνης, αύξηση της γλυκονογένεσης, αποσύζευξη της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και διαταραχή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων, με συνέπεια κατανάλωση O₂, ATP και παραγωγή γαλακτικού [271]. Άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η απομάκρυνση της MC540 από τα μόρια αλβουμίνης του ορού, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου για σύνδεση τόσο με τα καρκινικά όσο και με τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα. Από αυτή την άποψη, δεν βελτιώνουν σημαντικά το θεραπευτικό δείκτη της MC540, καθώς δεν έχουν εκλεκτική δράση [270]. Άλλοι ερευνητές προτείνουν ότι τα σαλικυλικά αυξάνουν τη συγγένεια των κυττάρων για τα μόρια της χρωστικής γιατί αυξάνουν το διαμεμβρανικό δυναμικό και συνεπώς τη συγγένεια των κυττάρων για αρνητικά φορτισμένα μόρια χρωστικής [271].

Όλα τα αερόβια κύτταρα, ακόμη και τα καρκινικά, διαθέτουν μηχανισμούς προστασίας έναντι των οξειδωτικών συστημάτων [272]. Ο ρόλος της γλουταθειόνης στην ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων στις ελεύθερες ρίζες έχει μελετηθεί [273]. Το γλουταθείο μεταπίπτει κυκλικά από την ανηγμένη μορφή GSH στην οξειδωμένη μορφή GSSG στην οποία τα δύο τριπεπτίδια συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό. Το γλουταθείο παίζει ένα ρόλο κλειδί στην αποτοξίνωση από το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα οργανικά υπεροξειδία, που επίσης παράγονται στη φωτοδυναμική διαδικασία.

2 GSH + ROOH → GSSG + H₂O + ROH

Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την υπεροξειδάση του γλουταθείου, που φέρει συνδεδεμένο ομοιοπολικά ένα άτομο σεληνίου [274]. Κύτταρα που στερούνται γλουταθειόνης ή σεληνίου είναι πιο ευαίσθητα στη ΦΔΘ, λόγω καταστροφής της Na⁺K⁺-ΑΤΡασης [275, 276]. Έτσι, στέρωση των λευχαιμικών κυττάρων από σελήνιο με επώαση σε κατάλληλο υλικό ή χρήση ανασταλτών σύνθεσης του γλουταθείου, όπως BSO (DL-βουθειονίνη-S,R-σουλφοξιμίνη) μπορεί να βελτιώσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα της ΦΔΘ.

Τα ένζυμα που συμμετέχουν στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Επίδραση χαμηλής θερμοκρασίας μετά τη ΦΔΘ, ενισχύει τη φωτοαδρανοποίηση κυττάρων λευχαιμικών σειρών και των προγονικών κυττάρων CFU-GM [277, 278]. Όμως η δράση αυτή δεν είναι κοινή για όλες τις λευχαιμικές κυτταρικές σειρές. Έτσι, ενώ ενισχύεται η αδρανοποίηση των L1210, στα K562 η χαμηλή θερμοκρασία παραδόξως μειώνει τη σύνδεση της MC540 στα κύτταρα.

2.4 ΦΩΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΝΟΜΗΣ

Ένα σημαντικό τμήμα στη ΦΔΘ είναι το φως κατάλληλου μήκους κύματος που θα ενεργοποιήσει το φωτοευαίσθητοποιητή. Η ροή φωτός μέσα στους ιστούς μειώνεται εκθετικά με την απόσταση, καθώς απορροφάται από ενδογενή χρωμοφόρα, όπως η αιμοσφαιρίνη και σκεδάζεται μέσα στους ιστούς [204]. Έχει παρατηρηθεί ότι το μήκος κύματος φωτός με τη μεγαλύτερη διεισδυτικότητα βρίσκεται μεταξύ 600 και 900 nm [193]. Κατά μέσο όρο η διεισδυτικότητα είναι 1 έως 3 mm στα 630 nm, μήκος κύματος που χρησιμοποιείται κατά τη ΦΔΘ με φωτοφρίνη.

Το πρόβλημα αυτό δεν αφορά την *ex vivo* κάθαρση μυελού των οστών, αφού η ΦΔΘ γίνεται απευθείας στα κύτταρα και από το μόσχευμα έχουν απομακρυνθεί τα ερυθροκύτταρα που περιέχουν αιμοσφαιρίνη. Έτσι η MC540 που έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για το σκοπό αυτό, έχει δύο κύματα απορρόφησης, ένα μικρότερο στα 502 nm

και ένα μεγαλύτερο στα 532 nm και για την ενεργοποίησή της έχουν χρησιμοποιηθεί είτε λευκό φως είτε Argon Laser [193].

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε λευκό φως και απλές πηγές φωτός, όπως προβολέας διαφανειών και λυχνίες τόξων αερίου ξένου. Τα τελευταία χρόνια όμως άρχισε να διαδίδεται η χρήση του Laser χρωστικής αντλούμενου από Laser αργού [279]. Ο όρος Laser προκύπτει από τα αρχικά των λέξεων light amplification by stimulated emission of radiation.

Τα πλεονεκτήματα της μονοχρωματικής ακτινοβολίας είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο μήκος κύματος ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική ενέργεια που παράγεται από την ακτινοβολία ευρέως φάσματος. Είναι γνωστό ότι η χρήση λευκού ή πράσινου φωτός υψηλής έντασης είναι μεταλλαξιογόνος [259]. Οι ιδιότητες του Laser έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη χειρουργική καθώς διαθέτουν δέσμη πολύ συνεκτική που μπορεί να κατευθυνθεί στα σημεία που ενδιαφέρουν ή να εστιαστεί σε πολύ μικρή δέσμη μέσω φακών ή μικροσκοπίων. Επιπλέον με τη χρήση εύκαμπτων οπτικών ινών, η δέσμη του Laser μπορεί να κατευθυνθεί ακόμη και σε σημεία μακριά από την επιφάνεια, όπως για παράδειγμα ο γαστρεντερικός σωλήνας [193, 228].

Η επίδραση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας στους ιστούς περιλαμβάνει θερμικά φαινόμενα όπως πήξη (μετουσίωση πρωτεϊνών σε υψηλές θερμοκρασίες, περίπου 60° C) και ατμοποίηση (στους 100° C) και μη θερμικά φαινόμενα, δηλαδή φωτοχημικά και φωτομηχανικά φαινόμενα.

Μερικά μειονεκτήματα της χρήσης Laser είναι το υψηλό κόστος, το μεγάλο μέγεθος τους και οι δυσκολίες συντήρησης των συστημάτων [193, 280].

Το Laser αργού (Argon pumped dye Laser) είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο Laser στην ιατρική. Έχει χρησιμοποιηθεί για τη διέγερση της αιματοπορφυρίνης σε κύμα εκπομπής 630 nm. Το Argon Laser 514 nm χρησιμοποιείται για τη διέγερση ροδαμίνης 123 (511 nm) και μεροκυανίνης 540 (532 nm) [193].

Δοσιμετρία φωτός

Ως δοσιμετρία αναφέρεται ο υπολογισμός της βέλτιστης ποσότητας φωτός που μεταφέρεται στη πάσχουσα περιοχή [228]. Ο απαιτούμενος χρόνος έκθεσης για

καταστροφή του όγκου εξαρτάται από την ισχύ του Laser σε Watts, το ρυθμό δόσης που μετριέται σε Watts/cm² και τη δόση φωτός σε Joule /cm². Η σχέση εκφράζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Χρόνος έκθεσης (Sec)} = \frac{\text{δόση φωτός (J/cm }^2)}{\text{ρυθμός δόσης (W/cm }^2)}$$

2.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΦΛΘ ΣΤΟΥΣ ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ

Η χρήση των φωτειναισθητοποιητών στην ογκολογία έχει δύο βασικές εφαρμογές: τη φωτοδιαγνωστική απεικόνιση και τη φωτοδυναμική θεραπεία.

2.5.1 Φωτοδιαγνωστική απεικόνιση [193]

1α) Φασματοσκοπία Laser

Η ανάπτυξη στη σύγχρονη τεχνολογία Laser και τη σπεκτροσκοπία έχει κάνει δυνατή την αναγνώριση χημικών και φυσικών ιδιοτήτων των ιστών. Η μονοχρωματική ακτινοβολία χαμηλής ισχύος επάγει φθορισμό στους ιστούς, χωρίς να προκαλεί βλάβη (Laser induced fluorescence spectroscopy, LIF). Διαφορές στο φάσμα φθορισμού μεταξύ των φυσιολογικών και καρκινικών ιστών έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση καρκίνου του πνεύμονος και του μαστού.

1β) Φθορισμός Laser χρωστικών (Laser dyes fluorescence)

Χρωστικές όπως τα παράγωγα αιματοπορφυρίνης και η ροδαμίνη 123 συνδέονται εκλεκτικά με καρκινικά κύτταρα και φθορίζουν επιτρέποντας την ανίχνευσή τους.

1γ) Σημασμένα μονοκλωνικά αντισώματα

Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι καρκινικών δεικτών, σημασμένα με χρωστική, διεγείρονται από μονοχρωματική ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, επιτρέποντας την εντόπιση ακόμη και μικρού αριθμού καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένα σημεία (μικρομεταστάσεις).

2.5.2 Φωτοδυναμική θεραπεία

Δέρμα

Κακοήθειες όπως το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα του δέρματος, το ακανθοκυτταρικό επιθηλίωμα, το κακόηθες μελάνωμα, το σάρκωμα Kaposi και η σπογγοειδής μυκητίαση έχουν αντιμετωπιστεί με ΦΔΘ με ενθαρρυντικά αποτελέσματα [228]. Επίσης έχει εφαρμοστεί σε δερματικές μεταστάσεις. Σε μερικές περιπτώσεις επιφανειακών βλαβών, ο φωτοευαισθητο-ποιητής μπορεί να εφαρμοστεί τοπικά [196].

Βρογχοπνευμονικοί όγκοι

Ενδοσκοπική ΦΔΘ για τη θεραπεία βρογχικού καρκινώματος εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1980. Η ΦΔΘ έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην παρηγορητική αντιμετώπιση προχωρημένου καρκίνου που αποφράζει μεγάλους βρόγχους με σχετική επιτυχία [196, 228, 281].

Γαστρεντερικό σύστημα

ΦΔΘ έχει εφαρμοστεί σε καρκίνο οισοφάγου και πρώιμο γαστρικό καρκίνωμα [196, 282, 283] με πολύ καλά αποτελέσματα. Στη θεραπεία του καρκίνου του ορθού οι ενδείξεις είναι προς το παρόν περιορισμένες και τα αποτελέσματα όχι και τόσο ενθαρρυντικά [196]. Πάντως σε μία προκλινική μελέτη, διαπιστώθηκε ότι τα παράγωγα αιματοπορφυρίνης κατά τη ΦΔΘ μειώνουν την προσκολλητικότητα των καρκινικών κυττάρων, γεγονός πολύ σημαντικό όσον αφορά την ικανότητά τους για μετάσταση [284].

Ουροποιητικό σύστημα

Στο πεδίο αυτό η ΦΔΘ έχει δώσει τα πιο θεαματικά αποτελέσματα. Έχει αναφερθεί για το μη διηθητικό καρκίνωμα in situ της ουροδόχου κύστης πλήρης ίαση σε ποσοστά 47-83% [206].

Γυναικολογία

Έχει εφαρμοστεί σε ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα του τραχήλου και του κόλπου . Πλήρης ίαση έχει αναφερθεί σε ποσοστό 33-58% [196, 206].

Κεφαλή και τράχηλος

Αρχικά εφαρμόστηκε για παρηγορητική θεραπεία σε περιπτώσεις που δεν απαντούσαν στη κλασσική θεραπεία. Λόγω της φτωχής διείσδυσης των ιστών με την επιφανειακή ακτινοβολήση, εφαρμόστηκε εμφύτευση οπτικών ινών μέσα στον όγκο. Πολύ καλά αποτελέσματα επιτεύχθηκαν στην αντιμετώπιση πρώιμου καρκίνου των βλενογόνων και του λάρυγγος, ιδιαίτερα στην παπιλωμάτωση του λάρυγγος [196, 228, 285].

Οφθαλμός

Το κακόηθες μελάνωμα του χοριοειδούς και το ρετινοβλάστωμα έχουν απαντήσει καλά στη ΦΔΘ [196]. Μία άλλη εφαρμογή είναι ο έλεγχος της επιθηλιακής υπερπλασίας του φακού μετά από εγχείρηση καταρράκτη, ενώ τελευταία έχει χρησιμοποιηθεί στην αντιμετώπιση της εκφύλισης της ωχράς κηλίδος [286].

Εγκέφαλος

Κλινικές μελέτες που αφορούν ασθενείς με όγκους του εγκεφάλου, όπως γλοιοβλάστωμα, αστροκύτωμα και μεταστατικοί όγκοι, έχουν αναφερθεί είτε με φωτοακτινοβολήση επιφανειακή είτε με εμφύτευση οπτικών ινών στερεοτακτικά ή χειρουργικά. Ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να χορηγηθεί τοπικά ή ενδοφλέβια [196, 206].

2.6 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΦΔΘ ΣΤΗΝ ΚΑΘΑΡΣΗ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

2.6.1 Προκλινικά δεδομένα

Η MC540, είναι ο φωτοευαισθητοποιητής, που έχει μελετηθεί εκτενώς σε προκλινικά μοντέλα. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν λάμπες λευκού φωτός ως πηγή ακτινοβολίας. Παρατηρήθηκε εκσεσημασμένη διαφορά ανάμεσα στην επιβίωση λευχαιμικών και κυττάρων λεμφώματος από κυτταρικές σειρές και τα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Κυτταρικές σειρές λευχαιμικών και κυττάρων λεμφώματος είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στην MC540 φωτοακτινοβολία και μειώνονται κατά 4-8 log [50, 287-291] ενώ τα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα επιβιώνουν ικανοποιητικά. Στον ποντικό, παρατηρούνται διαφορετικές ευαισθησίες στις διάφορες τάξεις των προγονικών κυττάρων που σχετίζονται με το αναπτυξιακό τους στάδιο [292]. Έτσι τα όψιμα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς (CFU-E) είναι τα πιο ευαίσθητα κύτταρα και ακολουθούν τα πρώιμα BFU-E, τα προγονικά κύτταρα των μεγακαρυοκυττάρων (CFU-Meg), τα κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες στο σπλήνα ποντικού την 7η ημέρα (7-day-CFU-S), τα προγονικά κύτταρα της κοκκιοκυτταρικής/μακροφαγικής σειράς (CFU-GM) και τα κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες στο σπλήνα ποντικού την 11η ημέρα (11-day-CFU-S). Αυτές οι διαφορετικές ευαισθησίες στη ΦΔΘ, μπορεί να αντανακλούν διαφορετική συγγένεια ή ικανότητα σύνδεσης με τη χρωστική ή ακόμη και διαφορές στην ενδογενή ευαισθησία στη δράση των τοξικών παραγώγων του οξυγόνου.

Πειράματα σε ποντίκια στα οποία είχε χορηγηθεί θανατηφόρος δόση ακτινοβολίας, και έγινε διάσωση με μυελό, ο οποίος περιείχε λευχαιμικά κύτταρα σε ποσοστό 1 έως 10%, έδειξαν ότι αν στο μυελό είχε προηγηθεί κάθαρση με MC540 φωτοακτινοβολία, τα ποντίκια επιβίωναν και παρέμεναν ελεύθερα νόσου. Αντίθετα τα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε μυελός χωρίς κάθαρση κατέληξαν από την πάθηση [252].

Τα κύτταρα των συμπαγών όγκων είναι λιγότερο ευαίσθητα στη ΦΔΘ με MC540. Εξάιρεση αποτελούν τα κύτταρα του νευροβλαστώματος καθώς παρουσιάζουν κοινές ιδιότητες στη μεμβράνη τους με τα νευρωνικά κύτταρα. Όπως είναι γνωστό, η MC540 συνδέεται με τα ηλεκτρικά διεγερόμενα κύτταρα, όπως τα νευρωνικά κύτταρα [205].

Μελέτες σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού [293] και ανθρώπου [294, 295] έδειξαν μεγαλύτερη ευαισθησία, συγκριτικά με τα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Μεταμόσχευση ακτινοβολημένων ποντικών με μίγματα φυσιολογικών κυττάρων μυελού και νευροβλαστώματος αφού είχαν υποβληθεί σε συνδυασμό MC540 και ακτινοβολία με λευκό φως, οδήγησε σε επιβίωση των πειραματοζώων, ελεύθερων νόσου [293]. Σε μία συγκριτική μελέτη, η αποτελεσματικότητα της κάθαρσης του μυελού με MC540 και λευκό φως είναι ανάλογη με τη χρήση μαφωσφαμίδης [289].

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η ΦΔΘ φαίνεται να πλεονεκτεί έναντι των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν πολυφαρμακευτική αντοχή (γονίδιο MDR) [197, 198].

Πρόσφατα μελετήθηκε η επίδραση της ΦΔΘ στην ικανότητα των κυττάρων του μυελού να εγκαταστήσουν και να διατηρήσουν καλλιέργειες μακράς διάρκειας (τύπου Dexter) [296]. Παρατηρήθηκε εξαφάνιση των λιποκυττάρων από το στρώμα καθώς και μείωση των κυττάρων που σχηματίζουν αποικίες ινοβλαστών (CFU-F) κατά 2 log σε αντίθεση με τα CFU-GM και BFU-E που είναι λιγότερο ευαίσθητα. Δεν είναι γνωστό αν αυτή η μείωση οφείλεται σε βλάβη των αρχέγονων κυττάρων (stem cell) ή των κυττάρων του στρώματος.

Σε μία άλλη προκλινική μελέτη μελετήθηκε η επίδραση της ΦΔΘ στη δραστηριότητα των T και B-λεμφοκυττάρων καθώς αυτά τα κύτταρα είναι σημαντικά στην αιμοποιητική και λεμφοποιητική αποκατάσταση κατά τη μεταμόσχευση του μυελού. Παρατηρήθηκε σχετική αναστολή των T και B λεμφοκυττάρων, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την ανοσολογική αποκατάσταση κατά την αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού των οστών [297]. Στα τέλη της δεκαετίας του '80 ξεκίνησε η χρήση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας (Laser) με σκοπό να εξαλειφθεί η μη ειδική θερμική βλάβη που προκαλείται στα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα από το λευκό φως. Έχει βρεθεί ότι η έκθεση των κυττάρων σε λευκό φως χωρίς φωτοευαισθητοποιητή αναστέλλει τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς σειράς [292] και τα κύτταρα νευροβλαστώματος κατά 25-65% [294]. Ο μηχανισμός αυτού του φωτοτοξικού φαινομένου είναι ανεξάρτητος από τη χρωστική και μπορεί να οφείλεται σε μικρές ποσότητες υπεριώδους ακτινοβολίας που εκπέμπεται από τις πηγές λευκού φωτός. Είναι γνωστό ότι το φως μπορεί να προκαλέσει φωτοτοξικά προϊόντα σε υλικά καλλιέργειας ιστών και να προκαλέσει γρήγορα μη αναστρέψιμη βλάβη.

Οι Gulliya και συν. [298], πρώτοι χρησιμοποίησαν Argon Laser 514 nm σε συνδυασμό με MC540 και αναφέρουν 99.9999% θανάτωση λευχαιμικών κυττάρων HL-60, ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα μυελού επιβιώνουν σε ποσοστό 55%. Παρουσία ανθρώπινης λευκωματίνης επιτεύχθηκε καλύτερη επιβίωση των φυσιολογικών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, αλλά παράλληλα απαιτήθηκε μεγαλύτερη δόση ακτινοβολίας για να θανατωθούν τα λευχαιμικά κύτταρα [299]. Οι Λυδάκη και συν. μελέτησαν κύτταρα μυελού από παιδιά με οξεία λευχαιμία στην αρχική διάγνωση, οξεία λευχαιμία σε ύφεση, νευροβλάστωμα και φυσιολογικά παιδιά και διαπίστωσαν και αυτοί την προστατευτική δράση της λευκωματίνης τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα νεοπλασματικά κύτταρα [300,301].

Οι Gulliya και συν. επίσης μελέτησαν τη δράση της ιντερφερόνης σε λευχαιμικά κύτταρα και κύτταρα λεμφώματος που υποβλήθηκαν σε ΦΔΘ με MC540 και Laser [302]. Η ιντερφερόνη σε μικρές δόσεις βελτίωσε την επιβίωση τόσο των λευχαιμικών όσο και των φυσιολογικών κυττάρων του μυελού, ενώ σε μεγαλύτερες δόσεις δεν την επηρεάζει. Επίσης δεν επηρεάζει την επιβίωση των κυττάρων λεμφώματος. Μία πιθανή εξήγηση για τη δράση αυτή, είναι ότι αλλάζει τη συγκέντρωση των γλυκοπρωτεϊνών και τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενος, η ΦΔΘ με λευκό φως επηρεάζει την ανοσολογική κατάσταση του μοσχεύματος. Η δράση αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί η μεταμόσχευση μυελού γίνεται σε ασθενείς που είναι ανοσοκατεσταλμένοι λόγω της προηγηθείσας χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας. Σε μία μελέτη της δράσης του Argon Laser 514 nm, χωρίς τη παρουσία φωτοευαισθητοποιητή, στην αναστολή μετανάστευσης μακροφάγων (macrophage migration inhibition assay) και στην απάντηση στον παράγοντα αναστολής μετανάστευσης μακροφάγων (macrophage inhibition factor, MIF) σε κύτταρα μυελού, φαίνεται ότι δεν επηρεάζονται σημαντικά [303]. Η δοκιμασία αναστολής μετανάστευσης των μακροφάγων χρησιμοποιήθηκε ως τεστ κυτταρικής ανοσίας και ο MIF πιστεύεται ότι κατευθύνει τα μακροφάγα στο σημείο φλεγμονής *in vivo*. Από αυτή την άποψη η χρήση του Laser πιθανώς υπερτερεί του λευκού φωτός.

Μία παραλλαγή της μεθόδου, περιλαμβάνει τη χορήγηση προενεργοποιημένης MC540 σε καρκινικά κύτταρα, δηλαδή αφού πρώτα ακτινοβοληθεί [256, 304-306]. Παρατηρήθηκε αναστολή των καρκινικών κυττάρων από διάφορες κυτταρικές σειρές

κατά 70-90%, με 85% επιβίωση των φυσιολογικών μονοκυρήνων κυττάρων του μυελού και 41% επιβίωση των προγονικών CFU-GM. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση της χρωστικής μπορεί να επιτευχθεί έως 99.9% θανάτωση των HL-60 λευχαιμικών κυττάρων. Η προενεργοποιημένη MC540 είναι σταθερή και διατηρεί την κυτταροτοξική της δραστηριότητα, για τουλάχιστον 30 ημέρες, όταν αποθηκεύεται στους -135°C .

Ένα πλεονέκτημα, της προενεργοποιημένης MC540, είναι η δυνατότητα για συστηματική χορήγηση και επαναληπτικές δόσεις. Ο μηχανισμός δράσης είναι οξυγονοεξαρτώμενος και μεσολαβείται μέσω σχηματισμού δραστικών ριζών οξυγόνου, αν και δεν πρέπει να αποτελούν αποκλειστικούς μεσολαβητές, καθώς το μονήρες οξυγόνο έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής (της τάξης των 10^{-9} - 10^{-6} sec). Τα κύτταρα που επωάζονται με την προενεργοποιημένη MC540, παρουσιάζουν στοιχεία, ενδεικτικά απόπτωσης [307, 308]. Η μέθοδος αυτή έχει μελετηθεί και με άλλους φωτοευαισθητοποιητές με παρόμοια αποτελέσματα.

2.6.2 Κλινικά δεδομένα:

Η MC540 άρχισε να χρησιμοποιείται ως παράγοντας κάθαρσης του μυελού σε κλινικές μελέτες φάσης I το 1986. 21 ασθενείς με οξεία λεμφοκυτταρική και μη-λεμφοκυτταρική λευχαιμία, νόσο Hodgkin και λέμφωμα μη-Hodgkin συμμετείχαν αρχικά στη μελέτη. Από αυτούς οι εννέα πέθαναν πρώιμα από υποτροπή ή βαρεία λοίμωξη, ηπατική φλεβοαποφρακτική νόσο ή οξεία καρδιακή ανεπάρκεια. Οι περισσότεροι από τους ασθενείς παρουσίασαν καθυστέρηση εγκατάστασης του μοσχεύματος (απόλυτος αριθμός πολυμορφοκυρήνων $> 500/\mu\text{l}$ την 23^η έως 67^η ημέρα). Τρεις από τους ασθενείς έλαβαν και δεύτερη έγχυση με μη καθαρισμένο μυελό. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια από τη χορήγηση του καθαρισμένου μυελού. Η καθυστέρηση στην εγκατάσταση του μοσχεύματος πιθανώς να μην οφείλεται σε τοξικότητα της ΦΔΘ, αλλά σε κακή ποιότητα του μοσχεύματος από τη προηγηθείσα χημειοθεραπεία [194, 309].

3. ΚΥΤΤΑΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Η αντικαρκινική χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία έχουν εξελιχθεί τα τελευταία χρόνια και η επιβίωση των ασθενών έχει βελτιωθεί σημαντικά. Παρόλα αυτά, η θεραπεία του καρκίνου συχνά υπόκειται σε σημαντικούς περιορισμούς καθώς επιτίθεται τόσο στα νεοπλασματικά όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα. Έτσι η εμφάνιση απειλητικών για τη ζωή των ασθενών αντιδράσεων, όπως η πανκυτταροπενία και η τοξικότητα στα φυσιολογικά όργανα, δεν επιτρέπουν τη χορήγηση πλήρων δόσεων χημειοθεραπείας, γεγονός που είναι πιθανόν να οδηγήσει σε μείωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας ή σε υποτροπή της νεοπλασματικής νόσου [310]. Έχει επίσης αναγνωριστεί η σημασία των δευτεροπαθών κακοηθειών από τα αντικαρκινικά θεραπευτικά σχήματα [311].

Η χορήγηση υψηλής δόσης χημειοθεραπείας και η διάσωση με αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού ή περιφερικών αρχέγονων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων έχουν βελτιώσει την επιβίωση από πολλά κακοήγη νοσήματα [1-4, 312-315]. Η κάθαρση του μυελού από τα υπολειπόμενα νεοπλασματικά κύτταρα, αν και έχει αμφισβητηθεί, φαίνεται πως σε πολλές περιπτώσεις μειώνει το κίνδυνο των υποτροπών. Ταυτόχρονα όμως, καθυστερεί την εγκατάσταση του μυελικού μοσχεύματος και την αιμοποιητική αποκατάσταση και είναι υπεύθυνη για αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων, αιμορραγικών επιπλοκών, παρατεταμένο χρόνο νοσηλείας, αυξημένες απαιτήσεις σε μεταγγίσεις παραγώγων αίματος και αιμοπεταλίων και αυξημένο κόστος [316].

Η ανάγκη για αντιμετώπιση αυτών των σοβαρών προβλημάτων, έχουν στρέψει την έρευνα προς την ανεύρεση ουσιών με κυτταροπροστατευτική δράση. Οι κυτταροπροστατευτικές ουσίες, έχουν την ιδιότητα ότι προστατεύουν εκλεκτικά τους φυσιολογικούς ιστούς και κύτταρα από τις βλαπτικές επιδράσεις της χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας, χωρίς να επηρεάζουν την αντικαρκινική τους δράση. Με τον τρόπο αυτό βελτιώνουν την ανοχή των ασθενών στη θεραπεία και προσφέρουν βελτίωση της ποιότητας ζωής, επιτρέπουν εντατικοποίηση του δοσολογικού σχήματος, βελτίωση της απάντησης στη θεραπεία και μείωση του κόστους και των υποστηρικτικών μέτρων για την αντιμετώπιση των επιπλοκών της θεραπείας [310].

Ένας ιδανικός κυτταροπροστατευτικός παράγοντας πρέπει να διαθέτει τις ακόλουθες ιδιότητες [317]:

1) Εκλεκτικότητα: Προστασία των φυσιολογικών κυττάρων, όχι όμως και των καρκινικών, από τη τοξικότητα της θεραπείας.

2) Ευρύ φάσμα: Προστασία πολλών διαφορετικών ιστών από τη τοξικότητα. Προστασία έναντι πολλών κυτταροτοξικών παραγόντων.

3) Μη-τοξικότητα.

3.1 Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη αναφορά έγινε από τον Patt και συν. το 1949 που έδειξαν ότι χορήγηση του σουλφουδρυλικού αμινοξέος κυστεΐνη σε ποντίκια, τα προστατεύει από θανατηφόρο δόση ακτινοβολίας [318]. Το 1959, ξεκίνησε μία ερευνητική μελέτη στο Ινστιτούτο Στρατιωτικής Έρευνας Walter Reed των ΗΠΑ για την ανακάλυψη παραγόντων που θα προστάτευαν τους στρατιώτες από την έκθεσή τους στην ακτινοβολία, σε ενδεχόμενη πυρηνική σύρραξη. Από περίπου 4400 δυνητικά προστατευτικές χημικές ουσίες που ελέγχθηκαν, επιλέχτηκε η Αμιφοστίνη, ως η πιο αποτελεσματική και λιγότερο τοξική. Στη δεκαετία του '80, αναγνωρίστηκε η σημασία της στη χημειοθεραπεία του καρκίνου και άρχισαν οι πρώτες κλινικές μελέτες, για να εγκριθεί τελικά από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων το 1996.

3.2 Κυτταροπροστατευτικές ουσίες

Μερικές από τις ουσίες που έχουν μελετηθεί και εφαρμοστεί για την προστασία από τη τοξικότητα της αντικαρκινικής χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας, εκτός από την Αμιφοστίνη, είναι οι ακόλουθες:

- L-κυστεΐνη
- N-ακετυλ- L-κυστεΐνη
- D-πενικιλλαμίνη
- Γλουταθειόνη
- Θειορεδοξίνη

- Θειοθειϊκό νάτριο (sodium thiosulphate, STS)
- Δινατριουχο-διαιθυλ-διθειο-καρβαμικό (Disodium diethyl-dithio-carbamate, DDTC)
- mesna (2-mercapto-ethane sulphonate sodium)
- BNP-7787 (dimesna)
- L-μεθειονίνη
- α-λιποϊκό οξύ
- 2-μερκαπτοαιθανόλη
- Βιταλεθίνη
- Κυστεαμίνη
- Μεταλλοθειονίνες
- Org 2766
- Δεξραζοζάνη (ICRF-187)
- Βιταμίνη E

Στη συνέχεια θα αναφερθούν συνοπτικά η κλινική σημασία και η χρήση μερικών από τις πιο σημαντικές ουσίες.

3.2.1 DDTC

Είναι μεταβολίτης της δισουλφιράμης και έχει χρησιμοποιηθεί ως αντίδοτο σε δηλητηρίαση με νικέλιο και κάδμιο. Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την προστασία από τη νεφροτοξικότητα και μυελοτοξικότητα των πλατινών. Είναι χηλωτικός παράγοντας και απομακρύνει τις πλατίνες από τους ιστούς παρουσιάζει όμως σημαντική τοξικότητα [319-322]. Πειράματα σε καλλιέργειες μακράς διάρκειας μυελικών κυττάρων ποντικού *in vitro*, έχουν δείξει ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του στρώματος μέσω ενός παράγοντα με αυξητική αιμοποιητική δράση [323].

