ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ ΠΑΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΗΒΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Προσδιορισμός μήκους τελομερικών άκρων σε παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

ΕΛΕΝΗ ΒΑΚΩΝΑΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, PhD

Ηράκλειο,
Φεβρουάριος 2022

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Στειακάκη Ευτυχία, Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης **(Επιβλέπουσα)**

Τσατσάκης Μ. Αριστείδης, Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης

Τζατζαράκης Εμμανουήλ, Αναπλ. Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης

2022

Βακωνάκη Ελένη

ALL RIGHTS RESERVED

Στη Χρυσή μου,
το φως της ζωής μου

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την μεταπτυχιακή μου εργασία, δεν μπορώ να μην σχολιάσω τις δυσκολίες που υπήρξαν μέχρι την ολοκλήρωση του προγράμματος λόγω της πανδημίας. Νέες μέθοδοι, νέοι όροι, webex, τηλεκπαίδευση, teams, που στην ηλικία των 40 δεν μου ήταν και πολύ γνώριμες, παρόλο όμως τις δυσκολίες το ταξίδι έφτασε στο τέλος, αφήνοντας όμορφες αναμνήσεις έστω και αν οι περισσότερες από αυτές ήταν μπροστά σε μία οθόνη βλέποντας τους συμφοιτητές μου σε κουτάκια.

Για όλο αυτό το ταξίδι θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Στειακάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να παρακολουθήσω το πρόγραμμα της, για την καθοδήγηση της στη παρούσα εργασία αλλά και για τις γνώσεις που απλόχερα μου έδωσε. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή μου κ. Τσατσάκη, που με εμπιστεύτηκε πριν 12 χρόνια που πέρασα το κατώφλι του εργαστηρίου του, ζητώντας εργασία και από τότε με στηρίζει ηθικά και υλικά σε κάθε μου βήμα χωρίς να μου αρνείται το παραμικρό. Δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθ. κ. Τζατζαράκη, που όλα αυτά τα χρόνια είναι δίπλα μου και με στηρίζει, αφιερώνοντας μου υπομονετικά πραγματικά άπειρες ώρες για να μου μάθει ότι ξέρω από την Τοξικολογία. Ευχαριστώ επίσης τον Ιατρό Δρ. Ιορδάνη Πελαγιάδη για την βοήθεια του στη συλλογή των πληροφοριών από τους μικρούς ασθενείς, την Υποψήφια Διδάκτωρ Μαριλένα Λούρου, Βιολόγο για την βοήθεια της στην συλλογή των δειγμάτων και τον Δρ. Αλεγκάκη Αθανάσιο, Φυσικό για την βοήθεια του στην στατιστική ανάλυση.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για όλη την υπομονή και την βοήθεια τους αυτούς τους μήνες, μα πιο πολύ την κόρη μου Χρυσή για την κατανόηση που έδειξε παρά το μικρό της ηλικίας της.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στους μικρούς συμμετέχοντες στην μελέτη αυτή, που μου παραχώρησαν τα δείγματα τους, με την ευχή να είναι η περιπέτεια τους αυτή παρελθόν και η ζωή τους από εδώ και έπειτα γεμάτη μόνο με χαμόγελα και φως.

Περιεχόμενα

Περίληψη 7

Λέξεις-κλειδιά 9

Summary 10

Keywords 12

Συντομογραφίες 13

1. Εισαγωγή 14

1.1. Λευχαιμία παιδικής ηλικίας 14

1.2. Πρόγνωστικοί παράγοντες 18

1.3. Θεραπεία 19

1.4. Τελομερή 20

1.5. Σκοπός της μελέτης 27

2. Πειραματικό μέρος 28

2.1. Πληθυσμός μελέτης 28

2.2. Απομόνωση DNA 29

2.3. Quantitative PCR (Q-PCR) 29

2.4. Στατιστική ανάλυση 31

3. Αποτελέσματα 33

3.1. Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών 33

3.2. Κατηγοριοποίηση ασθενών ως προς το είδος της ΟΛΛ 34

3.3. Κατηγοριοποίηση ασθενών βάση την κατηγορία κινδύνου, τον καρυότυπο και τις υποτροπές 34

3.4. Κατανομή του μήκους των τελομερικών άκρων των ασθενών, συνολικά και ανά ασθενή 35

3.5. Μεταβολές του μήκους των τελομερικών άκρων 37

4. Συζήτηση 41

4.1. Περιορισμοί μελέτης 47

4.2. Μέλλον, ορίζοντες, προοπτικές 48
4.3. Συμπεράσματα 49
5. Χρηματοδότηση..... 50
6. Έγκριση Επιστημονικούς συμβουλίου 50
6. Βιβλιογραφία..... 51
7. Παράρτημα..... 56

Περίληψη

Τίτλος εργασίας: Προσδιορισμός μήκους τελομερικών άκρων σε παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

Της: Ελένης Κων. Βακωνάκη

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Στειακάκη Ευτυχία, Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης **(Επιβλέπων)**

Τσατσάκης Μ. Αριστείδης, Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης

Τζατζαράκης Εμμανουήλ, Αναπλ. Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Πανεπιστημίου Κρήτης

Ημερομηνία: Φεβρουάριος 2022

Η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ) είναι η πιο συχνή νεοπλασματική νόσος της παιδικής ηλικίας και αποτελεί το 75% των νέων περιπτώσεων λευχαιμίας κάθε χρόνο. Είναι μία αιματολογική νεοπλασία, που χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη παραγωγή μη φυσιολογικών πρόδρομων κυττάρων λεμφικής σειράς και έχει εξαιρετικά καλή πρόγνωση καθώς ίαση επιτυγχάνεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% των παιδιατρικών ασθενών. Στην Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία σε ένα ποσοστό >90% ανιχνεύονται αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες καθώς επίσης και δομικές ανωμαλίες όπως μεταθέσεις, ελλείψεις κ.α. με επακόλουθο την διαταραχή της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αιμοποίηση. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία κυττάρων που κάνουν ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, οδηγώντας το κύτταρο με γρήγορο ρυθμό στην κυτταρική γήρανση.

Με τον όρο κυτταρική γήρανση ορίζεται η κατάσταση μη αναστρέψιμης παύσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με αποτέλεσμα τη συσσώρευση βλαβών στο γενετικό υλικό, που οδηγούν τελικά στην καρκινογένεση. Τα τελομερικά άκρα των χρωμοσωμάτων έχουν προστατευτικό ρόλο, διαφυλάξουν την ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων, προστατεύοντας τα από την αποικοδόμηση, τον ανασυνδυασμό και την σύντηξη. Το μήκος των τελομερικών άκρων εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου, την ηλικία του ατόμου, καθώς και από την κατάσταση της υγείας του και τις συνήθειες του. Η μείωση αυτή πραγματοποιείται σε κάθε κυτταρική διαίρεση έως ότου φτάσει στο όριο Hayflick όπου το κύτταρο οδηγείται στην απόπτωση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να προσδιοριστεί ο βαθμός κυτταρικής γήρανσης των λευχαιμικών κυττάρων στη διάγνωση των ασθενών και των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων στην ύφεση της νόσου και να διαπιστωθεί εάν η μέτρηση των τελομερικών άκρων θα μπορούσε να αποτελέσει βιοδείκτη για τον προσδιορισμό της επιθετικότητας της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία, τον κίνδυνο υποτροπών, δηλαδή σημαντικό προγνωστικό δείκτη για την επιβίωση τους.

Στην μελέτη έλαβαν μέρος συνολικά 35 παιδιά, έφηβοι και νεαροί ενήλικες, ηλικίας από 1,5 έως 18 ετών, οι οποίοι διαγνώστηκαν με Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία κατά την περίοδο 1/1/2010 έως 31/12/2020 στην Κλινική Αιματολογίας και Ογκολογίας Παίδων του ΠΑΓΝΗ. Το 62.9% των ασθενών ήταν αγόρια και τα υπόλοιπα κορίτσια. Όσο αφορά τον τύπο την Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας, το 88.6% έπασχε από Β-σειράς Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία και το υπόλοιπο από Τ-ΟΛΛ. Σε κάθε ασθενή χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μυελού των οστών, από α) στη διάγνωση της νόσου (λεμφοβλάστες) και β) μετά την επίτευξη ύφεσης (φυσιολογικά λεμφομονοπύρηνα κύτταρα). Από τα δείγματα λεμφοβλαστών/λεμφοκυττάρων που λήφθησαν πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του DNA και ακολούθησε η φωτομέτρηση του, ώστε να μετρηθεί η συγκέντρωση και να προσδιοριστεί η καθαρότητα του. Στην συνέχεια έγινε προσδιορισμός του μήκους των τελομερικών άκρων με την μέθοδο της qPCR. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση με την χρήση t-test και ANOVA.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το μέσο μήκος των τελομερικών άκρων στα δείγματα λεμφοβλαστών που λήφθησαν κατά την διάγνωση των

ασθενών ήταν 2,18±1,04 Kb ενώ κατά την επίτευξη της ύφεσης το μέσο μήκος ήταν 4,18±1,54 Kb. Δύο από τους ασθενείς εμφάνισαν αντίστροφα αποτελέσματα με μεγαλύτερο μήκος τελομερικών άκρων στους λεμφοβλάστες από ότι στα λεμφοκύτταρα. Ενώ ένας από τους ασθενείς δεν είχε καμία απολύτως διαφοροποίηση στο μέσο μήκος των τελομερών του κατά τις δύο δειγματοληψίες και είναι ο μοναδικός από τους ασθενείς μας που υποτροπίασε. Από την ομαδοποίηση των ασθενών με βάση τον τύπο της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με Τ-ΟΛΛ είχαν μεγαλύτερα τελομερικά άκρα από τους ασθενείς με Β-σειράς ΟΛΛ με μήκος 2.4±1.08 Kb έναντι 1.90±1.67 Kb αντίστοιχα. Παράλληλα οι ασθενείς υψηλού κινδύνου, σύμφωνα με τους προγνωστικούς παράγοντες των πρωτοκόλλων θεραπείας είχαν μικρότερο μήκος τελομερικών άκρων σε σχέση με εκείνους του ενδιάμεσου κινδύνου με τιμές 1.43±1.54 Kb και 2.29±1.47 Kb αντίστοιχα. Τέλος από την σύγκριση του μήκους των τελομερικών άκρων με βάση το καρυότυπο βρέθηκε ότι τα άτομα με 46 χρωμοσώματα είχαν μήκος τελομερικών άκρων 1.61±1.4 Kb, μικρότερο δηλαδή σε σχέση με εκείνα που εμφάνισαν καρυότυπο με >46 χρωμοσώματα.

Συμπερασματικά η μεγάλη μείωση του τελομερικού μήκους των λεμφοβλαστών λόγω του ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού τους μπορεί να είναι αναστρέψιμη κατά την διάρκεια της θεραπείας μέχρι την επίτευξη της ύφεσης. Η μέτρηση του μήκους των τελομερικών άκρων θα μπορούσε να αποτελέσει βιοδείκτη για την πρόγνωση της νόσου.

Λέξεις-κλειδιά

Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, τελομερικά άκρα, κυτταρική γήρανση

Summary

Title:"Determination of telomeres length in children, teens and young adults, with Acute Lymphoblastic Leukemia."

By: *Eleni K. Vakonaki*

Three Member Evaluating Committee

1. Steiakaki Eftichia, Professor of Pediatric Hematology & Oncology, Medical School, University of Crete (Supervisor)

2. Tsatsakis Aristidis, Professor of Toxicology, Medical School, University of Crete

3. Tzatzarakis Emmanouil, Associate Professor of Toxicology, Medical School, University of Crete

Date: February 2022

Acute Lymphoblastic Leukemia is a blood malignancy characterised by rapid and excessive production of abnormal precursor white blood cells. It is the most common neoplasm in childhood, accounting for 80% of childhood malignancies, with an excellent prognosis, as more than 90% of pediatric patients can be cured. In about 90% of Acute Lymphoblastic Leukemia cases numerical chromosomal abnormalities as well as structural abnormalities such as permutations, deficiencies etc. resulting in disruption of the expression of genes involved in hematopoiesis can be detected. As a result cells proliferate uncontrollably, leading the cell to rapid cell aging.

The term cell aging indicates the state of irreversible cessation of cell proliferation resulting in the accumulation of continuous damage to the genetic material, ultimately leading to carcinogenesis. The chromosomes telomeres have a protective role, preserving the chromosome integrity and offering protection from degradation, recombination and fusion. The length of the telomere limbs depends on the cell type, the age of the individual, as well as the person's state of health and habits. This reduction takes place in each cell division until it reaches the Hayflick limit where the cell is led to apoptosis.

The aim of this study was to determine the degree of cellular aging in patients with Acute Lympoblastic Leukemia and to determine whether the telomere length measurement could be a biomarker of the disease severity, the response to treatment, the risk of relapse and ultimately the survival of patients.

The study included a total of 35 children, adolescents and young adults, aged from 1.5 to 18 years, diagnosed with Acute Lymphoblastic Leukemia during the period 1/1/2010 to 31/12/2020 at the Department of Pediatric Hematology/ Oncology of the University Hospital of Crete. 62.9% of the patients were males and the rest females. Regarding the type of Acute Lymphoblastic Leukemia, 88.6% was diagnosed with B lineage Acute Lymphoblastic Leukemia and the remaining with T-lineage ALL. In each patient two samples were collected from the bone marrow, the first at diagnosis and the other when was achieved. DNA was extracted and concentration and purity were measured by photometry. The length of the telomeres was determined by qPCR methodology. Statistical analysis using t-test and ANOVA followed.

Our results showed that the mean length of telomeres in the lymphoblast specimens obtained at the diagnosis was 2.18 ± 1.04 Kb while at the time of remission the mean length was higher, 4.18 ± 1.54 Kb. Two of the patients showed longer telomere lengths in lymphoblasts compared to normal lymphocytes at remission. One of the patients had absolutely no difference in the mean telomere length between the two samplings and is the only one patient with disease relapse. After grouping the patients according to the type of Acute Lymphoblastic Leukemia,

patients with T-ALL presented longer telomere lenght than patients with B-ALL (2.4 ± 1.08 Kb versus 1.90 ± 1.67 Kb respectively). High-risk group patients had shorter telomere lengths compared to the intermediate-risk counterpart (1.43 ± 1.54 Kb and 2.29. ± 1.47 Kb respectively). Finally, comparing the telomeres length based on the karyotype analysis, individuals with 46 chromosomes had median telomere length of 1.61 ± 1.4 Kb, which is shorter than those with a karyotype with > 46 chromosomes.

In conclusion, the large reduction in the telomere length of lymphoblasts due to their uncontrolled proliferation may be reversible. Telomeres length measurement could provide an important correlation with disease progression and be a useful biomarker of ALL.

Keywords

Acute Lymphoblastic Leukemia, telomere end, cell aging

Συντομογραφίες

ΟΛΛ: Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

FISH: Fluorescence In Situ Hybridisation

ΚΝΣ: Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

TRF1: Telomeric Repeat Factor 1

TRF2: Telomeric Repeat Factor 2

POT1: Protection of Telomeres Homolog 1

TIN2: TERF1- Interacting Nuclear Factor 1

TPP1: Tripeptidyl Peptidase 1

RAP1: Repressor Activator Protein 1

ALT: Alternative Telomere Lengthening

APBs: ALT-associated PML bodies

PML: Promyelocytic Leukemia body protein

1. Εισαγωγή

1.1. Λευχαιμία παιδικής ηλικίας

Η λευχαιμία είναι η πιο συχνή νεοπλασία της παιδικής ηλικίας και αντιπροσωπεύει περίπου το 30% των νεοπλασιών σε παιδιά και εφήβους. Η συχνότερη μορφή της είναι η Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία σε ποσοστό 80% και ακολουθεί η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία με ποσοστό περίπου 20%, η νεανική μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (JMML), η οποία εμφανίζεται συνήθως σε ηλικίες μικρότερες των 4 ετών καθώς και η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία, οι οποίες είναι εξαιρετικά σπάνιες στην παιδική ηλικία (1).

Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ)

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία είναι μια αιματολογική νεοπλασματική νόσος που χαρακτηρίζεται από κλωνική υπερπαραγωγή πρόδρομων κυττάρων, αντιπροσωπεύει το 25% των νεοπλασιών στα παιδιά, αποτελώντας την πιο συχνή νεοπλασία της παιδικής ηλικίας. Υπολογίζεται ότι ετησίως διαγιγνώσκονται περίπου 3-4 νέα περιστατικά ανά 100.000 παιδιά, ηλικίας μικρότερης των 15 ετών (2). Η εμφάνιση της νόσου είναι πιο συχνή στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια, με υψηλότερη επίπτωση εμφάνισης της νόσου στις ηλικίες 1-4 ετών, ενώ είναι συχνότερη στην λευκή φυλή σε σχέση με τους Αφρικανούς, Ασιάτες και κατοίκους της Νοτίου Αμερικής.

Η αιτιολογία της ΟΛΛ στις περισσότερες περιπτώσεις είναι άγνωστη, ωστόσο προδιαθεσικοί παράγοντες φαίνεται να είναι τα σύνδρομα Down, Turner, Kleinefelter, Bloom, Fanconi, αταξίας-τηλεγγειεκτασίας, Schwachman, Li-Fraumeni, Wiskott-Aldrich, η αναιμία Diamond-Blackfan, η σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια, η νευρινωμάτωση τύπου 1 και μερικά άλλα (3). Πέρα από τους

γενετικούς παράγοντες υπάρχουν και περιβαλλοντικοί παράγοντες που μπορούν να προδιαθέσουν στην εμφάνιση της νόσου, όπως είναι η λοίμωξη από Epstein-Barr, η έκθεση σε υψηλή δόση ακτινοβολίας, η έκθεση του εμβρύου στην ακτινοβολία κατά τους πρώτους μήνες της κύησης, η έκθεση της μητέρας σε χρώματα και βερνίκια πριν την σύλληψη ή κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης (4). Τέλος φάρμακα, όπως ανοσοκατασταλτικά, αλκυλιωτικοί παράγοντες, η έκθεση στο βενζόλιο καθώς και η προχωρημένη ηλικία της μητέρας μπορούν να αυξήσουν το ποσοστό εμφάνισης της νόσου (1).

Ταξινόμηση ΟΛΛ

Η ταξινόμηση της ΟΛΛ βασίζεται στην μορφολογία των βλαστών, στον ανοσοφαινότυπο, στον καρυότυπο, καθώς και στα μοριακά χαρακτηριστικά. Όσο αφορά την μορφολογία των βλαστών οι λεμφοβλάστες L1 είναι ο ποιο συνηθισμένος υπότυπος, ο οποίος περιλαμβάνει σχετικά άωρα κύτταρα, μικρά και ομοιογενή, με στρογγυλό πυρήνα χωρίς πυρήνια και λίγο κυτταρόπλασμα, απαντάται στο 80-85% των περιπτώσεων ενώ έχει την καλύτερη δυνατή πρόγνωση. Ακολουθεί ο υπότυπος L2 ο οποίος απαντάται στο 15% των περιπτώσεων με κύτταρα περισσότερο διαφοροποιημένα, μεγάλα και ανομοιογενή με ανώμαλο πυρήνα με πυρήνια και αρκετό κυτταρόπλασμα. Τέλος ο υπότυπος L3 στο 1-2% των ασθενών με κύτταρα με μεγάλο ομοιογενή πυρήνα με πυρήνια, βασεοφιλο πρωτόπλασμα, κενοτόπια (κύτταρα Burkitt) (1).

Με βάση την προέλευση των βλαστών η ΟΛΛ ταξινομείται σε αυτή της Β κυτταρικής αρχής με ποσοστό 80-85% της ΟΛΛ, σε αυτή της Τ κυτταρικής αρχής σε ποσοστό 10-15%.

Με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής γίνεται η ταυτοποίηση των αντιγόνων επιφανείας στα λευχαιμικά κύτταρα με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και επομένως η τυποποίηση τους σε Β και Τ κύτταρα καθώς και ο βαθμός διαφοροποίησης τους. Για την πρώιμη προ-Β ΟΛΛ, η οποία εμφανίζεται συνήθως σε παιδιά ηλικίας 1-9 ετών, με χαμηλό αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων οι

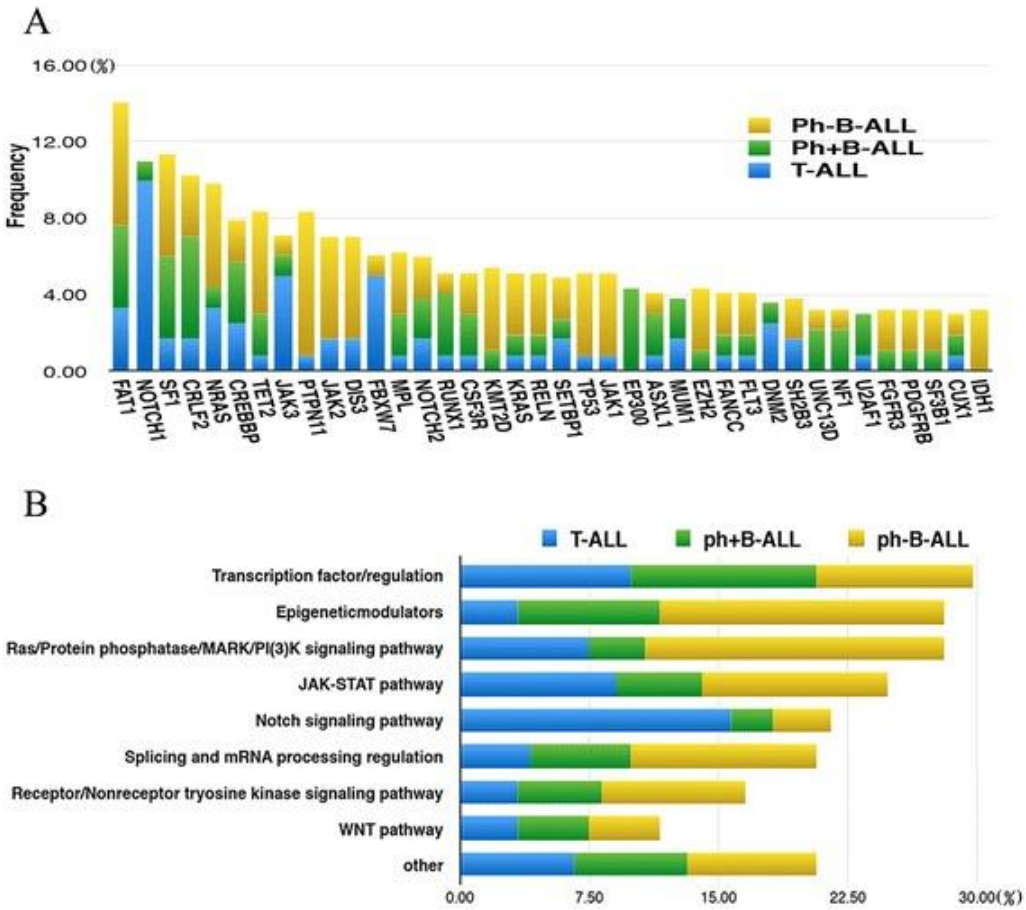
δείκτες οι οποίοι προσκαλούνται στην επιφάνεια είναι οι HLA-DR, CD10 και CD19, για την προ-Β ΟΛΛ, όπου παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, οι HLA-DR, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24 και clg. Για την μεταβατική προ Β ΟΛΛ οι HLA-DR, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, clg και slg είναι οι δείκτες που την χαρακτηρίζουν, για την ώριμη Β ΟΛΛ οι HLA-DR, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24 και slg.

Όσο αφορά την Τ ΟΛΛ, όπου οι ασθενείς εμφανίζουν συχνά αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων, συμμετοχή του θύμου ενώ σε μεγαλύτερο ποσοστό συμμετέχει το κεντρικό νευρικό σύστημα, στην πρώιμη σειρά οι δείκτες είναι CD2, CD5 και CD7, στην ενδιάμεση CD1, CD2, CD5 και CD7, και στην ώριμη CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 και CD8 (5).

Στην ΟΛΛ σε ένα ποσοστό >90% ανιχνεύονται αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και χρωμοσωμικές μεταθέσεις με επακόλουθο την διαταραχή της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στην αιμοποίηση. Όσο αφορά την κυτταρογενετική ταξινόμηση της ΟΛΛ, γίνεται είτε με την βοήθεια καρυότυπου όπου μπορούν να ανιχνευτούν οι αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως οι υπερδιπλοειδίες με ποσοστό 20-30% και οι υποδιπλοειδίες με 1-2%. Η παρουσία υψηλής υπερδιπλοειδίας στο 25% των περιπτώσεων (>50 χρωμοσώματα) έχει καλή πρόγνωση σε σχέση με την υποδιπλοειδία (<45 χρωμοσώματα) που καλύπτει μόλις το 1-2% των περιπτώσεων ΟΛΛ παιδικής ηλικίας και έχει δυσμενή πρόγνωση (6).

Όσο αφορά δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες η μέθοδος του φθορίζοντοε in situ υβριδισμού (Fluorescence In Situ Hybridisation, FISH) είναι εκείνη που χρησιμοποιείται, δίνοντας πληροφορίες για την ύπαρξη μεταθέσεων, συμπεριλαμβανομένων της t(12;21)(p13;q22)-ETV6/RUNX1 η οποία είναι η συχνότερη στη Β σειράς ΟΛΛ, με συχνότητα 22% στην παιδική ηλικία, έχοντας εξαιρετική πρόγνωση, τις αναδιατάξεις 11q23/KMT2A στο 8% των ασθενών, την t(1;19)(q23;p13.3)-TCF3/PBX1 με συχνότητα περίπου στο 5% στην προ-Β ΟΛΛ με δυσμενή πρόγνωση, την t(9;22)(q34;q11.2)-BCR/ABL1 (χρωμόσωμα Philadelphia) το οποίο απαντάται στο 3% των παιδιών με ΟΛΛ (7, 8).

Τέλος η μοριακή ταξινόμηση της ΟΛΛ η οποία τα τελευταία χρόνια μέσω των νέων μεθόδων που χρησιμοποιούνται, προσφέρει επιπρόσθετες πληροφορίες, ώστε να είναι περισσότερο κατανοητή η βιολογία της νόσου και δυνατή η ακριβέστερη διαστρωμάτωση των ασθενών σε ομάδες κινδύνου. Μπορεί να ανιχνεύονται κρυπτικές (μικροελλείψεις, μικροδιπλασιασμοί και αναδιατάξεις) ή υπομικροσκοπικές γενετικές ανωμαλίες, σε γονίδια που έχουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την καταστολή της ογκογένεσης, στην απόπτωση, στην λεμφοποίηση και στη μεταγραφική δραστηριότητα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Συχνότητα γονιδιακών μεταλλάξεων και σχετικών μονοπατιών σε ΟΛΟΥΣ τους υποτύπους Α) Οι 38 συχνότερες μεταλλάξεις Β) Συχνότητα γονιδιακών μεταλλάξεων ανάλογα με το λειτουργικό μονοπάτι στο οποίο εμπλέκονται (9)

Συμπτώματα

Αρχικά τα συμπτώματα της νόσου είναι μη ειδικά, σε αυτά περιλαμβάνονται η διαλείπουσα πυρετική κίνηση, η καταβολή και η ανορεξία. Στην συνέχεια ανάλογα με τον βαθμό διήθησης και την καταστολή του μυελού των οστών, εμφανίζεται ωχρότητα, κόπωση, κεφαλαλγία και δύσπνοια λόγω της μείωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Λόγω της μείωσης των λευκών αιμοσφαιρίων τα παιδιά είναι επιρρεπή σε λοιμώξεις, ενώ εμφανίζουν και εμπύρετη ουδετεροπενία, χωρίς εμφανή αιτιολογία. Από την μείωση των αιμοπεταλίων εμφανίζονται αιμορραγίες, πετέχειες, και εκχυμώσεις. Μπορεί να εκδηλωθούν αρθραλγίες και οστικά άλγη λόγω της έντονης δραστηριότητας του μυελού για την παραγωγή λευχαιμικών κυττάρων, ενώ λόγω των διηθήσεων που πιθανόν υπάρχουν στο ήπαρ, στο σπλήνα και στους λεμφαδένες εμφανίζεται ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία και διόγκωση λεμφαδένων αντίστοιχα. Από την συμμετοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), η συμπτωματολογία είναι έμετοι, κεφαλαλγία έως και σπασμοί σπανιότερα ενώ λόγω της διόγκωσης των λεμφαδένων αλλά και της διήθησης του μεσοθωρακίου εμφανίζεται δύσπνοια και βήχας (10).

1.2. Πρόγνωστικοί παράγοντες

Προγνωστικοί παράγοντες στην ΟΛΛ στα παιδιά και εφήβους είναι η ηλικία, παιδιά ηλικίας 1-9 ετών φαίνεται να έχουν καλύτερη πρόγνωση από τα μεγαλύτερα ή μικρότερα παιδιά, ο αριθμός των λευκών αιμοσφαιρίων στη διάγνωση, με τον αυξημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων να είναι δυσμενής προγνωστικός παράγοντας, καθώς και οι εξωμυελικές εντοπίσεις όπως η συμμετοχή του ΚΝΣ. Προγνωστικοί παράγοντες είναι επίσης ο καρυότυπος, τα κυτταρογενετικά και μοριακά δεδομένα των λεμφοβλαστών, καθώς και ο ρυθμός ανταπόκρισης της νόσου στη θεραπεία, όπως αυτός εκτιμάται με την MRD (minimal residual disease, ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος).

Η επιβίωση των ασθενών σχετίζεται και με μεταθέσεις γονιδίων, με ευνοϊκότερη την t(12;21) που οδηγεί στο υβριδικό γονίδιο TEL-AML1 και απαντάται στο 25% των ασθενών, με ποσοστό επιβίωσης 90% και δυσμενέστερη, την μετάθεση t(9;22), με το υβριδικό γονίδιο BCR-ABL, με συχνότητα 3-5% και επιβίωση <30%. Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί νέες οντότητες όπως η BCR-ABL1 like ΟΛΛ, BCR-ABL1 με ελλείμματα IKZF1 και η ενδοχρωμοσωμική ενίσχυση στο χρωμόσωμα 21 (iAMP21). Πέρα από τις μεταθέσεις προγνωστικοί βιοδείκτες θεωρούνται μεταλλάξεις στα γονίδια PAX5, IKZF1, JAK /2, CRLF2, IL7R, CREBBP, TP53.

