



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Τομέας Μητέρας-Παιδιού**

**Αιματολογία- Ογκολογία Παίδων**



**Απομόνωση και χαρακτηρισμός μεσεγχυματικών κυττάρων**

**από μυελό των οστών παιδιών με οξεία λευχαιμία**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Στέλλα Γενίτσαρη**

**Παιδίατρος**

**Ηράκλειο Κρήτης, 2018**

## **ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Δημητρίου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

Παπαδάκη Ελένη, Καθηγήτρια, Συνεπιβλέπουσα

Στειακάκη Ευτυχία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Συνεπιβλέπουσα

## **ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Δημητρίου Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα

Παπαδάκη Ελένη, Καθηγήτρια, Συνεπιβλέπουσα

Στειακάκη Ευτυχία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Συνεπιβλέπουσα

Γαλανάκης Εμμανουήλ, Καθηγητής

Τσατσάνης Χρήστος, Καθηγητής

Παπακωνσταντή Ευαγγελία, Επίκουρη Καθηγήτρια

Ποντίκογλου Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής

*Στο σύζυγό μου  
και σύντροφό μου σε όλα*

# **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

- 1. Πρόλογος**
- 2. Περίληψη**
- 3. Απόδοση περίληψης στην αγγλική γλώσσα**
- 4. Συντομεύσεις**
- 5. Γενικό μέρος**
  - 1. Αιμοποίηση**
    - 1.1 Φυσιολογική αιμοποίηση
    - 1.2 Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα
    - 1.3 Αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες
    - 1.4 Μικροπεριβάλλον μυελού των οστών - Αιμοποιητική φωλεά (niche)
  - 2. Μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος (ΜΚ)**
    - 2.1 Ιστορική αναδρομή- Χαρακτηριστικά ΜΚ
    - 2.2 Έκπτυξη ΜΚ
    - 2.3 Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός ΜΚ
    - 2.4 Φυσιολογικός ρόλος ΜΚ στο μυελό των οστών
    - 2.5 ΜΚ και ογκογένεση-λευχαιμογένεση
    - 2.6 Εφαρμογή ΜΚ στη μεταμόσχευση ιστών και στην Αναγεννητική Ιατρική
    - 2.7 Ανοσολογικές ιδιότητες ΜΚ
  - 3. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ)**
    - 3.1 Επιδημιολογία
    - 3.2 Αιτιολογία
    - 3.3 Παθογένεια
    - 3.4 Κλινική εικόνα
    - 3.5 Διάγνωση
    - 3.6 Διαφορική διάγνωση
    - 3.7 Θεραπεία
    - 3.8 Πρόγνωση
    - 3.9 Υποτροπή
  - 4. Κυτταρικός κύκλος**
  - 5. Απόπτωση**
  - 6. Αγγειοποιητίνη 1 (Angio-1)**
  - 7. Stromal cell-derived factor-1α (SDF-1α)**
- 6. Σκοπός**
- 7. Υλικό και μέθοδοι**
  - 1. Ασθενείς και υλικό**
  - 2. Απομόνωση Μονοπύρηνων Κυττάρων (MNC), Καλλιέργεια και έκπτυξη Μεσεγχυματικών Κυττάρων (ΜΚ, ΜSC) από τα δείγματα μυελού των οστών**
  - 3. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση**
  - 4. Μελέτη ικανότητας πολλαπλασιασμού (χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού, DT)**
  - 5. Μελέτη κλωνογονικότητας-ικανότητας σχηματισμού αποικιών ινοβλαστών (Colony Forming Unit-Fibroblast, CFU-F)**

**6. Μελέτη ικανότητας διαφοροποίησης και ιστοχημική ανάλυση**

- 6.1. Διαφοροποίηση MK σε λιποκύτταρα και χρώση λιποκυττάρων με Oil Red O
- 6.2. Διαφοροποίηση MK σε οστεοκύτταρα και χρώση οστεοκυττάρων με von Kossa
- 6.3. Διαφοροποίηση MK σε χονδροκύτταρα και χρώση χονδροκυττάρων με Alcian Blue