3.2.2 Sodium Thiosulphate (STS)

Είναι μία θειόλη που έχει χρησιμοποιηθεί ως αντίδοτο σε δηλητηρίαση με κυανίδια. Στις πρώτες κλινικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι πιθανώς προστατεύει από τη νεφροτοξικότητα των πλατινών. Όμως δρα ως ανταγωνιστικός ανταγωνιστής και μειώνει την αντικαρκινική τους δράση. Επίσης νεώτερες κλινικές μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν

προστασία έναντι της νεφροτοξικότητας, νευροτοξικότητας, ωτοτοξικότητας και μυελοτοξικότητας των πλατινών [319, 322].

3.2.3 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι η πιο σημαντική ενδοκυτταρική θειόλη και ο ρόλος της στη θεραπεία του καρκίνου και την κυτταροπροστασία είναι πολλαπλός. Προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα από τη τοξικότητα πολλών κυτταροτοξικών φαρμάκων, όπως οι πλατίνες, τα ανάλογα κυκλοφωσφαμίδης και οι ανθρακυκλίνες, αλλά παρατηρείται και σε ανθεκτικά νεοπλασματικά κύτταρα. Έτσι νεοπλασματικά κύτταρα πλούσια σε γλουταθειόνη, είναι ανθεκτικά σε διάφορα αντινεοπλασματικά φάρμακα καθώς και στη κυτταρόλυση από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα από την καταστροφική επίδραση της ακτινοβολίας, μέσω αδρανοποίησης δραστικών ριζών οξυγόνου και μηχανισμούς κυτταρικής επιδιόρθωσης. Παραδόξως, μεσολαβεί στην παραγωγή τοξικών μεταβολιτών από την αζαθειοπρίνη και την βλεομυκίνη και ενισχύει την κυτταρική πρόσληψη της μεθοτρεξάτης [321, 324, 325].

3.2.4 Mesna

Είναι μία θειόλη που έχει χρησιμοποιηθεί για την προστασία από αιμορραγική κυστίτιδα από την κυκλοφωσφαμίδη και τα ανάλογά της. Όμως διαθέτει σημαντική τοξικότητα, κυρίως νευροτοξικότητα και αντιδράσεις υπερευαισθησίας [321,326].

3.2.5 Θειορεδοξίνη

Είναι μία ενδοκυτταρική θειόλη που προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα από το οξειδωτικό στρες που προκαλούν κυτταροτοξικά φάρμακα, όπως οι πλατίνες και οι αλκυλιούντες παράγοντες [325, 327].

3.2.6 Org 2766

Είναι ανάλογο της ACTH με νευροτροφικές δράσεις. Προστατεύει από τη νευροτοξικότητα των πλατινών. Φαίνεται ότι διεγείρει το σχηματισμό νευρικών ινών σε σημεία βλάβης [320, 322].

3.2.7 Δεξραζοξάνη (ICRF-187)

Είναι χηλωτικός παράγοντας του ενδοκυτταρικού σιδήρου. Έχει χρησιμοποιηθεί για την προστασία από την καρδιοτοξικότητα από ανθρακυκλίνες [328].

3.3 ΑΜΙΦΟΣΤΙΝΗ

Η Αμιφοστίνη (WR-2721, εμπορική ονομασία Ethyol) είναι μια οργανική θειοφωσφορική ένωση, που αποφωσφορυλιώνεται στο δραστικό μεταβολίτη της WR-1065. Το χημικό όνομά της είναι αιθανεθιόλη (S-2-[3-αμινοπροπυλ-αμινο] αιθυλ-φωσφοροθειοϊκό οξύ) και έχει μοριακό βάρος 214.2. Ο χημικός του τύπος απεικονίζεται στο σχήμα 1.

Σχήμα 1. Χημικός τύπος της Αμιφοστίνης και του δραστικού μεταβολίτη.



WR-2721



WR-1065

3.3.1 Φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική

Η Αμιφοστίνη είναι προφάρμακο που μετατρέπεται στον ενεργό μεταβολίτη WR-1065 από το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, το οποίο βρίσκεται φυσιολογικά στα τριχοειδή και τα αρτηρίδια, αλλά και σε άλλα φυσιολογικά κύτταρα. Η δράση του εξαρτάται κυρίως από το pH του μικροπεριβάλλοντος. Οι όγκοι συνήθως έχουν αναερόβιο μεταβολισμό και ανεπαρκή αγγείωση. Έτσι περιέχουν μικρές ποσότητες αλκαλικής φωσφατάσης που αδρανοποιείται από το χαμηλό pH [329, 330]. Επιπρόσθετα, το WR-1065 μεταφέρεται μέσα στα φυσιολογικά κύτταρα με διευκολυνόμενη διάχυση ενώ στα καρκινικά με παθητική διάχυση και βραδύτερο ρυθμό [331, 332]. Το WR-1065 συμμετέχει σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και μεταβολίζεται περαιτέρω στο συμμετρικό δισουλφίδιο WR-33278, κυστεαμίνη, μικτά δισουλφίδια που περιέχουν L-κυστεΐνη, L-μεθειονίνη και πρωτεΐνες που περιέχουν θειόλες [310].

Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση, η Αμιφοστίνη απομακρύνεται γρήγορα από το πλάσμα, με διφασική αποδόμηση, με χρόνο ημιζωής α ($t_{1/2\alpha}$) λιγότερο από 1 λεπτό και χρόνο ημιζωής β 8.8 λεπτά ($t_{1/2\beta}$). Περισσότερο από 90% του φαρμάκου απομακρύνεται από το πλάσμα εντός 6 λεπτών. Ο γρήγορος ρυθμός κάθαρσης από το πλάσμα οφείλεται στην περιφερική ενεργοποίηση και πρόσληψη του WR-1065 από τους ιστούς. Τα φαρμακοκινητικά δεδομένα προτείνουν ότι η Αμιφοστίνη πρέπει να χορηγείται λίγο πριν την εφαρμογή της χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας [333].

3.3.2 Μηχανισμοί κυτταροπροστασίας

Ο κύριος μεταβολίτης που ασκεί κυτταροπροστατευτική δράση είναι το WR-1065. Δρα ως ισχυρός συλλέκτης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αδρανοποιεί δραστικές ρίζες, π.χ. υδροξυλικές ρίζες, ως δότης υδρογόνου, προστατεύοντας το DNA και συμμετέχοντας σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης [330, 334, 335]. Επίσης προλαμβάνει ή και αναστρέφει το σχηματισμό συμπλόκων, μεταξύ DNA και πλατινών [336]. Ως πυρηνόφιλο, συνδέεται με τα θετικά φορτισμένα ιόντα των αλκυλιούντων παραγόντων και τους αδρανοποιεί [330]. Έχει βρεθεί ότι επηρεάζει το μεταβολισμό του οξυγόνου στα κύτταρα και πιθανώς τη διαθεσιμότητά του στους ιστούς, προκαλώντας τοπική υποξία, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει την προστασία από οξυγονοεξαρτώμενες κυτταροτοξικές διαδικασίες, όπως η ακτινοθεραπεία και η φωτοδυναμική θεραπεία [334, 335, 337-339].

Το συμμετρικό δισουλφίδιο WR-33278 παρουσιάζει δομική ομοιότητα με την πολυαμίνη, σπερμίνη [340]. Οι πολυαμίνες είναι πολυκατιονικά μόρια που βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα και συμμετέχουν σε ενδοκυτταρικές διαδικασίες που επηρεάζουν τη σταθεροποίηση της χρωματίνης, τη σύνθεση DNA, τη δραστηριότητα κινασών, την έκφραση γονιδίων και τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών [341]. Το WR-33278 ανταγωνίζεται για τις ίδιες θέσεις σύνδεσης με τις πολυαμίνες στο DNA και αναστέλλει τη σύνθεσή του επιτρέποντας στο κύτταρο να επιδιορθώσει τα κατεστραμμένα από την χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία τμήματα DNA. Η πολυαμίνη σπερμίνη, ενισχύει τη χαλάρωση του DNA και τη σύνδεση των τοποϊσομερασών, που αναστέλλουν τη σύνθεση του DNA και συμμετέχουν σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Η τοποϊσομεράση I έχει

διορθωτικό ρόλο ενώ η τοποϊσομεράση II συμμετέχει μάλλον στη σύνθεση του DNA [342]. Έχει βρεθεί ότι το WR-1065 ενισχύει τη δράση της τοποϊσομεράσης I [343] ενώ αναστέλλει τη τοποϊσομεράση IIa και συνεπώς τη σύνθεση του DNA [344, 345]. Έτσι η Αμιφοστίνη διαθέτει αντικαρκινογόνο [346] και αντιμεταλλα-ξιογόνο δράση [347]. Προστατεύει το γονίδιο της φωσφοριβοσυλ-τρανσφεράσης υποξανθίνης-γουανίνης (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HPRT locus) [348, 349] και επίσης έχει αναφερθεί ότι καταστέλλει το ογκογονίδιο c-myc [350].

Μία άλλη σημαντική ιδιότητα της Αμιφοστίνης είναι ότι αναστέλλει την απόπτωση των κυττάρων, δηλαδή τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η απόπτωση χαρακτηρίζεται από μερικές μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές στο κύτταρο, όπως σχηματισμός φυσαλλίδων στην κυτταρική και πυρηνική μεμβράνη, διαταραχή της μεμβρανικής διαβατότητας, συμπύκνωση χρωματίνης, διάσπαση DNA και διαταραχή της σύνθεσης ATP. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο δρα η Αμιφοστίνη δεν είναι γνωστός. Πιθανώς δρα, μέσω σύνδεσης με το DNA και μεταβολής της δομής της χρωματίνης (δράσεις τύπου πολυαμίνης) [351, 352]. Φαίνεται επίσης ότι αναστέλλει ένζυμα υπεύθυνα για την αποδόμηση του DNA, όπως οι ενδονουκλεάσες. Τέλος μπορεί να δρα άμεσα ή έμμεσα, αναστέλλοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων, μέσω ρύθμισης μεταφοράς κατιόντων όπως το ασβέστιο. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων οδηγεί σε αυξημένη εισροή ασβεστίου μέσα στο κύτταρο, επηρεάζοντας τη διαβατότητα της μεμβράνης [352]. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η φωτοδυναμική θεραπεία με MC540 επάγει την απόπτωση των κυττάρων [267].

3.3.3 Προκλινικές μελέτες

Ραδιοαυτογραφικές μελέτες in vivo σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η Αμιφοστίνη προσλαμβάνεται εκλεκτικά από φυσιολογικούς ιστούς, όπως νεφροί, πνεύμονες, ήπαρ, καρδιά και σπλήνα. Η συγκέντρωση στους φυσιολογικούς ιστούς είναι 50 έως 100 φορές μεγαλύτερη από τους καρκινικούς ιστούς [310].

Η Αμιφοστίνη προστατεύει ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών ιστών όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Μόνο ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός δεν προστατεύονται καθώς η Αμιφοστίνη δεν περνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [354]. Έχει βρεθεί ότι η

Αμιφοστίνη προστατεύει τα αρχέγονα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού από την ακτινοβολία και πολλά χημειοθεραπευτικά, όπως οι μουστάρδες, πλατίνες, κυκλοφωσφαμίδη, BCNU και 5-φλουορο-ουρακίλη [329, 355, 356]. Επίσης προστατεύει από την καρδιοτοξικότητα των ανθρακυκλινών [357], καθώς και από τη νεφροτοξικότητα και νευροτοξικότητα των πλατινών [358]. Ως κυτταροπροστατευτικός παράγοντας παρουσιάζει εκλεκτικότητα και δεν επηρεάζει την αντικαρκινική δράση της χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας [355, 356, 359-361]. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 έχει γίνει εκτεταμένη προκλινική έρευνα σε πολλούς τύπους καρκίνων και για πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα [362].

Πίνακας 1. Προστασία φυσιολογικών ιστών από την Αμιφοστίνη

* Νεφροί	* Πνεύμονες
* Ωτα	* Οισοφάγος
* Περιφερικά νεύρα	* Λεπτό έντερο
* Μυελός οστών	* Παχύ έντερο
* Σιελογόνοι αδένες	* Ανοσοποιητικό σύστημα
* Στοματικός βλεννογόνος	* Όρχεις
* Καρδιά	* Ήπαρ

Οι Valeriotte και συν. αναφέρουν ότι το WR-2721 προστατεύει τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του ποντικού (CFU-S) από την δράση της μουστάρδας και παράλληλα ενισχύει την αντιλευχαιμική της δράση [363]. Παρόμοια, οι Treskes και συν. αναφέρουν ενίσχυση της αντινεοπλασματικής δράσης της καρβοπλατίνης σε ποντίκια στα οποία χορηγήθηκε Αμιφοστίνη πριν τη χημειοθεραπεία. [364]. Η Αμιφοστίνη προστατεύει φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα καθώς και φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες πνεύμονος από την πακλιταξέλη και ταυτόχρονα ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της έναντι κυττάρων μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονος [365]. Οι Meagher και συν. διεπίστωσαν ότι το WR-2721 ευαισθητοποιεί τα κύτταρα μικροκυτταρικού καρκίνου του

πνεύμονος στη δράση της MC540 κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία [366]. Ο μηχανισμός αυτής της παράδοξης δράσης δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως.

Πίνακας 2. Κατάλογος προκλινικών ερευνών για την αλληλεπίδραση της Αμιφοστίνης με διάφορες κυτταροτοξικές θεραπείες: η επώαση με Αμιφοστίνη δεν μειώνει την κυτταροτοξική δράση.

Ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (in vitro)	Θεραπεία
<ul style="list-style-type: none"> • Ωοθηκικές (PA-1, BG-1, A2780, 2780/S, 2780-CP70, OVCAR 3, OVCAR 10) • Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (REH, CEM-CCRF/MOLT-4) • Οξεία μυελογενής λευχαιμία • Καρκίνος μαστού (CAMA) • Ινοσάρκωμα • Γλοίωμα • Μελάνωμα (SK-MEL, PA01) • Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονος (A549, CALU-6, A427) • Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονος (ATCC HTB-110, HTB 120) • Ξενομοσχεύματα: καρκίνος μαστού, πνεύμονος, ωοθήκης, μελάνωμα 	<ul style="list-style-type: none"> • Βλεομυκίνη • Καρβοπλατίνη • Cis-πλατίνη • Αραβινοσίδη κυτοσίνης • Δοξορουβικίνη • Ετοποσίδη • 5-φλουορο-ουρακίλη • 4-υδροπεροξυκυκλοφωσφαμίδη
<ul style="list-style-type: none"> • Κλωνογονικές καρκινικές μελέτες: καρκίνος ουροδόχου κύστης, μαστού, μεγαλοκυτταρικός καρκίνος πνεύμονος, παγκρέατος 	<ul style="list-style-type: none"> • Παράγωγα αιματοπορφυρίνης (ΦΔΘ) • Ιδαρουβικίνη • Μεροκυανίνη 540 (ΦΔΘ) • Μελφαλάνη • Μιτομυκίνη • Μιτοξαντρόνη • Μουστάρδα • Ακτινοθεραπεία • Πακλιταξέλη • Βινπλαστίνη • Βινκριστίνη

3.3.4 Κλινικές μελέτες

Πολλές κλινικές μελέτες επιβεβαιώνουν την προστασία που παρέχει η Αμιφοστίνη έναντι στη μυελοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα, νευροτοξικότητα, οισοφαγίτιδα, ξηροστομία και βλεννογονίτιδα που προκαλούνται από τη συστηματική χημειοθεραπεία και ακτινοβολία [317]. Όσον αφορά τις βλαβερές επιδράσεις της ακτινοβολίας, φαίνεται ότι έχει ευνοϊκή επίδραση τόσο για τις πρώιμες όσο και για τις όψιμες παρενέργειες [367]. Η πιο μεγάλη τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη αφορά 242 ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών σταδίου III και IV που έλαβαν κυκλοφωσφαμίδη και cis-πλατίνη με ή χωρίς Αμιφοστίνη [368]. Οι ασθενείς που έλαβαν τον κυτταροπροστατευτικό παράγοντα παρουσίασαν σημαντικά λιγότερα επεισόδια ουδετεροπενίας ($p=0.019$) και χρειάστηκαν λιγότερες ημέρες αντιβιοτικής αγωγής ($p=0.019$). Επίσης, παρουσίασαν σε μικρότερο ποσοστό

νεφροτοξικότητα ($p=0.003$) και νευρο-τοξικότητα ($p=0.029$), ενώ η απάντηση στη θεραπεία και η επιβίωση ήταν παρόμοια στις δύο ομάδες.

Σε μία άλλη κλινική μελέτη, 25 ασθενείς με μετασταστικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος (NSCLC) στους οποίους χορηγήθηκε cis-πλατίνη, βινπλαστίνη και Αμιφοστίνη, αναφέρουν υψηλά ποσοστά απάντησης στη θεραπεία [369]. Έτσι οι ερευνητές προτείνουν μία πιθανή αλληλεπίδραση της Αμιφοστίνης με την πλατίνη και ενίσχυση της αντικαρκινικής της δράσης. Μία τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη φάσης III, σε ασθενείς με NSCLC, βρίσκεται σε εξέλιξη για να αποδείξει τη σχέση αυτή. Παρόμοια παρατήρηση έγινε σε μία άλλη κλινική μελέτη φάσης I, σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα [370].

Η χορήγηση Αμιφοστίνης σε παιδιά δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Σε κλινικές μελέτες σε παιδιά με ανθεκτικό καρκίνο φάσης I, η Αμιφοστίνη φαίνεται να βελτιώνει τη μυελοτοξικότητα από μελφαλάνη και να είναι καλά ανεκτή [311, 371, 372].

3.3.5 Αμιφοστίνη και κάθαρση μυελού των οστών

Η μαφωσφαμίδη και 4-υδροξυκυκλοφωσφαμίδη είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι φαρμακολογικοί παράγοντες στην κάθαρση του μυελού των οστών. Σε σημαντικό ποσοστό καταστρέφουν τα υπολειπόμενα καρκινικά κύτταρα. Ο ρόλος της κάθαρσης του μυελού, ιδιαίτερα στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, έχει προταθεί από αναδρομικές μελέτες της Ευρωπαϊκής Ομάδας Μεταμόσχευσης Μυελού (ECGBMT) και από τεχνικές σήμανσης με γονίδια [373]. Παρόλα αυτά έχουν στενό θεραπευτικό δείκτη καθώς είναι επίσης τοξικά στα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και μπορεί να προκαλέσουν καθυστέρηση της αιμοποιητικής αποκατάστασης με επακόλουθα λοιμώξεις, αιμορραγικές επιπλοκές, παρατεταμένη νοσηλεία και αυξημένο κόστος [316]. Σε *in vitro* μελέτες η Αμιφοστίνη, βελτιώνει την επιβίωση των αρχέγονων προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων μετά από κάθαρση με κυκλοφωσφαμίδη, διατηρώντας και την αντιλευχαιμική της δράση [355, 356] και ενισχύοντας την αντιλευχαιμική δράση της μαφωσφαμίδης [373, 374]. Τα φρέσκα λευχαιμικά κύτταρα από ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική, μυελογενή και χρόνια μυελογενή λευχαιμία, είναι πιο ευαίσθητα στην κάθαρση με μαφωσφαμίδη όταν επωαστούν με Αμιφοστίνη. Το φαινόμενο αυτό είναι εκ

πρώτης όψεως παράδοξο. Πιθανώς η λευχαιμική εκτροπή των αιμοποιητικών κυττάρων συνδέεται με κάποιου βαθμού αλλαγή στο μεταβολισμό της Αμιφοστίνης, οδηγώντας σε ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας παρά προστασία από τον αλκυκιούντα παράγοντα. Σε μία πρόσφατη μελέτη έγινε κάθαρση προϊόντος λευκαφαίρεσης με μουστάρδα με ή χωρίς Αμιφοστίνη. Η Αμιφοστίνη βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση των CFU-GM, BFU-E, CFU-Meg και LTI-IC ενώ πέτυχε μείωση των λευχαιμικών CFU-L κατά 4-6 log [375]. Η Sphall και συν. σε μια τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη σε ασθενείς με καρκίνο μαστού και λέμφωμα, που υποβλήθηκαν σε AMMO με κάθαρση με 4-υδροπεροξυκυκλοφωσφαμίδη με ή χωρίς Αμιφοστίνη, αναφέρει ταχύτερη εγκατάσταση του μοσχεύματος και μικρότερη περίοδο απλασίας στην ομάδα της Αμιφοστίνης [376, 377]. Έχει ξεκινήσει μια τυχαιοποιημένη κλινική Ευρωπαϊκή μελέτη για να διευκρινιστεί ο ρόλος της Αμιφοστίνης στην αυτόλογη μεταμόσχευση σε ασθενείς με οξεία λευχαιμία [373].

3.3.6 Αιμοποιητικές δράσεις της Αμιφοστίνης

Οι χαμηλού μοριακού βάρους θειόλες, όπως η 2-μερκαπτοαιθανόλη και η βιταλεθίνη, φαίνεται ότι ασκούν μιτογόνο *in vitro* δράση στα αρχέγονα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα [378, 379]. Ο μηχανισμός με τον οποίο ασκούν τροφική δράση οι θειόλες, πιθανώς σχετίζεται με τις ενδογενείς αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, καθώς και με την επαγωγή κυτοκινών [378]. Η αιμοποιητική δράση της Αμιφοστίνης διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στο Ερευνητικό Ινστιτούτο Walter Reed [380]. Πειράματα σε σκυλιά έδειξαν ότι μια ενδοφλέβια δόση Αμιφοστίνης οδήγησε σε αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων, των λευκοκυττάρων, του αιματοκρίτη και των αιμοπεταλίων. Ο List και συν., σε εργαστηριακές μελέτες προγονικών κυττάρων μυελού από φυσιολογικούς δότες, διαπίστωσαν ότι έκθεση σε WR-2721 ή WR-1065 ενισχύει την ικανότητα σχηματισμού αποικιών, κυρίως CFU-GEMM και BFU-E [381]. Επίσης ενισχύει το σχηματισμό CFU-GEMM από CD34+ κύτταρα και μπορεί να στηρίζει την παραγωγή προγονικών κυττάρων μυελού σε μελέτες *ex vivo* έκπτυξης, απουσία κυτοκινών. Η ικανότητα αυτή να διατηρεί την επιβίωση σε καλλιέργειες κυττάρων χωρίς την εξωγενή προσθήκη κυτοκινών, προτείνει ότι ο παράγοντας αυτός έχει άμεσες

αιμοποιητικές τροφικές δράσεις. Επιβραδύνει την κυτταρική απώλεια και την απόπτωση που παρατηρείται σε συνθήκες στέρησης κυτοκινών. Παρουσιάζει άλλοτε συνεργική και άλλοτε ανταγωνιστική δράση με διάφορες κυτοκίνες [378].

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η Αμιφοστίνη ασκεί αυτές τις δράσεις μπορεί να σχετίζεται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της και την προστατευτική δράση έναντι στην υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων, ιδιότητες ανάλογες με του bcl-2. Κατά τη διαδικασία της απόπτωσης η ενδοκυτταρική γλουταθειόνη μειώνεται. Οι αμινοθειόλες μπορεί να αναστέλλουν την απόπτωση αυξάνοντας το περιεχόμενο των ενδοκυτταρικών θειολών. Επίσης, μέσω της δομικής αναλογίας τους με τις πολυαμίνες, συμμετέχουν σε διαδικασίες ανάπτυξης, καθώς συνδέονται με το DNA και νουκλεοπρωτεΐνες, μεταβάλλουν τη δράση τοποϊσομερασών και κινασών, αναστέλλουν τη δράση νουκλεασών, και ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Φαίνεται ακόμη να ρυθμίζουν την αιμοποίηση μέσω ενδοκυτταρικών σημάτων που επηρεάζουν αυξητικούς παράγοντες όπως ο kit ligand [378].

Η ικανότητα αυτή της Αμιφοστίνης να προάγει την επιβίωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και να καθυστερεί την απόπτωση σε συνθήκες κυτταρικού στρες οδήγησε σε χρησιμοποίησή της σε καταστάσεις ανεπάρκειας του μυελού. Τα προγονικά κύτταρα από ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (ΜΔΣ) χαρακτηρίζονται από μειωμένη απάντηση σε κυτοκίνες, αυξημένη απόπτωση και ανεπαρκή αιμοποίηση [382]. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι η Αμιφοστίνη βελτιώνει την επιβίωση προγονικών μυελικών κυττάρων και μειώνει την απόπτωση των CD34+ κυττάρων από ασθενείς με ΜΔΣ [351, 383-385]. Παρόμοια, χορήγηση *in vivo* Αμιφοστίνης σε ασθενείς με ΜΔΣ, βελτιώνει την αιματολογική τους απάντηση, αυξάνοντας τον αριθμό των λευκοκυττάρων, αιμοπεταλίων και δικτυοερυθροκυττάρων [380, 386-389]. Περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για να διευκρινιστεί εάν υπάρχει δυνητικός κίνδυνος να επιταχυνθεί η λευχαιμική εκτροπή των ΜΔΣ κλώνων.

Ένα άλλο πρόβλημα που αφορά τη χρήση αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων είναι η περιορισμένη τους χρήση λόγω του ότι μετά από επανειλημμένες χρήσεις, η αποθήκη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων εξαντλείται. Η συνεργική δράση της Αμιφοστίνης με τους αυξητικούς παράγοντες μπορεί να υπερπηδήσει το εμπόδιο αυτό [310, 329, 390]. Άλλη πιθανή εφαρμογή είναι σε πρωτόκολλα κινητοποίησης

προγονικών κυττάρων με αυξητικούς παράγοντες. Ο συνδυασμός με Αμιφοστίνη φαίνεται ότι βελτιώνει την απόδοση (yield) σε CD34+ κύτταρα, παρά όταν χορηγείται μόνο G-CSF [316].

Τέλος, έχει αναφερθεί και άμεση ανασταλτική επίδραση της Αμιφοστίνης σε λευχαιμικά κύτταρα [380, 391]. Η ικανότητά της να επάγει το πρωτο-ογκογονίδιο p 53 μπορεί να συμμετέχει στην διακοπή του κυτταρικού κύκλου και να αναστέλλει την κλωνική ανάπτυξη ή κυτταρική διαφοροποίηση.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Κύτταρα

α) Κυτταρική σειρά

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από την κυτταρική σειρά HL-60 (οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία), τα οποία διατηρήθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν σε RPMI-1640 μετά από προσθήκη 10% ορού εμβρύου βοός (FCS), 1% πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης, 1% L-γλουταμίνης και 1% πυροσταφυλικού νατρίου, στους 37°C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂ στον αέρα. Με αυτές τις συνθήκες, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονταν λογαριθμικά και η επιβίωσή τους ήταν μεγαλύτερη από 95%.

β) Κύτταρα ασθενών

Τα κύτταρα μυελού ελήφθησαν από παιδιά, ηλικίας 3 μηνών έως 18 ετών, τα οποία νοσηλεύτηκαν στην Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Αιματολογική/Ογκολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΕΠΙΓΝΗ), με οξείες λευχαιμίες και συμπαγείς όγκους, σε διαφορετικές φάσεις της νόσου (n=31). Τα χαρακτηριστικά των νωπών δειγμάτων μυελού περιγράφονται στον Πίνακα 3. Κύτταρα μυελού από παιδιά αντίστοιχης ηλικίας, χωρίς αιματολογικές κακοήθειες ή άλλη νεοπλασματική νόσο, στα οποία έγινε παρακέντηση μυελού στα πλαίσια διερεύνησης παρατεινόμενου εμπύρετου, μεταβολικού νοσήματος ή λεμφαδενίτιδας

χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα ελέγχου (n=15). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μυελού από παιδιά με ουδετεροπενία (n=8) και παιδιά με θρομβοπενία (n=3). Κύτταρα περιφερικού αίματος από παιδιά με οξεία λευχαιμία στην πρωτοδιάγνωση υποβλήθηκαν σε ΦΔΘ (n=2). Η χρησιμοποίηση των παρασκευασμάτων μυελού και περιφερικού αίματος από τους ασθενείς έγινε μετά από έγγραφη συγκατάθεση των γονέων τους και έγκριση του πρωτοκόλλου από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Πανεπιστημίου και του Νοσοκομείου.

Η μελέτη της μορφολογίας των μυελικών επιχρισμάτων έγινε μετά από χρώση με Wright-Giemsa. Για την τυποποίηση των οξέων λευχαιμιών χρησιμοποιήθηκαν ειδικές κυτταροχημικές χρώσεις [μυελουπεροξειδάση, αντίδραση υπεριοδικού οξέος με Schiff (PAS), μη ειδική εστεράση, όξινη φωσφατάση], κυτταρομετρία ροής και οστεομυελική βιοψία. Η ταξινόμηση των περιστατικών οξείας μυελογενούς λευχαιμίας έγινε σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά FAB (French-American-British). Η διήθηση του μυελού από νεοπλασματικά κύτταρα στους ασθενείς με συμπαγείς όγκους μελετήθηκε με μυελικά επιχρίσματα και οστεομυελική βιοψία.

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά των νωπών δειγμάτων μυελού τα οποία χρησιμοποιήθηκαν.

Νόσημα	Αριθμός	Μυελός οστών
B-ΟΛΛ(CD10+)	9	45-100% διήθηση
ΟΜΛ	3	70-95% διήθηση
Νευροβλάστωμα	5	Ρόδακες στο μυελό
ΟΛΛ σε ύφεση	14	< 5% διήθηση
Ομάδα ελέγχου	15	Φυσιολογικός μυελός

1.2 Αντιδραστήρια

Παρασκευάστηκε διάλυμα Μεροκυανίνης 540 (MC540, Sigma, St. Louis, Mo) σε συγκέντρωση 1mg/ml με 50% αιθανόλη το οποίο διατηρήθηκε στους -20°C. Οι τελικές συγκεντρώσεις των εναιωρημάτων των κυττάρων έγιναν με RPMI-1640. Η Αμιφοστίνη (Ethyol, WR-2721) είναι της εταιρείας Schering-Plough, SA (Kenilworth, NJ, USA). Η λυοφιλιωμένη σκόνη διατηρήθηκε στους 2-8°C και η ανασύσταση έγινε με διάλυμα NaCl 0.9% αμέσως πριν τη χρήση. Ο αποφωσφορυλιωμένος παράγοντας-δραστικός μεταβολίτης (WR-1065) παραχωρήθηκε ευγενώς από την U.S. Bioscience (West Conshohocken, Philadelphia, USA), σε μορφή λιοφιλιωμένης σκόνης και η ανασύσταση του έγινε με διάλυμα NaCl 0.9% αμέσως πριν τη χρήση. Η αποστείρωση των διαλυμάτων έγινε με φίλτρα 0.22 μm.

1.3 Πηγή φωτός

Χρησιμοποιήθηκε Argon Laser (μοντέλο Spectra Physics Stabilite 2016). Το Laser περιέχει σαν ενεργό υλικό ιόντα του αερίου αργού (Ar⁺). Εκπέμπει ακτινοβολία με μήκος κύματος 488nm και 514nm. Για να γίνει δυνατή η απομόνωση της δέσμης ακτινοβολίας που εκπέμπει σε μήκος κύματος 514nm αντικαταστάθηκε το πίσω κάτοπτρο της οπτικής κοιλότητας του Laser με ένα πρίσμα.

Το Laser είναι εγκατεστημένο στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Laser, Τομέας Laser και Εφαρμογών.