1.3. Θεραπεία

Τα τελευταία χρόνια με την εφαρμογή νέων αποτελεσματικών θεραπειών τα ποσοστά επιβίωσης-ίασης των παιδιών με ΟΛΛ ξεπερνά το 85%. Το πόσο εντατική θα είναι η θεραπεία εξαρτάται από το αν η νόσος κατατάσσεται υψηλού, χαμηλού ή ενδιάμεσου κινδύνου. Συνήθως η θεραπεία περιλαμβάνει συμβατική χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, τα τελευταία χρόνια στοχευμένες ή ανοσολογικές θεραπείες, ενώ σε περίπτωσεις υψηλού κινδύνου, ανθεκτική νόσο ή υποτροπές έχει ένδειξη η αλλογενής μεταμόσχευση. Οι φάσεις της χημειοθεραπείας για την ΟΛΛ είναι τρεις. Αρχικά είναι η φάση εφόδου, με διάρκεια τεσσάρων έως οκτώ εβδομάδων. Στην φάση αυτή ο σκοπός είναι να καταστραφούν τα λευχαιμικά κύτταρα τόσο από τον μυελό των οστών όσο και από το περιφερικό αίμα, ενώ συγχρόνως αντικαθίστανται από φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι κορτικοστεροειδή, βινκριστίνη και ασπαραγινάση ενώ σε περιπτώσεις που η νόσος θεωρείται υψηλού κινδύνου μπορεί να χρησιμοποιηθούν και οι ανθρακυκλίνες. Στην φάση αυτή γίνονται ενδορραχιαίες εγχύσεις με κυτταροστατικά φάρμακα (μεθοτρεξάτη) προκειμένου να μην εγκατασταθούν βλάστες στο ΚΝΣ (11).

Η δεύτερη φάση είναι η θεραπεία εδραίωσης ή ενίσχυσης της ύφεσης η οποία έχει διάρκεια περίπου 6-9 μήνες. Η φάση αυτή έχει σαν στόχο την πλήρη

ύφεση της νόσου καθώς στοχεύει στον αφανισμό της υπομικροσκοπικής υπολειπόμενης νόσου. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην φάση αυτή είναι η μεθοτρεξάτη, η 6-μερκατπουρίνη, κυκλοφωσφαμίδη, η ετοποσίδη, η αραβινοσίδη της κυτοσίνης κ.α.

Τέλος ακολουθεί η τρίτη φάση που είναι εκείνη της διατήρησης της ύφεσης η οποία είναι ήπια από του στόματος θεραπεία με διάρκεια 2 ετών.

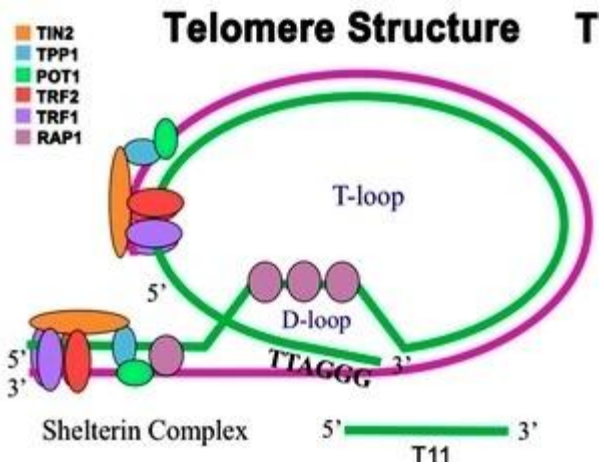
Σε περίπτωση που η νόσος υποτροπιάσει ή που δεν υπάρξει ανταπόκριση στην θεραπεία γίνεται χρήση άλλου πρωτοκόλλου με διαφορετικά κυτταροστατικά φάρμακα ενώ υπάρχει και η δυνατότητα της αλλογενούς μεταμόσχευσης, με την εύρεση συμβατού δότη. Συνήθως η πιθανότητα συμβατότητας ανάμεσα στα αδέρφια είναι 30%, ενώ πλέον σε περίπτωση που δεν βρεθεί συμβατός μη συγγενής δότης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και απλοταυτόσημος που είναι συνήθως ο γονέας μετά από κατάλληλη επεξεργασία του μοσχεύματος.

1.4. Τελομερή

Με τον όρο τελομερή εννοούμε τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 5’ TTAGGG3’ στο τέλος των γραμμικών χρωμοσωμάτων των ευκαρυωτικών κυττάρων, που έχουν σαν σκοπό να διαφυλάξουν την γενετική πληροφορία, διατηρώντας την ακεραιότητα των χρωμοσωμάτων, προστατεύοντας τα από την αποικοδόμηση, τον ανασυνδυασμό ή την σύντηξη. Οι αλληλουχίες αυτές είναι αρχικά δίκλωνες ενώ όσο απομακρύνονται από το κεντρομερίδιο καταλήγουν σε μονόκλωνο DNA. Ο λόγος είναι ότι κατά την κάθε κυτταρική διαίρεση, στην ασυνεχή αλυσίδα του DNA στο 5’ άκρο του νεοσυντιθέμενου κλώνου η DNA πολυμεράση δεν είναι δυνατόν μετά την απομάκρυνση του πρωταρχικού τμήματος να συνθέσει την συμπληρωματική αλληλουχία με αποτέλεσμα το τμήμα του DNA στο σημείο εκείνο να μένει μονόκλωνο. Επομένως σε κάθε αντιγραφή έχουμε ένα 3’ ελεύθερο άκρο σε κάθε χρωμόσωμα το οποίο είναι μονόκλωνο, ενώ ένα μέρος του 5’ άκρου χάνεται με αποτέλεσμα την μείωση του μήκους του τελομερικού άκρου (12).

Για να μπορούν τα τελομερή να προστατεύσουν την γενετική πληροφορία θα πρέπει να μην είναι αναγνωρίσιμα από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου ως δίκλωνα θραύσματα DNA, κάτι που επιτυγχάνεται με την βοήθεια ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου, της σελτερίνης (Shelterin complex). Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από έξι πρωτεΐνες τις TRF1 (Telomeric Repeat Factor 1), TRF2 (Telomeric Repeat Factor 2), POT1 (Protection Of Telomeres Homolog 1), TIN2 (TERF1-Interacting Nuclear Factor 1), TPP1 (Tripeptidyl Peptidase 1), και RAP1 (Repressor Activator Protein 1). Οι πρωτεΐνες TRF1 και TRF2 αναγνωρίζουν την αλληλουχία 5' TTAGGG3' στο δίκλωνο άκρο των χρωμοσωμάτων και η POT1 την περιοχή στο 3 ' μονόκλωνο άκρο της αλληλουχίας. Οι TRF1 και TRF2 αλληλεπιδρούν με τις TIN2 και Rap1 ενώ μέσω της TIN2 προσδένονται και οι TPP1 και την POT1 (13). Η πρόσδεση αυτή της σελτερίνης στα τελομερικά άκρα είναι ο λόγος που καθιστά τα μονόκλωνα άκρα μη αναγνωρίσιμα ως θραύσματα από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, αποφεύγοντας το κύτταρο έτσι να πάει σε απόπτωση.

Πιο συγκεκριμένα, το μονόκλωνο DNA, προκειμένου να προστατευτεί από την δράση τόσο των εξωνουκλεασών οι οποίες και θα το αποικοδομούσαν όσο και των υπόλοιπων ενζύμων που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA, με αποτέλεσμα την συνεχή δράση των μηχανισμών επιδιόρθωσης, εισχωρεί στην διπλή έλικα σχηματίζοντας τον βρόγχο t (t- loop), με την βοήθεια του συμπλόκου της σελτερίνης. Με βάση την συμπληρωματικότητα των βάσεων δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του μονόκλωνου άκρου πλούσιου σε G και του συμπληρωματικού κλώνου του δίκλωνου DNA, προκαλείται τοπική εκτόπιση της συμπληρωματικής αλυσίδας του κλώνου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του βρόγχου D (14) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Απεικόνιση των βρόγχων που σχηματίζονται προκειμένου να προφυλαχθεί το μονόκλωνο τμήμα DNA από την αποικοδόμηση και από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης (https://www.καρδιολογοσπισσαριδησκ.gr/2019/08/05/%CF%84%CE%B1-%CF%84%CE%B5%CE%BB%CE%BF%CE%BC%CE%B5%CF%81%CE%B7-%CE%BA%CE%B1%CE%B9-%CE%B7-%CF%84%CE%B5%CE%BB%CE%BF%CE%BC%CE%B5%CF%81%CE%B1%CF%83%CE%B7/).

Μήκος τελομερών

Το μήκος των τελομερών είναι καθοριστικό για την κυτταρική λειτουργία. Έχει βρεθεί ότι το μήκος τους στα σωματικά κύτταρα υγιών ατόμων κυμαίνεται από 9 – 15 Kb, μήκος το οποίο εξαρτάται από την ηλικία, τον τύπο του κυττάρου καθώς και από την κατάσταση της υγείας του ατόμου και τις συνήθειες του (15). Η μείωση αυτή πραγματοποιείται σε κάθε κυτταρική διαίρεση έως ότου μετά από 50-60 κυτταρικές διαιρέσεις φτάσει στο όριο Hayflick στο οποίο ενεργοποιούνται οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA οδηγώντας στην κυτταρική γήρανση και στην απόπτωση. Έχει βρεθεί ότι η γήρανση αυτή μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα μεταλλάξεις που προσδίδουν κέρδος λειτουργίας (gain of function), με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και τελικά να δημιουργούνται υπερπλασίες. Το αν τελικά το κύτταρο μετατραπεί σε καρκινικό ελέγχεται από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, π.χ. το γονίδιο της p53, η οποία δρα σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο και οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση, σε περίπτωση όπου τα ογκοκατασταλτικά δεν λειτουργήσουν συσσώρευση μεταλλάξεων θα οδηγήσει στην ογκογένεση. Ένα νεοπλασματικό κύτταρο όμως θεωρητικά θα έπρεπε να έχει

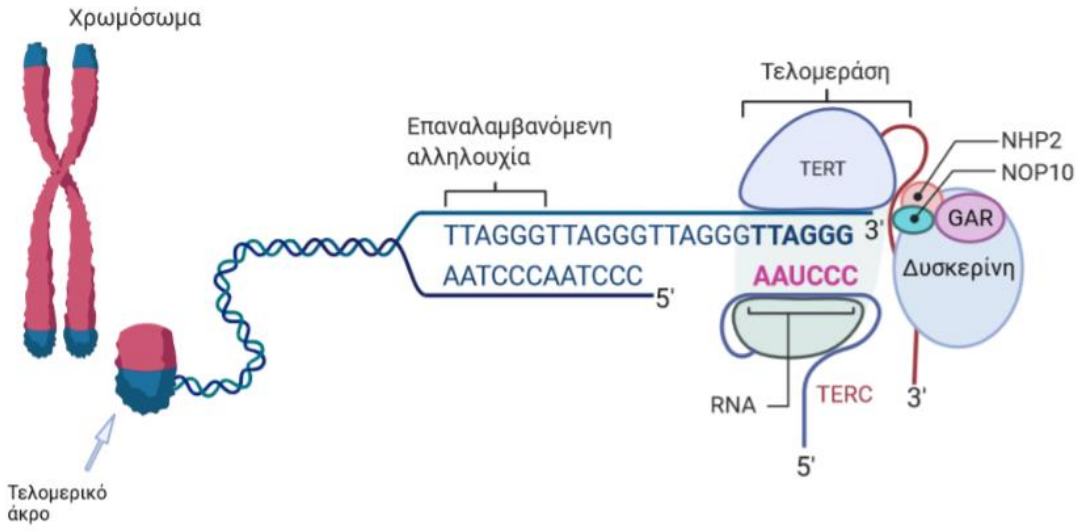
οδηγηθεί σε απόπτωση, αν από τις συνεχόμενες κυτταρικές διαιρέσεις δεν μπορούσε να διατηρήσει το μήκος του, κάτι όμως που δεν συμβαίνει καθώς έχει αναπτύξει μηχανισμούς για την επιμήκυνση του μήκους των τελομερών και την διατήρηση τους.

Μηχανισμοί επιμήκυνσης των τελομερικών άκρων

Τελομεράση

Η αναστολή της μείωσης των τελομερικών άκρων επιτυγχάνεται στο 85% των νεοπλασματικών κυττάρων από το ένζυμο της τελομεράσης, μιας ριβονουκλεοπρωτεΐνης με ενζυμική ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης, έχοντας την ικανότητα χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το RNA να τοποθετεί συμπληρωματικά δεοξυριβονουκλεοτίδια συνθέτοντας DNA. Η τελομεράση αποτελείται από δύο υπομονάδες, εκείνη της hTERC, μίας ριβονουκλεοπρωτεϊνικής αλληλουχίας, η οποία λειτουργεί σαν καλούπι για την σύνθεση του τελομερικού DNA και μια καταλυτική υπομονάδα αντίστροφης μεταγραφάσης την TERT η οποία προσθέτει τα συμπληρωματικά δεοξυριβονουκλεοτίδια στα μονόκλωνα τελομερικά άκρα, καθώς και από δυσκερίνη, ρεπτίνη, ποντίνη και άλλες ριβονουκλεοπρωτεΐνες όπως είναι η GAR1, NHP2 και η NOP10 (16).

Ο μηχανισμός δράσης της τελομεράσης ξεκινάει με την πρόσδεση της αλληλουχίας hTERC, σε μία αλληλουχία τριών νουκλεοτιδίων στο 3΄άκρο και στην συνέχεια ακολουθεί η επιμήκυνση του τμήματος των τελομερικών άκρων με την βοήθεια της τελομεράσης όπου συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα τοποθετεί δεοξυριβονουκλεοτίδια μέσω της υπομονάδας hTERC, σχηματίζοντας ένα υβριδικό μόριο DNA-RNA, το οποίο αποδεσμεύεται από την υπομονάδα χωρίς όμως να απομακρύνεται από το ένζυμο της τελομεράσης (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της επιμήκυνσης των τελομερικών άκρων με την βοήθεια του ενζύμου της τελομεράσης.

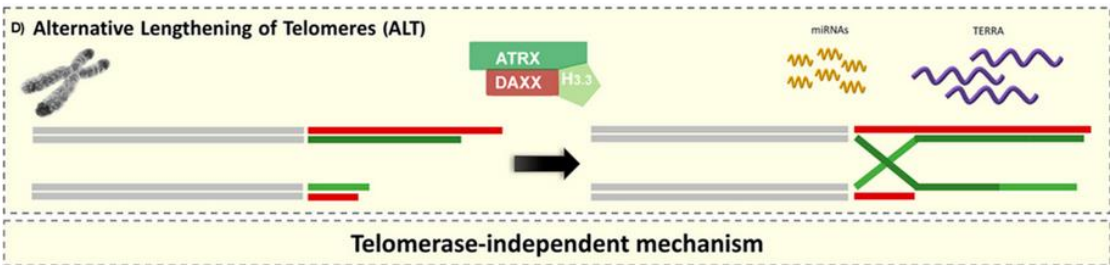
Αφού η υπομονάδα hTERT ολοκληρώσει την διαδικασία της επιμήκυνσης του τελομερούς, απελευθερώνει το μονόκλωνο DNA, το οποία θα μετατραπεί σε δίκλωνο με την βοήθεια του ενζύμου της DNA πολυμεράσης (17).