**7. Μελέτη απόπτωσης**

**8. Μελέτη κυτταρικού κύκλου**

**9. Προσδιορισμός επιπέδων των παραγόντων**

**Stroma Derived Factor-1a (SDF-1a) και Αγγειοποιητίνης-1 (Angio-1)**

**10. Στατιστική ανάλυση**

**8. Αποτελέσματα**

- 1. Μορφολογία
- 2. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση
- 3. Διαφοροποίηση
- 4. Χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού (DT)
- 5. Σχηματισμός αποικιών CFU-F
- 6. Μελέτη και ανάλυση κυτταρικού κύκλου
- 7. Μελέτη και ανάλυση απόπτωσης
- 8. Έκφραση παραγόντων SDF-1a και Angio-1

**9. Συζήτηση**

**10. Βιβλιογραφία**

**11. Βιογραφικό σημείωμα**

**12. Δημοσίευση**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο τότε Εργαστήριο Ιστικών Καλλιεργειών, Κλινική Αιματολογίας-Ογκολογίας Παιδών της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης και νυν Εργαστήριο Βιολογίας Αιματολογικών Νόσων και Καρκίνου στα παιδιά.

Ευχαριστώ την επιβλέπουσα της διατριβής μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ελένη Δημητρίου, για την επιστημονική καθοδήγηση, την επιμονή και την υπομονή της, ώστε να ολοκληρωθεί η εργασία αυτή. Για τη συνεργασία που είχαμε από την αρχή μέχρι και τώρα, για την υλική και, κυρίως, την ηθική της υποστήριξη. Την ευχαριστώ για τον πολύτιμο επαγγελματικό και προσωπικό της χρόνο που μου διέθεσε και για τις ουσιαστικές της παροτρύνσεις στα πολύ δύσκολα.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Ελένη Παπαδάκη, μέλος της συμβουλευτικής τριμελούς επιτροπής, για την αμέριστη βοήθειά της και τις πολύτιμες υποδείξεις της.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευτυχία Στειακάκη, συνεπιβλέπουσα του διδακτορικού μου, για την ουσιαστική βοήθεια της προκειμένου να προχωρήσει και να ολοκληρωθεί η διατριβή μου. Οι παραινέσεις, οι διορθώσεις και οι γνώσεις της αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι αυτής της εργασίας. Την ευχαριστώ για το πραγματικό της ενδιαφέρον και την ανεξάντλητη προθυμία της να μου παρέχει κάθε είδους βοήθεια και γνώση.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, με ειλικρινή σεβασμό, οφείλω στον Καθηγητή Παιδιατρικής Εμμανουήλ Γαλανάκη, για τις ανεκτίμητες γνώσεις του και την ευγένειά του, που αποτελούν αναφορά στην καθημερινή μου Παιδιατρική πράξη.

Ευχαριστώ από καρδιάς την Καθηγήτρια Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας Μαρία Καλμαντή, κατά τη θητεία της οποίας σχεδιάστηκε και άρχισε να υλοποιείται η διατριβή μου. Η ουσιαστική παρουσία της, η συμπαράστασή της και οι γνώσεις της αποτέλεσαν αναντικατάστατο εφόδιο για να συνεχίσω.

Θα ήταν μεγάλη μου παράλειψη να μην αναφερθώ και να μην ευχαριστήσω τη Δρ. Χρυσούλα Περδικογιάννη για την αμέριστη βοήθειά της, τις καίριες και σημαντικές παρατηρήσεις και παρεμβάσεις της, όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Βιολόγο Γεωργία Μαρτιμιανάκη, τη Δρ. Δέσποινα Χουμεριανού και την κ. Ελένη Κουταλά, για την εξαιρετικά σημαντική βοήθειά τους στους τομείς της τεχνογνωσίας, προκειμένου για την κατανόηση των μοριακών τεχνικών, της κυτταρομετρίας ροής και της ανάλυσης δεδομένων.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το κρατώ για τους γονείς μου, Βασίλη και Παναγιώτα, γιατί οι αρχές τους και η στήριξη τους με ακολουθούν σε όλη μου τη ζωή, και για την οικογένειά μου, το Γιώργο και τη Βασιλική, γιατί χωρίς αυτούς τίποτα δε γίνεται.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω το θαυμασμό μου και να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα παιδιά, τους πιο ανεπιτήδευτους και ανοιχτόμυαλους δασκάλους της ζωής.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