Η δέσμη του φωτός κατευθυνόταν μέσα από συστοιχία κατόπτρων σε φακό ο οποίος την απεστίαζε στην επιφάνεια του τρυβλίου του πειράματος. Τα τελευταία στάδια των ανακλάσεων όσο και η απεστίαση, έγιναν σε μεταλλικό κλωβό (διαστάσεων 30x30x50cm), με σκοπό την απομόνωση των δειγμάτων από το περιβάλλον και την προστασία του περιβάλλοντος από την ανακλώμενη ακτινοβολία Laser. Το τρυβλίο ήταν τοποθετημένο σε πιεζοηλεκτρικό δίσκο που παλλόταν μέσω παλμογεννήτριας και ανακινείτο συνεχώς με χαμηλή συχνότητα (περίπου 50 Hz) ώστε να επιτευχθεί διαρκής ομοιογενής έκθεση των κυττάρων στην ακτινοβολία.

1.4 Φωτοευαισθητοποίηση

Αρχικά, εναιωρήματα κυττάρων HL-60 και μονοπύρηννα κύτταρα μυελού σε RPMI-1640 εμπλουτισμένο με FCS 10%, σε συγκέντρωση 10^7 κύτταρα/ml τοποθετήθηκαν σε φλάσκες και επώαστηκαν με Αμιφοστίνη σε δύο δόσεις (1.5 mg/ml, 3mg/ml) ή WR-1065 (0.2 mg/ml, 1.5 mg/ml) για 15 λεπτά σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα, 37 °C, 5% CO₂. Ακολούθως τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με RPMI-1640 και επαναδιαλύθηκαν σε RPMI-1640 με 10% FCS σε συγκέντρωση 3×10^6 κύτταρα/ml. Τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 35x10mm (Falcon petri dishes) και επώαστηκαν με 20 µg/ml MC540 για μία ώρα, στο σκοτάδι, στους 37 °C, 5% CO₂, 95% υγρασία. Στη συνέχεια ακολούθησε έκθεση σε Argon Laser 514 nm για διαφορετικούς χρόνους έκθεσης και συγκεκριμένα 2,3,4,5,6,7.5 και 9 λεπτά στα 2 Watts, δηλαδή ενέργεια 24.9, 37.4, 46.8, 62.4, 74.8, 93.6 και 112.3 J/cm² αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης η βάση του τρυβλίου καλυπτόταν από μεταλλική μεμβράνη, για να διατηρηθεί η θερμοκρασία του κυτταρικού εναιωρήματος σταθερή, περίπου στους 24± 1°C υπό συνεχή ανακίνηση. Μετά την ακτινοβόληση, με σκοπό την απομάκρυνση της χρωστικής, ακολούθησαν δύο εκπλύσεις με RPMI-1640, επαναδιάλυση σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml και επώαση στους 37 °C, 5% CO₂, 95% υγρασία.

Η επιβίωση των κυττάρων εκτιμήθηκε με τη χρώση του κυανού του τρυπανίου 24 ώρες αργότερα. Για τα κύτταρα της λευχαιμικής σειράς η παρακολούθηση της επιβίωσης συνεχίστηκε σε υγρές καλλιέργειες ανά εβδομάδα και για διάστημα 4 εβδομάδων. Στο τέλος των 4 εβδομάδων έγινε καταμέτρηση των ζώντων κυττάρων σε 10πλάσια συγκέντρωση. Ως κυτταρικός θάνατος 99.9999% για τα λευχαιμικά κύτταρα, θεωρήθηκε η απουσία ζωντανών κυττάρων από όλες τις περιοχές του αιματοκυττόμετρου. Και αυτό διότι, αναφέρεται ότι ένας πληθυσμός ο οποίος αποτελείται από 8 μόνο κύτταρα HL-60, είναι ικανός να αναπτύξει, σε διάστημα 4 εβδομάδων, αριθμό κυττάρων εύκολα αναγνωρίσιμο με τη μέθοδο του αιματοκυττόμετρου [298]. Επειδή δε το όριο ανίχνευσης κυττάρων με τη μέθοδο αυτή είναι 3750 κύτταρα, σημαίνει ότι ο προαναφερόμενος πληθυσμός των 8 κυττάρων είναι ικανός να αναπτυχθεί σε περισσότερο από 3750 κύτταρα και επομένως να μετρηθεί με τη μέθοδο του αιματοκυττομέτρου [290]. Εφόσον

λοιπόν δεν έχει αναπτυχθεί κλώνος στο διάστημα των 4 εβδομάδων, θα πρέπει μετά τη ΦΔΘ να επιβιώσαν λιγότερα από 8 λευχαιμικά κύτταρα από τον αρχικό αριθμό των 3×10^6 κύτταρα (δηλαδή κυτταρικός θάνατος >99.9999%).

Τα πρόδρομα κύτταρα του μυελού και τα μονοπύρρηνα του περιφερικού αίματος δεν επιβιώνουν *in vitro* για διάστημα πέραν των ολίγων ημερών, οπότε και η παρακολούθησή τους σε υγρές καλλιέργειες μετά τη ΦΔΘ δεν κρίθηκε σκόπιμη. Τα νεοπλασματικά κύτταρα τα οποία προέρχονταν από ασθενείς, παρακολουθήθηκαν με υγρές καλλιέργειες, αλλά σε κανένα δείγμα (και στους μάρτυρες) δεν παρατηρήθηκε επιβίωση κυττάρων πέραν των δύο εβδομάδων.

Σε όλα τα πειράματα ακτινοβολήθηκαν αντίστοιχα και εναιωρήματα κυττάρων τα οποία δεν επώαστηκαν με Αμιφοστίνη. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης εναιωρήματα κυττάρων μαρτύρων με και χωρίς επώαση με Αμιφοστίνη, στα οποία προστέθηκε ποσότητα διαλύματος 50 % αιθανόλης ίση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση της Μεροκυανίνης 540, ώστε οι πειραματικές συνθήκες να είναι όμοιες.

1.5 Καλλιέργειες προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων

Ο διαχωρισμός των μονοπυρήνων κυττάρων από το μυελό και το περιφερικό αίμα έγινε με φυγοκέντρηση σε φικόλη (Ficoll-Hyraque).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τις κυτταρικές καλλιέργειες βασίστηκε σε προηγούμενη βιβλιογραφία [392], αφού τροποποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιστικών Καλλιιεργειών της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας/Ογκολογίας. Συγκεκριμένα κύτταρα μυελού από ασθενείς με λευχαιμίες ή συμπαγείς όγκους και φυσιολογικών μαρτύρων, διαχωρίστηκαν και φωτοακτινοβολήθηκαν, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Πρίν την επώαση τους με Αμιφοστίνη και Μεροκυανίνη 540 απομακρύνθηκαν τα μονοκύτταρα με επώαση για μία ώρα στους 37°C σε πλαστική φλάσκα. Μετά τη φωτοακτινοβολήση και την έκπλυση της Μεροκυανίνης 540, τα κύτταρα του κάθε τρυβλίου επαναδιαλύθηκαν σε RPMI-1640 σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ml. 100 μl του εναιωρήματος των κυττάρων (10^5 κύτταρα) εγχύθηκε σε 1 ml καλλιιεργητικού υλικού που περιείχε 1% μεθυλοκυτταρίνη, 30% FCS, 1% BSA 10^{-4} , 2-μερκαπτο-αιθανόλη και 10% αυξητικούς παράγοντες. Για την ανάπτυξη των CFU-E, BFU-E και CFU-GEMM αποικιών προστέθηκε στο καλλιιεργητικό υλικό 4 IU/ml ερυθροποιητίνη

(EPO, Eprex, Cilag), 5 ng/ml GM-CSF (Leucomax, Sandoz/Schering-Plough) και 10 ng/ml IL-3 (R&D Systems), ενώ για την ανάπτυξη των CFU-GM προστέθηκε 50 ng/ml G-CSF, 50 ng/ml GM-CSF και 20 ng/ml IL-3. Ακολούθησε επώαση στους 37° C, σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂.

Οι CFU-E αποικίες αναγνωρίστηκαν και μετρήθηκαν με ανάστροφο μικροσκόπιο την 7^η ημέρα, από το μικρό τους μέγεθος (8 έως 64 κύτταρα), ενώ οι BFU-E αποικίες είναι καλά αιμοσφαιρινοποιημένα μεγαλύτερα κυτταρικά αθροίσματα (>64 κύτταρα) και μετρήθηκαν την 14^η ημέρα. Οι CFU-GEMM αποικίες είναι μικτές αποικίες, που περιέχουν κύτταρα ερυθράς σειράς με κύτταρα από τουλάχιστον άλλη μία σειρά (δηλαδή μεγακαρυοκύτταρα, μακροφάγα, ηωσινόφιλα ή ουδετερόφιλα) και μετρήθηκαν την 14^η ημέρα. Τέλος οι CFU-GM αποικίες περιέχουν περισσότερα από 40 κύτταρα και μετρήθηκαν την 10^η ημέρα.

1.6 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσος όρος \pm σταθερό σφάλμα του μέσου (mean \pm SE). Σε κάθε πείραμα η υπό εξέταση παράμετρος μελετήθηκε σε τριπλό δείγμα. Η επί τοις εκατό επιβίωση των κυττάρων εκφράζεται με αναγωγή στην 100% επιβίωση των αντίστοιχων δειγμάτων που δεν υποβλήθηκαν σε καμία πειραματική θεραπεία. Ως 100% ανάπτυξη αποικιών, θεωρήθηκε ο αριθμός αποικιών των δειγμάτων της αντίστοιχης ομάδας, στα οποία δεν έγινε ΦΔΘ. Ο απόλυτος αριθμός των αποικιών εκφράζεται ανά 10⁵ κύτταρα ως ο μέσος όρος \pm σταθερό σφάλμα. Η ικανότητα σχηματισμού αποικιών (colony forming efficiency) έχει υπολογιστεί ως αριθμός αποικιών δια του αριθμού κυττάρων ανά τρυβλίοx100. Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων ομάδων χρησιμοποιήθηκε unpaired t-test με ίσες και άνισες διακυμάνσεις, ώστε να εκτιμηθεί η διαφορά μεταξύ των δύο μέσων τιμών.

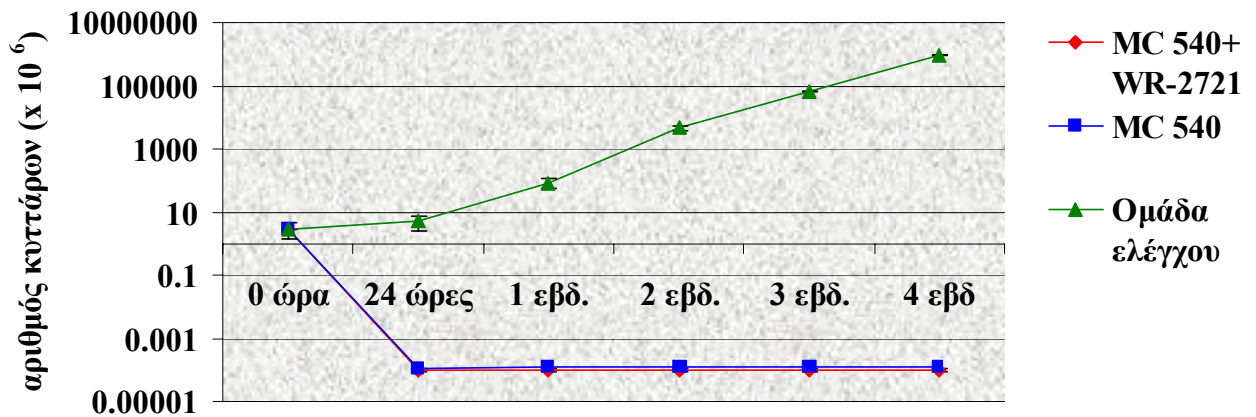
2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Κύτταρα λευχαιμικής σειράς HL-60

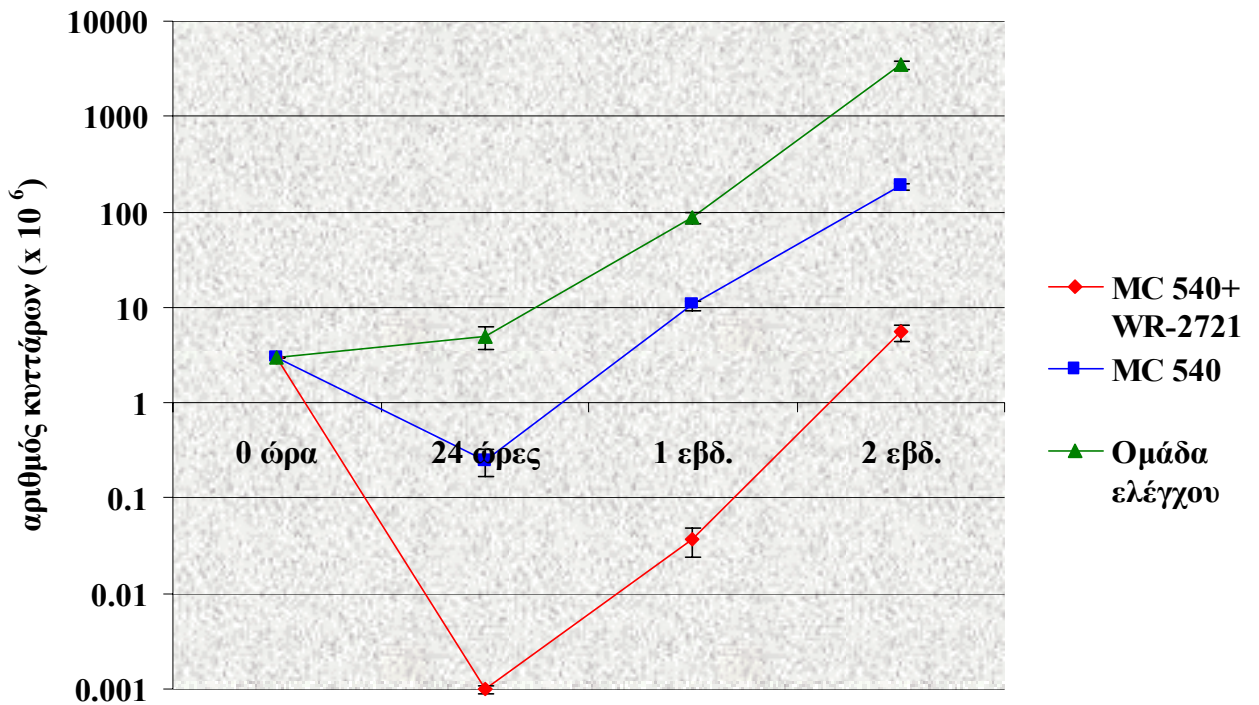
Τα HL-60 κύτταρα (3×10^6 κύτταρα/ml) ακτινοβολήθηκαν με Argon Laser 514 nm σε διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας, παρουσία 20 $\mu\text{g/ml}$ MC540, με και χωρίς Αμιφοστίνη (1.5 ή 3 mg/ml). Σε δόσεις ακτινοβολίας $\geq 64.2 \text{ J/cm}^2$, παρατηρήθηκε κυτταρικός θάνατος 99.9999%, ανεξάρτητα από την παρουσία Αμιφοστίνης (Σχήμα 2). Σε δόση ακτινοβολίας 46.8 J/cm^2 , τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με Αμιφοστίνη, επιβίωναν σε ένα μικρό ποσοστό 24 ώρες μετά από την φωτοακτινοβόληση και αναπτύσσονταν λογαριθμικά κατά τη διάρκεια των 4 εβδομάδων. Αντιθέτως, παρουσία Αμιφοστίνης, δεν βρέθηκε κανένα ζωντανό κύτταρο σε όλες τις περιοχές του αιματοκυττόμετρου, σε συμπυκνωμένο κατά 10 φορές διάλυμα, 24 ώρες μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Όμως παρατηρήθηκε κυτταρική ανάπτυξη μετά το τέλος της 1^{ης} εβδομάδας, της υγρής καλλιέργειας (κυτταρικός θάνατος 99.9%) (Σχήμα 3). Επώαση των κυττάρων με μεγαλύτερη συγκέντρωση Αμιφοστίνης (3 mg/ml) δεν ασκεί προστατευτική δράση στα λευχαιμικά κύτταρα (99.9% κυτταρικός θάνατος). Σε δόσεις ακτινοβολίας $< 46.8 \text{ J/cm}^2$, τα κύτταρα επιβιώνουν, παρουσία ή απουσία Αμιφοστίνης. Τέλος, μόνη η Laser ακτινοβολία, η χρωστική και η Αμιφοστίνη δεν ασκούν δράση στην επιβίωση των κυττάρων (Σχήμα 4).

2.2 Φυσιολογικά πρόδρομα κύτταρα μυελού

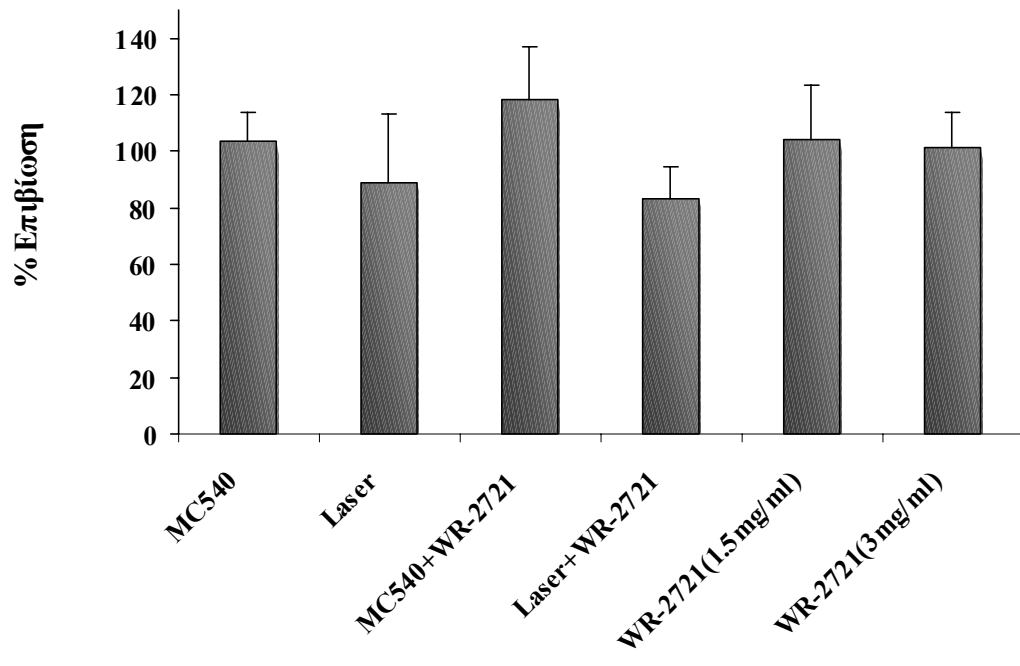
Τα κύτταρα μυελού από φυσιολογικά παιδιά μάρτυρες ($n=7$) ακτινοβολήθηκαν σε δόση 74.8 J/cm^2 με 20 $\mu\text{g/ml}$ MC 540, παρουσία ή όχι διαφορετικών συγκεντρώσεων WR-2721 ή WR-1065. Στη δόση αυτή, στην οποία παρατηρείται πλήρης κυτταρικός θάνατος των λευχαιμικών HL-60 κυττάρων, παρατηρείται ικανοποιητική επιβίωση των πρόδρομων κυττάρων μυελού. Η επώαση με Αμιφοστίνη (1.5 mg/ml) ή WR-1065 (0.2 mg/ml) φαίνεται να αυξάνει λίγο την επιβίωση των κυττάρων μυελού, χωρίς όμως



Σχήμα 2. Η επίδραση της Αμφοστίνης (WR-2721) στην MC 540 φωτοακτινοβόληση HL-60 λευχαιμικών κυττάρων σε δόση ακτινοβολίας 64.2 J/cm² (μέθοδος αποκλεισμού χρωστικής κυανούν του τρυπανίου). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα (SE) 10 τριπλών πειραμάτων.



Σχήμα 3. Η επίδραση της Αμφοστίνης (WR-2721) στην MC 540 φωτοακτινοβόληση HL-60 λευχαιμικών κυττάρων σε δόση ακτινοβολίας 46.8 J/cm² (μέθοδος αποκλεισμού χρωστικής κυανούν του τρυπανίου). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή ± σταθερό σφάλμα (SE) 6 τριπλών πειραμάτων.



Σχήμα 4. Επίδραση της ακτινοβολίας Laser, της MC540 και της WR-2721 μεμονωμένα στα λευχαιμικά κύτταρα HL-60, στις 24 ώρες.

στατιστικά σημαντικές διαφορές (Πίνακας 4, Σχήμα 5). Η χρωστική ή η ακτινοβολία μόνη της δεν επηρεάζει την επιβίωση των κυττάρων.

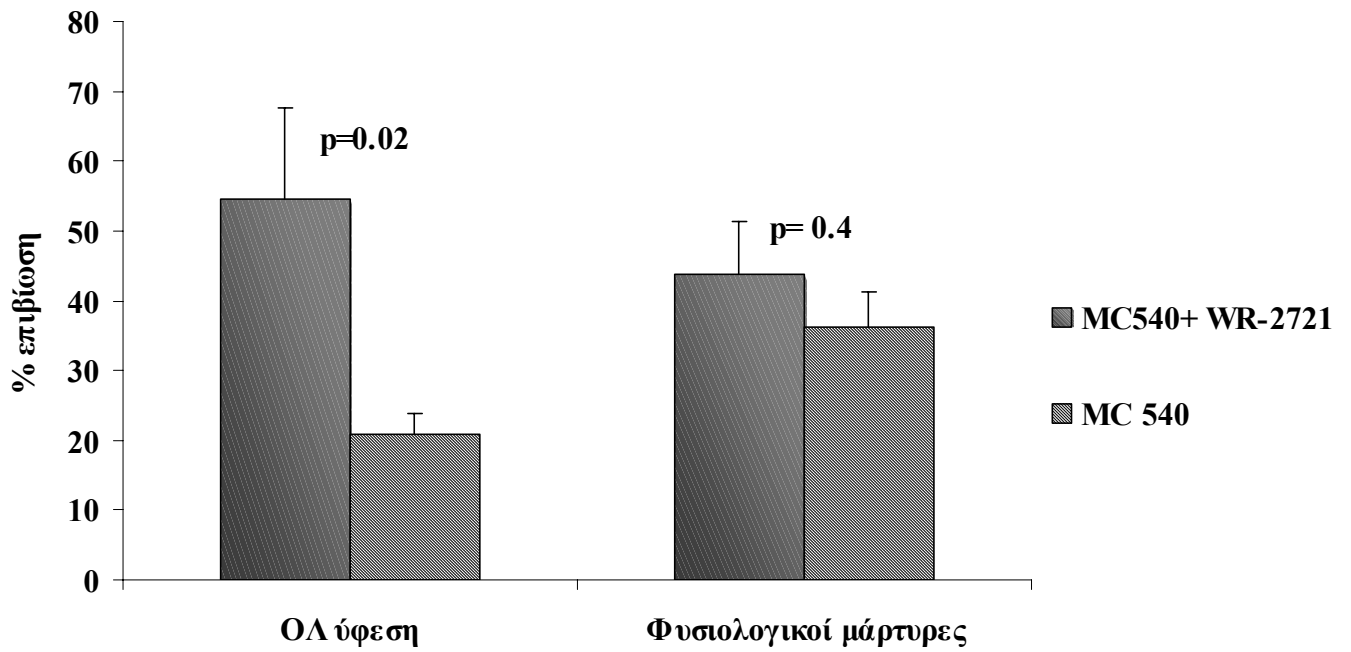
Πίνακας 4. Επιβίωση (%) των πρόδρομων κυττάρων μυελού από φυσιολογικά παιδιά στα οποία έγινε MC540 φωτοακτινοβόληση παρουσία ή όχι WR-2721 ή WR-1065 (n=7). Η σύγκριση (p) έγινε με την ομάδα που δεν επώαστηκε με κυτταροπροστατευτικό παράγοντα.

Φυσιολογικοί μάρτυρες (n=7)		
Συνθήκες ακτινοβόλησης	% επιβίωση±SE	p
74.8 J/cm²+MC 540	36.32±4.9	
74.8 J/cm²+MC 540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	43.87±7.5	p=0.4
74.8 J/cm²+MC 540+WR-2721 (3 mg/ml)	21.7±5.77	p=0.13
74.8 J/cm²+MC 540+WR-1065 (0.2 mg/ml)	41.34±4.7	p=0.19
MC 540+WR-2721	100.63±24.21	
74.8 J/cm²+WR-2721	103.38±44.4	

2.3 Πρόδρομα κύτταρα μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση

Τα κύτταρα μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση (n=14) ακτινοβολήθηκαν σε δόση 74.8 J/cm² με 20 μg/ml MC 540, παρουσία ή όχι διαφορετικών συγκεντρώσεων WR-2721 ή WR-1065. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική βελτίωση στην επιβίωση των κυττάρων από τη φωτοδυναμική θεραπεία μετά από επώαση με Αμιφοστίνη (1.5 mg/ml) (Πίνακας 5, Σχήμα 5).

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην επιβίωση των κυττάρων μεταξύ των φυσιολογικών παιδιών και των παιδιών με οξεία λευχαιμία σε ύφεση, παρά μόνο στην ομάδα που έγινε επώαση με WR-1065 (0.2 mg/ml) (Πίνακας 6). Επίσης, στην ίδια ομάδα παρατηρήθηκε σχετικά μικρότερη επιβίωση των κυττάρων μυελού από λευχαιμίες σε ύφεση, μετά από φωτοδυναμική θεραπεία, συγκριτικά με τους φυσιολογικούς μάρτυρες.



Σχήμα 5. Η επιβίωση των πρόδρομων κυττάρων μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση και φυσιολογικούς μάρτυρες, στις 24 ώρες μετά από MC 540 φωτοακτινοβόληση σε δόση 74.8 J/cm^2 (μέθοδος αποκλεισμού του κυανού του τρυπανίου).

Πίνακας 5. Επιβίωση (%) των πρόδρομων κυττάρων μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση (n=14) στα οποία έγινε MC540 φωτοακτινοβόληση παρουσία ή όχι WR-2721 ή WR-1065. Η σύγκριση (p) έγινε με την ομάδα που δεν επώαστηκε με κυτταροπροστατευτικό παράγοντα.

Οξείες Λευχαιμίες σε ύφεση		
Συνθήκες ακτινοβόλησης	% επιβίωση±SE	p
74.8 J/cm²+MC 540	20±2.6	
74.8 J/cm²+MC 540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	54.5±13.2	p=0.02
74.8 J/cm²+MC 540+WR-2721 (3 mg/ml)	22.7±2.85	p>0.1
74.8 J/cm²+MC 540+WR-1065 (0.2 mg/ml)	14.3±1.3	p>0.1
74.8 J/cm²+MC 540+WR-1065 (1.5 mg/ml)	19.16±2.4	p>0.1
MC 540+WR-2721	93.87±28.1	
74.8 J/cm²+WR-2721	83.85±15.4	

Πίνακας 6. Σύγκριση επιβίωσης (%) των πρόδρομων κυττάρων μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση και φυσιολογικούς μάρτυρες στα οποία έγινε MC540 φωτοακτινοβόληση παρουσία ή όχι WR-2721 ή WR-1065.

	ΟΛ ύφεση	Φυσιολογικά παιδιά	
Θεραπεία	% επιβίωση±SE		p
74.8 J/cm²+MC 540	20±2.6	36.32±4.9	p=0.5
74.8 J/cm²+MC 540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	54.5±13.2	43.87±7.5	p=0.2
74.8 J/cm²+MC 540+WR-2721 (3 mg/ml)	22.7±2.85	21.7±5.77	p=0.86
74.8 J/cm²+MC 540+ WR-1065 (0.2 mg/ml)	14.3±1.3	41.34±4.7	p=0.003

2.4 Λευχαιμικά κύτταρα μυελού

Τα χαρακτηριστικά των παιδιών με οξείες λευχαιμίες που μελετήθηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 7. Δείγματα μυελού τα οποία ελήφθησαν κατά την πρωτοδιάγνωση ακτινοβολήθηκαν με Argon Laser 514 nm σε διαφορετικές δόσεις,

παρουσία MC 540. Η επιβίωση των κυττάρων μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες μετά από φωτοδυναμική θεραπεία, είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή των φυσιολογικών πρόδρομων κυττάρων μυελού (π.χ. $p=0.00002$ σε δόση ακτινοβολίας 74.8 J/cm^2). Στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, η επώαση των κυττάρων με WR-2721 σε συγκέντρωση 1.5 mg/ml , προκάλεσε στατιστικά σημαντικά μείωση της επιβίωσης τους σε δόσεις ακτινοβολίας 64.2 και 74.8 J/cm^2 , συγκριτικά με αυτά που δεν επώαστηκαν, ενώ η επώαση με WR-1065 σε συγκέντρωση 0.2 mg/ml δεν φαίνεται να επηρεάζει την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων. Στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, η επώαση με Αμιφοστίνη μειώνει σημαντικά την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων στη μικρότερη δόση ακτινοβολίας (74.8 J/cm^2). Η επιβίωση των κυττάρων, μετά από την MC 540 φωτοακτινοβολήση, φαίνεται στους πίνακες 8 και 9. Η χρωστική ή η ακτινοβολία μεμονωμένες δεν φαίνεται να επηρεάζει το φωτοδυναμικό φαινόμενο (επιβίωση 102.3 ± 15.4 και $71.06 \pm 5.18\%$ αντίστοιχα).

Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά παιδιών με οξείες λευχαιμίες στην πρωτοδιάγνωση

Χαρακτηριστικά παιδιών με οξείες λευχαιμίες στην πρωτοδιάγνωση					
Αριθμός	Τύπος	Ηλικία	Φύλο	% διήθηση μυελού	Ύφεση
1.	B-ΟΛΛ (CD10+)	4 ετών	άρρεν	95%	ναι
2.	B-ΟΛΛ (CD10+)	13 ετών	άρρεν	85%	ναι
3.	B-ΟΛΛ (CD10+)	6 ετών	άρρεν	95%	ναι*
4.	Προ-B-ΟΛΛ (CD10+)	4,5 ετών	άρρεν	45%	ναι
5.	B-ΟΛΛ (CD10+)	5 ετών	θήλυ	90%	ναι
6.	B-ΟΛΛ (CD10+)	4 ετών	άρρεν	90%	ναι
7.	B-ΟΛΛ (CD10+)	3 ετών	άρρεν	95%	ναι
8	B-ΟΛΛ (CD10+)	9 ετών	άρρεν	99%	ναι
9.	B-ΟΛΛ (CD10+)	3 ετών	θήλυ	95%	ναι
10.	ΟΜΛ (M5a)	10 ετών	θήλυ	85%	ναι

11.	ΟΜΛ (Μ4)	3 μηνών	θήλυ	95%	όχι
12.	ΟΜΛ (Μ1)	4 ετών	άρρεν	70%	ναι

*παρουσίασε υποτροπή ΚΝΣ

Πίνακας 8. Επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων μυελού από παιδιά με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) σε πρωτοδιάγνωση 24 ώρες μετά από MC 540 φωτοακτινοβολήση. Στις παρενθέσεις αναγράφεται το εύρος των τιμών. Τα p αναφέρονται συγκριτικά με την ομάδα που δεν επώαστηκε με κυτταροπροστατευτικό παράγοντα.