Εναλλακτική επιμήκυνση τελομερικών άκρων

Πέρα από την δράση της τελομεράσης για την επιμήκυνση των τελομερών, ένα μικρό ποσοστό νεοπλασιών, περίπου το 15%, φαίνεται να χρησιμοποιεί έναν εναλλακτικό μηχανισμό επιμήκυνσης τελομερών (ALT: Alternative Telomere Lengthening), μέσω του ομόλογου ανασυνδιασμού, δίνοντας τελομερή με μεγάλη ετερογένεια ως προς το μήκος τους, κατά μέσο όρο ~20 kb (<2kb μέχρι >50 kb). Τα κύτταρα αυτά που δεν ενεργοποιούν την τελομεράση, αλλά τον μηχανισμό ALT, εμφανίζουν μεγαλύτερη χρωμοσωμική αστάθεια από ότι τα κύτταρα που φέρουν ενεργή τελομεράση, ενώ παράλληλα παρατηρείται μεγάλη συγκέντρωση εξωχρωμοσωμικού τελομερικού DNA στον πυρήνα. Το κυκλικό εξωχρωμοσωμικό τελομερικό DNA μπορεί να είναι δίκλωνο κυκλικό όπου σχηματίζει τα t-circles, μερικώς μονόκλονο πλούσιο σε κυτοσίνες C-circles, ή συμπλόκων τα οποία έχουν υψηλό μοριακό βάρος σχηματίζοντας t - complex ή εξωχρωμοσωμικές τελομερικές

επαναλήψεις (ECTRs) (18). Όλες αυτές οι παραλλαγές μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένα ποσοστά ανταλλαγής τελομερών ανάμεσα στις αδελφές χρωματίδες, σε μεταλλάξεις των γονιδίων ATRX, DAXX και SMARCAL1, καθώς και σε υψηλά επίπεδα του μη κωδικοποιού τελομερικού RNA μεταγράφου, TERRA. Χαρακτηριστικό του ALT αποτελούν και τα υψηλά επίπεδα χρωμοσωμικής αστάθειας, ο ανασυνδιασμός των τελομερών ανάμεσα στις αδελφές χρωματίδες και η παρουσία σφαιρικών πυρηνικών δομών πλούσιων σε πρωτεΐνη PML τα APBs (ALT-associated Promyelocytic Leukemia body protein bodies) (19). Τα σωματίδια APBs είναι πλούσια σε τελομερικό DNA, πρωτεΐνες της σελτερίνης ενώ εμπλέκονται και στον ομόλογο ανασυνδιασμό των χρωμοσωμάτων. Στα σωμάτια αυτά δεσμεύονται τα τελομερικά άκρα και αποδεσμεύονται με αποτέλεσμα την συνεχή επιμήκυνση τους.

Η επιμήκυνση του μήκους των τελομερών μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι με την άνιση ανταλλαγή των αδελφών χρωματίδων με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός θυγατρικού κυττάρου το οποίο θα φέρει εξαιρετικά μακριά τελομερή με αποτέλεσμα να έχει και αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα και ένα με πολύ μικρότερα τελομερικά άκρα και χαμηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα. Ο δεύτερος τρόπος είναι μέσω της σύνθεσης ενός νέου τελομερούς χρησιμοποιώντας ως καλούπι ένα ήδη υπάρχον τελομερές από άλλο χρωμόσωμα (20)(Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Απεικόνιση του μηχανισμού της εναλλακτικής επιμήκυνσης των τελομερικών άκρων (20)

Τελομερή και Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία

Ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα της ΟΛΛ και οι γενετικές αλλοιώσεις που οδηγούν τον κλωνικό πολλαπλασιασμό έχουν αναγνωριστεί ως προγνωστικοί παράγοντες. Έχει βρεθεί σε ασθενείς με ΟΛΛ ότι το μήκος των τελομερικών άκρων είναι πιο κοντό από εκείνο του γενικού πληθυσμού γεγονός που φαίνεται να σχετίζεται με την παθογένεση της νόσου. Παράλληλα η ενεργότητα της τελομεράσης είναι σημαντικά υψηλότερη σε ασθενείς υψηλού κινδύνου από εκείνους ενδιάμεσου ή χαμηλού κινδύνου. Κατά την διάρκεια της χημειοθεραπείας το μήκος των τελομερών παρουσιάζει μια αυξητική τάση ενώ λίγο μετά την ολοκλήρωση της λήξης της αρχίζει να μειώνεται (21).

Όσο αφορά την σύγκριση του μήκους των τελομερών ασθενών με ΟΛΛ με βάση το χρονικό διάστημα από την διάγνωση μέχρι την ύφεση καθώς και από την ύπαρξη ή όχι υποτροπών, φαίνεται το μικρότερο μήκος τελομερών να απαντάται στα κύτταρα αίματος ασθενών που υποτροπίασαν, ακολουθούν οι ασθενείς την στιγμή της διάγνωσης με σημαντικά μικρότερο μήκος τελομερών από τον γενικό πληθυσμό, ενώ τα μήκη σε ασθενείς με πλήρη ύφεση φαίνεται να είναι όμοια με τον υγιή πληθυσμό (22). Σε μεταγενέστερη μελέτη βρέθηκε ότι σε παιδιατρικούς ασθενείς με ΟΛΛ την στιγμή της διάγνωσης το μήκος των τελομερών είναι μικρότερο από την 50η θέση των υγειών παιδιών, ενώ τονίστηκε ότι το μήκος των τελομερών δεν σχετίζεται με την διαστρωμάτωση του κινδύνου, ενώ επιβεβαίωσε ότι η ενεργότητα της τελομεράσης είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε ασθενείς υψηλού κινδύνου (23). Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι ασθενείς με μικρό μήκος τελομερών είχαν καλύτερη απόκριση στην θεραπεία με imetelstat, συμπληρώνοντας την θεραπεία με bortezomib σε ασθενείς με υψηλού κινδύνου ΟΛΛ, καταλήγοντας ότι ο προσδιορισμός των τελομερικών άκρων αλλά και η ενεργότητα της τελομεράσης θα μπορούσαν να ενταχθούν στις εξετάσεις ρουτίνας των παιδιατρικών ασθενών με ΟΛΛ.

1.5. Σκοπός της μελέτης

Ποσοστό από 2 έως 3% των παιδιατρικών ασθενών με ΟΛΛ εμφανίζουν νόσο ανθεκτική στην χημειοθεραπεία ενώ το 10-15% εμφανίζει τουλάχιστον μία υποτροπή, παρά την επιτυχημένη αρχικά θεραπεία, μειώνοντας τα ποσοστά δεύτερης ύφεσης καθώς και την συνολική επιβίωση. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι να διαπιστωθεί ο βαθμός κυτταρικής γήρανσης σε παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες με ΟΛΛ αλλά επίσης να διερευνηθεί αν η γήρανση αυτή είναι αναστρέψιμη μετά το πέρας της θεραπείας. Παράλληλα μέσω της συσχέτισης του μήκους των τελομερών με την πορεία της νόσου θα ληφθούν πληροφορίες για το αν θα μπορούσε το μήκος των τελομερών να αποτελέσει βιοδείκτη για τον προσδιορισμό της βαρύτητας της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία, την ύπαρξη τυχόν υποτροπών και τελικά με την επιβίωση των ασθενών.

2. Πειραματικό μέρος

2.1. Πληθυσμός μελέτης

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία επιλέχθηκαν ασθενείς με ΟΛΛ οι οποίοι νοσηλεύτηκαν κατά το χρονικό διάστημα 1/1/2010 έως 31/12/2020, στην Κλινική Αιματολογίας και Ογκολογίας Παίδων του ΠΑΓΝΗ. Από 35 παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες ηλικίας από 1,5 έως 18 ετών, έχουν συλλεχθεί δείγματα μυελού των οστών προκειμένου να γίνει η διάγνωση την νόσου και να προσδιοριστούν στην συνέχεια τα μοριακά χαρακτηριστικά και ο καρυότυπος των νεοπλασματικών κυττάρων, όπως επίσης και σε επόμενες φάσεις θεραπείας για την τεκμηρίωση της ανταπόκρισης στη θεραπεία, την επίτευξη ύφεσης και τον προσδιορισμό της MRD. Περίσσεια βιολογικού υλικού λεμφοβλαστών/ λεμφοκυττάρων από τις φάσεις αυτές που είχε φυλαχθεί με την συναίνεση των γονιών, χρησιμοποιήθηκε για της ανάγκες της παρούσας μελέτης.

Στη μελέτη συμμετείχαν 35 παιδιά και έφηβοι (13 κορίτσια και 22 αγόρια), τα 31 είχαν Β-ΟΛΛ και 4 Τ-ΟΛΛ. Από τις πιο συχνές ανωμαλίες ήταν στο υβριδικό γονίδιο TEL-AML1, στους 7 από τους 35 συμμετέχοντες (20%), ενώ 7 συμμετέχοντες είχαν έλλειμμα των γονιδίων καταστολής όγκων CDKN2A- CDKN2B (20%) και ένας είχε έλλειμμα μόνο στο CDKN2A (2.85%), τέλος 5 από τους 35 συμμετέχοντες παρουσίασαν έλλειμμα στο PAX5 (14.28%).

Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν για καθαρά διαγνωστικούς σκοπούς και καμία επιπλέον ιατρική παρέμβαση δεν έγινε στους ασθενείς για την πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Έχουν δοθεί όλα τα απαραίτητα ενημερωτικά έντυπα στους συμμετέχοντες ή/και στους κηδεμόνες τους και έχει ληφθεί η ενυπόγραφη συγκατάθεση τους. Η παρούσα μελέτη έχει λάβει έγκριση από το επιστημονικό συμβούλιο του ΠΑΓΝΗ με αρ. πρωτ. Δ.Σ. 17203/1-12-2021 και αρ. πρωτ. του Επιστημονικού Συμβουλίου 1121/32/22-12-2021 για την διεξαγωγή της.

2.2. Απομόνωση DNA

Δείγματα μυελού των οστών συλλέχθηκαν από 35 παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διάγνωση της ΟΛΛ. Μετά το πέρας της θεραπείας πραγματοποιήθηκε επαναληπτική δειγματοληψία ώστε να επιβεβαιωθεί η ύφεση της νόσου. Όλα τα δείγματα μετά την συλλογή και την επεξεργασία τους, αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την στιγμή της ανάλυσης τους.

Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση του QIAamp DNA Mini kit (Quiagene, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, σε 5x10^{6} λεμφοβλάστες/λεμφοκύτταρα τα οποία ήταν διαλυμένα σε 200μl PBS, προστέθηκαν 20 μl Proteinase K και 200 μl Buffer AL. Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος για 15 sec και θέρμανση στους 56°C για 10min, 200 μl αιθανόλης προστέθηκαν στο διάλυμα και στην συνέχεια το σύνολο του μεταφέρθηκε σε QIAamp Mini spin column όπου και φυγοκεντρήθηκε για ένα λεπτό στις 8000 rpm. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη 500 μl Buffer AW1 και φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 8000 rpm. Ακολουθεί προσθήκη 500 μl Buffer AW2 και φυγοκέντρηση τριών λεπτών στις 12000 rpm ενώ αφού μεταφερθεί το QIAamp Mini spin σε Eppendorf 1.5 ml, γίνεται προσθήκη 50 μl AE με φυγοκέντρηση ενός λεπτού στις 8000 rpm προκειμένου να γίνει η έκλουση του DNA.

Μετά το πέρας της εκχύλισης έγινε έλεγχος για την καθαρότητα του DNA και προσδιορισμός της συγκέντρωσης του με φωτομέτρηση σε φωτόμετρο (Nanodrop ND1000, USA) στα 260nm και 280nm. Συγκεκριμένα, η ποσότητα του DNA προσδιορίζεται στα 260nm με μονάδες μέτρησης ng/μL, ενώ προκειμένου να βρεθεί η καθαρότητα του DNA υπολογίστηκε ο λόγος A260nm/A280nm, ο οποίος ήταν περίπου στο 1,8 τιμή η οποία είναι χαρακτηριστική στα διαλύματα καθαρού DNA. Στην συνέχεια όλα τα δείγματα DNA φυλάχθηκαν στους -20°C για 24 ώρες οπότε και αναλύθηκαν.

2.3. Quantitative PCR (Q-PCR)

Ο προσδιορισμός του μέσου μήκους των τελομερικών άκρων πραγματοποιήθηκε με την χρήση του Absolute Human Telomere Length

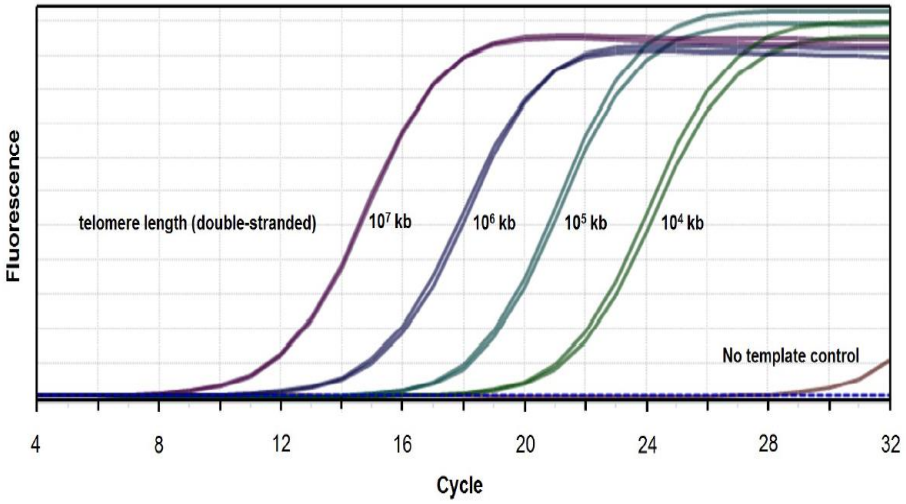
Quantification qPCR Assay Kit (ScienCell, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Δεδομένου ότι σύμφωνα με τις οδηγίες η ανώτατη ποσότητα DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι τα 5ng, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις στα υπό εξέταση δείγματα, ώστε η περιεκτικότητα των τελικών δειγμάτων να είναι 5ng/μl.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο σετ εκκινητών, οι οποίοι και περιέχονται στο κιτ, σε δύο χωριστές αντιδράσεις. Το ένα σετ αναγνωρίζει και ενισχύει την περιοχή των τελομερικών άκρων, ενώ το δεύτερο αναγνωρίζει και ενισχύει μια περιοχή 100bp στο 17^{ο} χρωμόσωμα και χρησιμοποιείται ως αναφορά για την κανονικοποίηση των δεδομένων. Και τα δύο σετ εκκινητών είναι σχεδιασμένα με σκοπό να εξασφαλίζουν αξιόπιστη ποσοτικοποίηση και ειδική ενίσχυση των επιλεγμένων περιοχών. Η χρωστική η οποία χρησιμοποιείται είναι η SYBR®Green, η οποία και περιλαμβάνεται στο κιτ.

Για τον κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο χωριστές αντιδράσεις οι οποίες και ενισχυθήκαν συγχρόνως προκειμένου να διασφαλιστούν οι ίδιες συνθήκες προετοιμασίας των δειγμάτων αλλά και ανάλυσης στο μηχάνημα της RT-qPCR Agilent Technologies Stratagene Mx 3005P (Stratagene, USA). Για το μείγμα της αλυσιδωτής αντίδρασης, σε τελικό όγκο 20μl, προστέθηκαν 2μl από το ζεύγος των εκκινητών (Telomere set για την μέτρηση των τελομερών ή SCR για την μέτρηση της περιοχής του 17^{ου} χρωμοσώματος γνωστού μήκους), 10μl 2x GoldNstart TaqGreen qPCR master mix το οποίο περιλαμβάνει SYBR®Green ως χρωστική, νουκλεοτίδια (dNTPs) και Taq DNA πολυμεράση, 7 μl Nuclease free H_2O και ποσότητα 5ng DNA (1μl).