### **Εισαγωγή**

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος (ΜΚ) αποτελούν σημαντικό συστατικό του μυελικού μικροπεριβάλλοντος, το οποίο ρυθμίζει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, ενώ πλήρης χαρακτηρισμός τους δεν έχει επιτευχθεί. Δεδομένης της θεωρίας συμμετοχής του μικροπεριβάλλοντος του μυελού στην λευχαιμική εκτροπή, θα μπορούσε να ισχύσει η υπόθεση ότι και τα ΜΚ εμπλέκονται στη διαταραχή της φυσιολογικής αιμοποίησης. Η συμμετοχή των ΜΚ στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στα παιδιά έχει πρόσφατα προταθεί και υπάρχουν ενδείξεις ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού τους είναι επιβραδυνμένος και η ικανότητα υποστήριξης της αιμοποίησης σε μακροχρόνιες καλλιέργειες είναι επηρεασμένη.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι ο μορφολογικός, ανοσοφαινοτυπικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεσεγχυματικών κυττάρων στρώματος από μυελό των οστών παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στη διάγνωση της νόσου, ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή επίδραση της λευχαιμίας στα βιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Επίσης, θα γίνει σύγκριση των χαρακτηριστικών τους στις φάσεις θεραπείας και στο τέλος αυτής, προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της χημειοθεραπείας στα ΜΚ.

### **Μεθοδολογία**

Το υλικό της μελέτης περιλαμβάνει δείγματα μυελού των οστών (ΜΟ) από παιδιά με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) στη διάγνωση, σε διάφορες φάσεις υπό θεραπεία και στο τέλος, μετά την ολοκλήρωση της.

Μελετήθηκε η ικανότητα πολλαπλασιασμού των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων με υπολογισμό του χρόνου κυτταρικού διπλασιασμού (DT) σε όλα τα στάδια επανακαλλιέργειας, μετά από κάθε θρυψινοποίηση. Η κλωνογονικότητα των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων μελετήθηκε με την ικανότητα σχηματισμού αποικιών ινοβλαστών (CFU-F).

Για την ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των δειγμάτων προσδιορίστηκε έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων επιφανείας, χαρακτηριστικών των μεσεγχυματικών και αιμοποιητικών κυττάρων, σε διάφορα στάδια καλλιέργειας.

Η εκτίμηση της απόπτωσης και η μελέτη του κυτταρικού κύκλου έγιναν στις επανακαλλιέργειες P2 και P4 με κυτταρομετρία ροής.

Η ικανότητα των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων να διαφοροποιούνται προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα μελετήθηκε στα στάδια P2 ή P3 των καλλιεργειών. Η ιστοχημική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρώση Oil Red O για τα λιποκύτταρα, von Kossa για τα οστεοκύτταρα και Alcian Blue για τα χονδροκύτταρα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόντων SDF-1a και Angio-1 έγινε με τη μέθοδο ELISA στο υπερκείμενο των καλλιεργειών των πειραμάτων.

Για ορισμένα από τα παραπάνω χαρακτηριστικά έγινε αξιολόγηση και μετά από κατηγοριοποίηση σε ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου (MR) και σε ομάδα υψηλού κινδύνου (HR), με βάση τους προγνωστικούς παράγοντες της ΟΛΛ σύμφωνα με το πρωτοκόλλο θεραπείας.

Τα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (mean  $\pm$  standard error of the mean, SEM). Για τη στατιστική ανάλυση των

αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Στατιστικό πακέτο για εφαρμογή στις Κοινωνικές Επιστήμες (SPSS, v18.0).

### **Αποτελέσματα**

#### **Μορφολογία:**

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών εμφάνισαν στην πρώτη καλλιέργεια και διατήρησαν στις επόμενες το χαρακτηριστικό ατρακτοειδές σχήμα, χωρίς μορφολογικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων των διαφορετικών ομάδων.