Δόση ακτινοβολίας	Επιβίωση ± SE (%)		
ΟΛΛ (n=9)			
	MC 540	MC540+ WR-2721	MC 540+WR-1065
64.2 J/cm²	2.07±0.8 (0.33-6.6)	0.64±0.15 (0.0001-1.6)	1.57±0.2 (0.84-2.3)
		p=0.038	p>0.1
74.8 J/cm²	2.34±0.69 (0.0001-7.3)	0.74±0.23 (0.0001-1.9)	1.19±0.26 (0.001-2.5)
		p=0.048	p>0.1
93.6 J/cm²	3.02±1.1 (0.13-11.9)	1.93±0.42 (0.0001-4.5)	3.1±0.65 (0.55-5.8)
		p>0.1	p>0.1

Πίνακας 9. Επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων μυελού από παιδιά με οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία (ΟΜΛ) σε πρωτοδιάγνωση 24 ώρες μετά από MC 540 φωτοακτινοβολήση. Στις παρενθέσεις αναγράφεται το εύρος των τιμών. Τα p αναφέρονται συγκριτικά με την ομάδα που δεν επώαστηκε με κυτταροπροστατευτικό παράγοντα.

Δόση ακτινοβολίας	Επιβίωση ± SE (%)
ΟΜΛ (n=3)	

	MC 540	MC540+ WR-2721 (1.5 mg/ml)
74.8 J/cm²	3.3±1.16 <i>(0.0001-6.8)</i>	0.36±0.25 <i>(0.0001-1.6)</i> p=0.04
93.6 J/cm²	4.5±2.8 <i>(0.0001-20.8)</i>	1.49±0.68 <i>(0.0001-4.3)</i> p>0.1
112.3 J/cm²	0.31±0.22 <i>(0.0001-1.4)</i>	0.12±0.08 <i>(0.0001-0.49)</i> p>0.1

2.5 Λευχαιμικά κύτταρα περιφερικού αίματος

Ακτινοβολήθηκαν λευχαιμικά κύτταρα περιφερικού αίματος από ένα παιδί με ΟΛΛ και ένα παιδί με ΟΜΛ κατά την πρωτοδιάγνωση σε διάφορες δόσεις ακτινοβολίας με MC540 και παρουσία ή όχι Αμιφοστίνης ή WR-1065. Παρατηρήθηκε ότι τα λευχαιμικά κύτταρα του περιφερικού αίματος θανατώνονται σε ικανοποιητικό βαθμό (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Επιβίωση (%) των λευχαιμικών κυττάρων περιφερικού αίματος από παιδί με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) και παιδί με οξεία μυελοβλαστική λευχαιμία (ΟΜΛ) σε πρωτοδιάγνωση μετά από MC 540 φωτοακτινοβόληση σε διάφορες δόσεις ακτινοβολίας, παρουσία ή όχι διαφορετικών συγκεντρώσεων WR-2721 ή WR-1065. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή 2-4 δειγμάτων για το κάθε πείραμα.

Δόση ακτινοβολίας (J/cm²)	64.2	74.8		93.6	112.3
	ΟΛΛ	ΟΛΛ	ΟΜΛ	ΟΜΛ	ΟΜΛ
MC 540	0.4	0.0001	0.4	0.0001	0.25
MC 540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	0.0001	0.0001	3	0.0001	0.09
MC 540+WR-2721 (3 mg/ml)	0.8	0.5	2.65	0.35	0.1
MC 540+ WR-1065(0.2 mg/ml)	0.0001	0.17			

2.6 Κύτταρα μυελού από παιδιά με νευροβλάστωμα

Μελετήθηκε η επιβίωση κυττάρων μυελού παιδιών με διήθηση νευροβλαστώματος (n=5) μετά από Argon Laser 514 nm ακτινοβόληση σε 74.8 J/cm² με MC540 και παρουσία ή όχι WR-2721 ή WR-1065. Παρατηρήθηκε ότι επιβιώνει ένα σημαντικό ποσοστό των κυττάρων του νευροβλαστώματος, ενώ η παρουσία της Αμιφοστίνης δεν επηρεάζει την επιβίωση τους (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Επιβίωση (%) των κυττάρων μυελού στις 24 ώρες από παιδιά με νευροβλάστωμα, με διήθηση μυελού μετά από MC540 φωτοακτινοβόληση, παρουσία ή όχι WR-2721 ή WR-1065 (n=5). Αναγράφονται οι μέσες τιμές % επιβίωσης επί της ομάδας ελέγχου ± σταθερό σφάλμα (SE).

Δόση ακτινοβολίας 74.8 J/cm ²	% Επιβίωση±SE
MC 540	32.86±5.1
MC 540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	31.04±5.1
MC 540+ WR-1065 (0.2 mg/ml)	33.3±6.3

2.7 Προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα

Η επιβίωση των φυσιολογικών δεσμευμένων προγονικών κυττάρων μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση, μετά από MC540 φωτοακτινοβόληση, βελτιώνεται παρουσία Αμφοστίνης, όπως φαίνεται στον Πίνακα 12 και το Σχήμα 6.

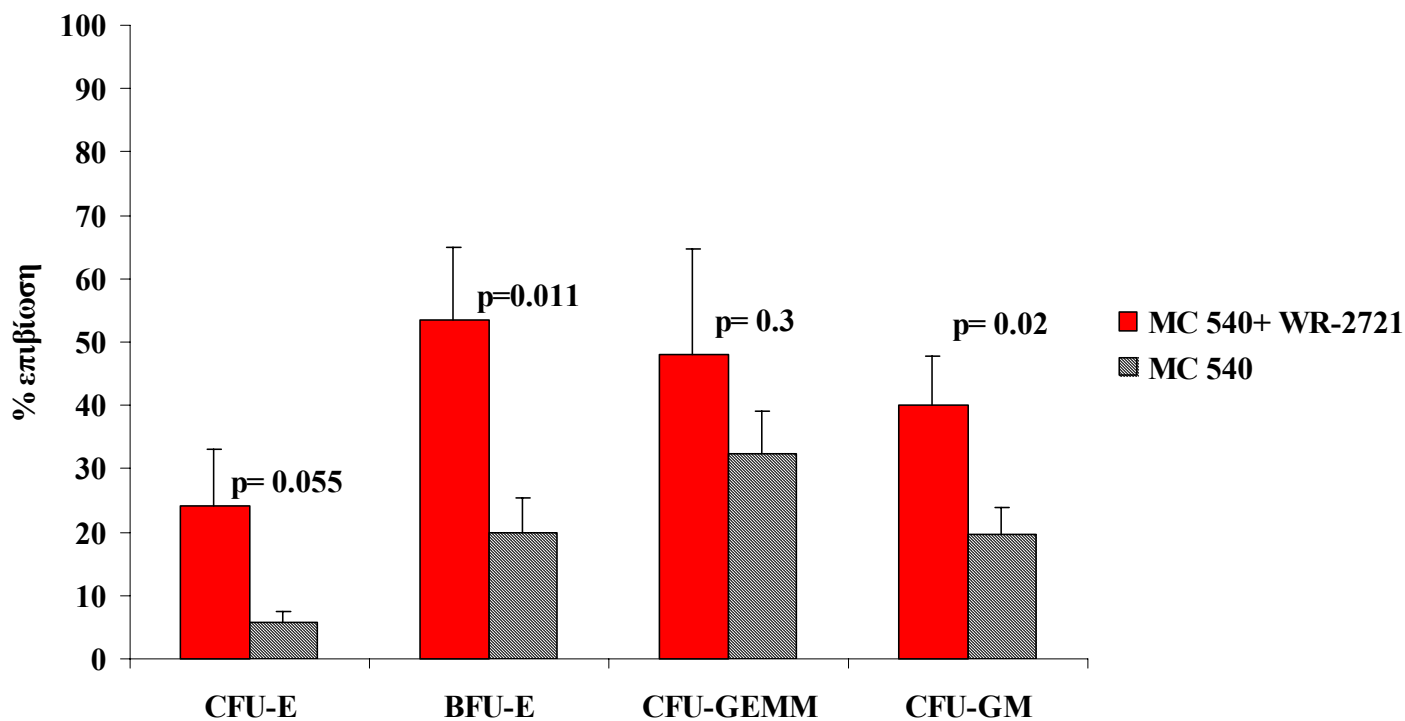
Πίνακας 12 . Επιβίωση των προγονικών κυττάρων μυελού από παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση (n=11) μετά από MC540 φωτοακτινοβόληση, παρουσία ή όχι διαφορετικών συγκεντρώσεων WR-2721 ή WR-1065. Αναγράφονται οι μέσες τιμές % επιβίωσης επί της ομάδας ελέγχου ± σταθερό σφάλμα (SE). Τα p αναφέρονται συγκριτικά με την ομάδα που δεν επώαστηκε με κυτταροπροστατευτικό παράγοντα.

Δόση ακτινοβολίας 74.8 J/cm ²	ΟΛ ύφεση			
	CFU-E	BFU-E	CFU-GEMM	CFU-GM
MC 540	5.6±1.7	20±5.4	32.45±6.6	19.7±4
MC 540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	24.2±8.8	53.51±11.52	48.11±16.46	40.04±7.6
	p=0.055	p=0.011	p=0.3	p=0.02
MC 540+WR-2721 (3 mg/ml)		41.26±14.6	51.64±6.5	46.43±8.15
		p=0.12	p=0.07	p=0.003
MC 540+ WR-1065 (0.2 mg/ml)		61.64±19.59		46.72±5.1
		p=0.014		p=0.002

Στην εκτίμηση της επίδρασης της Αμιφοστίνης στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα διαπιστώθηκε ότι η Αμιφοστίνη (1.5 mg/ml) και ο δραστικός μεταβολίτης WR-1065

(0.2 mg/ml) βελτιώνουν την επιβίωση των BFU-E και CFU-GM. Παρατηρήθηκε επίσης, βελτίωση της επιβίωσης των CFU-GM παρουσία 3 mg/ml Αμιφοστίνης.

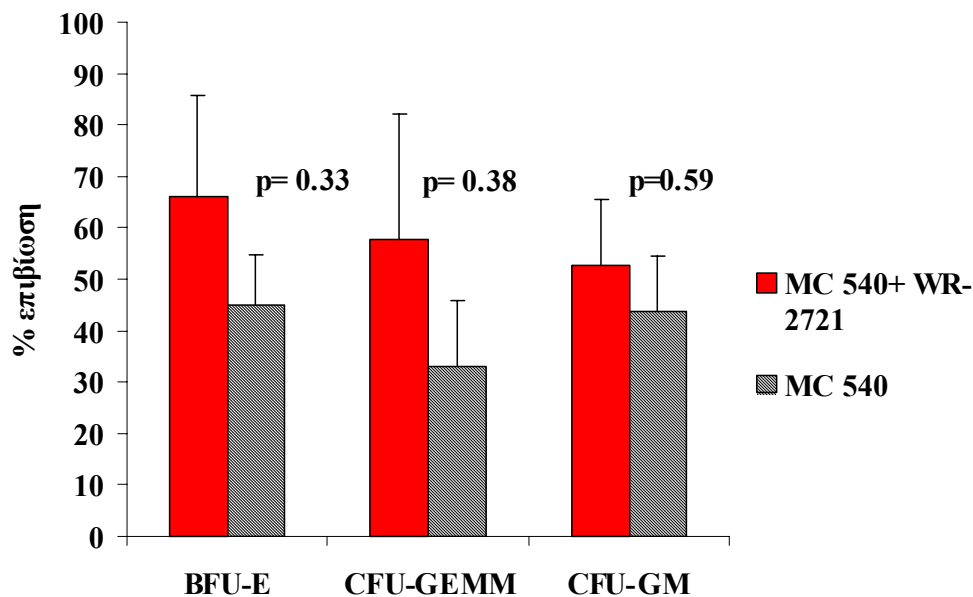
Στον Πίνακα 13 φαίνεται ότι η παρουσία της Αμιφοστίνης ενισχύει επίσης την ικανότητα σχηματισμού αποικιών BFU-E και CFU-GM. Επίσης προάγει την ανάπτυξη των CFU-GEMM μετά από ΦΔΘ, αλλά η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Τα κύτταρα που φωτοακτινοβολούνται χωρίς Αμιφοστίνη έχουν σημαντικά μειωμένη ικανότητα σχηματισμού αποικιών CFU-GEMM, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p=0.0018$). Αντιθέτως στα κύτταρα που φωτοακτινοβολούνται παρουσία Αμιφοστίνης, δεν φαίνεται να επηρεάζεται η ικανότητα σχηματισμού αποικιών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p=0.6$). Επώαση των κυττάρων μόνο με Αμιφοστίνη, δεν επηρεάζει την επιβίωση των φυσιολογικών



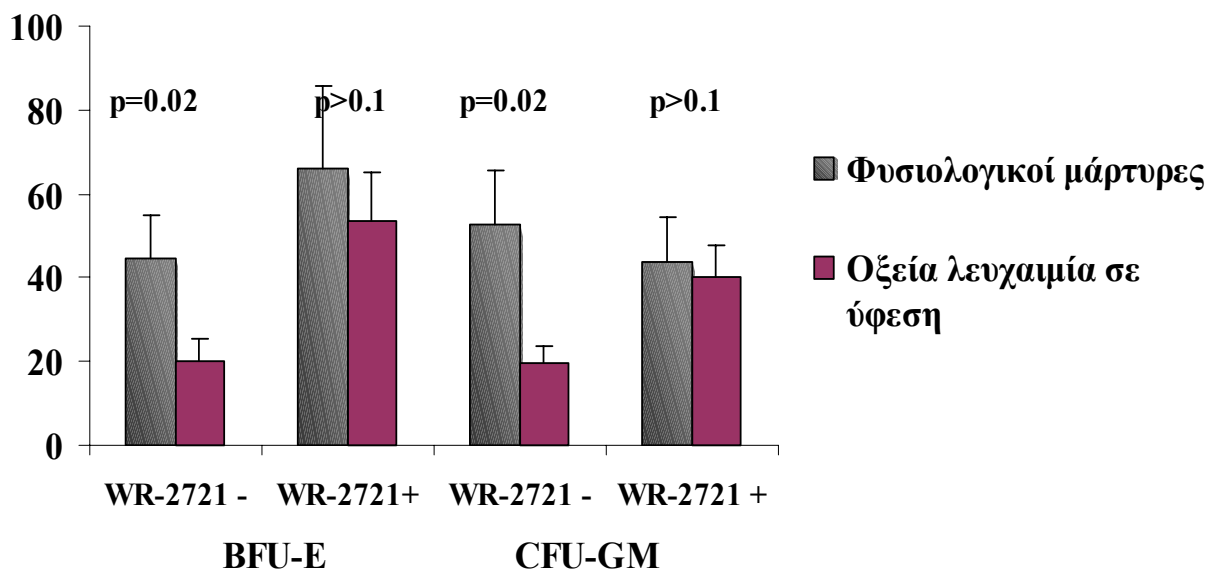
Σχήμα 6. Η επίδραση της Αμιφοστίνης (1.5 mg/ml) στην επιβίωση προγονικών κυττάρων μυελού από παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση ($n=11$) μετά MC 540 φωτοακτινοβόληση, σε δόση 74.8 J/cm².

ελέγχου ($p=0.6$). Επώαση των κυττάρων μόνο με Αμιφοστίνη, δεν επηρεάζει την επιβίωση των φυσιολογικών προγονικών κυττάρων, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η επίδραση της Αμιφοστίνης έχει άμεση σχέση με το φωτοδυναμικό φαινόμενο. Τέλος, η παρουσία της MC540 ή του Laser μεμονωμένα δεν επηρεάζουν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών (Πίνακας 13).

Η παρουσία της Αμιφοστίνης δεν επηρεάζει την επιβίωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων από τους φυσιολογικούς μάρτυρες (Πίνακας 14, Σχήμα 7) ούτε την ικανότητα σχηματισμού αποικιών (Πίνακας 15). Παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη ανάπτυξη των BFU-E και CFU-GM στα φυσιολογικά δείγματα, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα από λευχαιμίες σε ύφεση, μετά τη ΦΔΘ. Οι διαφορές αυτές στην επιβίωση μετά την φωτοδυναμική θεραπεία εξαλείφονται όταν τα κύτταρα επωάζονται με Αμιφοστίνη (1.5 mg/ml) (Σχήμα 8).



Σχήμα 7. Επίδραση της Αμιφοστίνης στην επιβίωση προγονικών κυττάρων μυελού από φυσιολογικούς μάρτυρες ($n=6$) μετά από MC 540 φωτοακτινοβολήση, σε δόση 74.8 J/cm^2 . Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα (SE).



Σχήμα 8. Σύγκριση της επίδρασης της Αμιφοστίνης (1.5 mg/ml) στην επιβίωση των BFU-E και CFU-GM μετά από MC 540 φωτοακτινοβόληση σε δόση 74.8 J/cm² σε φυσιολογικούς μάρτυρες και παιδιά με λευχαιμία σε ύφεση. Η επιβίωση των φυσιολογικών προγονικών κυττάρων γίνεται ανάλογη με των φυσιολογικών μαρτύρων μετά από επώαση με Αμιφοστίνη.

Πίνακας 13. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών μυελικών κυττάρων από παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση μετά από MC540 φωτοακτινοβόληση, παρουσία ή όχι διαφορετικών συγκεντρώσεων WR-2721 ή WR-1065 (n=11). Τα αποτελέσματα δείχνουν τη μέση τιμή και το σταθερό σφάλμα. Τα p αναφέρονται συγκριτικά με την αντίστοιχη ομάδα που δεν επώαστηκε με κυτταροπροστατευτικό παράγοντα.

Ικανότητα σχηματισμού αποικιών (colony forming efficiency)= αριθμός αποικιών δια του αριθμού των κυττάρων ανά τρυβλίο x 100

ΟΔ ύφεση

Ικανότητα σχηματισμού αποικιών

	CFU-E	BFU-E	CFU-GEMM	CFU-GM
74.8 J/cm ² , MC 540	0.002±0.0007	0.008±0.002	† 0.003±0.0009	0.032±0.01
74.8 J/cm ² , MC 540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	0.014±0.004 p=0.06	0.02±0.004 p=0.03	♦0.015±0.007 p=0.06	0.077±0.01 p=0.02
74.8 J/cm ² , MC 540+WR-2721 (3 mg/ml)	ΔΠ*	0.018±0.007 p=0.059	0.015±0.01 p>0.1	0.042±0.017 p>0.1
74.8 J/cm ² , MC 540+ WR-1065 (0.2 mg/ml)	ΔΠ	0.016±0.004 p=0.19	0.007±0.002 p>0.1	0.032±0.017 p>0.1
74.8 J/cm ² , MC 540+ WR-1065 (1.5 mg/ml)	ΔΠ	0.034±0.02 p=0.04	0.017±0.008 p>0.1	0.053±0.02 p>0.1
Ομάδα ελέγχου	0.014±0.007	0.06±0.01	† ♦0.013±0.002	0.164±0.03
Ομάδα ελέγχου+WR-2721 (1.5 mg/ml)	0.04±0.02 p=0.35	0.08±0.02 p>0.1	0.022±0.005 p=0.1	0.165±0.04 p>0.1
Ομάδα ελέγχου+WR-2721 (3 mg/ml)	ΔΠ	0.11±0.05 p=0.16	0.018±0.008 p>0.1	0.156±0.06 p>0.1
MC 540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	0.037±0.03 p>0.1	0.1±0.03 p>0.1	0.02±0.002 p>0.1	0.165 p>0.1
Laser+WR-2721 (1.5 mg/ml)	0.016±0.006 p>0.1	0.09±0.07 p>0.1	0.028±0.01 p>0.1	0.26±0.1 p>0.1

*ΔΠ= Δεν προσδιορίστηκε

† p=0.0018

♦p=0.6

Στα φυσιολογικά παιδιά, η παρουσία της Αμιφοστίνης στις καλλιέργειες προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, που δεν έχουν υποστεί φωτοδυναμική θεραπεία, δεν επηρεάζει την ανάπτυξή τους (Πίνακες 14,15). Αντίστοιχα η προσθήκη Αμιφοστίνης στην καλλιέργεια κυττάρων χωρίς φωτοδυναμική θεραπεία δεν επηρεάζει τον απόλυτο αριθμό αποικιών τόσο στα φυσιολογικά παιδιά όσο και στα παιδιά με λευχαιμίες σε ύφεση (Πίνακας 16, Σχήματα 9, 10). Ενδιαφέρον είναι ότι η ανάπτυξη των CFU-GEMM (ο απόλυτος αριθμός) ήταν σημαντικά μικρότερη στα παιδιά με οξείες λευχαιμίες υπό χημειοθεραπεία σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες (p=0.03). Αντίθετα ο αριθμός των CFU-GM ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στην κατηγορία αυτή των ασθενών (p=0.04).

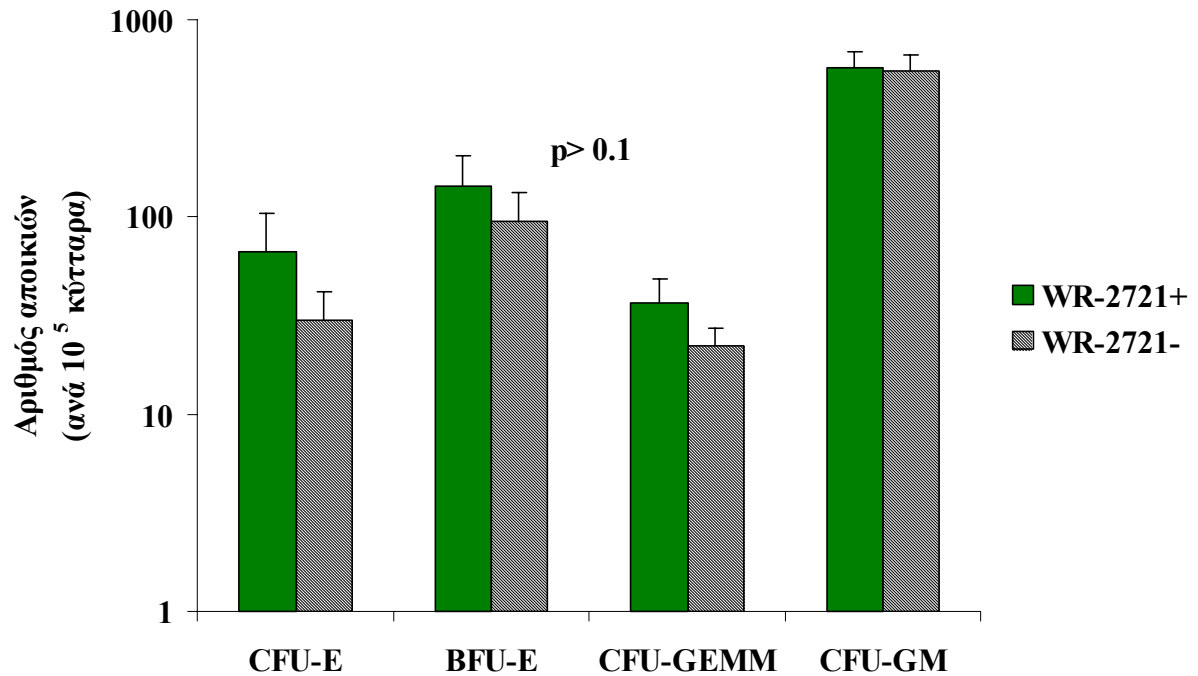
Πίνακας 14. Επιβίωση των προγονικών κυττάρων μυελού από φυσιολογικά παιδιά μετά από MC540 φωτοακτινοβόληση, παρουσία ή όχι WR-2721 (n=6). Αναγράφονται οι μέσες τιμές % επιβίωσης επί της ομάδας ελέγχου ± σταθερό σφάλμα (SE). Τα p αναφέρονται συγκριτικά με την ομάδα που δεν επώαστηκε με κυτταροπροστατευτικό παράγοντα.

Φυσιολογικοί μάρτυρες			
(% επιβίωση)			
	Αμιφοστίνη	Χωρίς Αμιφοστίνη	p
BFU-E	66.12±19.5	44.86±9.9	p=0.33
CFU-GEMM	57.82±24.22	32.98±12.84	p=0.38
CFU-GM	52.8±12.7	43.68±10.7	p=0.59

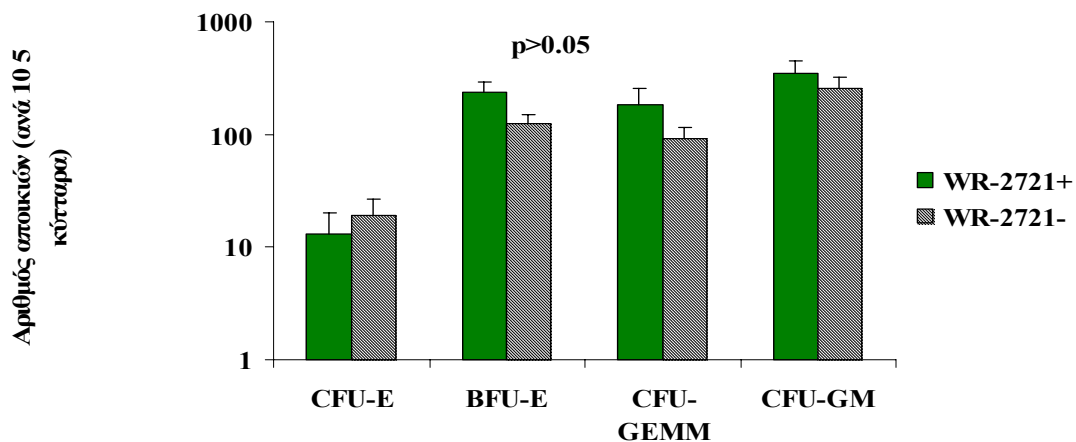
Πίνακας 15. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών μυελικών κυττάρων από φυσιολογικά παιδιά μετά από MC 540 φωτοακτινοβόληση, παρουσία ή όχι WR-2721(n=6). Τα αποτελέσματα δείχνουν τη μέση τιμή και το σταθερό σφάλμα. Τα p αναφέρονται συγκριτικά με την ομάδα που δεν επώαστηκε με κυτταροπροστατευτικό παράγοντα.

Φυσιολογικοί μάρτυρες				
Ικανότητα σχηματισμού αποικιών				
	CFU-E	BFU-E	CFU-GEMM	CFU-GM

74.8 J/cm ² +MC 540	0.009±0.005	0.07±0.02	0.027±0.01	0.05±0.01
74.8 J/cm ² +MC 540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	0.014±0.007 p>0.1	0.086±0.02 p>0.1	0.08±0.02 p=0.089	0.09±0.03 p>0.1
Ομάδα ελέγχου	0.02±0.006	0.07±0.01	0.09±0.01	0.18±0.02
Ομάδα ελέγχου+WR-2721 (1.5 mg/ml)	0.02±0.007 p>0.1	0.18±0.1 p=0.03	0.18±0.09 p>0.1	0.27±0.02 p=0.03



Σχήμα 9. Η επίδραση της Αμφοστίνης στην επιβίωση των προγονικών κυττάρων μυελού από παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση χωρίς MC 540 φωτοθεραπεία (n=7).



Σχήμα 10. Η επίδραση της Αμιφοστίνης στην επιβίωση των προγονικών κυττάρων μυελού από φυσιολογικά παιδιά χωρίς MC 540 φωτοθεραπεία (n=4).

Πίνακας 16. Απόλυτος αριθμός αποικιών ανά 10^5 κύτταρα από κύτταρα μυελού φυσιολογικών παιδιών (n=4) και παιδιών με οξεία λευχαιμία σε ύφεση (n=7) που επώαστηκαν με ή χωρίς Αμιφοστίνη (1.5 mg/ml). Αναφέρεται η μέση τιμή \pm σταθερό σφάλμα.

	Φυσιολογικά παιδιά		ΟΛ ύφεση	
	Αμιφοστίνη	Χωρίς Αμιφοστίνη	Αμιφοστίνη	Χωρίς Αμιφοστίνη
CFU-E	13 \pm 7	19 \pm 8 (p>0.1)	67 \pm 37	30 \pm 12 (p>0.1)
BFU-E	217 \pm 43	123 \pm 26 (p=0.08)	143 \pm 61	96 \pm 37 (p>0.1)
CFU-GEMM	173 \pm 52	92 \pm 24 (p>0.1)	37 \pm 12	22 \pm 5 (p>0.1)
CFU-GM	346 \pm 109	256 \pm 71 (p>0.1)	574 \pm 112	551 \pm 108 (p>0.1)

Τέλος μελετήθηκε η επιβίωση των φυσιολογικών αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων από παιδιά με νευροβλάστωμα και διήθηση μυελού (n=5). Παρατηρήθηκε ικανοποιητική επιβίωση των BFU-E, CFU-GEMM και CFU-GM μετά από ΦΔΘ. Η επώαση των κυττάρων με 1.5 mg/ml WR-2721 βελτιώνει την επιβίωση και των τριών κυτταρικών σειρών (BFU-E, CFU-GEMM, CFU-GM) και στατιστικά σημαντική είναι η διαφορά για τα BFU-E (p=0.03) και CFU-GEMM (p=0.03), ενώ η επώαση με 0.2 mg/ml WR-1065 βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση των BFU-E (p=0.01), CFU-GEMM (p=0.028) και CFU-GM (p=0.016) (Πίνακας 17).

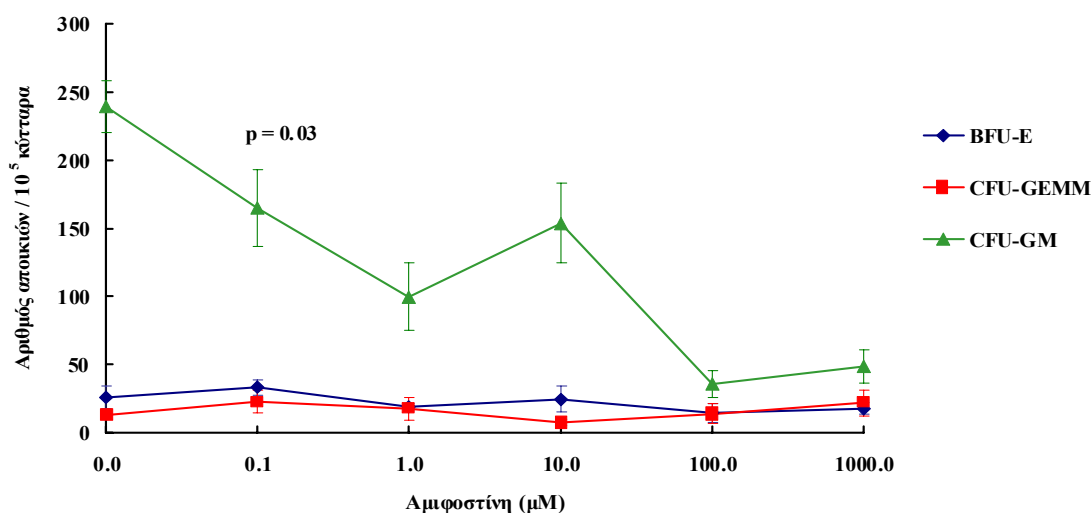
Πίνακας 17. Επιβίωση των προγονικών κυττάρων μυελού από παιδιά με νευροβλάστωμα μετά από MC 540 φωτοακτινοβόληση, παρουσία ή όχι WR-2721 ή WR-1065. Αναγράφονται οι μέσες τιμές % επιβίωσης επί της ομάδας ελέγχου \pm σταθερό σφάλμα (SE). Τα p αναφέρονται συγκριτικά με την ομάδα που δεν επώαστηκε με κυτταροπροστατευτικό παράγοντα.