Η συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της Q-PCR είναι αρχική θερμική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά, ακολούθησαν 32 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C για 20 δευτερόλεπτα, υβριδοποίηση των εκκινητών στους 52°C για 20 δευτερόλεπτα και επιμήκυνση στους 72°C διάρκειας 45 δευτερολέπτων.

Χρησιμοποιώντας τις καμπύλες βαθμονόμησης της αντίδρασης, για τον υπολογισμό του μέσου μήκους των τελομερών χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Καμπύλες βαθμονόμησης της qPCR για την μέτρηση του μήκους των τελομερικών άκρων

ΔCq (TEL) = Cq (TEL δείγματος) - Cq (TEL θετικού μάρτυρα)

ΔCq (SCR) = Cq (SCR δείγματος) - Cq (SCR θετικού μάρτυρα)

Όπου Cq ο κύκλος ποσοτικοποίησης

Σχετικό μήκος τελομερών του δείγματος σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα = $2^{-\Delta\Delta Cq}$

Συνολικό μήκος τελομερών του δείγματος στο διπλοειδές κύτταρο = Μήκος τελομερούς του δείγματος αναφοράς x $2^{-\Delta\Delta Cq}$

Μέσο μήκος τελομερών σε καθένα άκρο χρωμοσώματος = Συνολικό μήκος τελομερών / 92

2.4. Στατιστική ανάλυση

Ο μέσος όρος, η τυπική απόκλισης αλλά και η διάμεσος χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των συνεχών μεταβλητών όπως η ηλικία, η ηλικία εμφάνισης της νόσου, το μήκος των τελομερικών άκρων κ.α. Η συχνότητα και η % συχνότητα χρησιμοποιήθηκε για τις κατηγορικές μεταβλητές όπως φύλο, καρυότυπος κ.α.

Οι διαφορές μεταξύ τους τελομερικού μήκους ανάμεσα σε δύο ομάδες (π.χ. είδος λευχαιμίας) ελέγχθηκαν με το t-test ανεξαρτήτων δειγμάτων, ενώ για διαφορές σε άνω των δύο ομάδων με τον έλεγχο διακύμανσης κατά ένα παράγοντα one-way ANOVA (π.χ. ηλικιακή ομάδα). Η διαφορά μεταξύ των τελομερικών μηκών κατά την έναρξη και κατά την ύφεση ελέγχθηκε με τη μέθοδο t-test ζευγαρωτών δειγμάτων. Για την μεταβολή του τελομερικού μήκους ως προς τα γενετικά χαρακτηριστικά (καρυότυπο, χρωμοσώματα, μέγεθος κινδύνου) εφαρμόστηκε μια ANOVA repeated measures. Χρησιμοποιήθηκαν θηκογράμματα (Box and Whisker plots), διαγράμματα στηλών (bar charts) και διαγράμματα διασποράς (scatterplots).

Η συλλογή των δεδομένων και η στατιστική ανάλυση έγινε τόσο στο υπολογιστικό φύλλο Microsoft EXCEL 365, όσο και στο στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 24.0. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε το p=0,05

3. Αποτελέσματα

3.1. Δημογραφικά στοιχεία των ασθενών

Η στατιστική ανάλυση αφορά ένα σύνολο 35 παιδιών, εφήβων και νεαρών ενηλίκων που διαγνώστηκαν κατά το χρονικό διάστημα 1/1/2010 έως 31/12/2020 με ΟΛΛ. Από καθένα από τους ασθενείς ελήφθησαν δύο δείγματα, το πρώτο από αυτά ελήφθη κατά τη διάγνωση της ασθένειας, ενώ το δεύτερο κατά την πλήρη ύφεση της. Από το σύνολο των δειγμάτων το 62.9% (n=22) ήταν αγόρια και το υπόλοιπο 37.1% (n=13) κορίτσια.

Όσο αφορά τις ηλικιακές ομάδες η νόσος είναι συχνότερη στην ηλικία των 1-9.9 ετών με 80 % (n=28). Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε ηλικία μικρότερη του ενός έτους, ενώ το 20% (n=7) των ασθενών είχαν ηλικία >10 ετών κατά την διάγνωση. Η μέση ηλικία των συμμετεχόντων είναι 6,4 ± 4,1 (1,7-18,0). Η τωρινή ηλικία των παιδιών την στιγμή της στατιστικής ανάλυσης (βάση ο Δεκέμβριος 2021) ήταν 11,8 ± 3,5 έτη (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κατανομή των δειγμάτων ανά φύλο και ηλικία νόσησης, καθώς και η μέση ηλικία και η παρούσα ηλικία των ασθενών.

		N	%
Φύλο	**Αγόρι**	22	62,9%
	Κορίτσι	13	37,1%
Ηλικιακή Ομάδα	**<1**	0	0 %
	1-9.9	28	80%
	>10	7	20%
	Μέσος Όρος ± Τυπική Απόκλιση		**Ελάχιστη – Μέγιστη Ηλικία**
Ηλικία εμφάνισης νόσου (έτη)	6.4 ± 4.1		1.7 - 18.0
Παρούσα Ηλικία (έτη)	11.8 ± 3.5		5.8 - 19.3

3.2. Κατηγοριοποίηση ασθενών ως προς το είδος της ΟΛΛ

Με βάση τον ανοσοφαινότυπο πληροφορίες υπάρχουν για τα 31 από τα 35 δείγματα (88.6%). Το 88.6% (n=31) αφορούσε Β-σειράς ΟΛΛ η οποία είναι και η συχνότερη στην παιδική ηλικία, ενώ μόλις το 11.4% (n=4) αφορούσε Τ- ΟΛΛ. Από τους ασθενής που εμφάνισαν Β-σειράς ΟΛΛ, πρώιμη προ-Β ΟΛΛ είχαν το 29.6% (n=8) των συμμετεχόντων, προ-Β ΟΛΛ το 14.8% (n=4) και το υπόλοιπο 55.6% (n=15) είχαν κοινή Β ΟΛΛ. Από τα άτομα που εμφάνισαν Τ- ΟΛΛ το 25% είχε προ-Τ ΟΛΛ (n=1) και το υπόλοιπο 75% είχε Φλοιώδης Τ-ΟΛΛ (ώριμη Τ-ΟΛΛ) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Κατανομή των δειγμάτων ανά κατηγορία ΟΛΛ

		n	%
Κατηγορία ΟΛΛ (λεμφοκύτταρα)	**Β-ALL**	31	88.6%
	Τ-ALL	4	11.4%
Κατηγορία Β-ΟΛΛ	**Πρώιμη προ-Β ΟΛΛ**	8	29.6%
	Προ-Β ΟΛΛ	4	14.8%
	Κοινή	15	55.6%
Κατηγορία Τ-ΟΛΛ	**Προ-Τ ΟΛΛ**	1	25%
	Φλοιώδης (ώριμη) Τ-ΟΛΛ	3	75%

3.3. Κατηγοριοποίηση ασθενών βάση την κατηγορία κινδύνου, τον καρυότυπο και τις υποτροπές

Από τους ασθενείς το 34.3% (n=12) χαρακτηρίστηκαν με βάση τα χαρακτηριστικά της νεοπλασίας ως υψηλού κινδύνου, ενώ το υπόλοιπο 65.7%

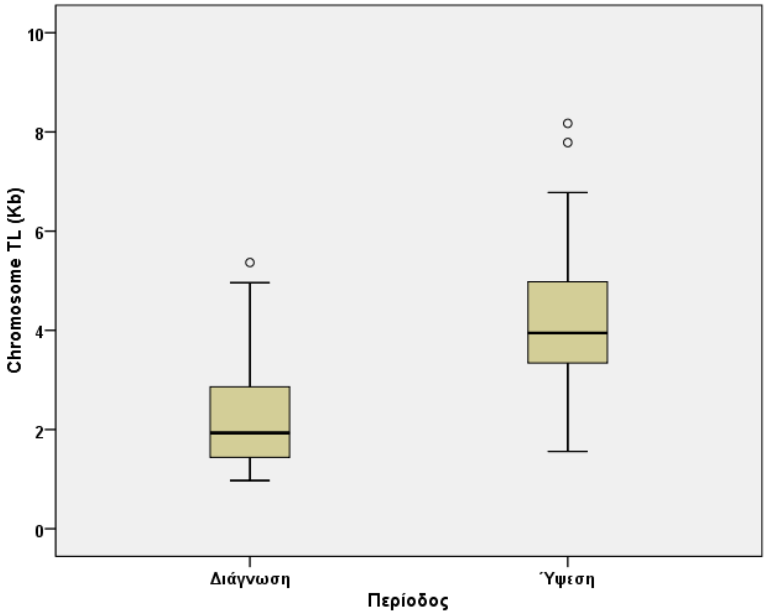
(n=23) χαρακτηρίστηκε ως ενδιάμεσου κινδύνου. Ένας (2.9%) εκ των ασθενών παρουσίασε υποτροπή της νόσου και όλοι οι ασθενείς (100%) την στιγμή που γράφεται η παρούσα εργασία είναι εν ζωή. Όσο αφορά τον καρυότυπο των ασθενών δεδομένα υπάρχουν για τους 33 ασθενείς. Από αυτούς το 63.6% (n=21) είχαν καρυότυπο με 46 χρωμοσώματα, και το υπόλοιπο 36.4% (n=12) είχαν καρυότυπο με περισσότερα από 46 χρωμοσώματα.

Πίνακας 3. Κατάταξη ασθενών με βάση την κατηγορία κινδύνου, οι υποτροπές και ο καρυότυπος τους κατά την διάγνωση.

		n	%
Κατηγορία κινδύνου	**Υψηλού κινδύνου**	12	34,3%
	Ενδιάμεσου κινδύνου	23	65,7%
Υποτροπή	**N**	34	97,1%
	Y	1	2,9%
Καρυότυπος	**46 CHR**	21	63.6%
	46+ CHR	12	36.4%

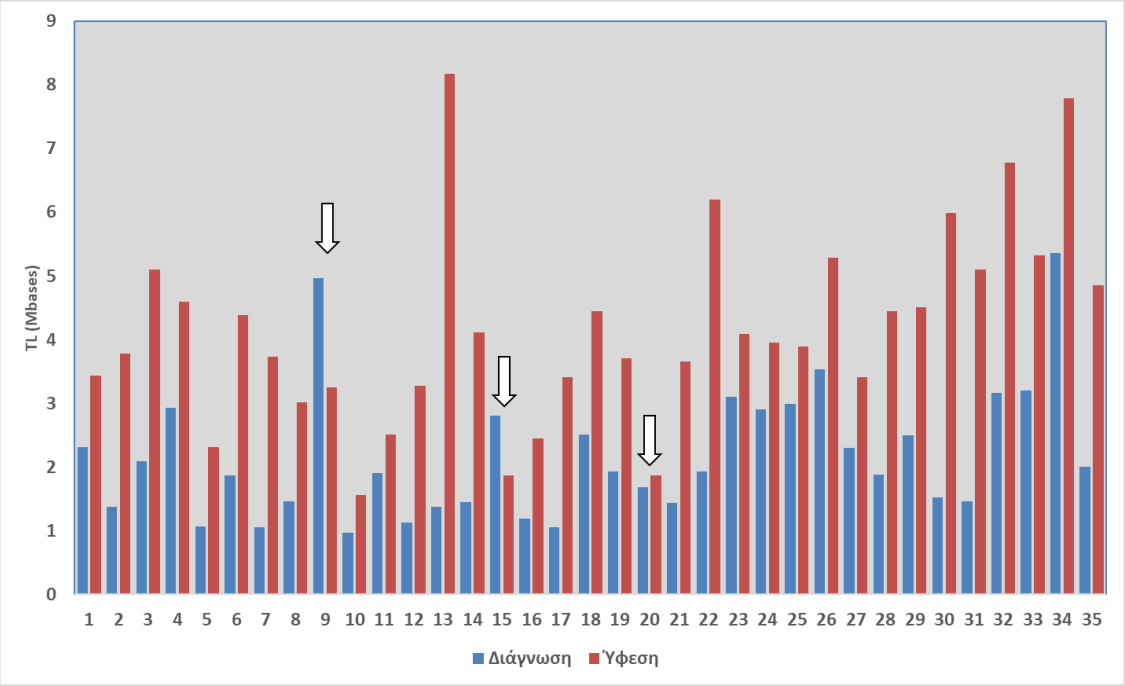
3.4. Κατανομή του μήκους των τελομερικών άκρων των ασθενών, συνολικά και ανά ασθενή

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζεται με τη μορφή θηκογραμμάτων η κατανομή του τελομερικού μήκους των ασθενών κατά τη διάγνωση και κατά την επίτευξη της ύφεσης. Ο μέσος όρος του μήκους των τελομερών ήταν 2,18±1,04 (διάμεσος 1,93) ενώ κατά τη διάρκεια της ύφεσης ο μέσος όρος ήταν 4,18±1,54 (διάμεσος 3,95). Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών με βάση το t-test των ζευγών δειγμάτων ($t(34)=-7.731$, $p<0,001$).



Διάγραμμα 1. Κατανομή τελομερικών μηκών κατά τη διάγνωση και κατά την ύφεση της νόσου.

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται οι μετρήσεις για κάθε ένα από τους ασθενείς χωριστά Οι μπλε μπάρες αφορούν τις μετρήσεις κατά τη διάγνωση και οι κόκκινες μπάρες κατά την ύφεση. Στο 91.4% (n=32) των ασθενών οι μετρήσεις έδειξαν αύξηση του τελομερικού μήκους κατά την ύφεση. Εξαίρεση αποτέλεσαν τρεις περιπτώσεις που σημειώνονται με λευκά βελάκια (περίπτωση 9, 15 και 20) με την τελευταία να αφορά το παιδί που παρουσίασε υποτροπή, στο οποίο δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια μεταβολή του μήκους.