#### **Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση:**

Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα μονοπύρηννα κύτταρα (D0) και στα μεσεγχυματικά κύτταρα των σταδίων P2 και P4. Δεν υπήρξαν διαφορές στην έκφραση των μονοκλωνικών αντισωμάτων μεταξύ των ομάδων. Στη διάγνωση, τα μεσεγχυματικά κύτταρα εκφράζουν σε πολύ υψηλό ποσοστό τους δείκτες CD90, CD105, CD146, CD29, CD44, CD95 και CD73, ενώ η έκφραση των αιμοποιητικών δεικτών CD34, CD45 και CD14 είναι μηδενική. Το ίδιο ανοσοφαινοτυπικό προφίλ παρέμεινε σε όλες τις φάσεις της θεραπείας, στο τέλος της χημειοθεραπείας και στην ομάδα ελέγχου.

#### **Διαφοροποίηση:**

Τα *ex vivo* εκπυγμένα μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς προς τους τρεις κυτταρικούς τύπους λιποκύτταρα (A), οστεοκύτταρα (O), χονδροκύτταρα (C). Στη διάγνωση η διαφοροποίηση και προς τις τρεις σειρές ήταν φτωχότερη σε σύγκριση με τις φάσεις θεραπείας της λευχαιμίας, όπου παρατηρήθηκε ίδια ικανότητα διαφοροποίησης με την ομάδα ελέγχου.

#### **Χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού (DT):**

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα στο κλάσμα των μονοπύρηννων κυττάρων (D0) χρειάστηκαν περισσότερες ημέρες στη διάγνωση για το σχηματισμό στρώματος. Στις επόμενες επανακαλλιέργειες, ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού ήταν παρόμοιος σε όλες τις ομάδες των δειγμάτων (διάγνωση λευχαιμίας, ημέρα 15 και 33 εισαγωγής στην ύφεση, εδραίωση της ύφεσης, διατήρηση της ύφεσης και τέλος θεραπείας). Τα αποτελέσματα αυτά, καταδεικνύουν ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα στο κλάσμα των μονοπύρηννων κυττάρων στη διάγνωση, που απαρτίζεται κυρίως από λεμφοβλάστες, παρουσιάζουν βραδύτερο ρυθμό έκπτυξης σε σχέση με τα μεσεγχυματικά κύτταρα στις φάσεις θεραπείας της λευχαιμίας και της ομάδας ελέγχου. Η μειονεκτική αυτή ικανότητα πολλαπλασιασμού αποκαθίσταται γρήγορα, με την πρόοδο των καλλιιεργειών. Διαπιστώθηκε ότι, όσο πιο προχωρημένο ήταν το στάδιο επανακαλλιέργειας, τόσο μεγαλύτερος ήταν και ο χρόνος κυτταρικού πολλαπλασιασμού (βραδύτερος ρυθμός πολλαπλασιασμού) σε όλες τις ομάδες δειγμάτων, χωρίς διαφορές μεταξύ των φάσεων της θεραπείας, αλλά και της ομάδας ελέγχου. Σε ό,τι αφορά στη μελέτη μετά από διαχωρισμό σε ομάδα υψηλού κινδύνου (HR) και ενδιάμεσου κινδύνου (MR), παρατηρήθηκε ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα των ασθενών υψηλού κινδύνου είχαν μικρότερο χρόνο κυτταρικού διπλασιασμού στη διάγνωση, στην αρχική καλλιέργεια και στα πρώτα στάδια επανακαλλιέργειας (μέχρι το P2).

#### **Σχηματισμός αποικιών CFU-F:**

Την ημέρα 0, η ικανότητα σχηματισμού αποικιών CFU-F ήταν μειονεκτική στη διάγνωση σε σχέση με τις φάσεις θεραπείας, το τέλος της χημειοθεραπείας και την ομάδα ελέγχου. Ο αριθμός των CFU-F σταδιακά αυξάνεται ήδη από τη d15, αλλά εξακολουθεί να υπολείπεται έως και τη d33 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες φάσεις θεραπείας. Το αποτέλεσμα αυτό προκύπτει από το μικρότερο αριθμό αποικιών μεσαίου και μεγάλου μεγέθους που