Δόση ακτινοβολίας 74.8 J/cm ²	Παιδιά με νευροβλάστωμα (n=5)		
	BFU-E	CFU-GEMM	CFU-GM
MC 540	45.57 \pm 10	37.14 \pm 10.9	58 \pm 5.79
MC540+WR-2721 (1.5 mg/ml)	90.48 \pm 17.7	76.95 \pm 12.55	63.16 \pm 9.16

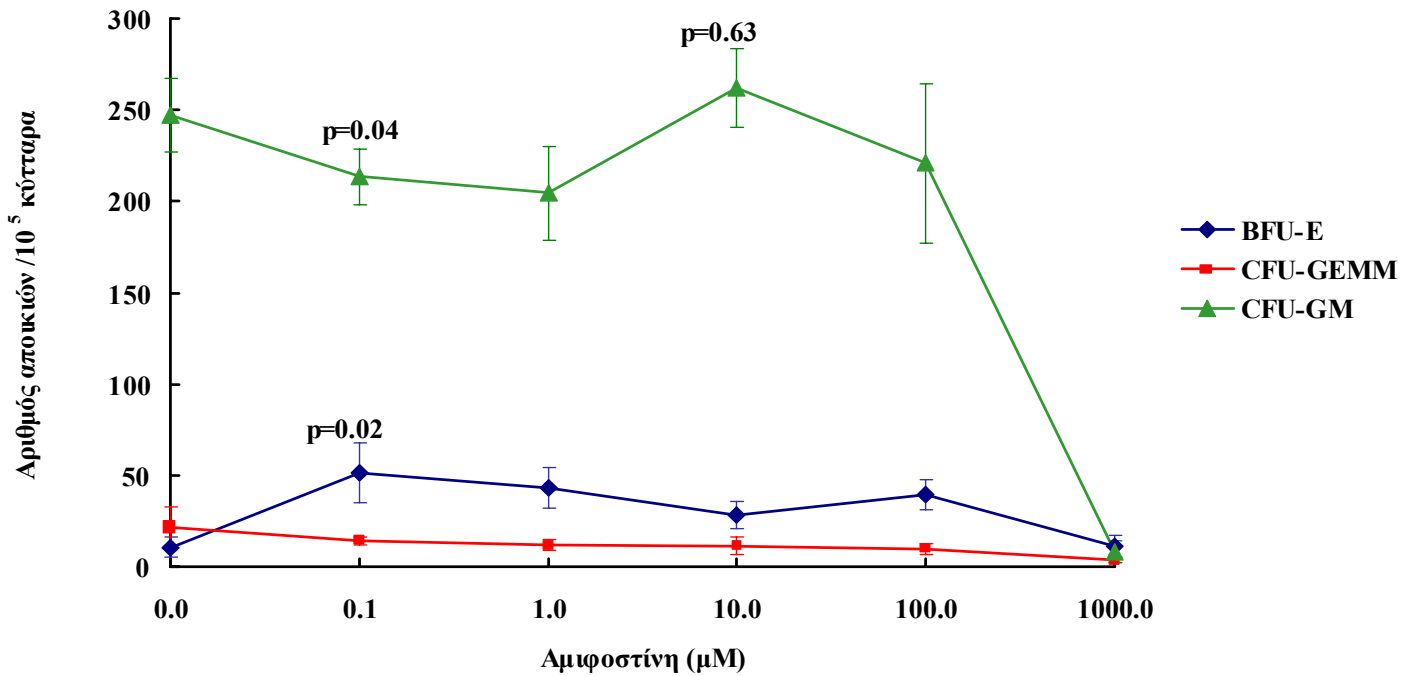
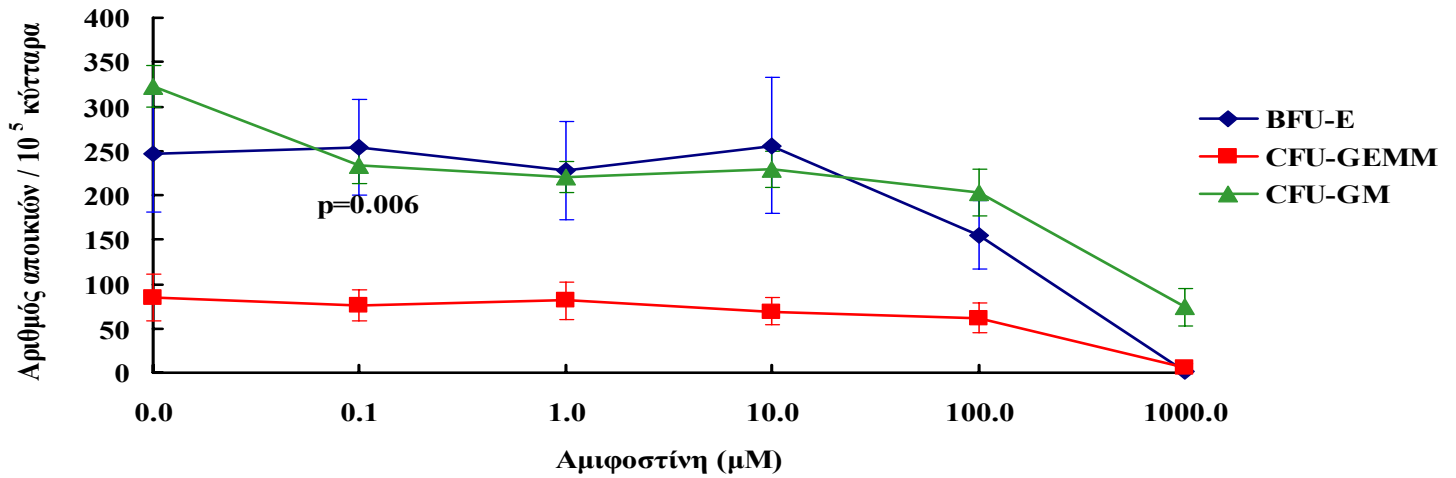
	p=0.03	p=0.03	p=0.64
MC 540+WR-1065 (0.2 mg/ml)	89.11±12.67	80.41±13.34	79.6±5.1
	p=0.01	p=0.02	p=0.016

2.8 Δράση της Αμιφοστίνης στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων

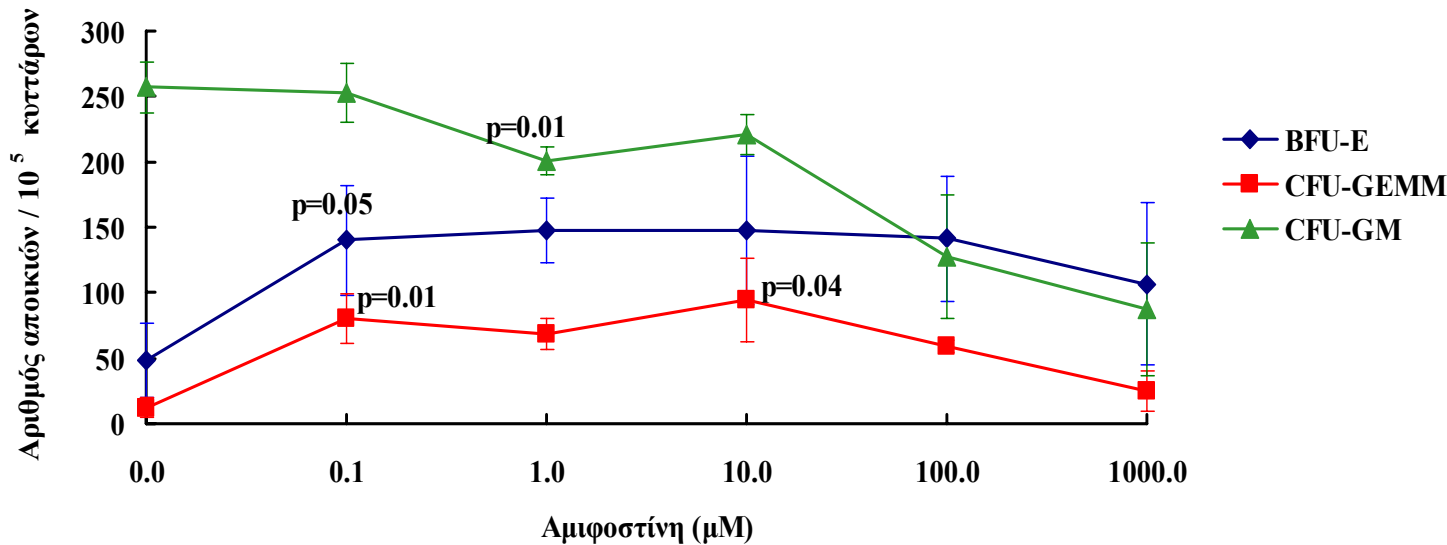
Για να εκτιμηθεί καλύτερα η πιθανή επαγωγική δραστηριότητα της Αμιφοστίνης ως θειόλης στην αιμοποίηση, μελετήθηκε η επίδραση *in vitro* διαφόρων συγκεντρώσεων Αμιφοστίνης (0.1-1000 μM) στην ανάπτυξη των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων από παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση (n=8), φυσιολογικά παιδιά (n=6), παιδιά με ουδετεροπενία (n=8) και παιδιά με θρομβοπενία (n=3). Τα κύτταρα επώαστηκαν με Αμιφοστίνη για 5 λεπτά και ακολούθως εκπλύθηκαν δύο φορές προτού μπούν σε ημιστερεές καλλιέργειες μεθυλοκυτταρίνης παρουσία αυξητικών παραγόντων (Κεφάλαιο Υλικό και Μέθοδοι). Η παρουσία της Αμιφοστίνης, δεν φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη των BFU-E και CFU-GEMM στα παιδιά με λευχαιμία σε ύφεση (σχήμα 11) και στα φυσιολογικά παιδιά (σχήμα 12), ενώ φαίνεται να ασκεί ανασταλτική επίδραση στα CFU-GM. Σε όλα τα πειράματα η συγκέντρωση 1000 μM φαίνεται να έχει ισχυρή ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη όλων των σειρών των προγονικών κυττάρων ($p < 0.0005$). Παρατηρήθηκε μία σημαντική βελτίωση στην ανάπτυξη των BFU-E στα παιδιά με ουδετεροπενία (σχήμα 13) και θρομβοπενία (σχήμα 14) καθώς και στην ανάπτυξη των CFU-GEMM στα παιδιά με θρομβοπενία, σε συγκέντρωση 0.1 μM .



Σχήμα 11. Επίδραση της παρουσίας Αμιφοστίνης σε συγκεντρώσεις 0.1-1000 μM στην επιβίωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων παιδιών με οξεία λευχαιμία σε ύφεση.



Σχήμα 13. Επίδραση της παρουσίας Αμιφοστίνης σε συγκεντρώσεις 0.1-1000 μM στην επιβίωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων παιδιών με ουδετεροπενία.



Σχήμα 14. Επίδραση της παρουσίας Αμφοστίνης σε συγκεντρώσεις 0.1-1000 μM στην επιβίωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων παιδιών με θρομβοπενία.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της κάθαρσης του μυελού των οστών, έχουν συζητηθεί από πολλούς ερευνητές. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι η παρουσία υπολειμματικών νεοπλασματικών κυττάρων στο αυτόλογο μόσχευμα του μυελού είναι υπεύθυνη για υποτροπές της νόσου και ελαττωμένη επιβίωση ελεύθερη νόσου. Στόχος της κάθαρσης είναι να απομακρύνει τα νεοπλασματικά κύτταρα από το μόσχευμα χωρίς να επηρεάσει σημαντικά τα φυσιολογικά αρχέγονα και προγονικά κύτταρα και την ικανότητα της αποκατάστασης της αιμοποίησης.

Τα λευχαιμικά κύτταρα παρουσιάζουν διαφορές στην κλωνογονικότητα και την ικανότητά τους να εγκαταστήσουν λευχαιμία. Έτσι σε μυελό σε κλινική ύφεση, μετά την αυτόλογη μεταμόσχευση, σημαίνει ότι οι φυσιολογικοί κλώνοι, αναπτύσσονται διατηρώντας φυσιολογική αιμοποίηση εις βάρος του λευχαιμικού κλώνου. Η υποτροπή συμβαίνει όταν ο λευχαιμικός κλώνος παύει να είναι σε κατάσταση ηρεμίας και

επανεισέρχεται στον κυτταρικό κύκλο. Η *in vitro* κάθαρση πριν την αυτόλογη μεταμόσχευση, μπορεί να επαναφέρει αποτελεσματικά την ισορροπία ανάμεσα στους φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς κλώνους και να επηρεάσει ευνοϊκά την αναγεννητική δραστηριότητα (repopulating activity) των αρχέγονων κυττάρων, καταστρέφοντας τα λευχαιμικά. Οι συνήθως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι κάθαρσης, που έχουν την ικανότητα να καταστρέψουν τα κακοήθη κύτταρα κατά 4-6 log φαίνεται να δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα, αν και έχει υπολογιστεί ότι για ένα ασθενή βάρους 75 kg που λαμβάνει αυτόλογο μόσχευμα 1.5×10^{10} κύτταρα με 0.1 έως <5% διήθηση με βλάστες, χρειάζεται να επιτευχθεί θανάτωση κατά 8 log των λευχαιμικών κυττάρων και κατά 6 log των κλωνογονικών κυττάρων [43].

Η φωτοδυναμική θεραπεία με MC540, αποτελεί ένα πρόσφατο πειραματικό πεδίο, στο χώρο της έρευνας για την κάθαρση του μυελού. Η MC540, είναι φωτοευαίσθητη χρωστική, που παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με τα λευχαιμικά κύτταρα από τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού. Με ακτινοβόληση με φως κατάλληλου μήκους κύματος, η MC540 ασκεί αντινεοπλασματική δράση [240, 242, 243, 287, 288, 294, 298-301]. Παρόλα αυτά η μέθοδος δεν είναι απόλυτα εκλεκτική και εμφανίζει κάποιου βαθμού τοξικότητα και για τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα [298, 300]. Το γεγονός αυτό επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα του μοσχεύματος, με αποτέλεσμα καθυστέρηση της αιμοποιητικής αποκατάστασης και εγκατάστασης του μοσχεύματος και συνεπώς σοβαρές και δυνητικά θανατηφόρες επιπλοκές, όπως αιμορραγίες και λοιμώξεις. Είναι λοιπόν απαραίτητη η εύρεση προστατευτικών ουσιών, οι οποίες θα βελτιώσουν την επιβίωση των φυσιολογικών αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών προβαθμίδων, χωρίς να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η δράση της MC540 φωτοακτινοβόλησης με ακτινοβολία Laser, παρουσία της θειόλης Αμιφοστίνης σε νεοπλασματικά και φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε πρωτοδιάγνωση, λευχαιμίες σε ύφεση, νευροβλάστωμα και φυσιολογικούς μάρτυρες. Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, δεν έχουν δημοσιευτεί πειραματικά δεδομένα που να αναφέρονται στη συνδυασμένη επίδραση της Αμιφοστίνης και MC540 φωτοακτινοβόλησης με Laser σε κύτταρα από νωπά δείγματα μυελού από παιδιά με

οξείες λευχαιμίες στη διάγνωση, σε ύφεση ή από παιδιά με συμπαγείς όγκους. Οι δημοσιεύσεις αφορούν μόνο κάθαρση κυτταρικής σειράς μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονος και την επιβίωση προγονικών κυττάρων μυελού CFU-GEMM από φυσιολογικούς ενήλικους δότες, με συνδυασμό Αμιφοστίνης, MC540 και λευκού φωτός [366]. Στην παρούσα μελέτη ως πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε μονοχρωματική ακτινοβολία (Laser), η οποία υπερέχει του λευκού φωτός, γιατί αποφεύγεται η μη ειδική κυτταρική καταστροφή λόγω θερμικών φαινομένων καθώς και η δυνητική μεταλλαξιγένεση από μακρούς χρόνους έκθεσης στο φως [298, 259]. Η σημασία της μελέτης σε κύτταρα μυελού από ασθενείς που λαμβάνουν χημειοθεραπεία είναι μεγάλη, καθότι η κάθαρση μυελού δεν εφαρμόζεται σε φυσιολογικούς δότες, αλλά σε ασθενείς που έχουν λάβει υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας και το αιμοποιητικό τους σύστημα έχει υποστεί σχετικές βλάβες.

Σήμερα, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι κάθαρσης είναι οι φαρμακολογικές και ανοσολογικές μέθοδοι. Οι μέθοδοι αυτές επιτυγχάνουν κάθαρση λευχαιμικών κυττάρων κατά 4 έως 8 log [67-74, 87-103]. Η χρήση κυτταροστατικών, όπως οι μεταβολίτες της κυκλοφωσφαμίδης, παρουσιάζει περιορισμούς καθώς έχουν στενό θεραπευτικό εύρος. Είναι ιδιαίτερα τοξικοί για τα CFU-GM, επιτρέποντας την επιβίωση κατά 0-5% [72]. Επίσης οι φαρμακευτικές μέθοδοι έχουν το μειονέκτημα ότι εφαρμόζονται σε ασθενείς που έχουν λάβει χημειοθεραπεία επί μακρό χρονικό διάστημα, με κίνδυνο τα νεοπλασματικά κύτταρα να έχουν αναπτύξει φαρμακευτική αντοχή. Από την άλλη, οι ανοσολογικές μέθοδοι, μπορεί να υπερέχουν ως προς την εκλεκτικότητα, αλλά έχουν το μειονέκτημα ότι προϋποθέτουν παρασκευή μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι μεγάλου αριθμού αντιγόνων. Πρέπει δε να ληφθεί υπόψιν ότι υπάρχει ποικιλία στην αντιγονική έκφραση, που δεν αφορά μόνο διαφορετικούς μορφολογικούς υποτύπους των κακοηθειών και διαφορετικούς ασθενείς, αλλά συχνά παρατηρείται ετερογένεια στην αντιγονική έκφραση ακόμη και μέσα στα νεοπλασματικά κύτταρα του ίδιου ασθενή [97, 104-106]. Επιπλέον έχουν αναφερθεί μηχανισμοί αντίστασης, όπως απώλεια της φαινοτυπικής έκφρασης διαφόρων αντιγόνων ή παρουσία ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος που εμποδίζουν την κυτταρική λύση και που καθιστούν την εφαρμογή των ανοσολογικών μεθόδων δυσκολότερη [100, 108]. Εξάλλου και οι

ανοσολογικές μέθοδοι παρουσιάζουν μη ειδική καταστροφή των φυσιολογικών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων.

Τα προβλήματα αυτά αντιμετωπίζει η φωτοδυναμική θεραπεία που είναι αποτελεσματική ακόμη και έναντι νεοπλασματικών κυττάρων με πολυφαρμακευτική αντοχή [197, 198, 393]. Παρά την εκλεκτικότητα της μεθόδου, παρατηρείται κάποιου βαθμού τοξική επίδραση στα φυσιολογικά αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα [298, 300]. Για το λόγο αυτό είναι πολύ σημαντικό να βρεθούν παράγοντες που προστατεύουν τα φυσιολογικά κύτταρα του μυελού ενώ ταυτόχρονα δεν θα επηρεάζουν την επιβίωση των νεοπλασματικών κυττάρων ή στην ιδανική περίπτωση θα ενισχύουν το φωτοτοξικό φαινόμενο εναντίον τους. Πρόσφατα οι Λυδάκη και συν. έδειξαν ότι η ανθρώπινη λευκωματίνη βελτιώνει την επιβίωση των πρόδρομων κυττάρων μυελού και των προγονικών κυττάρων της ερυθράς σειράς (BFU-E), από παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση, μετά από MC540 φωτοακτινοβόληση. Ταυτόχρονα όμως παρατηρήθηκε μικρή θετική επίδραση στην επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων. Συνεπώς, ο παράγοντας αυτός από μόνος του δεν είναι κατάλληλος για κάθαρση του μυελού [300].

Η Αμιφοστίνη είναι μία οργανική θειοφωσφορική ένωση που έχει χρησιμοποιηθεί για την προστασία των φυσιολογικών κυττάρων και ιστών από την τοξικότητα της χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας. Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί στην κάθαρση μυελού με παράγωγα κυκλοφωσφαμίδης όπου φαίνεται ότι βελτιώνει την ποιότητα του μοσχεύματος και μειώνει την περίοδο πανκυτταροπενίας κατά την αυτόλογη μεταμόσχευση μυελού [377]. Έχει ήδη μελετηθεί η επίδραση των θειολών χαμηλού μοριακού βάρους στην κυτταρική επιβίωση και η προστατευτική τους δράση έναντι των φωτοοξειδωτικών βλαβών μετά τη ΦΔΘ [255, 275, 276, 338, 394]. Η Αμιφοστίνη προστατεύει *in vitro* και *in vivo* φυσιολογικούς ιστούς μετά από ΦΔΘ με παράγωγα αιματοπορφυρίνης. Ως πιθανοί μηχανισμοί προστασίας προτείνονται η εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών (scavenging) και του μονήρους οξυγόνου (quenching) και η μείωση του φωτοπολυμερισμού των πρωτεϊνών μέσω επιτάχυνσης της φωτοδιάσπασης (photobleaching) των πορφυρινών [394]. Επίσης η παρουσία της Αμιφοστίνης κατά την φωτοακτινοβόληση έχει σαν συνέπεια τη δέσμευση του οξυγόνου, δημιουργώντας υποξικές συνθήκες [339] που ευνοούν τις αντιδράσεις τύπου I παρά τις τύπου II αντιδράσεις [264]. Το περιεχόμενο των κυττάρων σε γλουταθειόνη από την άλλη

καθορίζει την ευαισθησία τους στη ΦΔΘ με λευκό φως σε συνδυασμό με παράγωγα αιματοπορφυρίνης [338] και Μεροκυανίνη [255, 275, 276]. Κύτταρα τα οποία επωάζονται με τον αναστολέα βιοσύνθεσης γλουταθειόνης BSO, ή περιέχουν γενετικά καθορισμένα μειωμένη γλουταθειόνη είναι πιο ευαίσθητα στη ΦΔΘ. Η γλουταθειόνη εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, προστατεύει τα ακόρεστα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης από τις διαδικασίες της φωτοοξειδωτικής και συμμετέχει σε κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, ως δότης υδρογόνου.

Με βάση τα δεδομένα αυτά, μελετήθηκε η επίδραση της Αμιφοστίνης σε κύτταρα μυελού από παιδιά με λευχαιμίες, νευροβλάστωμα και φυσιολογικούς μάρτυρες καθώς και σε κύτταρα λευχαιμικής σειράς HL-60.

Τα λευχαιμικά κύτταρα του μυελού από παιδιά με οξεία λευχαιμία στην πρωτοδιάγνωση έχουν μεγάλη ευαισθησία στη φωτοακτινοβόληση με MC540 (κυτταρικός θάνατος >95%). Η επιβίωση των κυττάρων που παρατηρείται μπορεί να οφείλεται στο ποσοστό των φυσιολογικών μονοπυρήνων κυττάρων. Η ετερογένεια της ευαισθησίας της μεθόδου που παρατηρήθηκε, πιθανώς οφείλεται σε δομικές διαφορές στην κυτταρική μεμβράνη μεταξύ των βλαστών, οι οποίοι με τις ισχύουσες μεθόδους αναγνώρισης ταξινομούνται στην ίδια κατηγορία. Είναι επίσης πιθανό κάποια κύτταρα να είναι ενδογενώς λιγότερο ευαίσθητα στη φωτοδυναμική βλάβη από άλλα ή περισσότερο ικανά να επιδιορθώσουν τις βλάβες που υφίστανται κατά τη ΦΔΘ. Στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, η παρουσία της Αμιφοστίνης φαίνεται να μειώνει σημαντικά την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων, ιδιαίτερα στις μικρές δόσεις ακτινοβολίας. Η επώαση με WR-1065 δεν επηρεάζει στατιστικά την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων. Από τα σημερινά δεδομένα παραμένει αδιευκρίνιστη η αντιλευχαιμική δράση της Αμιφοστίνης. Ομοίως στην οξεία μυελογενή λευχαιμία η επώαση με Αμιφοστίνη μειώνει σημαντικά την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων στη μικρότερη δόση ακτινοβολίας. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην οξεία λεμφοβλαστική και μυελογενή λευχαιμία.

Κατά τη ΦΔΘ η παρουσία Αμιφοστίνης δεν προστατεύει τα κύτταρα της λευχαιμικής σειράς HL-60. Φαίνεται μάλιστα να ενισχύει ελαφρώς το φωτοδυναμικό φαινόμενο, αφού επιτυγχάνεται μείωση των λευχαιμικών κυττάρων κατά 3 log με ακτινοβόληση στα 46.8 J/cm², ενώ κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες χωρίς

Αμιφοστίνη επιβιώνουν περίπου 10% κύτταρα HL-60. Οι αντιλευχαιμικές ιδιότητες της Αμιφοστίνης είναι ένα παράδοξο φαινόμενο, που όμως έχει καταδειχθεί *in vitro* και με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως νιτρώδη μουστάρδας [363], πακλιταξέλη [365], καρβοπλατίνη [364], και μαφροσφαμίδη [374]. Επίσης οι Meagher και συν. αναφέρουν ότι η Αμιφοστίνη ενισχύει τη φωτόλυση κυττάρων μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονος με φωτοθεραπεία με MC540 και λευκό φως [366]. Ο μηχανισμός με τον οποίο ασκεί αυτή τη δράση είναι άγνωστος. Θα μπορούσε να οφείλεται σε διαφορές στη πρόσληψη της Αμιφοστίνης μεταξύ των φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων, που μπορεί να ρυθμίζει επίσης και τη σύνδεση της MC540 σε αυτά. Σε προκλινικές μελέτες έχει δειχθεί ότι η Αμιφοστίνη και ο δραστικός μεταβολίτης της WR-1065 μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα γλουταθειόνης σε ορισμένες κυτταρικές σειρές [395, 396]. Εφόσον η Αμιφοστίνη απορροφάται από τα νεοπλασματικά κύτταρα σε μικρότερο βαθμό από τα φυσιολογικά και με παθητική διάχυση, είναι δυνατόν να μειώνει τα επίπεδα γλουταθειόνης και συνεπώς να αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στη φωτοθεραπεία. Είναι γνωστός ο ρόλος της γλουταθειόνης στους μηχανισμούς κυτταρικής επιδιόρθωσης από τις οξειδωτικές βλάβες [324]. Εξάλλου έχει αναφερθεί και άμεση αντιλευχαιμική δράση της Αμιφοστίνης, μέσω επαγωγής του πρωτο-ογκογονιδίου p53, που συμμετέχει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και αναστέλλει την κλωνική ανάπτυξη [380, 391], δράση την οποία εμφανίζει και η Μεροκυανίνη [397]. Άλλοι μηχανισμοί, όπου φαίνεται να συγκλίνουν οι δράσεις της Αμιφοστίνης και Μεροκυανίνης είναι στη διαδικασία της απόπτωσης και στην αναστολή της τοποϊσομεράσης II. Και οι δύο ουσίες φαίνεται να αναστέλλουν την τοποϊσομεράση II [344, 398].

Η επιβίωση των φυσιολογικών πρόδρομων κυττάρων μυελού στις 24 ώρες μετά τη ΦΔΘ ευνοείται από την παρουσία Αμιφοστίνης στα παιδιά με λευχαιμία με ύφεση (20 ± 2.6 έναντι 54.5 ± 13.2 , $p=0.02$). Αντίθετα, στους φυσιολογικούς μάρτυρες, η παρουσία της Αμιφοστίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει την επιβίωση των κυττάρων. Επίσης, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην επιβίωση των κυττάρων από παιδιά με λευχαιμίες σε ύφεση και φυσιολογικά παιδιά, αλλά η επιβίωση των κυττάρων στην πρώτη ομάδα είναι σχετικά μικρότερη. Οι διαφορές ίσως αντανακλούν βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης ή διαταραχές στους μηχανισμούς

κυτταρικής επιδιόρθωσης στα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα που προκαλούνται από τη χημειοθεραπεία. Πάντως το εύρημα ότι η Αμιφοστίνη προστατεύει σε μεγαλύτερο βαθμό τα αιμοποιητικά κύτταρα από παιδιά με λευχαιμία σε ύφεση έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς η ΦΔΘ ως μελλοντική μέθοδος κάθαρσης στοχεύει σε αυτή την κατηγορία των ασθενών.

Αντίστοιχα, η Αμιφοστίνη ευνοεί την επιβίωση των φυσιολογικών προγονικών κυττάρων της ερυθράς (BFU-E) και μυελικής σειράς (CFU-GM) από τα παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση, καθώς και την ικανότητα σχηματισμού αποικιών. Παρόμοια δράση παρουσιάζει και ο δραστικός μεταβολίτης WR-1065. Παρατηρείται προστατευτική δράση στην επιβίωση των CFU-GM και μετά από επώαση με μεγαλύτερες δόσεις Αμιφοστίνης (3 mg/ml). Η Αμιφοστίνη δεν προστατεύει τα CFU-GEMM, εύρημα που συμφωνεί με την βιβλιογραφία [366]. Διαπιστώσαμε όμως ότι τα κύτταρα που φωτοακτινοβολούνται χωρίς Αμιφοστίνη έχουν σημαντικά μειωμένη ικανότητα σχηματισμού αποικιών CFU-GEMM, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ενώ όταν φωτοακτινοβολούνται παρουσία Αμιφοστίνης η ικανότητα σχηματισμού αποικιών δεν διαφέρει σημαντικά από της ομάδας ελέγχου. Επώαση των κυττάρων μόνο με Αμιφοστίνη δεν επηρεάζει την επιβίωση, άρα η Αμιφοστίνη προστατεύει άμεσα από το φωτοδυναμικό φαινόμενο και τις οξειδωτικές βλάβες. Αντίθετα στους φυσιολογικούς μάρτυρες η Αμιφοστίνη δε μεταβάλλει την επιβίωση των προγονικών κυττάρων ούτε την ικανότητα σχηματισμού αποικιών μετά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Μία άλλη σημαντική παρατήρηση είναι ότι τα προγονικά κύτταρα της ερυθράς (BFU-E) και της μυελικής σειράς (CFU-GM) από τα παιδιά με λευχαιμία σε ύφεση είναι πιο ευαίσθητα στη φωτοδυναμική θεραπεία από τα αντίστοιχα των φυσιολογικών μαρτύρων. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενη δημοσίευση [300]. Η επώαση με Αμιφοστίνη απαλείφει τη διαφορά, γεγονός που τονίζει την ιδιαίτερη κυτταροπροστατευτική δράση της στα κύτταρα μυελού από παιδιά που λαμβάνουν χημειοθεραπεία, τα οποία είναι και τα πιο ευαίσθητα στο φωτοτοξικό φαινόμενο.

Στα φυσιολογικά παιδιά, η παρουσία της Αμιφοστίνης στις καλλιέργειες προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων που δεν φωτοακτινοβολούνται δεν επηρεάζει την ανάπτυξη τους. Ενδιαφέρον είναι να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη των CFU-GEMM είναι σημαντικά μικρότερη στα παιδιά με λευχαιμίες σε ύφεση από τους φυσιολογικούς

μάρτυρες ($p=0.03$), γεγονός που ίσως αντανακλά βλάβες που έχουν υποστεί τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από την προηγηθείσα χημειοθεραπεία. Αντίθετα η ανάπτυξη των CFU-GM είναι σημαντικά μεγαλύτερη στα παιδιά με λευχαιμία σε ύφεση σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες ($p=0.04$). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενη δημοσίευση [300] και ίσως συσχετίζονται με την *in vivo* χορήγηση αυξητικών παραγόντων στα παιδιά αυτά, κατά τις περιόδους ουδετεροπενίας μετά από χημειοθεραπεία.