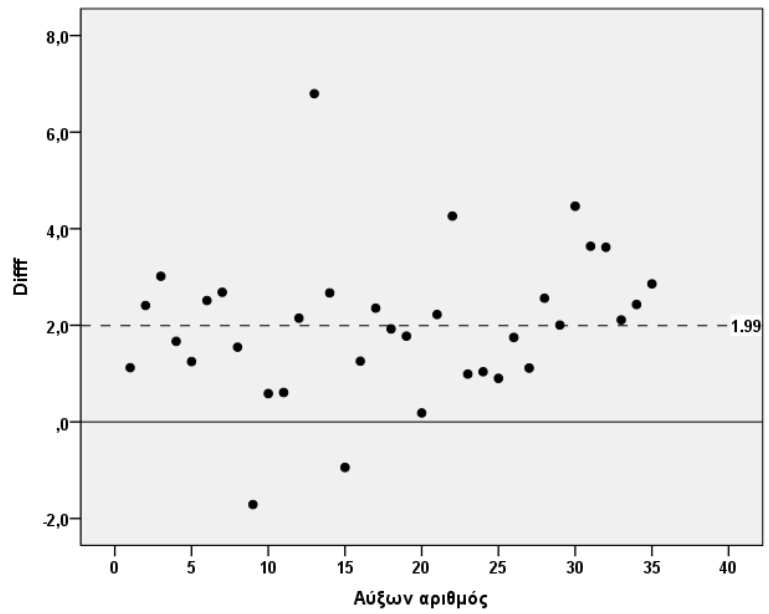


Διάγραμμα 2. Ομαδοποιημένο ραβδόγραμμα τελομερικού μήκους

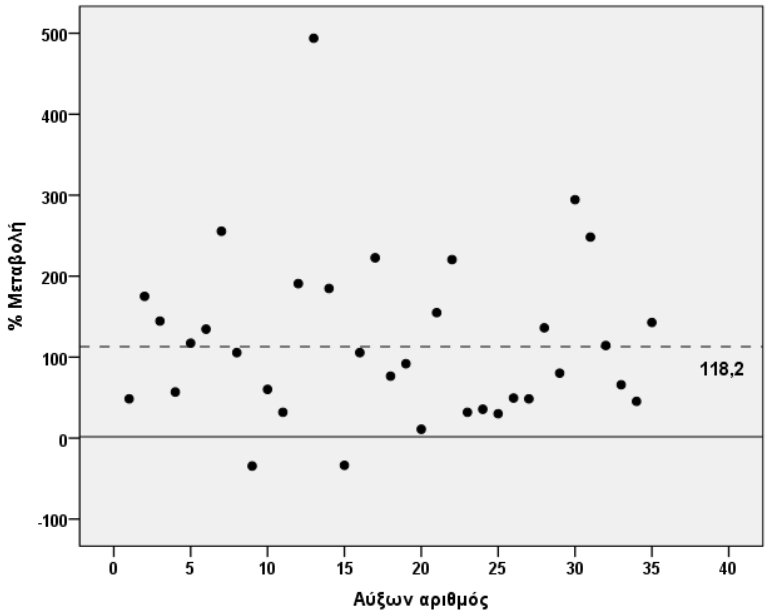
3.5. Μεταβολές του μήκους των τελομερικών άκρων

Οι μεταβολές και % μεταβολές του τελομερικού μήκους παρουσιάζονται στα διαγράμματα 3α και 3β αντίστοιχα. Στο διάγραμμα 3α φαίνονται οι μεταβολές τελικού (ύφεση) – αρχικού τελομερικού μήκους (διάγνωση) (TL_{tel}-TL_{arx}). Οι μεταβολές είναι αρνητικές για δύο από τους ασθενείς (9 και 15) ενώ οριακά κοντά στο 0 (μη μεταβολή) είναι ο ασθενής 20 ο οποίος και εμφάνισε υποτροπή της νόσου. Όλες οι υπόλοιπες μετρήσεις έχουν θετική μεταβολή με την μεγαλύτερη να παρουσιάζεται στον ασθενή 13 με αύξηση 6,80 Kb. Ο μέσος όρος της μεταβολής ήταν 1,99 ± 1,5 ενώ η διάμεσος ήταν 2,0 .

Στο διάγραμμα 3β παρουσιάζονται οι % μεταβολές του τελομερικού μήκους (% TL_{tel}/TL_{arx}). Οι δύο ασθενείς που παρουσίασαν μείωση του τελομερικού μήκους είχαν ποσοστό μεταβολής -34.5% και -33.6%. Οι τρεις πιο μεγάλες % διαφορές αύξησης του μήκους των τελομερών ήταν: 255,5%, 294,5%, και 493,8%, ενώ η μέση % διαφορά ήταν 118.2 ± 103.8 με τη διάμεσο να έχει τιμή 105.6%.



(α)



(β)

Διάγραμμα 3. Ομαδοποιημένο ραβδόγραμμα μεταβολών (ύφεση – διάγνωση) τελομερικού μήκους (α) και % μεταβολών τελομερικού μήκους (β)

Η μεταβολή και η % μεταβολή του μήκους των τελομερικών άκρων μετά τη θεραπεία, παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην μεταβολή του μήκους των τελομερών ανάμεσα στην Β-σειράς ομάδα ΟΛΛ ασθενών (1,90±1,67 Kb, διάμεσος: 1,78) και στην Τ-ΟΛΛ ομάδα ασθενών

(2,40±1,08 Kb, διάμεσος: 2,50 Kb) (p=0,570). Αντίστοιχο είναι και το αποτέλεσμα για την % μεταβολή όπου η ομάδα Β-ΟΛΛ είχε μέσο όρο 119.2 ± 113.3 και διάμεσο 91.9, ενώ η ομάδα Τ-ΟΛΛ είχε μέσο όρο 82.0 ± 51.1 και διάμεσο 79.9 (p=0,527). Όσο αφορά την ομάδα κινδύνου, η ομάδα μέσου κινδύνου (IR) είχε μέσο όρο μήκους τελομερών 2,29 ± 1,47 Kb ενώ η ομάδα υψηλού κινδύνου (1,43 ± 1,54 Kb) (p=0,118). Η αντίστοιχη εικόνα για τις % μεταβολές έδειξε τιμή στατιστικής σημαντικότητας p=0,057.

Η μεταβολή του μέσου μήκους ήταν υψηλότερη στα άτομα με πολυπλοειδία. Οι ασθενείς με αριθμό χρωμοσωμάτων > 46 είχαν μέσο μήκος 3,02±1,78 Kb και οι ασθενείς με 46 χρωμοσώματα 1,61±1,40 Kb (p=0,030). Η αντίστοιχη % μεταβολή ήταν 209,5±135,5 για την πολυπλοειδία και 84,3±73,5 για τα 46 χρωμοσώματα (p=0,003).

Πίνακας 4. Μεταβολή και % μεταβολή του τελομερικού μήκους ανάμεσα στη διάγνωση και την ύφεση

		Μεταβολή			
Μεταβολή		**Μέσος Όρος**	**Τυπική Απόκλιση**	**Διάμεσος**	**p**
Κατηγορία	**B-ALL**	1,90	1,67	1,78	0,570
	T-ALL	2,40	1,08	2,50	
Κατηγορία κινδύνου	**Υψηλού κινδύνου**	1,43	1,54	1,63	0,118
	Ενδιάμεσου κινδύνου	2,29	1,47	2,15	
Καρυότυπος	**46 Χρωμοσώματα**	1,61	1,40	1,67	0,030
	46+ Χρωμοσώματα	3,02	1,78	2,43	
%Μεταβολή		**%**			
		Μέσος Όρος	**Τυπική Απόκλιση**	**Διάμεσος**	**p**
Κατηγορία	**B-ALL**	119,2	113,3	91,9	0,527
	T-ALL	82,0	51,1	79,9	
Κατηγορία κινδύνου	**Υψηλού κινδύνου**	72,2	78,9	57,2	0,057
	Ενδιάμεσου κινδύνου	142,2	108,6	117,3	
Καρυότυπος	**46 CHR**	84,3	73,5	65,9	0,03
	46+ CHR	209,5	135,5	172,9	

4. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός του μέσου μήκους των τελομερικών άκρων από δείγμα λεμφοβλαστών, κατά τη διάγνωση παιδιών, εφήβων και νεαρών ενηλίκων με ΟΛΛ και η σύγκριση του μήκους τους με το μήκος των τελομερικών άκρων των λεμφοκυττάρων μετά την επίτευξη της ύφεσης της νόσου. Σε αιματολογικές διαταραχές με βάση την διεθνή βιβλιογραφία, τα τελομερή μειώνονται προδιαθέτοντας σε γενετική αστάθεια, η οποία μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA καθώς και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, οδηγώντας τελικά σε δυσμενή έκβαση της νόσου (24).

Η ΟΛΛ είναι αιματολογική νεοπλασία πιο συχνά της Β-σειράς με μεγαλύτερη επίπτωση στην ηλικία των 1- 4 ετών. Υπολογίζεται ότι στις ΗΠΑ 8 παιδιά νοσούν ετησίως ανά 100.000. Στη νόσο φαίνεται να είναι πιο ευάλωτα τα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια (25). Στην παρούσα μελέτη από τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των 35 παιδιών, εφήβων και νεαρών ενηλίκων που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη, παρατηρείται ότι οι περισσότεροι από τους ασθενείς ήταν άρρενες σε ποσοστό 62,9 %, με συχνότερη ηλικία εμφάνισης της νόσου να είναι εκείνη των 3-6 ετών και στην συνέχεια ακολουθεί εκείνη των <3 και εκείνη των >9 ετών, ενώ ως προς το είδος της λευχαιμική σειράς που εμφανιζόταν στους ασθενείς η Β ήταν η επικρατέστερη έναντι της Τ με ποσοστό 88.6 %.

Δεδομένου ότι η μείωση των τελομερικών άκρων σε κάθε κυτταρική διαίρεση κυμαίνεται από 50 έως 100 bp και σε ορισμένες περιπτώσεις σε συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες η μείωση αυτή μπορεί να είναι ακόμα και 500 bp και γνωρίζοντας ότι οι λεμφοβλάστες ως νεοπλασματικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Ο κλωνικός αυτός πολλαπλασιασμός έχει σαν αποτέλεσμα την εξαιρετικά μεγάλη μείωση του μήκους των τελομερικών άκρων κάτι που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της μελέτης μας. Κατά την διάγνωση της ΟΛΛ ο μέσος όρος του μήκους των τελομερικών άκρων των δειγμάτων μας από τους λεμφοβλάστες ήταν

2,18±1,04 Kb ενώ κατά την ύφεση ο μέσος όρος σε λεμφοκύτταρα αυτή την φορά καθώς είχε επιτευχθεί η ύφεση, σχεδόν διπλασιάστηκε στο 4,18±1,54 Kb.

Σε προγενέστερη μελέτη του Borssén και των συνεργατών του, όπου πραγματοποιήθηκε μέτρηση του μήκους την τελομερικών άκρων σε δύο χρονικές στιγμές, κατά τη διάγνωση και κατά την ύφεση, όπως ακριβώς και στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι οι βλάστες είχαν σημαντικά μικρότερο μήκος από τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία και έχουν προέλθει από τον μυελό των οστών μετά την επίτευξη ύφεσης (21). Η πιθανή εξήγηση που δόθηκε από τους ερευνητές, είναι η διαφορά του αριθμού των κυτταρικών διαιρέσεων ανάμεσα στα λευχαιμικά κύτταρα και τα φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, ωστόσο επισημάνθηκε η ανάγκη να πραγματοποιηθεί αντίστοιχη μελέτη όπου θα μετρηθεί το μήκος των τελομερικών άκρων σε άτομα που ανήκουν στην ίδια ομάδα ΟΛΛ ως προς την κυτταρική σειρά, είχαν τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων στον καρυότυπο, έλαβαν την ίδια θεραπεία και για το ίδιο χρονικό διάστημα. Η αύξηση που μήκους των τελομερικών άκρων κατά την ύφεση φαίνεται να σχετίζεται με την έκφραση της τελομεράσης. Η ενεργοποίηση της ωστόσο πιθανόν να καθυστερεί να πραγματοποιηθεί και επομένως οι κυτταρικές διαιρέσεις σε πρώιμα στάδια των βλαστών να γίνονται χωρίς την δράση της, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το μήκος των τελομερικών άκρων να είναι εξαιρετικά μικρό στα κύτταρα αυτά (22).

Σε μελέτη του Davison και των συνεργατών του βρέθηκε αυξημένη έκφραση της τελομεράσης σε ασθενείς με ΟΛΛ ώριμων Β-κυττάρων σε σχέση με την ΟΛΛ από πρόδρομα Β κύτταρα (26). Κατ' αντιστοιχία θα μπορούσαμε να πούμε ότι το μήκος των τελομερών των πρόδρομων κυττάρων θα έπρεπε να ήταν μικρότερο από εκείνο των πιο ώριμων κυττάρων, κάτι τέτοιο ωστόσο δεν φάνηκε στην παρούσα μελέτη από την σύγκριση των αποτελεσμάτων παιδιών με πρώιμη προ-Β ΟΛΛ και προ-Β ΟΛΛ με εκείνα της κοινής Β ΟΛΛ, καθώς το μήκος των τελομερών δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο υποομάδες (p= 0,8). Αντίστοιχα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, είχε και η μελέτη του Karow και των συνεργατών του όπου μειωμένα τελομερικά άκρα βρέθηκαν στους λεμφοβλάστες των παιδιατρικών ασθενών με ΟΛΛ (23). Στην ίδια μελέτη πραγματοποιήθηκε και σύγκριση του μήκους των τελομερικών άκρων μεταξύ λεμφοβλαστών (στην

διάγνωση) και λεμφοκυττάρων (στην ύφεση) όπου το τελομερικό μήκος στους λεμφοβλάστες ήταν περίπου το μισό από εκείνο των λεμφοκυττάρων (4,3 kb και 8,0 kb αντίστοιχα).

Δύο από τους ασθενείς μας εμφάνισαν διαφορετική εικόνα ως προς το μήκος των τελομερικών άκρων με μακρύτερα τελομερικά άκρα κατά την διάγνωση και πιο κοντά κατά την ύφεση της νόσου. Ο ένας ασθενής (ασθενής 9) ήταν 4,5 ετών, με διάγνωση κοινής Β-ΟΛΛ, με φυσιολογικό καρυότυπο, που είχε ταξινομηθεί ως υψηλού κινδύνου με βάση τα χαρακτηριστικά της νόσου. Ο δεύτερος ασθενής (ασθενής 15) είχε ηλικία 3.5 ετών κατά την διάγνωση, με πρώιμη προ-Β ΟΛΛ, με φυσιολογικό καρυότυπο και ήταν και αυτός υψηλού κινδύνου. Το αυξημένο μήκος τελομερών των δύο αυτών ασθενών θα μπορούσε να οφείλεται σε αυξημένη ενεργότητα της τελομεράσης, όπως για παράδειγμα στην υπερέκφραση του γονιδίου hTERT, το οποίο σύμφωνα με την μελέτη της Nogueira και των συνεργατών της μπορεί να αποτελέσει βιοδείκτη για την εξέλιξη της νόσου αλλά και ένα πολλά υποσχόμενο στόχο για νέα θεραπευτικά και προγνωστικά πρωτόκολλα (27). Εάν όμως η αυξημένη ενεργότητα της τελομεράσης δεν ευθύνεται για το αυξημένο μήκος των τελομερικών άκρων ο εναλλακτικός μηχανισμός επιμήκυνσης των τελομερών (ALT) θα μπορούσε να αποτελέσει αιτία της διαφοροποίησης των δύο ασθενών, μιας και ευθύνεται για τη μεγάλη ετερογένεια στο μήκος των τελομερικών άκρων ανά χρωμόσωμα από εξαιρετικά μεγάλα έως εξαιρετικά μικρά, δεδομένου ότι χρησιμοποιεί σαν καλούπι για την σύνθεση των τελομερών, το τελομερές άλλου χρωμοσώματος (28). Ωστόσο λόγω της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε, στην μελέτη αυτή μετράμε το μέσο μήκος των τελομερικών άκρων και δεν είναι δυνατόν να πάρουμε επιπλέον πληροφορίες για καθένα από τα τελομερικά άκρα, παρά μόνο ότι κατά την ύφεση το μήκος των τελομερών του ασθενούς 9, μειώθηκαν και έφτασαν σε επίπεδα εκείνα των υπόλοιπων συμμετεχόντων στην στιγμή της ύφεσης, ενώ στο 15 το μήκος των τελομερών στην ύφεση ήταν λίγο μικρότερο από εκείνο των υπόλοιπων συμμετεχόντων. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο McNally και οι συνεργάτες του, ανέφεραν τον όρο του συνδρόμου μακρού τελομερούς, κάτι όχι και πολύ σύνηθες, το οποίο σχετίζεται με υψηλή διείσδυση δερματικού μελανώματος καθώς και με την χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (29).