αναπτύσσονται. Στα αρχικά στάδια προεξάρχουν οι αποικίες μεγάλου μεγέθους, ενώ σε προχωρημένα στάδια επανακαλλιέργειας ο πληθυσμός των CFU-F αποικιών απαρτίζεται, κυρίως, από αποικίες μικρού μεγέθους. Η ελαττωμένη κλωνογονικότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων στη διάγνωση ήταν σταθερό εύρημα και παρατηρήθηκε σε όλα τα στάδια επανακαλλιέργειας. Με την πρόοδο των καλλιεργειών, ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών εμφανίζεται μειωμένος σε όλες τις φάσεις και στα δείγματα της ομάδας ελέγχου, ενώ σε προχωρημένα στάδια επανακαλλιέργειας (P4, P5) προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά. Στη μελέτη της ομάδας υψηλού κινδύνου σε σχέση με την ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών, παρά το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, τα δείγματα ασθενών υψηλού κινδύνου ανέπτυξαν λιγότερες αποικίες από τα δείγματα ασθενών ενδιάμεσου κινδύνου. Η ελαττωμένη κλωνογονικότητα στη διάγνωση παρατηρήθηκε και στην κατάταξη στις ομάδες υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου. Στο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων (MNCs) και στις 2 ομάδες κινδύνου παρατηρήθηκε μικρότερος αριθμός αποικιών CFU-F στη διάγνωση συγκριτικά με τις υπόλοιπες φάσεις, εύρημα που φαίνεται ότι οφείλεται στις αποικίες μεγάλου μεγέθους.

#### Μελέτη και ανάλυση κυτταρικού κύκλου:

Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής στα στάδια επανακαλλιέργειας P2 και P4 και, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης, το μεγαλύτερο ποσοστό των μεσεγχυματικών κυττάρων βρίσκεται σε φάση ηρεμίας.

#### Μελέτη και ανάλυση απόπτωσης:

Η μελέτη της απόπτωσης πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με 7-AAD, επίσης στα στάδια επανακαλλιέργειας P2 και P4 και επιβεβαίωσε τη σταθερότητα των ΜΚ του μυελού των οστών σε συνθήκες μακροχρόνιας καλλιέργειας, τόσο στη διάγνωση της λευχαιμίας όσο και στις φάσεις χημειοθεραπείας. Παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό απόπτωσης στις φάσεις και στο τέλος της θεραπείας σε σχέση με τη διάγνωση, με σταθερά όμως και εδώ ποσοστά στις επανακαλλιέργειες P2 και P4.

#### Έκφραση παραγόντων SDF-1α και Angio-1:

Η έκφραση του παράγοντα SDF-1α ήταν μεγαλύτερη στα κύτταρα του στρώματος και παρουσίασε μεγάλο εύρος διακύμανσης τιμών στα υπερκείμενα των καλλιεργειών των μεσεγχυματικών κυττάρων στη διάγνωση, ενώ στις φάσεις της θεραπείας η έκφρασή του ήταν πιο ομοιογενής. Στη διάγνωση της λευχαιμίας, διαπιστώθηκε μεγαλύτερο ποσοστό έκφρασης σε σχέση με τις φάσεις χημειοθεραπείας, χωρίς να υπάρξει στατιστικά σημαντική διαφορά. Επίσης, στα δείγματα της διάγνωσης, ήταν μεγαλύτερη η έκφραση του παράγοντα στους ασθενείς υψηλού κινδύνου και μικρότερη στους ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου. Στην ομάδα ελέγχου δε μελετήθηκε η έκφραση του παράγοντα.

Η έκφραση του παράγοντα Ang-1 στους υποπληθυσμούς των μονοπύρηνων και των μεσεγχυματικών κυττάρων, ήταν συγκριτικά μεγαλύτερη στα κύτταρα του στρώματος και παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά. Δε διαπιστώθηκε διαφορά στα επίπεδα του παράγοντα μεταξύ της διάγνωσης και των φάσεων θεραπείας, ενώ ήταν ανεξάρτητα από το διαχωρισμό σε ομάδα υψηλού και σε ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου στη διάγνωση και στις φάσεις χημειοθεραπείας, ενώ στο τέλος της θεραπείας προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά.