Τα κύτταρα του νευροβλαστώματος παρουσίασαν μικρότερη αναστολή επιβίωσης από αυτή που αναφέρουν άλλοι ερευνητές [293-295]. Στις μελέτες εκείνες όμως χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές από ανθρώπους ή ποντίκια και όχι νωπά δείγματα μυελού διηθημένου από κύτταρα νευροβλαστώματος. Τα δεδομένα ευρήματα συμφωνούν με προηγούμενες δημοσιεύσεις που έγιναν από το εργαστήριο Ιστικών Καλλιέργειών της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας/Ογκολογίας [300, 301]. Οι διαφορές με τα αποτελέσματα των άλλων ερευνητών μπορεί να αντανακλούν διαφορές στη συμπεριφορά των νεοπλασματικών κυττάρων του νευροβλαστώματος ή υπολειπόμενη επιβίωση των φυσιολογικών κυττάρων του μυελού. Η επιβίωση των κυττάρων μυελού στις 24 ώρες είναι περίπου 30% και δεν επηρεάζεται από την επώαση με Αμιφοστίνη. Το ποσοστό διήθησης του μυελού δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί σε ποσοστά και καθορίζεται μόνο από την παρουσία ροδάκων ή όχι. Τα κύτταρα που επιβιώνουν μπορεί να αντιστοιχούν στα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Εξάλλου η μελέτη με καλλιέργειες προγονικών κυττάρων έδειξε επιβίωση των BFU-E, CFU-GEMM και CFU-GM σε πολύ υψηλά ποσοστά. Το ποσοστό διήθησης είναι μικρότερο σε σύγκριση με τα παιδιά με λευχαιμία σε πρωτοδιάγνωση, στα οποία ήταν αδύνατη η ανάπτυξη αποικιών στις καλλιέργειες. Πάντως και στην ομάδα αυτή, η Αμιφοστίνη φαίνεται να έχει ευνοϊκή επίδραση στην επιβίωση των προγονικών κυττάρων μετά τη ΦΔΘ, αφού επώαση με Αμιφοστίνη βελτιώνει σημαντικά την επιβίωση των BFU-E και CFU-GEMM ενώ ο δραστικός μεταβολίτης WR-1065 προστατεύει τα προγονικά κύτταρα και της ερυθράς και της μυελικής σειράς.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η Αμιφοστίνη είναι ένας ιδανικός παράγοντας για την κάθαρση του μυελού των οστών με φωτοδυναμική θεραπεία, καθώς όχι μόνο προσφέρει προστασία στα φυσιολογικά κύτταρα του μυελού αλλά ενισχύει και

την αντιλευχαιμική δράση. Καθώς χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο αυτόλογα μοσχεύματα από περιφερικό αίμα με κινητοποίηση αρχέγονων προγονικών κυττάρων, είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί μελλοντικά η επίδραση της Αμιφοστίνης στην επιβίωση CD34+ κυττάρων μετά από φωτοακτινοβόληση. Μελέτη της ποιότητας του μοσχεύματος, με LTC-IC και CFU-Meg και ο πιθανός προστατευτικός ρόλος της Αμιφοστίνης, αποτελούν έναυσμα για περαιτέρω έρευνα. Επίσης είναι απαραίτητος ο ακριβής προσδιορισμός της επιβίωσης των νεοπλασματικών κυττάρων με λευχαιμικές καλλιέργειες και PCR ανάλυση. Συνδυασμός της φωτοδυναμικής θεραπείας με ανοσολογικές ή άλλες μεθόδους ίσως αυξήσει την αποτελεσματικότητα στην καταστροφή των κακοήθων κυττάρων και ξεπεράσει τα προβλήματα που παρουσιάζει καθεμία μέθοδος χωριστά.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η επώαση των κυττάρων με Αμιφοστίνη, ανεξάρτητα από τη ΦΔΘ, δεν επηρεάζει την ανάπτυξη αποικιών στις καλλιέργειες των προγονικών κυττάρων. Όμως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι θειόλες έχουν αιμοποιητική και διαφοροποιητική δράση [378, 381]. Αναφέρεται δε ότι η Αμιφοστίνη έχει μιτογόνο δράση στα αρχέγονα και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα και αυξάνει σημαντικά την ικανότητα σχηματισμού αποικιών, ιδιαίτερα σε κύτταρα μυελού από ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Επιβραδύνει την κυτταρική απώλεια και καθυστερεί την πορεία προς την απόπτωση που ξεκινά από την έλλειψη των κυτοκινών, γεγονός που σημαίνει ότι έχει άμεση τροφική δράση, αντίστοιχη με των κυτοκινών. Έχει εφαρμοστεί κλινικά σε ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο στους οποίους φαίνεται ότι επάγει την αιμοποίηση [389]. Για να διερευνηθεί περαιτέρω η συγκεκριμένη δράση της Αμιφοστίνης, μελετήσαμε την επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων Αμιφοστίνης στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση μονοκυττάρων μυελού από 4 κατηγορίες παιδιών. Στα παιδιά με λευχαιμία σε ύφεση και τα φυσιολογικά παιδιά δεν επηρεάζεται η ανάπτυξη των BFU-E και CFU-GEMM, ενώ παρατηρείται παράδοξη αναστολή των CFU-GM. Έχει αναφερθεί η ενζυματική αποδόμηση του WR-1065 σε τοξικούς μεταβολίτες, όπως ακρολεΐνη και υπεροξειδίου του υδρογόνου, που μπορούν να βλάψουν τις κυτταρικές δομές [395] γεγονός στο οποίο οφείλεται η ανασταλτική επίδραση της Αμιφοστίνης στις κυτταρικές καλλιέργειες. Αντίθετα παρατηρήθηκε βελτίωση στην ανάπτυξη των BFU-E στα παιδιά με ουδετεροπενία και θρομβοπενία, εύρημα που είναι

δύσκολο να ερμηνευτεί, με βάση την ανοσολογική φύση αυτών των παθήσεων. Τα αποτελέσματα στην υπάρχουσα βιβλιογραφία αφορούν ενήλικες ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο και φυσιολογικούς δότες, που πιθανώς ερμηνεύουν τις παρατηρούμενες διαφορές.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα συμπεράσματα της μελέτης αυτής είναι:

1) Η επώαση των λευχαιμικών κυττάρων HL-60 με Αμιφοστίνη πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία με MC540 φαίνεται να ενισχύει την κυτταροξικότητα της μεθόδου εναντίον τους.

2) Τα λευχαιμικά κύτταρα από ασθενείς με λευχαιμία στη διάγνωση παρουσιάζουν ετερογένεια στην φωτοευαισθησία, ενώ η επώαση με Αμιφοστίνη φαίνεται να ενισχύει την τοξικότητα της μεθόδου, ιδιαίτερα στις μικρές δόσεις ακτινοβολίας.

3) Τα κύτταρα του νευροβλαστώματος είναι λιγότερο ευαίσθητα στη ΦΔΘ με Μεροκυανίνη. Η επώαση με Αμιφοστίνη δεν επηρεάζει θετικά την επιβίωση τους.

4) Τα πρόδρομα και προγονικά κύτταρα μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση προστατεύονται σημαντικά από την επώαση με Αμιφοστίνη πριν τη ΦΔΘ σε αντίθεση με τα αντίστοιχα των φυσιολογικών μαρτύρων, στα οποία η Αμιφοστίνη δεν φαίνεται να έχει επίδραση. Επίσης η επιβίωση των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων μυελού από παιδιά με νευροβλάστωμα ευνοείται θετικά από την επώαση με Αμιφοστίνη πριν τη φωτοδυναμική θεραπεία.

5) Τα πρόδρομα και προγονικά κύτταρα μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση φαίνεται να είναι περισσότερο ευαίσθητα στη ΦΔΘ από τα αντίστοιχα των φυσιολογικών μαρτύρων, η διαφορά αυτή όμως εξαλείφεται παρουσία Αμιφοστίνης.

6) Η Αμιφοστίνη δε διαπιστώθηκε να έχει άμεση αιμοποιητική ή διαφοροποιητική δράση στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα από παιδιά με λευχαιμίες σε ύφεση και φυσιολογικούς μάρτυρες. Ένδειξη για επαγωγή αιμοποίησης της ερυθράς σειράς παρατηρήθηκε μόνο στα παιδιά με ουδετεροπενία και θρομβοπενία.

Συμπερασματικά, η Αμιφοστίνη προστατεύει εκλεκτικά τα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση κατά την φωτοακτινοβολήση με MC540 και Laser ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της μεθόδου έναντι των λευχαιμικών κυττάρων. Ο συνδυασμός της Αμιφοστίνης με τη φωτοδυναμική θεραπεία βελτιώνει την ποιότητα του μοσχεύματος και

αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο κατά την ex vivo κάθαρση του μυελού από τα νεοπλασματικά κύτταρα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η MC 540 είναι μία φωτοευαισθητοποιός χρωστική που έχει χρησιμοποιηθεί στην κάθαρση του μυελού των οστών κατά την αυτόλογη μεταμόσχευση. Παρουσιάζει εκλεκτική σύνδεση με τα νεοπλασματικά κύτταρα και σε συνδυασμό με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος διεγείρεται και καταστρέφει τα κύτταρα αυτά (φωτοδυναμική θεραπεία). Παρά την εκλεκτικότητα της μεθόδου, καταστρέφονται έως κάποιο βαθμό και τα φυσιολογικά αρχέγονα και προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα. Για τον λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η εύρεση κυτταροπροστατευτικών ουσιών που θα βελτιώσουν την ποιότητα του μοσχεύματος, χωρίς να επηρεάσουν την αντικαρκινική δράση της μεθόδου. Η Αμιφοστίνη, είναι μία οργανική θειοφωσφορική ένωση, που ανήκει στην κατηγορία των κυτταροπροστατευτικών ουσιών και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την προστασία των φυσιολογικών ιστών από τις βλαβερές επιδράσεις της χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας.

Σκοπός της μελέτης ήταν να μελετηθεί η συνδυασμένη δράση της Αμιφοστίνης και MC 540 κατά την φωτοακτινοβόληση με Laser σε νεοπλασματικά και φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα μυελού των οστών από παιδιά με οξείες λευχαιμίες, νευροβλάστωμα και φυσιολογικούς μάρτυρες, καθώς και να προσδιοριστεί η πιθανή κυτταροπροστατευτική δράση της Αμιφοστίνης στα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά και να εκτιμηθεί εάν επηρεάζει την αντιλευχαιμική δράση της μεθόδου. Επίσης μελετήθηκε εάν η Αμιφοστίνη έχει μιτογόνο και διαφοροποιητική δράση στις καλλιέργειες αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων.

Μελετήθηκαν κύτταρα μυελού και περιφερικού αίματος από παιδιά με οξείες λευχαιμίες και νευροβλάστωμα κατά την πρωτοδιάγνωση και σε ύφεση (n=31), καθώς και από φυσιολογικούς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας και φύλου (n=15) και κύτταρα της λευχαιμικής σειράς HL-60. Η αιμοποιητική δράση της Αμιφοστίνης εκτιμήθηκε επίσης σε παιδιά με ουδετεροπενία (n=8) και παιδιά με θρομβοπενία (n=3).

Τα εναιωρήματα των κυττάρων επώαστηκαν με MC 540, με ή χωρίς την παρουσία Αμιφοστίνης, και εκτέθηκαν σε διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας Argon Laser 514 nm. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε 24 ώρες μετά και για τα λευχαιμικά κύτταρα παρακολούθηθηκε σε υγρές καλλιέργειες για διάστημα 4 εβδομάδων, ενώ η επιβίωση των φυσιολογικών προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων προσδιορίστηκε σε ημιστερεές καλλιέργειες.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η επώαση των λευχαιμικών κυττάρων HL-60 με Αμιφοστίνη πριν τη ΦΔΘ φαίνεται να ενισχύει την αντιλευχαιμική δράση της μεθόδου. Σε δόση ακτινοβολίας 64.2 J/cm^2 , παρατηρήθηκε 99.9999% κυτταρικός θάνατος ανεξάρτητα από την παρουσία Αμιφοστίνης. Σε μικρότερη όμως δόση 46.8 J/cm^2 , η επώαση με Αμιφοστίνη επιτυγχάνει 99.9% κυτταρικό θάνατο, ενώ απουσία της, τα λευχαιμικά κύτταρα επιβιώνουν σε σημαντικό ποσοστό.

Τα φρέσκα λευχαιμικά κύτταρα μυελού και περιφερικού αίματος από παιδιά με οξείες λευχαιμίες στην πρωτοδιάγνωση παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στην MC 540 φωτόλυση (θάνατος > 95%). Παρατηρήθηκε ετερογένεια στην απάντησή τους, ενώ η επώαση με Αμιφοστίνη φαίνεται να ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της μεθόδου. Τα κύτταρα του νευροβλαστώματος φαίνεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα στην ΦΔΘ, εντούτοις η επώαση με Αμιφοστίνη δεν επηρεάζει την επιβίωση τους.

Η επώαση με Αμιφοστίνη προστατεύει σημαντικά τα φυσιολογικά κύτταρα μυελού από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση, από τη φωτοτοξική δράση της MC 540 και ενισχύει την ικανότητα σχηματισμού αποικιών BFU-E και CFU-GM. Έτσι σε δόση ακτινοβολίας όπου επιτυγχάνεται 99.9999% θανάτωση των λευχαιμικών κυττάρων HL-60, επιβιώνουν $24.2 \pm 8.8\%$ vs. $5.6 \pm 1.7\%$ CFU-E ($p=0.055$), $53.51 \pm 11.52\%$ vs. $20 \pm 5.4\%$ BFU-E ($p=0.011$), $48.11 \pm 16.46\%$ vs. $32.45 \pm 6.6\%$ CFU-GEMM ($p=0.3$) και $40 \pm 7.6\%$ vs. $19.6 \pm 4.3\%$ CFU-GM ($p=0.02$) παρουσία ή όχι 1.5 mg/ml Αμιφοστίνης αντίστοιχα. Αντίθετα στους φυσιολογικούς μάρτυρες η Αμιφοστίνη δεν επηρεάζει την επιβίωση των πρόδρομων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων. Η επιβίωση των CFU-GEMM αποικιών, στα παιδιά με οξεία λευχαιμία σε ύφεση, βρέθηκε να είναι σημαντικά μικρότερη από των φυσιολογικών μαρτύρων, γεγονός που ίσως αντανακλά την βλαβερή επίδραση της χημειοθεραπείας στην αποθήκη των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

Τέλος η Αμιφοστίνη δεν διαπιστώθηκε να έχει άμεση αιμοποιητική και διαφοροποιητική δράση στα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση και φυσιολογικούς μάρτυρες. Σε παιδιά με ουδετεροπενία ενισχύει την επιβίωση των BFU-E και σε παιδιά με θρομβοπενία, των BFU-E και CFU-GEMM αποικιών.

Συμπερασματικά, η Αμιφοστίνη προστατεύει εκλεκτικά τα φυσιολογικά προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα από παιδιά με οξείες λευχαιμίες σε ύφεση κατά την φωτοακτινοβολήση με MC540 και Laser ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της μεθόδου έναντι των λευχαιμικών κυττάρων. Ο συνδυασμός της Αμιφοστίνης με τη φωτοδυναμική θεραπεία βελτιώνει την ποιότητα του μοσχεύματος και αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο κατά την ex vivo κάθαρση του μυελού από τα νεοπλασματικά κύτταρα.

Photodynamic therapy in purging of malignant cells from bone marrow and peripheral blood of children with malignancies: Effect of Amifostine

Vassiliki Danilatou, MD
Thesis

SYMMARY

Merocyanine 540 is a fluorescent dye, which has been used in preclinical and clinical studies phase I in bone marrow purging for autologous transplantation. It exerts a preferential uptake by leukemic cells and in combination with light of suitable wavelength it is excited and destroys the cells (photodynamic therapy). Despite the selectivity of the method normal progenitor hemopoietic and stem cells are also affected. It is therefore necessary to detect the cytoprotective substances that could improve the quality of the graft without affecting the antileukemic action of the method.

Amifostine is an organic thiophosphate compound, which has been used for the protection of normal tissues from the harmful effects of chemotherapy and radiotherapy.

The aim of the present study was to estimate the combined effect of Amifostine pretreatment and MC 540 photoirradiation with Laser, on normal and malignant bone marrow cells, from children with acute leukemia, neuroblastoma and normal controls. The possible cytoprotective effect on normal cells and the influence on the antileukemic activity of Merocyanine were also studied. Finally, the possible mitogenic and differentiating effect of Amifostine on the survival of normal progenitors in methylcellulose cultures was estimated.

Bone marrow and peripheral blood cells from children with acute leukemia and neuroblastoma at first diagnosis and remission (n=31), as well as from age-matched normal controls (n=15) and HL-60 cell line were studied. The hemopoietic and trophic effect of Amifostine was also evaluated in children with neutropenia (n=8) and children with thrombocytopenia (n=3).

Cell suspensions were incubated with MC 540, in the presence or absence of Amifostine and they were subsequently exposed to different irradiation doses by Argon Laser 514 nm. Cell survival was estimated by trypan blue supravital stain following a 24 hours incubation. The leukemic cell line was studied in continuous liquid cell cultures for 4 weeks. The survival of normal bone marrow progenitors has been estimated by colony formation assay in methylcellulose cultures.

Our results showed that pretreatment of HL-60 cells with Amifostine enhanced the MC540 phototoxicity. At irradiation doses of 64.2 J/cm^2 a 99.9999% cell death was observed regardless of Amifostine presence. However, at lower doses of irradiation HL-60 cells survived. Amifostine pretreatment achieved a 99.9% cell death.

Leukemic bone marrow and peripheral blood cells from children with acute leukemia at first diagnosis are very sensitive to MC 540 photolysis (> 95% cytotoxicity). The heterogeneity in the sensitivity observed among leukemic cells could be attributed to differences of lipid membrane structure of blast cells. Pretreatment with Amifostine enhanced the cytotoxicity of the method, especially in lower doses of irradiation.

Neuroblastoma cells are less sensitive to photodynamic treatment, however Amifostine does not have any effect on their survival.

Amifostine significantly protected normal precursors and progenitors, from children with acute leukemia in remission, from the photokilling effect of MC 540 and it enhanced the colony formation efficiency of BFU-E and CFU-GM. At irradiation doses, used for a 99.9999% elimination of HL-60, normal progenitors survived and the presence of Amifostine had an impact on the survival: $24.2 \pm 8.8\%$ vs. $5.6 \pm 1.7\%$ CFU-E ($p=0.055$), $53.51 \pm 11.52\%$ vs. $20 \pm 5.4\%$ BFU-E ($p=0.011$), $48.11 \pm 16.46\%$ vs. $32.45 \pm 6.6\%$ CFU-GEMM ($p=0.3$) and $40.04 \pm 7.6\%$ vs. $19.6 \pm 4.3\%$ CFU-GM ($p=0.02$), in the presence or absence of Amifostine respectively. On the contrary however, Amifostine did not influence the survival of precursors and progenitors from normal controls. The survival of CFU-GEMM was significantly lower in children with acute leukemia in remission. This could be attributed to the harmful effect of preceded chemotherapy, which is toxic to the stem cell pool.

Finally, Amifostine had no direct hemopoietic or differentiating effect on normal progenitors from children with acute leukemia and normal controls. Children with neutropenia showed an improvement on BFU-E survival, whereas BFU-E and CFU-GEMM formation was enhanced in children with thrombocytopenia after Amifostine pretreatment.

In conclusion, Amifostine selectively protects normal bone marrow and progenitor cells from children with acute leukemia in remission after MC 540 photoirradiation with Laser and enhances the photokilling effect against leukemic cells. The combination of Amifostine pretreatment with photodynamic therapy improves the quality of the graft and it is a promising method for the ex vivo purging of malignant cells.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fefer A, Thomas ED. Marrow transplantation in the treatment of leukemia. In: Henderson ES, Lister TA editors. *Leukemia*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders, 1990: 431-441 .
2. Kalmanti M, Stiakaki E. Autologous peripheral blood stem cell transplantation in childhood tumors. *Ped. Hem. Oncol.* 1999; 16: 277-281.
3. Rowe JM. Bone marrow transplantation in first remission. *Leukemia* 1997; 11 (supp 4): S12-S14.
4. Kaizer H, Chow HS. Autologous bone marrow transplantation (ABMT) in the treatment of cancer. *Cancer Inv.* 1984; 2 (3): 203-213.
5. Vogelsang GB, Wagner JE. Graft- versus- host disease. *Hem/Oncol Clin. North Am.* 1990; 4: 625-639.
6. Zaia JA. Viral infections associated with bone marrow transplantation. *Hem/Oncol. Clin. North Am.* 1990; 4: 603-623
7. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med* 1995;332: 217-223.
8. Shulman HM, Hinterberg W. Hepatic veno-occlusive disease-liver toxicity syndrome after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 1992; 10: 197-214.
9. Gorin NC, Labopin M, Fouillard L et al. Retrospective evaluation of autologous bone marrow transplantation vs. allogeneic bone marrow transplantation from HLA identical related donor in acute myelocytic leukemia. A study of the European Cooperative Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18: 111-117.
10. Ringden O, Labopin M, Gluckman E et al. Donor search or autografting in patients with acute leukemia who lack an HLA-identical sibling? A matched-pair analysis. *Bone Marrow Transplantation* 1997; 19: 963-968.
11. Forman SJ, Blume KG. Allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia. *Hem/Oncol Clin. North Am.* 1990; 4: 517-533
12. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: 555-562.
13. Antin JH. Graft-versus-leukemia: No longer an epiphenomenon. *Blood* 1993; 82: 2273-2277.
14. Kernan NA. T-cell depletion for prevention of graft-versus-host disease. Forman SJ, Blume KG, Donnall TE. editors. *Bone marrow transplantation*. Boston: Blackwell Scientific Publ.1994: 124-131.
15. Negrin RS, Cleary ML. Laboratory evaluation of minimal residual disease. Forman SJ, Blume KG, Donnall TE. editors. *Bone marrow transplantation*. Boston: Blackwell Scientific Publ.1994: 179-188.
16. Gribben JG, Nadler LM. Antibody-mediated purging. Forman SJ, Blume KG, Donnall TE. editors. *Bone marrow transplantation*. Boston: Blackwell Scientific Publ.1994: 149-163.
17. Horning SJ, Galili N, Cleary M, Sklar J. Detection of Non-Hodgkin's Lymphoma in the peripheral blood by analysis of antigen receptor gene rearrangements: Results of a prospective study. *Blood* 1990; 75: 1139-1145.

18. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995; 85: 1416-1434
19. Dascalescu CM, Callanan M, Chauvet et al. Interphase FISH: a rapid method for detecting malignant plasma cells in multiple myeloma patients submitted to autologous transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1999; 23: 687-694.
20. Talpaz M, Kantarjian H, Liang J et al. Percentage of Philadelphia chromosome (Ph)-negative and Ph- positive cells found after autologous transplantation for chronic myelogenous leukemia depends on percentage of diploid cells induced by conventional-dose chemotherapy before collection of autologous cells. *Blood* 1995; 85: 3257-3263.
21. Albrechtsen R, Nielsen M, Wewer U et al. Basement membrane changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. *Cancer Res.* 1981; 41: 5076-81.
22. Pantel K, Ahr A. Immunocytochemical and molecular strategies for the detection of micrometastases in patients with solid epithelial tumors: a review. *Nucl. Med. Commun* 1998; 19: 521-527.
23. Izaguirre CA, Curtis J, Messner H, McCulloch EA. A colony assay for blast cell progenitors in non-B-non-T (common) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1981; 57: 823-829.
24. Buick RN, Minden MD, McCulloch EA. Self-renewal in culture of proliferative blast progenitor cells in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1979; 54: 95-104.
25. Aye MT, Niho Y, Till JE, McCulloch EA. Studies of leukemic cell populations in culture. *Blood* 1974; 44 (2): 205-219.
26. Swart K, Hagemeijer A, Lowenberg B. Acute myeloid leukemia colony growth in vitro: differences of colony-forming cells in PHA-supplemented and standard leukocyte feeder cultures. *Blood* 1982; 59 (4): 816-821.
27. Lowenberg B, Hagemeijer A, Swart K. Karyotypically distinct subpopulations in acute leukemia with specific growth requirements. *Blood* 1982; 59 (3): 641-645.
28. Aul C, Gattermann N, Schneider W. Comparison of in vitro growth characteristics of blast cell progenitors (CFU-L) in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Blood* 1992; 80(3): 625-633.
29. Miller CB, Zehnauer BA, Piantadosi S et al. Correlation of occult clonogenic leukemia drug sensitivity with relapse after autologous bone marrow transplantation. *Blood* 1991; 78: 1125-1131.
30. Stong RC, Kersey JH. In vitro culture of leukemic cells in t (4;11) acute leukemia. *Blood* 1985; 66: 439-443.
31. Gibelli N, Lanza A, Pedrazzoli P. et al. Minimal tumor contamination of hematopoietic harvests from breast cancer patients can be easily detected by liquid culture assay. *Cytotherapy* 2000; 2 (1): 39-44.
32. Negrin RS, Blume KG. The use of the polymerase chain reaction for the detection of minimal residual malignant disease. *Blood* 1991; 78: 255-258.
33. Corradini P, Voena C, Astolfi M et al. High-dose sequential chemoradiotherapy in multiple myeloma: residual tumor cells are detectable in bone marrow and peripheral blood cell harvests and after autografting. *Blood* 1995; 85: 1596-1602.
34. Atta J, Martin H, Bruecher J et al. Residual leukemia and immunomagnetic bead purging in patients with BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 1996; 18: 541-548.

35. Gribben JG, Freedman AS, Woo SD et al. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood* 1991; 78: 3275-3280.
36. Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325: 1525- 1533.
37. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993; 81: 3449-3457.
38. Brenner MK, Rill DR, Moen RC et al. Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341: 85-86.
39. Rill DR, Santana VM, Roberts WM et al. Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* 1994; 84 (2): 380-383.
40. Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D et al. Genetic marking shows that Ph⁺ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 1994; 83: 3068-3076.
41. Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK. Gene-marking and haemopoietic stem-cell transplantation. *Blood Rev.* 1995; 9: 220-225.
42. Kurh T, Bechter O, Geley S et al. Detection and quantitation of genetically marked acute myeloid leukemia by competitive polymerase chain reaction after autologous bone marrow transplantation: a preclinical model for minimal residual disease. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 266-271.
43. Rizzoli V, Carlo-Stella C. Stem cell purging: An intriguing dilemma. *Exp. Hemat.* 1995; 23: 296-302.
44. Champlin R. Purging: the separation of normal from malignant cells for autologous transplantation. *Transfusion* 1996; 36: 910-918.
45. Bensinger WI. Should we purge? *Bone Marrow Transpl.* 1998; 21: 113-115.
46. Douay L. Negative selection and protection of normal progenitor cells for autografting. *Bone Marrow Transpl.* 1998; 22: 423-430.
47. Hammert LC, Ball ED. Purging of autologous bone marrow with monoclonal antibodies for transplantation in acute myelogenous leukemia. *Blood Rev.* 1997; 11: 80-90.
48. Freedman AS, Nadler LM. Developments in purging in autotransplantation. *Hem/Oncol. Clin. N. Amer.* 1993; 7 (3): 687-715.
49. Danilatou V, Kalmanti M. Current approaches on ex vivo purging for autologous transplantation: Could they help? A review. *Haema* 2000; 3 (3): 159-175.
50. Sieber F. Elimination of residual tumor cells from autologous bone marrow grafts by dye-mediated photolysis: preclinical data. *Photochem. Photobiol.* 1987; 46: 71-76.
51. Saarinen UM, Wikstrom S, Makiperna A et al. In vivo purging of bone marrow in children with poor-risk neuroblastoma for marrow collection and autologous bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14 (10): 2791-2802.
52. Stein AS, O'Donnell MR, Chai A et al. In vivo purging with high dose cytarabine followed by high-dose chemoradiotherapy and reinfusion of unpurged bone marrow for

- adult acute myelogenous leukemia in first complete remission. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14 (8): 2206-2216.
53. Williams CD, Goldstone AH, Pearce RM et al. Purging of bone marrow in autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case-matched comparison with unpurged cases by the European Blood and Marrow Transplant Lymphoma Registry. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14: 2454-2464.
54. Chao NJ, Stein AS, Long GD et al. Busulfan/Etoposide-initial experience with a new preparative regimen for autologous bone marrow transplantation in patients with acute nonlymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 81 (2): 319-323.
55. Laport JP, Douay L, Lopez M et al. One hundred twenty-five adult patients with primary acute leukemia autografted with marrow purged by mafosfamide: A 10-year single institution experience. *Blood* 1994; 84 (11): 3810-3818.
56. Gorin NC, Aegerter P, Auvert B et al. Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission: A European survey of the role of marrow purging. *Blood* 1990; 75 (8): 1606-1614.
57. Rossetti F, Deeg HJ, Hackman RC. Early pulmonary recurrence of non-Hodgkin's lymphoma after autologous marrow transplantation: evidence for reinfusion of lymphoma cells? *Bone Marrow Transplantation* 1995; 15: 429-432.
58. Peters SO, Stockschrader M, Hegewisch-Becker S. et al. Infusion of tumor-contaminated bone marrow for autologous rescue after high-dose therapy leading to long-term remission in a patient with relapsed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transpl.* 1995; 15: 783-784.
59. Ferrero D, Tarella C, Cherasco C et al. A single step density gradient for large scale enrichment of mobilized peripheral blood progenitor cells collected for autotransplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 21: 409-413.
60. Kies MS, Gordon LI, Rosen ST et al. Autologous bone marrow transplantation in breast cancer: separation of clonogenic tumor cell colonies by gradient fractionation. *Exp. Hemat.* 1988; 16: 190-194.
61. Wagner JE, Donnenberg AD, Noga SJ et al. Lymphocyte depletion of donor bone marrow by counterflow centrifugal elutriation: results of a phase I clinical trial. *Blood* 1988; 72 (4): 1168-1176.
62. Nagler A, Morecki S, Slavin S. The use of soybean agglutinin (SBA) for bone marrow (BM) purging and hematopoietic progenitor cell enrichment in clinical bone marrow transplantation. *Mol. Biotechnol.* 1999; 11(2): 181-194.
63. Lazzaro GE, Meyer BF, Willis JI et al. The synthesis of a peanut agglutinin-ricin A chain conjugate: Potential as an in vitro purging agent for autologous bone marrow in multiple myeloma. *Exp. Hemat.* 1995; 23: 1347-1352.
64. Da WM, Liu Y, Wei SN. Studies on sensitivity of human CFU-GM and L-CFU to hyperthermic killing in vitro. *Leuk. Res.* 1989; 13 (3): 217-220.
65. Thijsen SFT, van Oostveen JW, Schuurhuis GJ et al. Hypersensitivity of bcr-abl positive progenitors to hyperthermia in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1762-1768.
66. Wierenga PK, Dillingh JH, Konings AWT. Reduction of heat-induced hemotoxicity in a hyperthermic purging protocol of murine acute myeloid leukaemic stem cells by AcSDKP. *Brit.J.Hem.* 1997; 99: 692-698.