Ένας από τους ασθενείς μας (ασθενής 20) παρουσίασε υποτροπή της νόσου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το μήκος των τελομερών στον ασθενή παρέμεινε σταθερό κατά την διάγνωση και κατά την ύφεση. Βιβλιογραφικά δεν υπάρχουν ανάλογες αναφορές , αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι στο μεγαλύτερο μέρος από αυτές δεν υπήρχε το χρονικό διάστημα της παρακολούθησης του ασθενούς για κάποια χρόνια μετά την επίτευξη της ύφεσης, όπως συμβαίνει στην παρούσα μελέτη.

Από την σύγκριση του μήκους των τελομερικών άκρων, ατόμων με Β-σειράς ΟΛΛ και Τ- ΟΛΛ παρατηρήθηκε εξαιρετικά μικρό μέσο μήκος τελομερών κατά την στιγμή της διάγνωσης για την Β- σειράς ΟΛΛ με τιμές 1,90 ± 1,67 Kb. Για την Τ- ΟΛΛ το μέσο μήκος ήταν λίγο μεγαλύτερο, στις 2,40 ± 1,08 Kb, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική η διαφοροποίηση ανάμεσα στις δύο ομάδες της ΟΛΛ. Το αποτέλεσμα μας αυτό, έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης του Capraro και των συνεργατών του όπου έδειξαν μακρύτερα τελομερικά άκρα σε ασθενείς με Τ- ΟΛΛ σε σχέση με εκείνα ασθενών με Β-σειράς ΟΛΛ, ωστόσο η μελέτη αυτή αφορούσε μονάχα ενήλικους ασθενείς (30).

Από την σύγκριση του μήκους των τελομερικών άκρων ανάμεσα στους ασθενείς υψηλού κινδύνου και σε εκείνους ενδιάμεσου κινδύνου βρέθηκε ότι το μέσο μήκος των τελομερικών άκρων για τους ασθενής υψηλού κινδύνου ήταν κατά πολύ χαμηλότερο από εκείνο του ενδιάμεσου κινδύνου με τιμές 1.43 ± 1,54 Kb έναντι 2.29 ± 1.47 Kb αντίστοιχα. Τα κοντά τελομερικά άκρα φαίνεται να σχετίζονται και με την υψηλού κινδύνου οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία συμβάλλοντας στην εξέλιξη της νόσου σύμφωνα με την μελέτη του Jebaraj και των συνεργατών του (31). Σε μελέτη του Sheng και τον συνεργατών του, αναφέρεται ωστόσο ότι το μεγάλο μέγεθος τελομερικών άκρων είναι το ίδιο κρίσιμο για την καρκινογένεση όσο και το εξαιρετικά μικρό μήκος, για τον λόγο αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πιθανό προγνωστικό παράγοντα για την εκδήλωση της ΟΛΛ (32).

Ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών με Β-σειράς ΟΛΛ εμφανίζει ασυνήθιστα χαμηλούς αριθμούς χρωμοσωμάτων, που ορίζονται ως υποδιπλοειδία, σε λευχαιμικά κύτταρα. Η υποδιπλοειδία με λιγότερα από 40 χρωμοσώματα είναι μια

σπάνια γενετική ανωμαλία στη Β-σειράς ΟΛΛ και σχετίζεται με εξαιρετικά κακή έκβαση, με χαμηλά ποσοστά επιβίωσης τόσο σε παιδιατρικούς όσο και σε ενήλικες ασθενείς (33). Το σύνηθες είναι ένας φυσιολογικός ή ένας ανευπλοειδικός καρυότυπος καθώς και υπερδιπλοειδία (>50 χρωμοσώματα) το οποίο και αποτελεί έναν πολύ καλό προγνωστικό παράγοντα (34). Από τους ασθενείς μας το 63.6% είχε φυσιολογικό καρυότυπο ως προς των αριθμό των χρωμοσωμάτων με το 23.8% από αυτά να έχουν δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ενώ το υπόλοιπο 36.4% εμφάνισε καρυότυπο με περισσότερα από 46 χρωμοσώματα. Τα παιδιά που νοσούν από ΟΛΛ είναι πιο πιθανό να θεραπευτούν από την νόσο, εάν τα λευχαιμικά τους κύτταρα είναι υπερδιπλοειδικά, έχουν δηλαδή από 50 χρωμοσώματα, ειδικά εάν υπάρχει ένα επιπλέον χρωμόσωμα 4, 10 ή 17 (35). Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι οι ασθενείς με περισσότερα από 46 χρωμοσώματα είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μήκος τελομερών κατά μέσο όρο 3,02 Kb έναντι των 1.61 Kb των ασθενών με 46 χρωμοσώματα. Πιθανόν η διαφοροποίηση αυτή του μήκους των τελομερών να σχετίζεται και με την καλύτερη δυνατή πρόγνωση στους παιδιατρικούς ασθενείς.

Επομένως θα μπορούσαμε να πούμε ότι το μήκος των τελομερικών άκρων των παιδιών, εφήβων και νεαρών ενηλίκων κατά την διάγνωση είναι εξαιρετικά μικρό σε σχέση με αυτά που αναμένονται βιβλιογραφικά από τον γενικό πληθυσμό της ίδιας ηλικιακής ομάδας, βλάβη όμως που φαίνεται να είναι αναστρέψιμη μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας όπου το μήκος των τελομερών σχεδόν διπλασιάζεται. Το πόσο μικρό είναι το μήκος των τελομερών φαίνεται να σχετίζεται με την ομάδα κινδύνου καθώς και τον αριθμό χρωμοσωμάτων στον καρυότυπο των λευχαιμικών κυττάρων, ενώ δεν φαίνεται να σχετίζεται με τον ανοσοφαινότυπο στον πληθυσμό που μελετήθηκε. Στην επιμήκυνση των τελομερικών άκρων πιθανόν να συμβάλει η ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης, με αποτέλεσμα κατά την επίτευξη της ύφεσης το μήκος των τελομερικών άκρων, των φυσιολογικών πλέον λεμφοκυττάρων να έχει επιμηκυνθεί σημαντικά, προστατεύοντας πλέον τα κύτταρα από την συσσώρευση νέων μεταλλάξεων και την μετατροπή τους ξανά σε λευχαιμικά. Όσο αφορά τους ασθενείς μας με εξαιρετικά μακριά τελομερικά άκρα κατά την διάγνωση σε σχέση με την ύφεση είναι κάτι που θα μπορούσε να εξηγηθεί από την δράση κάποιου εναλλακτικού μηχανισμού επιμήκυνσης των τελομερών, η

δράση του οποίου πιθανόν να έπαψε με αποτέλεσμα τα κύτταρα μετά την θεραπεία να επανέρχονται σε αντίστοιχα επίπεδα με εκείνα των υπόλοιπων συμμετεχόντων.

Η βράχυνση των τελομερικών άκρων είναι πολυπαραγοντική καθώς εξαρτάται από την ηλικία του ατόμου, από την κατάσταση της υγείας του και τις συνήθειες του. Η ΟΛΛ με την σειρά της είναι μία νόσος αρκετά πολύπλοκη στην κατάταξη της καθώς μορφολογικά, καρυοτυπικά, ανονοσοφαινοτυπικά και μοριακά κριτήρια, έχουν σημαντική προγνωστική αξία. Σημαντικές πληροφορίες όμως θα μπορούσαμε να αντλήσουμε από την μέτρηση της ενεργότητας της τελομεράσης. Συνεργικά μήκος τελομερικών άκρων και ενεργότητα της τελομεράσης θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν επιπλέον σημαντικό προγνωστικό βιοδείκτη για ασθενείς με ΟΛΛ, εμπλουτίζοντας τους ήδη υπάρχοντες.

4.1. Περιορισμοί μελέτης

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μέτρηση του μήκους των τελομερικών άκρων σε παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες, οι οποίοι διαγνώστηκαν με ΟΛΛ κατά την περίοδο 1/1/2010 έως 31/12/2020 στην Κλινική Αιματολογίας και Ογκολογίας Παίδων του ΠΑΓΝΗ. Στα δείγματα αυτά μετρήθηκε το μέσο μήκος των τελομερικών άκρων των λεμφοβλαστών/λεμφοκυττάρων σε δύο φάσεις, κατά την διάγνωση και μετά την επίτευξη την ύφεσης. Ένα από τα χαρακτηριστικά της ΟΛΛ είναι πως τα νεοπλασματικά κύτταρα πολύ συχνά έχουν καρυότυπο με περισσότερα από 46 χρωμοσώματα. Η Q-PCR η μεθοδολογία η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι μία μέθοδος που δεν είναι δυνατόν να διαχωρίσει κύτταρα με φυσιολογικό καρυότυπο από εκείνα με μη φυσιολογικό, καθώς απομονώνεται εκτός από το DNA των φυσιολογικών σε καρυότυπο κυττάρων και εκείνο των απλοειδικών ή πολυπλοειδικών κυττάρων. Με βάση τον τρόπο υπολογισμού του μέσου μήκους των τελομερικών άκρων, το συνολικό μήκος των τελομερών θα πρέπει να διαιρεθεί με τον αριθμό των χρωμοσωμάτων, ο οποίος θεωρήθηκε ότι είναι το 46, παρόλο που σε ένα μέρος των ασθενών μας από τις μεταφάσεις που δόθηκαν είναι γνωστό ότι έχουν περισσότερα από 46 χρωμοσώματα.

4.2. Μέλλον, ορίζοντες, προοπτικές

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε το μέσο μήκος των τελομερικών άκρων λεμφοβλαστών και λεμφοκυττάρων. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η κυτταρική γήρανση που εμφανίζεται στους λεμφοβλάστες κατά την διάγνωση της νόσου υποστρέφει μετά το πέρας της χημειοθεραπείας με την βοήθεια των επιδιορθωτικών μηχανισμών και το μήκος των τελομερών αποκαθίσταται στα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα με την επίτευξη της ύφεσης της νόσου. Μετά την λήψη της βασικής αυτής πληροφορίας πρέπει να ακολουθήσουν νέες πιο στοχευμένες πλέον μελέτες, τόσο στον προσδιορισμό του μήκους των τελομερικών άκρων ανά χρωμόσωμα αυτή την φορά όσο και στην ενεργότητα της τελομεράσης. Με νέες τεχνικές όπως η Q-FISH μπορεί να αντληθεί επιπλέον πληροφορία για τα νεοπλασματικά κύτταρα δεδομένου ότι η μέτρηση των τελομερικών άκρων θα γίνεται ανά χρωμόσωμα και ανά βραχίονα χρωμοσώματος, ενώ θα υπάρχει η δυνατότητα να διαχωριστούν τα κύτταρα σε εκείνα φυσιολογικού καρυότυπου και σε εκείνα με >46 χρωμοσώματα. Από την σύγκριση των δύο κυττάρων (φυσιολογικών και απλοειδικών ή πολυπλοειδικών) θα είναι δυνατόν να διαπιστωθεί σε ποια κύτταρα και σε ποια χρωμοσώματα το μήκος των τελομερών είναι κρίσιμα κοντά (critical short). Παράλληλα θα πρέπει να γίνει και ο προσδιορισμός της έκφρασης της τελομεράσης ώστε να υπάρχουν πληροφορίες για την ενεργότητα της σε κάθε ασθενή στα δύο στάδια της δειγματοληψίας, ώστε να διαπιστωθεί ό λόγος επιμήκυνσης του μήκους των τελομερικών άκρων κάτι που θα μπορούσε να οδηγήσει πιθανόν σε πιο στοχευμένες θεραπευτικές στρατηγικές.

4.3. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαμε να πούμε ότι:

- Το μήκος των τελομερικών άκρων των λεμφοβλαστών κατά την διάγνωση της Β- σειράς ΟΛΛ σε παιδιά, εφήβους και νεαρούς ενήλικες είναι κατά πολύ μικρότερο από εκείνο των παιδιών του γενικού πληθυσμού
- Το μήκος τελομερών σε λεμφοκύτταρα ασθενών με Β- σειράς ΟΛΛ κατά την επίτευξη ύφεσης είναι περίπου διπλάσιο σε σχέση με εκείνο των λεμφοβλαστών κατά την διάγνωση
- Σε ασθενή που υποτροπίασε μετά την θεραπεία από Β-σειράς ΟΛΛ, η μεταβολή του μήκους των τελομερικών άκρων ανάμεσα στην διάγνωση και την ύφεση ήταν σχεδόν μηδενική
- Η μεταβολή του μήκους των τελομερικών άκρων είναι μεγαλύτερη σε άτομα με πολυπλοειδία και σε ασθενής με μέσου κινδύνου ΟΛΛ

5. Χρηματοδότηση

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία χρηματοδοτήθηκε από τα ερευνητικά προγράμματα του Εργαστηρίου Τοξικολογίας, Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, σχετικά με το αντικείμενο της μελέτης.

6. Έγκριση Επιστημονικούς συμβουλίου

Η παρούσα μελέτη έχει λάβει έγκριση από το επιστημονικό συμβούλιο του ΠΑΓΝΗ με αρ. πρωτ. Δ.Σ. 17203/1-12-2021 και αρ. πρωτ. του Επιστημονικού Συμβουλίου 1121/32/22-12-2021 για την διεξαγωγή της.

6. Βιβλιογραφία

1. Seth R, Singh A. Leukemias in Children. Indian J Pediatr. 2015 Sep;82(9):817-24. doi: 10.1007/s12098-015-1695-5. Epub 2015 Feb 15. PMID: 25680783.
2. Arora RS, Eden TO, Kapoor G. Epidemiology of childhood cancer in India. Indian J Cancer. 2009 Oct-Dec;46(4):264-73. doi: 10.4103/0019-509X.55546. PMID: 19749456.
3. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Clin North Am. 2015 Feb;62(1):47-60. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.004. PMID: 25435111; PMCID: PMC4250840.
4. Bailey HD, Metayer C, Milne E, Petridou ET, Infante-Rivard C, Spector LG, Clavel J, Dockerty JD, Zhang L, Armstrong BK, Rudant J, Fritschi L, Amigou A, Hatzipantelis E, Kang AY, Stiakaki E, Schüz J. Home paint exposures and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: findings from the Childhood Leukemia International Consortium. Cancer Causes Control. 2015 Sep;26(9):1257-70. doi: 10.1007/s10552-015-0618-0. Epub 2015 Jul 2. PMID: 26134047; PMCID: PMC5257283.
5. Foon KA, Todd RF 3rd. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood. 1986 Jul;68(1):1-31. PMID: 2941082.
6. Malouf C, Ottersbach K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. Cell Mol Life Sci. 2018 Feb;75(3):417-446. doi: 10.1007/s00018-017-2620-z. Epub 2017 Aug 17. PMID: 28819864; PMCID: PMC5765206.
7. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2008 Mar 22;371(9617):1030-43. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60457-2. PMID: 18358930.
8. Cazzola M. Introduction to a review series: the 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Blood. 2016 May 19;127(20):2361-4. doi: 10.1182/blood-2016-03-657379. Epub 2016 Apr 11. PMID: 27069255.
9. Feng J, Li Y, Jia Y, Fang Q, Gong X, Dong X, Ru K, Li Q, Zhao X, Liu K, Wang M, Tian Z, Jia Y, Wang Y, Lin D, Wei H, Tang K, Mi Y, Wang J. Spectrum of somatic

mutations detected by targeted next-generation sequencing and their prognostic significance in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. J Hematol Oncol. 2017 Feb 28;10(1):61. doi: 10.1186/s13045-017-0431-1. PMID: 28245838; PMCID: PMC5331692.