## Συζήτηση

Τα μεσεγγυματικά κύτταρα υποστηρίζουν και ρυθμίζουν την αιμοποίηση, αποτελώντας σημαντικό συστατικό του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, παρά το γεγονός ότι αποτελούν μικρό μόνο ποσοστό των εμπύρηνων κυττάρων. Η δομή που αντιπροσωπεύει την αιμοποιητική φωλεά έχει βασικό ρόλο στη λειτουργική διατήρηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και την προστασία τους από εξωγενείς βλαπτικούς παράγοντες. Η διατήρηση της ομοιόστασης του αιμοποιητικού συστήματος προϋποθέτει την ισορροπία μεταξύ αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης και απόπτωσης των αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και την αδιατάρακτη αλληλεπίδρασή τους με το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Τα ΜΚ συμμετέχουν στην οργάνωση της αιμοποιητικής φωλεάς, ασκώντας καθοριστικό ρόλο στη δέσμευση, κινητοποίηση και έξοδο των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (ΑΑΚ). Η παρουσία τους είναι απαραίτητη για την εγκατάσταση και διατήρηση των ΑΑΚ, ενώ, επιπλέον, ρυθμίζουν τη λειτουργία των αιμοποιητικών κυττάρων και διατηρούν την ομοιόσταση της φωλεάς, μέσω έκκρισης αυξητικών παραγόντων. Υπάρχουν βιβλιογραφικές ενδείξεις ότι οι αιματολογικές κακοήθειες συνδέονται με απορρύθμιση στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και ότι τα ΜΚ συμμετέχουν στη διαδικασία ανάπτυξης νεοπλασίας, είτε ενισχύοντας τη δημιουργία είτε τροποποιώντας το φαινότυπο νεοπλασιών του αιμοποιητικού συστήματος.

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία αποτελεί αγνώστου αιτιολογίας ετερογενές νόσημα του αιμοποιητικού ιστού, αποτέλεσμα συσσώρευσης μεταλλάξεων και ανώμαλου πολλαπλασιασμού των προγονικών Β λεμφοκυττάρων. Είναι ο συχνότερος κακοήθης όγκος στα παιδιά. Δεν έχει μελετηθεί πιθανός ρόλος ή η συμβολή των ΜΚ στην έναρξη της νόσου και στη μετέπειτα πορεία της καθώς και στην ανταπόκριση στη θεραπεία. Παράλληλα δε, υπάρχει το δεδομένο ότι, τα μεσεγγυματικά κύτταρα μυελού των οστών των παιδιών δεν είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα των ενηλίκων.

Τα δεδομένα που προέκυψαν για την πολλαπλασιαστική δυνατότητα, την κλωνογονικότητα και την ικανότητα διαφοροποίησης των μεσεγγυματικών κυττάρων, καταδεικνύουν ότι η διήθηση του μυελού των οστών από λεμφοβλάστες στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας επηρεάζει αυτά τα χαρακτηριστικά τους, ενώ δεν έχει επίδραση η χορήγηση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

Την τελευταία δεκαετία εγείρεται η υπόθεση ότι διαταραχές στην ρύθμισή του κυτταρικού κύκλου και στην αλληλουχία των γεγονότων της απόπτωσης οδηγούν σε γενετική αστάθεια, με αποτέλεσμα την προδιάθεση σε κακοήθη εξαλλαγή. Ειδικότερα, εκφράζεται η πιθανότητα εμπλοκής της απορρύθμισης μεταξύ πολλαπλασιασμού των κυττάρων του αίματος και της ικανότητάς τους να οδηγηθούν σε απόπτωση στην παθογένεια, αλλά και την εξέλιξη της λευχαιμίας. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν τη σταθερότητα των ΜΚ του μυελού των οστών σε συνθήκες μακροχρόνιας καλλιέργειας, τόσο στη διάγνωση της λευχαιμίας όσο και στις φάσεις χημειοθεραπείας.