67. Rowley SD. Pharmacological purging of malignant cells. Forman SJ, Blume KG, Donnall Thomas E. editors. Bone marrow transplantation. Boston: Blackwell Scientific Publ.1994: 164-178.
68. Bhatia R, Verfaillie CM, Miller JS, McGlave PB. Autologous transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1997; 89 (8): 2623-2634.
69. Kaizer H, Stuart RK, Brookmeyer R et al. Autologous bone marrow transplantation in acute leukemia: A phase I study of in vitro treatment of marrow with 4-Hydroperoxycyclophosphamide to purge tumor cells. *Blood* 1985; 65 (6): 1504-1510.
70. Gorin NC, Douay L, Laporte JP et al. Autologous bone marrow transplantation using marrow incubated with ASTA Z 7557 in adult acute leukemia. *Blood* 1986; 67 (5): 1367-1376.
71. Rowley SD, Zuehlsdorf M, Braine HG et al. CFU-GM content of bone marrow graft correlates with time to hematologic reconstitution following autologous bone marrow transplantation with 4-Hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow. *Blood* 1987; 70 (1): 271-275.
72. Douay L, Giarratana MC, Labopin M et al. Characterization of late and early hematopoietic progenitor/stem cell sensitivity to mafosfamide. *Bone Marrow Transplantation* 1995; 15: 769-775.
73. Carlo-Stella C, Magnoni L, Almici C et al. Differential sensitivity of adherent CFU-blast, CFU-Mix, BFU-E and CFU-GM to mafosfamide: implications for adjusted dose purging in autologous bone marrow transplantation. *Exp. Hemat.* 1992; 20: 328-333.
74. Damon LE, Rugo HS, Ries CA, Linker CA. Delayed engraftment of 4-Hydroperoxycyclophosphamide-purged autologous bone marrow after induction treatment containing mitoxantrone for acute myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transpl.*1996; 17: 93-99.
75. Moreb J, Zucali JR, Rueth S. The effects of tumor necrosis factor- α on early human progenitor cells treated with 4-Hydroperoxycyclophosphamide. *Blood* 1990; 76 (4): 681-689.
76. Bullock G, Tang C, Tourkina E et al. Effect of combined treatment with interleukin-3 and interleukin-6 on 4-Hydroperoxycyclophosphamide-induced programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Exp. Hemat.* 1993; 21: 1640-1647.
77. Stiff PJ, Koester AR. In vitro chemoseparation of leukemic cells from murine bone marrow using VP16-213: importance of stem cell assays. *Exp. Hemat.* 1987; 15: 263-268.
78. Olivieri A, Poloni A, Montanari M et al. Pharmacologic bone marrow purging: Is there any place for etoposide? In vitro comparison with mafosfamide. *J. Hematother.* 1997; 6: 137-144.
79. Tamayo E, Herve P. Preclinical studies of the combination of mafosfamide (Asta-Z 7654) and etoposide (VP-16-213) for purging leukemic autologous marrow. *Exp. Hemat.* 1988; 16: 97-101.
80. Motta MR, Mangianti S, Rizzi S et al. Pharmacological purging of minimal residual disease from peripheral blood stem cell collections of acute myeloblastic leukemia patients: preclinical studies. *Exp. Hemat.* 1997; 25: 1261-1269.
81. Lisheng W, Chutse W, Xuetao P et al. Purging effect of dibutyl phthalate on leukemic cells associated with apoptosis. *Leuk. Res.* 1996; 20:989-992.

82. Koenigsmann MP, Notter M, Knauf WU et al. Chemopurging of peripheral blood-derived progenitor cells by alkyl-lysophospholipid and its effect on haematopoietic rescue after high-dose therapy. *Bone Marrow Transplantation* 1996; 18: 549-557.
83. Heesbeen EC, Rijksen G, Heugten HG, Verdonck LF. Influence of serum levels on leukemic cell destruction by ether lipid ET-18-OCH₃. *Leuk. Res.* 1995; 19: 417-425.
84. Einat M, Lishner M, Amiel A et al. Eilatin: A novel marine alkaloid inhibits in vitro proliferation of progenitor cells in chronic myeloid leukemia patients. *Exp. Hemat.* 1995; 23: 1439-1444.
85. Foon KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986; 68(1): 1-31.
86. Ball ED, Fanger MW. The expression of myeloid-specific antigens on myeloid leukemia cells: correlations with leukemia subclasses and implications for normal myeloid differentiation. *Blood* 1983; 61(3): 456-463.
87. Ball ED, Mills LE, Cornwell GG III et al. Autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia using monoclonal antibody-purged bone marrow. *Blood* 1990; 75 (5): 1199-1206.
88. Granena A, Castellsague X, Badell I et al. Autologous bone marrow transplantation for high risk acute lymphoblastic leukemia: clinical relevance of ex vivo bone marrow purging with monoclonal antibodies and complement. *Bone Marrow Transplantation* 1999; 24: 621-627.
89. Maldonado MS, Diaz-Heredia C, Badell I et al. Autologous bone marrow transplantation with monoclonal antibody purged for children with acute lymphoblastic leukemia in second remission. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 22: 1043-1047.
90. Selvaggi KJ, Wilson JW, Mills LE et al. Improved outcome for high risk acute myeloid leukemia patients using autologous bone marrow transplantation and monoclonal antibody-purged bone marrow. *Blood* 1994; 83: 1698-1705.
91. Howell AL, Ball ED. Monoclonal antibody-mediated cytotoxicity of human myeloid leukemia cells: an in vitro model for estimating efficiency and optimal conditions for cytolysis. *Blood* 1985; 66: 649-654.
92. Favrot MN, Philip I, Philip T et al. Bone marrow purging procedure in Burkitt lymphoma with monoclonal antibodies and complement: quantification by a liquid cell culture monitoring system. *Br. J. Haematol.* 1986; 64: 161-168.
93. Sugita K, Majdic SK, Stockinger H et al. Use of a cocktail of monoclonal antibodies and human complement in selective killing of acute lymphocytic leukemia cells. *Int. J. Cancer* 1986; 37: 351-357.
94. Saarinen UM, Coccia PF, Gerson SL et al. Eradication of neuroblastoma cells in vitro by monoclonal antibody and human complement: method for purging autologous bone marrow. *Cancer Res.* 1985; 45: 5969-5975.
95. Ferrero D, De Fabritiis P, Amadori S et al. Autologous bone marrow transplantation in acute myeloid leukemia after in vitro purging with an anti-lacto-N-fucopentose III antibody and rabbit complement. *Leuk. Res.* 1987; 11: 265-272.
96. Myers CD, Thorpe PE, Ross WC et al. An immunotoxin with therapeutic potential in T-cell leukemia: WT1-Ricin A. *Blood* 1984; 63: 1178-1185.
97. Uckun FM, Galz-Pegzalska KJ, Kersey JH et al. Use of a novel colony assay to evaluate the cytotoxicity of an immunotoxin containing pokeweed antiviral protein

- against blast progenitor cells freshly obtained from patients with common B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* 1986; 163: 347-368.
98. La Russa VF, Griffin JD, Kessler SW et al. Effects of anti-CD33 blocked ricin immunotoxin on the capacity of CD34+ human marrow cells to establish in vitro hematopoiesis in long-term marrow cultures. *Exp. Hematol.* 1992; 20: 442-448.
99. Kvalheim G, Sorensen O, Fodstad O et al. Immunomagnetic removal of B-lymphoma cells from human bone marrow: a procedure for clinical use. *Bone Marrow Transplant.* 1988; 3: 31-41.
100. Gribben JG, Saporito L, Barber M et al. Bone marrows of non-Hodgkin's lymphoma patients with a bcl-2 translocation can be purged of polymerase chain reaction-detectable lymphoma cells using monoclonal antibodies and immunomagnetic bead depletion. *Blood* 1992; 80: 1083-1089.
101. Reading CL, Thomas MW, Hickey CM et al. Magnetic affinity colloid (MAC) cell separation of leukemia cells from autologous bone marrow aspirates. *Leuk. Res.* 1987; 11: 1067-1077.
102. Bieva CJ, Vander Bruggen FJ, Stryckmans PA. Malignant leukemic cell separation by iron colloid immunomagnetic absorption. *Exp. Hematol.* 1989; 17: 914-920.
103. Canals C, Torrico C, Picon M et al. Immunomagnetic bone marrow purging in children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Hematother.* 1997; 6: 261-268.
104. Sutherland HJ, Blair A, Zapf RW. Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells. *Blood* 1996; 87: 4754-4761.
105. Lowenberg B, Bauman GJ. Further results in understanding the subpopulation structure of AML: clonogenic cells and their progeny identified by differentiation markers. *Blood* 1985; 66: 1225-1232.
106. Hast R, Dowding C, Robak T, Goldman JM. Staging of leukemic progenitor cells in acute myeloid leukemia by phenotyping with myeloid monoclonal antibodies. *Exp. Hematol.* 1986; 14: 981-987.
107. Boyle MD, Gee AP. Low-antigen density tumor cells: an obstacle to effective autologous bone marrow purging? *Cancer Invest.* 1987; 5: 113-118.
108. Vervoordeldonk SF, Van den Berg H, Von dem Borne A et al. Optimization of purging of autologous bone marrow grafts for children with precursor B acute lymphoblastic leukemia. *J. Hematother.* 1997; 6: 495-500.
109. Bishop MR, Jackson JD, Tarantolo SR et al. Ex vivo treatment of bone marrow with phosphorothioate oligonucleotide OL(1)p53 for autologous transplantation in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *J. Hematother.* 1997; 6: 441-446.
110. Giles RV, Spiller DG, Green JA et al. Optimization of antisense oligodeoxynucleotide structure for targeting bcr-abl mRNA. *Blood* 1995; 86: 744-754.
111. Clark RE, Grzybowski J, Broughton CM et al. Clinical use of streptolysin-O to facilitate antisense oligodeoxyribonucleotide delivery for purging autografts in chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23: 1303-1308.
112. Maran A, Waller CF, Paranjape JM et al. 2',5'-oligoadenylate-antisense chimeras cause RNase L to selectively degrade bcr/abl mRNA in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* 1998; 92: 4336-4343.
113. Snyder DS, Wu Y, Wang JL et al. Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a Philadelphia chromosome-positive cell line. *Blood* 1993; 82: 600-605.

114. Teoh G, Chen L, Urashima M et al. Adenovirus vector-based purging of multiple myeloma cells. *Blood* 1998; 92: 4591-4601.
115. Hirai M, Kelsey LS, Maneval DC et al. Adenovirus p53 purging for human breast cancer stem cell products. *Acta Haematol.* 1999; 101: 97-105.
116. Chang J, Dexter TM. Long-term marrow cultures: in vitro purging of leukaemic cells. *Bail. Clin. Haemat.* 1991; 4: 775-788.
117. Udomsakdi C, Eaves CJ, Swolin B et al. Rapid decline of chronic myeloid leukemic cells in long-term culture due to a defect at the leukemic stem cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 6192-6196.
118. Barnett MJ, Eaves CJ, Philips GC et al. Successful autografting in chronic myeloid leukemia after maintenance of marrow in culture. *Bone Marrow Transplant.* 1989; 4: 345-351.
119. Iland HJ, Croaker GM, Repka E et al. Long-term bone marrow culture induces terminal differentiation of human myeloid leukemic cells. *Exp. Hemat.* 1987; 15: 1109-1114.
120. Coutinho LH, Chang J, Brereton ML et al. Autografting in Philadelphia (Ph)+ chronic myeloid leukemia using cultured marrow: an update of a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19: 969-976.
121. Veena P, Cornetta K, Davidson A et al. Preferential sequestration in vitro of bcr/abl negative hematopoietic progenitor cells among cytokine nonresponsive CML marrow CD34+ cells. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19: 1213-1221.
122. Parker AN, Pragnell IB. Inhibitors of haemopoiesis and their potential clinical relevance. *Blood Rev.* 1995; 9: 226-233.
123. Eaves CJ, Cashman JD, Wolpe SD, Eaves AC. Unresponsiveness of primitive chronic myeloid leukemia cells to macrophage inflammatory protein 1 α , an inhibitor of primitive normal hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 12015-12019.
124. Barrett J, Childs R. The benefits of an alloresponse: graft-versus-tumor. *J. Hematother & Stem Cell Res.* 2000; 9: 347-354.
125. Dermine S, Mavroudis D, Jiang YZ et al. Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19: 989-999.
126. Dazzi F, Szydlo RM, Goldman JM. Donor lymphocyte infusions for relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplant: where we now stand. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 1477-1486.
127. Vourka –Karoussis U, Ackerstein A, Pugatsch T, Slavin S. Allogeneic cell-mediated immunotherapy for eradication of minimal residual disease: comparison of T-cell and IL-2 activated killer (LAK) cell-mediated adoptive immunotherapy in murine models. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 461-469.
128. Soiffer RJ, Murray C, Gonin R, Ritz J. Effect of low-dose interleukin-2 on disease relapse after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1994; 84: 964-971.
129. Hauch M, Gazzola MV, Small T et al. Anti-leukemia potential of interleukin-2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1990; 75: 2250-2262.

130. Mackinnon S, Hows JM, Goldman JM. Induction of in vitro graft-versus-leukemia activity following bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood* 1990; 76: 2037-2045.
131. Margolin KA, Wright C, Forman SJ. Autologous bone marrow purging by in situ IL-2 activation of endogenous killer cells. *Leukemia* 1997; 9: 723-728.
132. Beaujean F, Bernaudin F, Kuentz M et al. Successful engraftment after autologous transplantation of 10-day cultured bone marrow activated by interleukin 2 in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 15: 691-696.
133. Areman EM, Rhodes PL, Mazumber A, Meehan KR. Differential effects of IL-2 incubation on hematopoietic potential of autologous bone marrow and mobilized PBSC from patients with hematologic malignancies. *J.Hematother.* 1999; 8: 39-44.
134. Silva MR, Ascensao JL. Generation of human natural killer from pharmacologically purged bone marrow. *Br. J. Haemat.* 1995; 89: 34-40.
135. Zhong RZ, Donnenberg AD, Rubin J, Ball ED. Differential effect of 4-hydroperoxycyclophosphamide and antimyeloid monoclonal antibodies on T and natural killer cells during bone marrow purging. *Blood* 1994; 83: 2345-2351.
136. Scheffold C, Brandt K, Johnston V et al. Potential of autologous immunologic effector cells for marrow purging in patients with chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 15: 33-39.
137. Kaneko T, Fusauchi Y, Kakui Y et al. A bispecific antibody enhances cytokine-induced killer-mediated cytotoxicity of autologous acute myeloid leukemia cells. *Blood* 1993; 81: 1333-1341.
138. Da WM, Liu Y, Zhong JT et al. Autologous bone marrow mixed with HLA-haploidentical allogeneic marrow transplantation for treatment of patients with malignant blood diseases. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19: 107-112.
139. Berkahn L. Immunologic methods of purging in autologous stem cell transplantation. *J. Hematother. & Stem Cell Res.* 2000; 9: 147-159.
140. Tam YK, Klingemann HG. Antileukemic effect of interleukin-2-transduced murine bone marrow after autologous transplantation. *Biol. Blood & Marrow Transplant.* 1999; 5: 231-242.
141. Gu L, Zhou M, Jurickova I et al. Expression of interleukin-6 receptors by pediatric acute lymphoblastic leukemia cells with the t (4;11) translocation: a possible target for therapy with recombinant IL-6-Pseudomonas exotoxin. *Leukemia* 1997; 11: 1779-1786.
142. Appelbaum FR. Antibody-targeted therapy for myeloid leukemia. *Semin. Hematol.* 1999; 36: 2-8.
143. Vose JM. Antibody-targeted therapy for low-grade lymphoma. *Semin. Hematol.* 1999; 36: 15-20.
144. Press OW. Monoclonal antibody therapy for indolent non-Hodgkin's lymphomas. *ASH, Education Program Book*, 1999: 305-311.
145. Matthews DC. The use of monoclonal antibodies in the treatment of AML. *ASH. Education Program Book*, 1999: 138-142.
146. Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT et al. Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood* 1999; 93: 3678-3684.
147. Matthews DC, Appelbaum FR, Eary JF et al. Development of a marrow transplant regimen for acute leukemia using targeted hematopoietic irradiation delivered by ¹³¹I-

- labeled anti-CD45 antibody, combined with cyclophosphamide and total body irradiation. *Blood* 1995; 85:1122-1131.
148. Hale G, Waldmann H. CAMPATH-1 monoclonal antibodies in bone marrow transplantation. *J. Hematother* 1994; 3: 15-31.
149. Dyer MJ. The role of CAMPATH-1 antibodies in the treatment of lymphoid malignancies. *Semin. Oncol.* 1999; 26(5 suppl 14): 52-57.
150. Dyer MJ, Kelsey SM, Mackay HJ et al. In vivo purging of residual disease in CLL with Campath-1H. *Br. J. Haematol.* 1997; 97: 669-672.
151. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996; 87: 1-13.
152. Holyoake TL, Alcorn MJ. CD34+ positive hemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev.* 1994; 8: 113-124.
153. Zanjani ED, Almeida-Polada G, Livingston AG et al. Human bone marrow CD34-cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD 34⁺ cells. *Exp. Hemat.* 1998; 26: 353-360.
154. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 1997; 89: 2233-2258.
155. Dreger P, Schmitz N. The role of stem cell transplantation in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997; 11(suppl.2): S42-S45.
156. Boogaerts MA, Brugger W, Carella AM et al. Peripheral blood progenitor cell transplantation: where do we stand? *Ann. Oncol.* 1996; 7 (supp2): 1-4.
157. Juttner CA, Henon P, Gale RP. Blood stem cell transplants: current state; future directions. In: Gale RP, Juttner C, Henon P. editors. *Blood stem cell transplants.* Cambridge University Press 1994: 167-180.
158. Verbik DJ, Jackson JD, Pirruccello SJ et al. Functional and phenotypic characterization of human peripheral blood stem cell harvests: a comparative analysis of cells from consecutive collections. *Blood* 1995; 85: 1964-1970.
159. Schulze R, Schulze M, Wischnik A et al. Tumor cell contamination of peripheral blood stem cell transplants and bone marrow in high risk breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19: 1223-1228.
160. Lemoli RM, Fortuna A, Motta MR et al. Concomitant mobilization of plasma cells and hematopoietic progenitors into peripheral blood of multiple myeloma patients: positive selection and transplantation of enriched CD34+ cells to remove circulating tumor cells. *Blood* 1996; 87: 1625-1634.
161. Brugger W, Bross KJ, Glatt M et al. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 1994; 83: 636-640.
162. Handgretinger R, Greil J, Schurmann U et al. Positive selection and transplantation of peripheral CD34+ progenitor cells: feasibility and purging efficacy in pediatric patients with neuroblastoma. *J. Hematother.* 1997; 6: 235-242.
163. Gidali J, Feher I. Lymphoma cell contamination of PBSC: a murine model. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 24: 617-620.
164. Thomas TE, Miller CL, Eaves CJ. Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 1999; 17: 202-218.

165. Schriber JR, Dejbakhsh-Jones S, Kusnierz-Glaz CR et al. Enrichment of bone marrow and blood progenitor (CD34+) cells by density gradients with sufficient yields for transplantation. *Exp. Hemat.* 1995; 23: 1024-1029.
166. Lang P, Schumm M, Taylor G et al. Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD34+ progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 24:583-589.
167. Despres D, Flohr T, Uppenkamp M et al. CD34+ cell enrichment for autologous peripheral blood stem cell transplantation by use of the CliniMACS device. *J. Hematother. & Stem Cell Res.* 2000; 9: 557-564.
168. Roots-Weib A, Papadimitriou C, Serve H et al. The efficiency of tumor cell purging using immunomagnetic CD34+ cell separation systems. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19: 1239-1246.
169. Farley TJ, Ahmed T, Fitzgerald M, Preti R. Optimization of CD34+ cell separation using immunomagnetic beads: implications for use in cryopreserved peripheral blood stem cell collections. *J. Hematother.* 1997; 6: 53-60.
170. Siena S, Bregni M, Brando B et al. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 1991; 77: 400-409.
171. Gordon MY, Blackett NM. Some factors determining the minimum number of cells required for successful clinical engraftment. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 15: 659-662.
172. Legros M, Fleury J, Cure H et al. New method for stem cell quantification: applications to the management of peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 15: 1-8.
173. Haylock DN, To LB, Dowse TL et al. Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. *Blood* 1992; 80: 1405-1412.
174. Bachier CR, Gokmen E, Teale J et al. Ex-vivo expansion of bone marrow progenitor cells for hematopoietic reconstitution following high-dose chemotherapy for breast cancer. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 615-623.
175. Spour EF, Abonour R, Cornetta K, Traycoff CM. Ex vivo expansion of hemopoietic stem and progenitor cells: Are we there yet? *J. Hematother.* 1999; 8: 93-102.
176. Lista P, Brizzi MF, Avanzi G et al. Induction of proliferation of acute myeloblastic leukemia (AML) cells with hemopoietic growth factors. *Leuk. Res.* 1988; 12: 441-447.
177. Nagler A, Riklis I, Kletter Y et al. Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid on normal human pluripotent (CFU-Mix), erythroid (BFU-E), and myeloid (CFU-C) progenitor cell growth and differentiation patterns. *Exp. Hemat.* 1986; 14: 60-65.
178. Santini V. Differentiation therapy of myelodysplastic syndromes: Fact or fiction? *Br. J. Haemat.* 1998; 102: 1124-1138.
179. Ferrero D, Carlesso N, Pregno P et al. Self-renewal inhibition of acute myeloid leukemia clonogenic cells by biological inducers of differentiation. *Leukemia* 1992; 6: 100-106.
180. Howell AL, Stukel TA, Bloomfield CD et al. Induction of differentiation in blast cells and leukemia colony-forming cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1990; 75: 721-729.
181. Uckun FM, Gajl-Peczalska K, Meyers DE et al. Marrow purging in autologous bone marrow transplantation for T-lineage acute lymphoblastic leukemia: efficacy of ex vivo

- treatment with immunotoxins and 4-hydroperoxycyclophosphamide against fresh leukemic marrow progenitor cells. *Blood* 1987; 69: 361-366.
182. Aihara M, Aihara Y, Schmidt-Wolf G et al. A combined approach for purging multi-drug resistant leukemic cell lines in bone marrow using a monoclonal antibody and chemotherapy. *Blood* 1991; 77: 2079-2084.
183. Stiff PJ, Schulz WC, Bishop M, Marks L. Anti-CD33 monoclonal antibody and etoposide/cytosine arabinoside combinations for the ex vivo purification of bone marrow in acute nonlymphoblastic leukemia. *Blood* 1991; 77: 355-362.
184. Mao XY, Higashigawa M, M'Soka T et al. Enhanced cytotoxic interaction between 5-fluorouracil and 4-hydroperoxycyclophosphamide against L1210 murine leukemic cells: applicability to ex vivo purging. *Cancer Invest.* 1999; 17: 486-493.
185. Osman Y, Moriyama Y, Shibata A. Enhanced elimination of Ph⁺ chromosome cells in vitro by combined hyperthermia and other drugs (AZT, IFN- α , TNF and quercetin): its application to autologous bone marrow transplantation for CML. *Exp. Hematol.* 1995; 23: 444-452.
186. Botzler C, Ellwart J, Gunther W et al. Synergistic effects of heat and ET-18-OCH3 on membrane expression of hsp70 and lysis of leukemic K562 cells. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 470-478.
187. Negrin RS, Kusnierz-Glaz CR, Still BJ et al. Transplantation of enriched and purged peripheral blood progenitor cells from a single apheresis product in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1995; 85: 3334-3341.
188. Mapara M, Korner I J, Lentzsch S et al. Combined positive/negative purging and transplantation of peripheral blood progenitor cell autografts in breast cancer patients: a pilot study. *Exp. Hematol.* 1999; 27: 169-175.
189. Hoppe B, Mohr M, Roots-Weib A et al. Improvement of tumor cell depletion by combining immunomagnetic positive selection of CD 34-positive hematopoietic stem cells and negative selection (purging) of tumor cells. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 23: 809-817.
190. Marini FC, Snell V, Zhang X et al. Purging of contaminating breast cancer cells from hematopoietic stem cell grafts by adenoviral GAL-TEK gene therapy and magnetic antibody cell separation. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5:1557-1568.
191. Mulrone CM, Gluck S, Ho AD. The use of photodynamic therapy in bone marrow purging. *Semin. Oncol.* 1994; 21(6supp15): 24-27.
192. Levy JG. Photosensitizers in photodynamic therapy. *Semin. Oncol.* 1994; 21(6supp15): 4-10.
193. CastroDJ, Saxton RE, Lufkin RB et al. Future directions of Laser phototherapy for diagnosis and treatment of malignancies: fantasy, fallacy or reality? *Laryngoscope* 1991; 101: 1-10.
194. Sieber F. Phototherapy, photochemotherapy and bone marrow transplantation. *J. Hematother.* 1993;2: 43-62.
195. Castro DJ, Saxton RE, Fetterman H: New concepts in photodynamic therapy with lasers. *In* Fee W, Geopfert H, Johns M (eds): *H and N Cancer*, vol 2. Philadelphia, BC Decker, 1990: 400-408.
196. Spinelli P, Fante MD. Photodynamic therapy of solid tumors. *Semin. Hematol.* 1992; 29(2): 142-154.

197. Lemoli RM, Igarashi T, Knizewski M et al. Dye-mediated photolysis is capable of eliminating drug-resistant (MDR+) tumor cells. *Blood* 1993; 81: 793-800.
198. Frazier DL, Barnhill MA, Lu X et al. Effect of multidrug-resistant P-glycoprotein gene expression on chloroaluminum tetrasulphonate phthalocyanine concentration. *Lasers in Surg. & Med.* 1993; 13: 511-516.
199. Edelson R, Berger C, Gasparro F et al. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. *N. Eng. J. Med.* 1987; 316 (6): 297-303.
200. Greinix HT, Volc-Platzer B, Rabitch W. et al. Successful use of extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. *Blood* 1998; 92 (9): 3098-3104.
201. Barr ML, Meiser BM, Eisen HJ et al. Photopheresis for the prevention of rejection in cardiac transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339 (24): 1744-1751.
202. Deeg HJ, Erickson K, Storb R, Sullivan KM. Photoinactivation of lymphohematopoietic cells: studies in transfusion medicine and bone marrow transplantation. *Blood Cells* 1992; 18 (1): 151-161.
203. Belnier DA, Ho YK, Padney RK et al. Distribution and elimination of Photofrin II in mice. *Photochem. & Photobiol.* 1989; 50 (2): 221-228.
204. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 1992; 55 (1): 145-157.
205. Easton TG, Valinsky JE. Merocyanine 540 as a fluorescent probe of membranes: staining of electrically excitable cells. *Cell* 1978; 13: 475-486.
206. Pass HI, Mitchell J, Russo A. et al. Photodynamic therapy. *Mediguide to Oncology.* 1989; 9 (3): 1-8.
207. Gaffney DK, Schober SL, Sieber F. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of leukemia cells: role of oxygen and effects on plasma membrane integrity and mitochondrial respiration. *Exp. Hematol.* 1990; 18: 23-26.
208. Blazer ER, Hariharan PV. Alkaline elution studies of hematoporphyrin-derivative photosensitized DNA damage and repair in chinese hamster ovary cells. *Photochem. & Photobiol.* 1984; 40 (1): 5-13.
209. Salet C, Moreno G, Atlante A, Passarella S. Photosensitization of isolated mitochondria by hematoporphyrin derivative (Photofrin): effects on bioenergetics. *Photochem. & Photobiol.* 1991; 53 (3): 391-393.
210. Gantchev TG, Lier JE. Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulphonated metallophthalocyanines. *Photochem. & Photobiol.* 1995; 62 (1): 123-134.
211. Ιατρικά Lasers. Επιστήμη και κλινική εφαρμογή. Carruth JAS, McKenzie AL. 1994: σελ. 287.
212. Ho YK, Padney RK, Missert JR, Dougherty TJ. Some components of the tumor-localizing fraction of hematoporphyrin derivative. *Photochem. & Photobiol.* 1990; 52 (6): 1085-1088.
213. Nakajima S, Hayashi H, Omote Y et al. The tumour-localizing properties of porphyrin derivatives. *J. Photochem. Photobiol, B: Biol.* 1990; 7: 189-198.
214. Kessel D. Transport and binding of hematoporphyrin derivative and related porphyrins by murine leukemia L1210 cells. *Cancer Res.* 1981; 41: 1318-1323.

215. Evensen JF, Sommer S, Moan J, Christensen T. Tumor-localizing and photosensitizing properties of the main components of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.* 1984; 44: 482-486.
216. Korbelik M, Kroszl G, Adomat H, Skov KA. The effect of differentiation on photosensitizer uptake by HL60 cells. *Photochem. Photobiol.* 1993; 58 (5): 670-675.
217. Takemura T, Ohta N, Nakajima S, Sakata I. The mechanism of photosensitization in photodynamic therapy: phosphorescence behavior of porphyrin derivative in saline solution containing human serum albumin. *Photochem. Photobiol.* 1991; 54 (5): 683-688.
218. Chapman JD, Stobbe CC, Arnfield MR et al. Oxygen dependency of tumor cell killing in vitro by light-activated Photofrin II. *Radiation Res.* 1991; 126: 73-79.
219. Ricchelli F, Gobbo S. Porphyrins as fluorescent probes of monitoring phase transitions of lipid domains in biological membranes. Factors influencing the microenvironment of hematoporphyrin and protoporphyrin in liposomes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1995; 29: 65-70.
220. Tanielian C, Heinrich G. Effect of aggregation on the hematoporphyrin-sensitized production of singlet molecular oxygen. *Photochem. Photobiol.* 1995; 61 (2): 131-135.
221. Lakos Z, Berki T. Effect of hematoporphyrin induced photosensitization on lipid membranes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1995; 29: 185-191.
222. Berns MW, Dahlman A, Johnson FM et al. In vitro cellular effects of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.* 1982; 42: 2325-2328.
223. Khanum F, Jain V. Effects of hematoporphyrin derivative on the cellular energy metabolism in the absence and presence of light. *Photochem. Photobiol.* 1989; 50 (5): 647-651.
224. Foultier MT, Patrice T, Praloran V et al. Influence of hematoporphyrin derivative concentration, incubation time, temperature during incubation and laser dose fractionation on photosensitivity of normal hemopoietic progenitors or leukemic cells. *Biochimie* 1989; 71: 819-825.
225. Patrice T, Praloran V, Le Bodic MF, Le Bodic L. Experimental aspects of in vitro and in vivo photochemotherapy. *Biochimie* 1986; 68: 923-926.
226. Kessel D. Components of hematoporphyrin derivatives and their tumor-localizing capacity. *Cancer Res.* 1982; 42: 1703-1706.
227. Ιατρικά Lasers. Επιστήμη και κλινική εφαρμογή. Carruth JAS, McKenzie AL. 1994: σελ. 293-299.
228. Gluckman JL. Photodynamic therapy for head and neck neoplasms. *Otolaryng. Clin. N. Amer.* 1991; 24 (6): 1559-1566.
229. Gomer CJ, Rucker N, Banerjee A, Benedict WF. Comparison of mutagenicity and induction of sister chromatid exchange in chinese hamster cells exposed to hematoporphyrin derivative photoradiation, ionizing radiation or ultraviolet radiation. *Cancer Res.* 1983; 43: 2622-2627.
230. Ben-Hur E, Geacintov NE, Studamire B et al. The effect of irradiance on virus sterilization and photodynamic damage in red blood cells sensitized by phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 1995; 61 (2): 190-195.
231. Cook MJ, Chambrier I, Cracknell SJ et al. Octa-alkyl zinc phthalocyanines: potential photosensitizers for use in the photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* 1995; 62 (3): 542-545.