10. Kaplan J A. Leukemia in Children. Pediatr Rev (2019) 40 (7): 319–331. https://doi.org/10.1542/pir.2018-0192
11. Cooper SL, Brown PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Clin North Am. 2015 Feb;62(1):61-73. doi: 10.1016/j.pcl.2014.09.006. Epub 2014 Oct 18. PMID: 25435112; PMCID: PMC4366417.
12. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Mar;11(3):171-81. doi: 10.1038/nrm2848. Epub 2010 Feb 3. PMID: 20125188; PMCID: PMC2842081.
13. Vakonaki E, Tzatzarakis M, Tsiminikaki K, Nathena D, Fragkiadaki P, Kalliantasi K, Kanaki K, Vaki G, Plaitis S, Tsoukalas D, Alegakis A, Spandidos D.A., Tsatsakis AM. Effect of chronic and heavy drug abuse on biological aging. World Academy Of Sciences Journal 2019 Feb, Pages: 67-73
14. Lai TP, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2018 Mar 5;373(1741):20160451. doi: 10.1098/rstb.2016.0451. PMID: 29335378; PMCID: PMC5784071.
15. Tsatsakis A, Tsoukalas D, Fragkiadaki P, Vakonaki E, Tzatzarakis M, Sarandi E, Nikitovic D, Tsilimidos G, Alegakis AK. Developing BIOTEL: A Semi-Automated Spreadsheet for Estimating Telomere Length and Biological Age. Front Genet. 2019 Feb 19;10:84. doi: 10.3389/fgene.2019.00084. PMID: 30838025; PMCID: PMC6389611.
16. Razgonova MP, Zakharenko AM, Golokhvast KS, Thanasoula M, Sarandi E, Nikolouzakis K, Fragkiadaki P, Tsoukalas D, Spandidos DA, Tsatsakis A. Telomerase and telomeres in aging theory and chronographic aging theory (Review). Mol Med Rep. 2020 Sep;22(3):1679-1694. doi: 10.3892/mmr.2020.11274. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32705188; PMCID: PMC7411297.
17. Wu RA, Upton HE, Vogan JM, Collins K. Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. Annu Rev Biochem. 2017 Jun 20;86:439-460. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045019. Epub 2017 Jan 30. PMID: 28141967; PMCID: PMC5812681.

18. Sakellariou D, Chiourea M, Raftopoulou C, Gagos S. Alternative lengthening of telomeres: recurrent cytogenetic aberrations and chromosome stability under extreme telomere dysfunction. Neoplasia. 2013 Nov;15(11):1301-13. doi: 10.1593/neo.131574. PMID: 24339742; PMCID: PMC3858894.
19. Giardini MA, Segatto M, da Silva MS, Nunes VS, Cano MI. Telomere and telomerase biology. Prog Mol Biol Transl Sci. 2014;125:1-40. doi: 10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3. PMID: 24993696.
20. Gaspar TB, Sá A, Lopes JM, Sobrinho-Simões M, Soares P, Vinagre J. Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. Genes (Basel). 2018 May 3;9(5):241. doi: 10.3390/genes9050241. PMID: 29751586; PMCID: PMC5977181.
21. Borssén M, Cullman I, Norén-Nyström U, Sundström C, Porwit A, Forestier E, Roos G. hTERT promoter methylation and telomere length in childhood acute lymphoblastic leukemia: associations with immunophenotype and cytogenetic subgroup. Exp Hematol. 2011 Dec;39(12):1144-51. doi: 10.1016/j.exphem.2011.08.014. Epub 2011 Sep 10. PMID: 21914494.
22. Eskandari E, Hashemi M, Naderi M, Bahari G, Safdari V, Taheri M. Leukocyte Telomere Length Shortening, hTERT Genetic Polymorphisms and Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Asian Pac J Cancer Prev. 2018 Jun 25;19(6):1515-1521. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.6.1515. PMID: 29936725; PMCID: PMC6103564.
23. Karow A, Haubitz M, Oppliger Leibundgut E, Helsen I, Preising N, Steiner D, Dantonello TM, Ammann RA, Roessler J, Kartal-Kaess M, Röth A, Baerlocher GM. Targeting Telomere Biology in Acute Lymphoblastic Leukemia. Int J Mol Sci. 2021 Jun 22;22(13):6653. doi: 10.3390/ijms22136653. PMID: 34206297; PMCID: PMC8268026.
24. Nogueira BMD, Machado CB, Montenegro RC, DE Moraes MEA, Moreira-Nunes CA. Telomere Length and Hematological Disorders: A Review. In Vivo. 2020 Nov-Dec;34(6):3093-3101. doi: 10.21873/invivo.12142. PMID: 33144412; PMCID: PMC7811674.
25. Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. Exp Hematol Oncol. 2014 Jun 13;3:16. doi: 10.1186/2162-3619-3-16. PMID: 24949228; PMCID: PMC4063430.

26. Davison GM. Telomeres and telomerase in leukaemia and lymphoma. Transfus Apher Sci. 2007 Aug;37(1):43-7. doi: 10.1016/j.transci.2007.04.006. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17766184.
27. Nogueira BMD, da Costa Pantoja L, da Silva EL, Mello Júnior FAR, Teixeira EB, Wanderley AV, da Silva Maués JH, de Moraes Filho MO, de Moraes MEA, Montenegro RC, Khayat AS, Moreira-Nunes CA. Telomerase (*hTERT*) Overexpression Reveals a Promising Prognostic Biomarker and Therapeutical Target in Different Clinical Subtypes of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia. Genes (Basel). 2021 Oct 17;12(10):1632. doi: 10.3390/genes12101632. PMID: 34681025; PMCID: PMC8535500.
28. Fasching CL, Bower K, Reddel RR. Telomerase-independent telomere length maintenance in the absence of alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia bodies. Cancer Res. 2005 Apr 1;65(7):2722-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2881. PMID: 15805271.
29. McNally EJ, Luncsford PJ, Armanios M. Long telomeres and cancer risk: the price of cellular immortality. J Clin Invest. 2019 Aug 5;129(9):3474-3481. doi: 10.1172/JCI120851. PMID: 31380804; PMCID: PMC6715353.
30. Capraro V, Zane L, Poncet D, et al. Telomere deregulations possess cytogenetic, phenotype and prognostic specificities in acute leukemias. Exp Hematol. 2011;39:195–202
31. Jebaraj BMC, Tausch E, Landau DA, Bahlo J, Robrecht S, Taylor-Weiner AN, Bloehdorn J, Scheffold A, Mertens D, Böttcher S, Kneba M, Jäger U, Zenz T, Wenger MK, Fingerle-Rowson G, Wendtner C, Fink AM, Wu CJ, Eichhorst B, Fischer K, Hallek M, Döhner H, Stilgenbauer S. Short telomeres are associated with inferior outcome, genomic complexity, and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2019 Sep;33(9):2183-2194. doi: 10.1038/s41375-019-0446-4. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30911113; PMCID: PMC6737251.
32. Sheng X, Zhang L, Luo D, et al (2012). A common variant near TERC and telomere length are associated with susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia in Chinese. Leuk Lymphoma, 53, 1688-92
33. Molina O, Bataller A, Thampi N, Ribera J, Granada I, Velasco P, Fuster JL, Menéndez P. Near-Haploidy and Low-Hypodiploidy in B-Cell Acute Lymphoblastic

Leukemia: When Less Is Too Much. Cancers (Basel). 2021 Dec 22;14(1):32. doi: 10.3390/cancers14010032. PMID: 35008193; PMCID: PMC8750410.

34. Inaba H, Pui CH. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Med. 2021 Apr 29;10(9):1926. doi: 10.3390/jcm10091926. PMID: 33946897; PMCID: PMC8124693.
35. Horton TM, Steuber CP. Risk group stratification and prognosis for acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents. UpToDate. 2018. Accessed at www.uptodate.com/contents/risk-group-stratification-and-prognosis-for-acute-lymphoblastic-leukemia-in-children-and-adolescents on December 29, 2018.

7. Παράρτημα

Πίνακας S1. Δημογραφικά, μορφολογικά, καρυοτυπικά, ανονοσοφαινοτυπικά και μοριακά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Α/Α ασθενούς	Φύλο ασθενούς	Ηλικία Διάγνωσης	Διάγνωση	Υψηλού/ Ενδιάμεσου κινδύνου	Μοριακά Χαρακτηριστικά της νόσου	Αριθμός Χρωμοσωμάτων κατά την διάγνωση	Υποτροπή	Εν ζωή
1	Θήλυ	4.89		Υψηλού			Όχι	Ναι
2	Άρρεν	3.39		Ενδιάμεσου		46	Όχι	Ναι
3	Άρρεν	2.97		Ενδιάμεσου	10% τρία αντίγραφα γονιδίου AML1	46	Όχι	Ναι
4	Άρρεν	3.76	Pre-cursor B ALL	Ενδιάμεσου	TEL-AML1	46	Όχι	Ναι
5	Θήλυ	7.20	Common B-ALL	Ενδιάμεσου	Τρισωμία 21	46	Όχι	Ναι
6	Θήλυ	4.02	Common B-ALL	Ενδιάμεσου		>46	Όχι	Ναι
7	Άρρεν	4.39	Common B-ALL	Ενδιάμεσου		>46	Όχι	Ναι
8	Άρρεν	4.99	Common B-ALL	Ενδιάμεσου	TEL-AML1	46	Όχι	Ναι
9	Άρρεν	4.53	Common B-ALL	Υψηλού		46	Όχι	Ναι
10	Άρρεν	3.41	Common B-ALL	Ενδιάμεσου		46	Όχι	Ναι
11	Θήλυ	1.66	Pre-cursor B ALL	Ενδιάμεσου		46	Όχι	Ναι
12	Θήλυ	3.92	Pre-cursor B ALL	Ενδιάμεσου		>46	Όχι	Ναι

13	Θήλυ	2.49	Pre-cursor B ALL	Ενδιάμεσου		>46	Όχι	Ναι
14	Άρρεν	7.40	Common B-ALL	Ενδιάμεσου	TEL/AML1	>46	Όχι	Ναι
15	Θήλυ	3.57	Pre-cursor B ALL	Υψηλού		46	Όχι	Ναι
16	Άρρεν	11.35	Common B-ALL	Υψηλού	Έλλειμμα 9p21,12p13	46	Όχι	Ναι
17	Άρρεν	3.71		Ενδιάμεσου	Τρισωμία 11, επιπλέον φυλετικό Χ	>46	Όχι	Ναι
18	Θήλυ	2.30	Pre-cursor B ALL	Ενδιάμεσου		>46	Όχι	Ναι
19	Άρρεν	8.15	Common B-ALL	Ενδιάμεσου		46	Όχι	Ναι
20	Άρρεν	4.97	Pre-B CD10+	Ενδιάμεσου	TEL/AML1	46	Ναι	Ναι
21	Άρρεν	6.24	Common B-ALL	Ενδιάμεσου	TEL/AML1	>46	Όχι	Ναι
22	Άρρεν	2.53	Common B-ALL	Ενδιάμεσου	Τρισωμία 12,Τρισωμία 21, Τρισωμία 22, Τρισωμία 11, 9p21, Τρισωμία , υπερδιπλοειδία νεοπλασματικού πληθυσμού	46	Όχι	Ναι
23	Άρρεν	2.47	Pre-T ALL	Υψηλού	NOTCH1+	46	Όχι	Ναι
24	Άρρεν	12.20	Common B-ALL	Ενδιάμεσου	Διπλασιασμός χρωμοσώματος Χ, Έλλειψη χρωμοσώματος Υ	46	Όχι	Ναι
25	Θήλυ	10.84	Pre-B CD10+	Υψηλού	Ελλείμματα στα γονίδια και περιοχές IKZF1, PAX5, BTG1, CDKN2A,CDKN2B,9p21	46	Όχι	Ναι
26	Θήλυ	3.46	Pre-B CD10+	Ενδιάμεσου	TEL-AML1 Έλλειμμα CDKN2A-CDKN2B(2p21.3) και Έλλειμα ETV6(12p13.2)	46	Όχι	Ναι
27	Άρρεν	5.01	Pre-B	Ενδιάμεσου	Διπλασιασμός περιοχής PAR1	>46	Όχι	Ναι

			CD10+		χρωμοσώματος X(Xp22.33)			
28	Άρρεν	11.61	T - cortical	Υψηλού	Ελλείμματα στις περιοχές PAX5, CDKN2A,CDKN2B	>46	Όχι	Ναι
29	Θήλυ	7.44	Pre-cursor B ALL	Υψηλού	Έλλειμα RB1	46	Όχι	Ναι
30	Θήλυ	3.79	Common B-ALL	Ενδιάμεσου	Έλλειμμα CDKN2A-CDKN2B, Έλλειμμα RB1, Διπλασιασμός IKZF1, διπλασιασμός PAR1(X)	>46	Όχι	Ναι
31	Θήλυ	8.39	Pre-cursor B ALL	Υψηλού		46	Όχι	Ναι
32	Άρρεν	10.34	T - cortical	Ενδιάμεσου	Έλλειμμα CDKN2A, NOTC1 +	46	Όχι	Ναι
33	Άρρεν	9.86	Common B-ALL	Υψηλού	Έλλειμμα CDKN2A-CDKN2B (9p21.3), Έλλειμα PAX5(9p13.2)	46	Όχι	Ναι
34	Άρρεν	17.45	T - cortical	Υψηλού	Έλλειμμα CDKN2A-CDKN2B (9p21.3), Έλλειμμα PAX5(9p13.2), Έλλειμμα ETV6912p13.2)NOTCH1 Μετάλλαξη, del CDKN2A-2B, del PAX5, NOTCHI1 +	46	Όχι	Ναι
35	Άρρεν	18.04	Common B-ALL	Υψηλού	Μερικό έλλειμμα IK2F1,δισπλ/μός EBF1		Όχι	Ναι

Πίνακας S2. Μήκος τελομερών ανά ασθενή και ανά δειγματοληψία καθώς και η μεταξύ τους διαφορά

Α/Α ασθενούς	Μήκος τελομερικών άκρων κατά την διάγνωση (Kb)	Μήκος τελομερικών άκρων κατά την ύφεση (Kb)	Διαφορά μήκους (Kb)
1	2.31	3.44	1.12
2	1.38	3.79	2.41
3	2.09	5.10	3.02
4	2.93	4.60	1.67
5	1.07	2.31	1.25
6	1.87	4.38	2.51
7	1.05	3.73	2.68
8	1.46	3.01	1.55
9	4.96	3.25	-1.71
10	0.97	1.56	0.59
11	1.91	2.52	0.61
12	1.13	3.27	2.15
13	1.38	8.17	6.80
14	1.44	4.11	2.67
15	2.81	1.87	-0.94
16	1.19	2.45	1.26
17	1.06	3.41	2.35
18	2.52	4.44	1.93
19	1.93	3.71	1.78
20	1.68	1.87	0.18
21	1.43	3.66	2.22
22	1.93	6.19	4.26
23	3.10	4.09	0.99
24	2.91	3.95	1.04
25	2.99	3.89	0.90
26	3.53	5.28	1.75
27	2.30	3.41	1.11
28	1.88	4.44	2.56
29	2.50	4.50	2.00
30	1.52	5.98	4.47
31	1.46	5.10	3.64
32	3.16	6.78	3.62
33	3.21	5.32	2.11
34	5.37	7.79	2.42
35	2.00	4.86	2.86