Οι παράγοντες αγγειοποιητίνη-1 και SDF-1a έχουν πρόσφατα χαρακτηριστεί ως μείζονες ρυθμιστές της αλληλεπίδρασης μεταξύ προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών. Η έκφραση του παράγοντα SDF-1a στα υπερκείμενα διαλύματα των καλλιέργειών των μεσεγγυματικών κυττάρων ΜΟ παιδιών με ΟΛΛ βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στα δείγματα της διάγνωσης της λευχαιμίας σε σύγκριση με τα δείγματα των φάσεων θεραπείας, χωρίς, όμως, να προκύπτει στατιστικά

σημαντική διαφορά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση της συσχέτισης με τους προγνωστικούς παράγοντες, αφού στην ομάδα των ασθενών υψηλού κινδύνου η ποσοτική έκφραση ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την ομάδα των ασθενών ενδιάμεσου κινδύνου. Η διαφορά αυτή παύει να υφίσταται με την έναρξη της χημειοθεραπείας. Οι χαμηλότερες τιμές αγγειοποιητίνης 1 που παρατηρήθηκαν εκφράζονται στο υπερκείμενο διάλυμα των καλλιιεργειών των μεσεγχυματικών κυττάρων στη διάγνωση της λευχαιμίας και, μάλιστα, ανεξαρτήτως της ομάδας κινδύνου. Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μετά τη σύγκριση με τις φάσεις χημειοθεραπείας.

Συμπερασματικά, τα βιολογικά χαρακτηριστικά και οι λειτουργικές ιδιότητες των μεσεγχυματικών κυττάρων που μελετήθηκαν επηρεάζονται από τη διήθηση του μυελού των οστών στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, ενώ οι μεταβολές παραμένουν και στις επανακαλλιέργειες. Αντίθετα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα αναλαμβάνουν λειτουργικά με την έναρξη της χημειοθεραπείας και την επίτευξη της ύφεσης της νόσου και δεν επηρεάζονται από τη θεραπεία. Η ικανότητα έκκρισης αυξητικών παραγόντων (αγγειοποιητίνη-1) και χημειοκινών (παράγοντας SDF-1a) δεν επηρεάζεται από τη λευχαιμία.

Τα αποτελέσματα δεν μπορούν να αποσαφηνίσουν το ρόλο των μεσεγχυματικών κυττάρων στη λευχαιμογένεση και να απαντήσουν στο ερώτημα αν τα λευχαιμικά κύτταρα προστατεύονται ή εκτίθενται στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες από τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Δείχνουν, όμως, σαφώς ότι η οποιαδήποτε επίδραση του λευχαιμικού κλώνου στα βιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων είναι παροδική και παύει να υφίσταται με την έναρξη της θεραπείας.

## **SUMMARY**

### **Introduction**

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are important component of the bone marrow microenvironment which regulates the survival, proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells, while their characterization is not complete. Considering the participation of marrow microenvironment in the development and progress of leukemia, one could apply the hypothesis that MSCs are involved in abnormal hematopoiesis. MSCs involvement in acute lymphoblastic leukemia in children has recently been addressed and there are indications that the proliferation rate is slower and the support of hematopoiesis in long term cultures is affected.

The aim of this study is the morphological, immunophenotypical and functional characterization of mesenchymal stromal cells from the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia in the diagnosis of disease, in order to assess the possible effect of leukemia in biological and functional characteristics. There will further be compared with the relevant characteristics of MSC derived from different treatment phases, in order to evaluate the effect of treatment on these features.

### **Methodology**

The samples of the study include bone marrow (BM) from children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) at diagnosis, at the different phases of the treatment during the therapeutic protocol and at the end of chemotherapy after treatment completion. The control group consisted of BM samples from children with solid tumors without BM involvement.

The proliferation capacity of pluripotent mesenchymal cells was studied by cell doubling time (DT) calculation at all stages, after each trypsinization. The clonogenicity was evaluated by colony forming unit- fibroblast (CFU-F) formation. For the immunophenotypic profile the expression of surface antigens, relevant for mesenchymal and hematopoietic cells in various stages of culture was performed by flow cytometry. Apoptosis and cell cycle analysis were assessed at passages P2 and P4 with flow cytometry.