232. Rosenthal I, Shafirovich VY, Geacintov NE et al. The photochemical properties of fluoroaluminum phthalocyanine. *Photochem. Photobiol.* 1994; 60 (3): 215-220.
233. Rousseau J, Langlois R, Ali H, van Lier JE. Biological activities of phthalocyanines XII: synthesis tumor uptake and biodistribution of ¹⁴C-labeled disulfonated and trisulfonated gallium phthalocyanine in C3H mice. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1990; 6: 121-132.
234. Oleinick NL, Antunez AR, Clay ME et al. New phthalocyanine photosensitizers for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1993; 57 (2): 242-247.
235. Kessel D, Smith KM, Padney RK et al. Photosensitization with bacteriochlorins. *Photochem. Photobiol.* 1993; 58 (2): 200-203.
236. Padney RK, Bellnier DA, Smith KM, Dougherty TJ. Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 1991; 53 (1): 65-72.
237. Villeneuve L. Ex vivo photodynamic purging in chronic myelogenous leukaemia and other neoplasias with rhodamine derivatives. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1999; 30: 1-17.
238. Fibach E, Gatt S, Rachmilewitz EA. Selective photosensitization of human leukemic cells by a pyrene-containing fatty acid. *Exp. Hematol.* 1990; 18: 89-93.
239. Morgan J, MacRobert AJ, Gray AG, Huehns ER. Use of photosensitive, antibody directed liposomes to destroy target populations of cells in bone marrow: a potential purging method for autologous bone marrow transplantation. *Br. J. Cancer* 1992; 65: 58-64.
240. Sieber F. Merocyanine 540. *Photochem. Photobiol.* 1987; 46 (6): 1035-1042.
241. Waggoner AS. Dye indicators of membrane potential. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1979; 8: 47-68.
242. Schlegel RA, Phelps BM, Waggoner A et al. Binding of Merocyanine 540 to normal and leukemic erythroid cells. *Cell* 1980; 20: 321-328.
243. Valinsky JF, Easton TG, Reich E. Merocyanine 540 as a fluorescent probe of membranes: selective staining of leukemic and immature hemopoietic cells. *Cell* 1978; 13: 487-499.
244. Pyatt RE, Jenks LL, Allen R et al. Use of Merocyanine 540 for the isolation of quiescent, primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells. *J. Hematother.* 1999; 8: 189-198.
245. Davila J, Harriman A, Gulliya KS. Photochemistry of Merocyanine 540: the mechanism of chemotherapeutic activity with cyanine dyes. *Photochem. Photobiol.* 1991; 53 (1): 1-11.
246. Organer Y, Quitevis EL. Dynamics of merocyanine 540 in model biomembranes: photoisomerization studies in small unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1192: 27-34.
247. Humphries G, Lovejoy JP. Cholesterol-free phospholipid domains may be the membrane feature selected by N-ε-dansyl-L-lysine and Merocyanine 540. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1983; 111 (2): 768-774.
248. Gaffney DK, Feix JB, Schwarz HP et al. Cholesterol content but not plasma membrane fluidity influences the susceptibility of L1210 leukemia cells to Merocyanine 540-sensitized irradiation. *Photochem. Photobiol.* 1991; 54 (5): 717-723.

249. Gulliya KS, Davila J, Harriman A. The mechanism of LDL-mediated increased uptake of merocyanine 540 by HL-60 cells. *Cancer J.* 1990; 3 (6): 360-365.
250. Lagerberg J, Kallen KJ, Haest C. et al. Factors affecting the amount and the mode of merocyanine 540 binding to the membrane of human erythrocytes. A comparison with the binding to leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1235: 428-436.
251. Smith OM, Gaffney DK, Anderson MS et al. Plasma membrane properties regulating the sensitivity of leukemia, lymphoma and solid tumor cells to Merocyanine 540-sensitized photoirradiation. *Exp. Hematol.* 1991; 19: 785-788.
252. Sieber F, Spivak JL, Sutcliffe AM. Selective killing of leukemic cells by merocyanine 540-mediated photosensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 7584-7587.
253. O'Brien JM, Singh RJ, Feix JB et al. Action spectra of the antileukemic and antiviral activities of Merocyanine 540. *Photochem. Photobiol.* 1991; 54 (5): 851-854.
254. O'Brien JM, Gaffney DK, Wang TP. Et al. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of enveloped viruses in blood products: site and mechanism of phototoxicity. *Blood* 1992; 80 (1): 277-285.
255. Gaffney DK, O'Brien JM, Sieber F. Modulation by thiols of the Merocyanine 540-sensitized photolysis of leukemia cells, red cells and herpes simplex virus type I. *Photochem. Photobiol.* 1991; 53 (1): 85-92.
256. Tran CC, Allan JS, Pervaiz S. et al. Preactivated merocyanine 540 inactivates HIV-1 and SIV: potential therapeutic and blood banking applications. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1992; 5: 188-195.
257. Dunne WM, Slater WA. Antimicrobial activity of merocyanine 540: a photosensitizing dye. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 32 (2): 101-105.
258. Smith OM, Dolan SA, Dvorak JA et al. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of human erythrocytes parasitized by plasmodium falciparum. *Blood* 1992; 80 (1): 21-24.
259. O'Brien JM, Sieber F. Mutagenicity of Merocyanine 540-mediated photosensitization. *Exp. Hematol.* 1989; 17: 166-170.
260. Kalyanaraman B, Feix JB, Sieber F. et al. Photodynamic action of merocyanine-540 on artificial and natural cell membranes: involvement of singlet molecular oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 2999-3003.
261. Gaffney DK, Sieber F. Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of soluble and membrane-bound enzymes in L1210 leukemia cells. *Cancer Res.* 1990; 50: 7765-7769.
262. Bachowski GJ, Pintar TJ, Girotti AW. Photosensitized lipid peroxidation and enzyme inactivation by membrane-bound merocyanine 540: reaction mechanisms in the absence and presence of ascorbate. *Photochem. Photobiol.* 1991; 53 (4): 481-491.
263. Davila J, Gulliya KS, Harriman A. Inactivation of tumours and viruses via efficient photoisomerization. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989: 1215-1216.
264. Feix JB, Kalyanaraman B. An electron spin resonance study of Merocyanine 540-mediated type I reactions in liposomes. *Photochem. Photobiol.* 1991; 53 (1): 39-45.
265. Chen YC, Lin JK. Photodynamic anticancer agent merocyanine 540 inhibits cell growth by apoptosis. *Anticancer Res.* 1996; 16 (5A): 2781-2788.
266. Pervaiz S, Seyed MA, Hirpara JL. Et al. Purified photoproducts of Merocyanine 540 trigger cytochrome C release and caspase 8-dependent apoptosis in human leukemia and melanoma cells. *Blood* 1999; 93 (12): 4096-4108.

267. Traul DL, Sieber F. Merocyanine 540-sensitized photoirradiation induces apoptosis in HL-60 leukemia cells. *Blood* 1992; 80 (supp 1): 143a (abstr).
268. Lin F, Girotti AW. Stimulatory and inhibitory effects of iron on photodynamic inactivation of leukemia cells. *Photochem. Photobiol.* 1995; 62(3): 528-534.
269. Lin F, Girotti AW. Hyperresistance of leukemia cells to photodynamic inactivation after long-term exposure to hemin. *Cancer Res.* 1996; 56: 4636-4643.
270. Traul DL, Anderson GS, Bilitz JM et al. Potentiation of Merocyanine 540-mediated photodynamic therapy by salicylate and related drugs. *Photochem. Photobiol.* 1995; 62 (4): 790-799.
271. Anderson MS, Kalyanaraman B, Feix JB. Enhancement of Merocyanine 540-mediated phototherapy by salicylate. *Cancer Res.* 1993; 53: 806-809.
272. Nathan CF, Arrick BA, Murray HW et al. Tumor cell antioxidant defenses. *J. Exp. Med.* 1980; 153: 766-782.
273. Crook TR, Souhami RL, Whyman GD et al. Glutathione depletion as a determinant of sensitivity of human leukemia cells to cyclophosphamide. *Cancer Res.* 1986; 46: 5035-5038.
274. Stryer L. Βιοχημεία. Τόμος II. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1997: 645-646.
275. Lin F, Girotti AW. Cytoprotection against Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of the Na⁺, K⁺ -adenosine triphosphate in leukemia cells: glutathione and selenoperoxidase involvement. *Photochem. Photobiol.* 1994; 59 (3): 320-327.
276. Lin F, Geiger PG, Girotti AW. Selenoperoxidase-mediated cytoprotection against Merocyanine 540-sensitized photoperoxidation and photokilling of leukemia cells. *Cancer Res.* 1992; 52: 5282-5290.
277. Yamazaki T, Sieber F. Effect of hypothermia on the Merocyanine 540-mediated purging of hematopoietic cells. *J. Hematother.* 1997; 6: 31-39.
278. Yamazaki T, Sato Y, Sieber F. Role of cytoprotective mechanisms in the photochemical purging of autologous bone marrow grafts. *Exp. Hematol.* 1997; 25: 629-637.
279. Carruth JAS, McKenzie AL. Ιατρικά Lasers. Επιστήμη και κλινική εφαρμογή. 1994: 289.
280. Pratesi R. Diode Lasers in photomedicine. *IEEE Journal of Quantum Electronics* 1984; QE-20 (12): 1433-1438.
281. Lam S. Photodynamic therapy of lung cancer. *Semin. Oncol.* 1994; 21 (6 supp 15): 15-19.
282. Kato H, Horai T, Furuse K et al. Photodynamic therapy for cancers: a clinical trial of porfimer sodium in Japan. *Jap. J. Cancer Res.* 1993; 84: 1209-1214.
283. Marcon NE. Photodynamic therapy and cancer of the esophagus. *Semin. Oncol.* 1994; 21 (6 supp 15): 20-23.
284. Foultier MT, Vonarx-Coinsmann V, Cordel S et al. Modulation of colonic cancer cell adhesiveness by haematoporphyrin derivative photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1994; 23: 9-17.
285. Abramson AL, Shikowitz MJ, Mully VM et al. Variable light dose effect on photodynamic therapy for laryngeal papillomas. *Arch. Otolaryng/ H&N Surgery* 1994; 120: 852-855.
286. Bressler NM, Gills JP. Age related macular degeneration. *BMJ* 2000; 321: 1425-1427.

287. Sieber F, Stuart RK, Rowley SD et al. Dye-mediated photolysis of normal and neoplastic hematopoietic cells. *Leukemia Res.* 1987; 11: 43-49.
288. Atzpodien J, Gulati SC, Strife A, Clarkson BD. Photoradiation models for the clinical ex vivo treatment of autologous bone marrow grafts. *Blood.* 1987; 70: 484-489.
289. Porcellini A, Talevi N, Marchetti-Rossi MT et al. Limiting-dilution analysis for the determination of leukemic cell frequencies after bone marrow decontamination with mafosfamide or Merocyanine 540. *Blood* 1987; 70 (5): 1543-1549.
290. Atzpodien J, Gulati SC, Clarkson BD. Comparison of the cytotoxic effects of Merocyanine-540 on leukemic cells and normal bone marrow. *Cancer Res.* 1986; 46: 4892-4895.
291. Manna A, Marchetti-Rossi MT, Porcellini A. In vitro purging of leukemia and solid tumor cells by Merocyanine 540. *Haematologica* 1987; 72: 177-179.
292. Meagher RC, Sieber F, Spivak JL. Susceptibility to merocyanine 540-mediated photosensitization: a differentiation marker on murine hematopoietic progenitor cells. *J. Cell. Phys.* 1983; 116: 118-124.
293. Sieber F, Sieber-Blum M. Dye-mediated photosensitization of murine neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1986; 46: 2072-2076.
294. Sieber F, Rao S, Rowley SD et al. Dye-mediated photolysis of human neuroblastoma cells: implications for autologous bone marrow. *Blood* 1986; 68 (1): 32-36.
295. Kohler A, Muller A, Zintl F. Investigation of the usefulness of the photodynamic reaction for the purging of bone marrow from metastatic neuroblastoma cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1993; 19: 227-229.
296. Kubo Y, Sieber F. Photochemical purging of autologous bone marrow grafts: assessment of damage to stem cells and the microenvironment in long-term marrow cultures. *Bone Marrow Transpl.* 1997; 20: 27-31.
297. Lum LG, Yamagami M, Giddings BR et al. The immunoregulatory effects of Merocyanine 540 on in vitro human T- and B-lymphocyte functions. *Blood* 1991; 77 (12): 2701-2706.
298. Gulliya KS, Fay JW, Dowben RM et al. Elimination of leukemic cells by laser photodynamic therapy. *Cancer Chem. Pharm.* 1988; 22: 211-214.
299. Gulliya KS, Matthiws JL Fay JW, Dowben RM. Increased survival of normal cells during laser photodynamic therapy: Implications for ex vivo autologous bone marrow purging. *Life Sciences* 1988; 42 (25): 2651-2656.
300. Lydaki E, Dimitriou H, Papazoglou Th et al. Merocyanine 540 mediated photolysis of normal bone marrow, committed hemopoietic progenitors and neoplastic cells. Implications for bone marrow purging. *Leukem. Res.* 1997;21: 641-650.
301. Lydaki E, Dimitriou H, Papazoglou Th et al. Merocyanine 540 mediated photoirradiation of leukemic cells. In vitro inference on cell survival. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1996; 32: 27-32.
302. Gulliya KS, Pervaiz S. Elimination of clonogenic tumor cells from HL-60, Daudi and U-937 cell lines by laser photoradiation therapy: implications for autologous bone marrow purging. *Blood* 1989; 73 (4): 1059-1065.
303. Gulliya KS, Matthews JL. Photosensitization of leukemic cells and normal bone marrow cells by 514 nm Laser light and effects of Laser light on migration inhibition and lymphokine response. *Cell Biol. Int. Rep.* 1988; 12 (4): 305-312.

304. Gulliya KS, Pervaiz S, Dowben RM et al. Tumor cell specific dark cytotoxicity of light-exposed Merocyanine 540: implications for systemic therapy without light. *Photochem. Photobiol.* 1990; 52 (4): 831-838.
305. Gulliya KS, Chanh T, Newman J et al. Preactivation-a novel antitumour and antiviral approach. *Eur.J. Cancer* 1990; 26 (5): 551-553.
306. Pervaiz S, Harriman A, Gulliya KS. Protein damage by photoproducts of Merocyanine 540. *Free Radic. Biol. Med.* 1992; 12 (5): 389-396.
307. Sharma R, Gulliya KS. In situ stimulation of topoisomerase II-induced cleavage sites in the c-myc protooncogene by antitumor agent p MC540 is associated with gene expression. *Anticancer Drugs* 1996; 7 (3): 293-298.
308. Pervaiz S, Hirpara JL, Clement MV. Caspase proteases mediate apoptosis induced by anticancer agent preactivated MC540 in human tumor cell lines. *Cancer Lett.* 1998; 128 (1): 11-22.
309. Sieber F, Craig A, Krueger GL et al. Autotransplantation of bone marrow after extracorporeal purging with Merocyanine 540 and light. *Blood* 1986; 68 (supp 1): 292a.
310. Cappizi RL. The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapies by Amifostine. *Semin. Oncol.* 1999; 26 (2): 3-21.
311. Bukowski R. Cytoprotection in the treatment of pediatric cancer: review of current strategies in adults and their application to children. *Med. Ped. Oncol.* 1999; 32: 124-134.
312. Philip T, Gugliemi C, Hagenbeek A et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N. Eng. J. Med.* 1995; 333 (23): 1540-1545.
313. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy of multiple myeloma. *N. Eng. J. Med.* 1996; 335 (2): 91-97.
314. Stiff PJ, Dahlberg S, Forman SJ et al. Autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed or refractory diffuse aggressive non-Hodgkin lymphoma: value of augmented preparative regimens- Southwest Oncology Group Trial. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16 (1): 48-55.
315. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RMF et al. Randomized comparison of addition of autologous bone marrow transplantation to intensive chemotherapy to acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. *Lancet* 1998; 351: 700-708.
316. Balzarotti M, Grisanti S, Granzow K et al. Ex vivo manipulation of hematopoietic stem cells for transplantation: the potential role of Amifostine. *Semin. Oncol.* 1999; 26 (2 supp 7): 66-71.
317. Griggs JJ. Reducing the toxicity of anticancer therapy: new strategies. *Leuk. Res.* 1998; 22: S27-S33.
318. Patt HM, Tyree EB, Straube RL. Technical papers. Cysteine protection against X irradiation. *Science* 1949; 110: 213-214.
319. Hausheer FH, Kanter P, Cao S et al. Modulation of platinum-induced toxicities and therapeutic index: mechanistic insights and first- and second-generation protecting agents. *Semin. Oncol.* 1998; 25 (5): 584-599.
320. Schuchter LM, Luginbuhl WE, Meropol NJ. The current status of toxicity protectants in cancer therapy. *Semin. Oncol.* 1992; 19 (6): 742-751.
321. Borch RF, Markman M. Biochemical modulation of cisplatin toxicity. *Pharmac. Ther.* 1989; 41: 371-380.

322. Alberts DS, Noel JK. Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented? *Anti-cancer Drugs* 1995; 6: 369-383.
323. Schmalbach TK, Borch RF. Mechanism of diethyldithiocarbamate modulation of murine bone marrow toxicity. *Cancer Res.* 1990; 50: 6218-6221.
324. Arrick BA, Nathan CF. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res.* 1984; 44 : 4224-4232.
325. Sen CK. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 1998; 55 (11): 1747-1758.
326. Roberts JC, Francetic DJ, Zera RT. Chemoprotection against cyclophosphamide-induced urotoxicity: comparison of nine thiol protective agents. *Anticancer res.* 1994; 14: 389-396.
327. Yokomizo A, Ono M, Nanri H et al. Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin and etoposide. *Cancer Res.* 1995; 55: 4293-4296.
328. Dorr RT. Cytoprotective agents for anthracyclines. *Semin. Oncol.* 1996; 23 (4): 23-34.
329. Cappizi RL, Scheffler BJ, Schein PS. Amifostine- mediated protection of normal bone marrow from cytotoxic chemotherapy. *Cancer suppl.* 1993; 72: 3495-3501.
330. Van der Vijgh WJF, Peters GJ. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by Amifostine (Ethyol): preclinical aspects. *Semin. Oncol.* 1994; 21 (5 supp 11): 2-7.
331. Yuhas JM. Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S- 2- (3- Aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res.* 1980; 40: 1519-1524.
332. Calabro- Jones PM, Aguilera JA, Ward JF et al. Uptake of WR-2721 derivatives by cells in culture: identification of the transported form of the drug. *Cancer Res.* 1988; 48: 3634-3640.
333. Van der Vijgh WJF, Korst AEC. Amifostine (Ethyol): Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in vivo. *Eur. J. Cancer* 1996; 32A (supp4): S26-S30.
334. Fahey RC. Protection of DNA by thiols. *Pharmac. Ther.* 1988; 39: 101-108.
335. Smoluk GD, Fahey RC, Calabro-Jones PM et al. Radioprotection of cells in culture by WR-2721 and derivatives: form of the drug responsible for protection. *Cancer Res.* 1988;48: 3641-3647.
336. Treskes M, Holwerda U, Nijtmans LGJ et al. The reversal of cisplatin-protein interactions by modulating agent WR2721 and its metabolites WR1065 and WR33278. *Cancer Chemother. Pharmac.* 1992; 29: 467-470.
337. Glover D, Negendank W, Delivoria-Papadopoulos M et al. Alterations in oxygen transport following WR-2721. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 1984; 10 (9): 1565-1568.
338. Miller AC, Henderson BW. The influence of cellular glutathione content on cell survival following photodynamic treatment in vitro. *Radiat. Res.* 1986; 107: 83-94.
339. Purdie JW, Inhaber ER, Schneider H, Labelle JL. Interaction of cultured mammalian cells with WR-2721 and its thiol WR-1065: implications for mechanisms of radioprotection. *Int. J. Radiat. Biol.* 1983;43: 517-527.
340. Mitchell JLA, Judd GG, Diveley RR et al. Involvement of the polyamine transport system in cellular uptake of the radioprotectants WR-1065 and WR-33278. *Carcinogenesis* 1995; 16 (12): 3063-3068.

341. Fiorio R, Velloso R, Bronzetti R. Effects of spermine on formation of HGPRT-mutants induced by ethylmethanesulphonate, methylmethanesulphonate and mitomycin C in V79 Chinese hamster cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 1994; 23: 294-298.
342. Stryer L. Βιοχημεία, τόμος ΙΙ. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 1997: 721-729.
343. Holwitt EA, Koda E, Swenberg CE. Enhancement of topoisomerase I-mediated unwinding of supercoiled DNA by the radioprotector WR-33278. *Radiat. Res.* 1990; 124: 107-109.
344. Grdina DJ, Constantinou A, Shigematsu N et al. Inhibition of topoisomerase I α activity in CHO K1 cells by 2-[(aminopropyl)amino] ethanethiol (WR-1065). *Radiat. Res.* 1994; 138: 44-52.
345. Grdina DJ, Murley JS, Roberts JC. *Effects of thiols on topoisomerase-II α activity and cell cycle progression. Cell Prolif.* 1998; 31: 217-229.
346. Milas L, Hunter N, Stephens C et al. Inhibition of radiation carcinogenesis in mice by S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res.* 1984; 44: 5567-5569.
347. Werner-Wassik M. Future development of Amifostine as a radioprotectant. *Semin. Oncol.* 1999; 26 (2 supp 7): 129-134.
348. Kataoka Y, Perrin J, Hunter N et al. Antimutagenic effects of Amifostine: clinical implications. *Semin. Oncol.* 1996; 23 (4 supp 8): 53-57.
349. Clark LS, Albertini RJ, Nicklas JA. The Amino-thiol WR-1065 protects T-lymphocytes from ionizing radiation-induced deletions of the HPRT gene. *Cancer Epid., Biomark. & Prev.* 1997; 6: 1033-1037.
350. Liu SC, Murley JS, Woloschak G, Grdina DJ. Repression of c-myc gene expression by the thiol and disulphide forms of the cytoprotector amifostine. *Carcinogenesis* 1997; 18 (12): 2457-2459.
351. Glinsmann-Gibson B, List AF. Amifostine suppresses apoptosis in myelodysplastic CD34+ cells and promotes progenitor growth via polyamine-like effects. *Blood* 1997; 90 (10 supp 1): 520a (abstr).
352. Provinciali M, Ciavattini A, Di Stefano G et al. In vivo Amifostine (WR-2721) prevents chemotherapy induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes from cancer patients. *Life Sci.* 1999; 64 (17): 1525-1532.
353. Ramakrishnan N, Catravas GN. N-(2-mercaptoethyl)-1,3-propanediamine (WR-1065) protects thymocytes from programmed cell death. *J. Immun.* 1992; 148 (6): 1817-1821.
354. Schuchter LM, Glick JH. The current status of WR-2721 (Amifostine): a chemotherapy and radiation therapy protector. *Biol. Ther. Cancer* 1993; 3 (1): 1-10.
355. Douay L, Hu C, Giarratana MC, Gorin NC. Comparative effects of Amifostine (Ethyol) on normal hematopoietic stem cells versus human leukemic cells during ex vivo purging in autologous bone marrow transplants. *Semin. Oncol.* 1994; 21 (5supp 11): 16-20.
356. Douay L, Giarratana MC, Gorin NC. Amifostine (WR-2721) protects normal haematopoietic stem cells against cyclophosphamide derivatives' toxicity without compromising their antileukemic effect. *Eur. J. Cancer* 1995; 31A(supp1): S14-S16.

357. Dorr RT, Lagel K, McLean S. Cardioprotection of rat heart myocytes with amifostine (Ethyol) and its free thiol WR-1065, in vitro. *Eur. J. Cancer* 1996; 32A (supp 4): S21-S25.
358. Schuchter LM. Exploration of platinum-based dose-intensive chemotherapy strategies with Amifostine (Ethyol). *Eur. J. Cancer* 1996; 32A (supp 4): S40-S42.
359. Alberts DS, Speicher LA, Krutzsch M et al. WR-1065, the active metabolite of Amifostine (Ethyol), does not inhibit the cytotoxic effects of a broad range of standard anticancer drugs against human ovarian and breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* 1996; 32A (supp 4): S17-S20.
360. Wasserman T. Radioprotective effects of Amifostine. *Semin. Oncol.* 1999; 26 (2 supp 7): 89-94.
361. Tannehill SP, Mehta MP. Amifostine and radiation therapy: Past, present and future. *Semin. Oncol.* 1996; 23 (4 supp 8): 69-77.
362. Capizzi RL. The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapies by Amifostine (Ethyol). *Eur. J. Cancer* 1996; 32A (supp 4): S5-S16.
363. Valeriote F, Tolen S. Protection and potentiation of nitrogen mustard cytotoxicity by WR-2721. *Cancer Res.* 1982; 42: 4330-4331.
364. Treskes M, Boven E, van de Loosdrecht AA et al. *Effects of the modulating agent WR-2721 on the myelotoxicity and antitumour activity in carboplatin- treated mice.* *Eur. J. Cancer* 1994; 30A(2): 183-187.
365. Taylor CW, Wang LM, List AF et al. Amifostine protects normal tissues from paclitaxel toxicity while cytotoxicity against tumour cells is maintained. *Eur. J. Cancer* 1997; 33: 1693-1698.
366. Meagher RC, Rothman SA, Paul P et al. Purging of small-cell lung cancer cells from human bone marrow using ethiofos (WR-2721) and light-activated Merocyanine 540 phototreatment. *Cancer Res.* 1989; 49: 3637-3641.
367. Alberts DS. Protection by Amifostine of cyclophosphamide-induced myelosuppression. *Semin. Oncol.* 1999; 26 (2 supp7): 37-40.
368. Kemp G, Rose P, Lurain J et al. Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14 (7): 2101-2112.
369. Schiller JH, Storer B, Berlin J et al. Amifostine, cisplatin and vinblastin in metastatic non-small-cell lung cancer: a report of high response rates and prolonged survival. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14 (6): 1913-1921.
370. Glover D, Glick JH, Weiler C. et al. WR-2721 and high dose cisplatin: an active combination in the treatment of metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1987; 5 (4): 574-578.
371. Borsi JD, Csaki C, Ferencz T, Oster W. Administration of Ethyol (amifostine) to a child with medulloblastoma to ameliorate hematological toxicity of high dose carboplatin. *Anti-Cancer Drugs* 1996; 7: 121-126.
372. Dorr RT, Holmes BC. Dosing considerations with Amifostine: a review of the literature and clinical experience. *Semin. Oncol.* 1999; 26 (2 supp 7): 108-119.

373. Gorin NC. The potential role of Amifostine (Ethyol) in haematological malignancies. *Eur. J. Cancer* 1996; 32A (supp4): S31-S39.
374. Douay L, Hu C, Giarratana MC et al. Amifostine improves the antileukemic therapeutic index of mafosfamide: implications for bone marrow purging. *Blood* 1995; 86: 2849-2855.
375. Poloni A, Leoni P, Curzi L et al. Ex vivo pharmacological purging of leukapheresis collections with nitrogen mustard: amifostine pretreatment improves both early and late peripheral blood progenitor cell recovery. *Exp. Hemat.* 1999; 27: 1548-1556.
376. Sphall EJ, Stemmer SM, Hami L et al. Amifostine (WR-2721) shortens the engraftment period of 4- hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow in breast cancer patients receiving high dose chemotherapy with autologous bone marrow support. *Blood* 1994; 83: 3132-3137.
377. Cagnoni PJ, Jones RB, Bearman SI et al. Use of Amifostine in bone marrow purging. *Semin. Oncol.* 1996; 23 (4 supp 8): 44-48.
378. List AF, Heaton R, Glinsmann-Gibson B, Cappizi RL. Amifostine stimulates formation of multipotent and erythroid bone marrow progenitors. *Leukemia* 1998; 12: 1596-1602.
379. Knight GD, Laubscher KH, Fore ML et al. Vitalethine modulates erythropoiesis and neoplasia. *Cancer Res.* 1994; 54: 5623-5635.
380. List AF. Use of amifostine in hematologic malignancies, myelodysplastic syndrome and acute leukemia. *Semin. Oncol.* 1999; 26(2 supp 7): 61-65.
381. List AF, Heaton R, Glinsmann- Gibson B, Capizzi RL. Amifostine protects primitive hematopoietic progenitors against chemotherapy cytotoxicity. *Semin. Oncol.* 1996; 23 (4 supp 8): 58-63.
382. *Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. N.Eng.J.Med. 1999; 340 (21): 1649-1660.*
383. Rajapaska R, Bhatia S, Swarnakar A et al. Amifostine in combination with cytokines stimulates in vitro hemopoiesis in myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood* 1998; 92 (10 supp 1): 160 (abstr).
384. Klimecki WT, Glinsmann-Gibson BJ, Heaton R et al. Amifostine enhances survival of CD34+ cells from myelodysplastic syndrome (MDS) patients. *Proc. 89th Ann. Mtg. AACR* 1998; 39: 606 (abstr).
385. Klimecki W, Heaton R, Glismann-Gibson B et al. Amifostine suppresses apoptosis in myelodysplastic CD34+ cells and promotes progenitor growth via polyamine-like effects. *Blood* 1997; 90 (10 supp 1): 520 (abstr).
386. Grossi A, Fabbri A, Santini V et al. Amifostine as a single agent or in a combination regimen with low-dose Ara-C in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Blood* 1998; 92 (10 supp 1): 632 (abstr).
387. List AF, Holmes H, Vempaty H et al. Phase III study of Amifostine in patients with myelodysplastic syndromes (MDS): impact on hematopoiesis. *Blood* 1998; 92 (10 supp 1): 714 (abstr).
388. deCastro CM, Gockerman JP, Moore JO et al. Treatment of myelodysplastic syndrome (MDS) with Amifostine. *Blood* 1998; 92 (10 supp 1): 251 (abstr).
389. List AF, Bransfield F, Heaton R et al. Stimulation of hemopoiesis by Amifostine in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 1997; 90: 3364-3369.

390. Patchen ML, MacVittie TJ. Granulocyte colony-stimulating factor and Amifostine (Ethyol) synergize to enhance hemopoietic reconstitution and increase survival in irradiated animals. *Semin. Oncol.* 1994; 21 (5 supp 11): 26-32.
391. Gao XZ, Chopra HK, Huang XK et al. The effects of Amifostine (AM) on myelodysplastic and myeloid leukemia progenitor cells. *Proc. 88th Ann. Mtg. AACR* 1997; 38: 323 (abstr).
392. Caracciolo D, Clark S, Rovera G. Differential activity of recombinant colony-stimulating factors in supporting proliferation of human peripheral blood and bone marrow myeloid progenitors in culture. *Brit. J. Hematol.* 1989; 72: 306-311.
393. Gibson SL, Al-Shawi MK, Senior AE, Hilf R. Inhibition of the ATPase activity of P-glycoprotein by porphyrin photosensitization of multi-drug resistant cells in vitro. *Photochem. Photobiol.* 1995; 61 (4): 390-396.
394. Dillon J, Kennedy JC, Pottier RH, Roberts JE. In vitro and in vivo protection against phototoxic side effects of photodynamic therapy by radioprotective agents WR-2721 and WR-77913. *Photochem. Photobiol.* 1988; 48 (2): 235-238.
395. Meier T, Issels RD. Degradation of 2-(3-aminopropylamino) ethanethiol (WR-1065) by Cu- dependent amine oxidases and influence on glutathione status of the chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharm.* 1995; 50(4): 489-496.
396. Issels RD, Nagele A. Promotion of cystine uptake, increase of glutathione biosynthesis and modulation of glutathione status by S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid (WR-2721) in chinese hamster cells. *Cancer Res.* 1989; 49: 2082-2086.
397. Chen YC, Lin JK. Photodynamic anticancer agent merocyanine 540 inhibits cell growth by apoptosis. *Anticancer Res.* 1996; 16 (5A): 2781-2788.
398. Sharma R, Arnold L, Gulliya KS. Correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in pMC 540 and merodantoin sensitive and resistant human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 1995; 15 (2): 295-304.