The ability of mesenchymal stromal cells to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes was studied in passages P2 or P3 of cultures. Differentiation was confirmed by histochemical analysis after staining with Oil Red O for adipocytes, von Kossa for osteocytes and Alcian Blue for chondrocytes.

SDF-1a and angiopoietin-1 levels in MSC supernatant at diagnosis and in different phases of treatment were assessed by ELISA.

For some of the above features the results were reviewed after classification of the patients into medium-risk group (MR) and high-risk group (HR), according to the prognostic factors for ALL outcome.

The results of the experiments are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) unless otherwise indicated. Differences between groups were assessed using the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. *p*-values lower than 0.05 were considered as statistically significant. For the statistical analysis the statistical package SPSS, (v18.0) was used.

## **Results**

### **Morphology:**

BM MSCs from all groups were expanded up to the fifth passage and all displayed the characteristic spindle-shape morphology. No morphological differences were observed among cells of different groups.

### **Immunophenotypic analysis:**

The immunophenotypic analysis was performed in mononuclear cells (D0) and in mesenchymal cells at passages P2 and P4. There were no differences in the expression of surface antigens among groups. At diagnosis, mesenchymal cells highly express the CD90, CD105, CD146, CD29, CD44, CD95 and CD73 markers, while there was no expression of the hematopoietic markers CD34, CD45 and CD14. The same profile remained in all phases of treatment, at the end of chemotherapy and in the control group.

### **Growth rate (DT):**

Mesenchymal cells in the fraction of mononuclear cells (D0) required several days at diagnosis to form layer. In the next passages, cell doubling time was similar in all groups (diagnosis, day 15 and 33 of therapy, consolidation therapy, maintenance and at the end of treatment). These results indicate that mesenchymal cells present in the fraction of mononuclear cells at diagnosis which, is mainly constituted of lymphoblasts, expanded more slowly compared to treatment phases and the control group, but this defect subsides with the progression of culture (more advanced P). It was found that the more advanced the passage was, the slower was the proliferation rate in all groups and there were no differences between the phases of treatment and the control group. The HR group numerically presented lower doubling time at diagnosis at the beginning of the culture and at the initial passages (P1 to P2) but the comparison of the DT between High (HR) and Medium (MR) risk patients, in each treatment group showed no statistically significant difference.

### **CFU - F development:**

On day 0, the CFU-F formation at the time of diagnosis was impaired compared to the treatment phases, the end of chemotherapy and the control group. The number of CFU-F gradually increases from d15, but continues to lag behind until d33 compared with the other phases of treatment. This result derives from the lesser number of medium and large-sized colonies that grow. In the initial stages of culture there are more large-sized colonies, while in advanced stages of the population of CFU-F colonies consist, mainly, of small-sized colonies. The reduced CFU-F development at diagnosis was a constant finding observed at subsequent passages as well. With the progress of cultures, the number of colonies formed appears reduced at all treatment phases and at the control group and became statistically significant at the later passages (P1 vs P4 or P5). Comparing clonogenicity of the risk groups there was no statistically significant difference in the total number of CFU-F although in most cases MR were producing more colonies than HR.. MSC in the fraction of mononuclear cells (MNCs) in both risk groups developed fewer colonies at diagnosis compared to other phases, finding that should be attributed to large-size colonies.

### **Differentiation capacity:**

The *ex vivo* expanded mesenchymal cells differentiated successfully into the three cell types namely adipocytes (A), osteocytes (O), chondrocytes (C). At diagnosis the differentiation capacity was defective in comparison with the treatment phases of leukemia.

#### Study and analysis of cell cycle:

Cell cycle was studied at P2 and P4 by flow cytometry and, according to the results, the higher percentage of mesenchymal cells were found in the quiescence phase.

#### Study and analysis of apoptosis:

The study of apoptosis by flow cytometry was performed after staining with 7-AAD, at either P2 or P4. . According to our results, most of the MSC from childhood ALL are in quiescence. This finding confirms the stability of bone marrow MSCs under long-term culture expansion, both at the diagnosis of leukemia and the chemotherapy phases.

#### SDF -1a and Angio -1 expression:

SDF-1a in the MSC supernatants at diagnosis was variably expressed and did not differ compared to the treatment phases, and exhibited a more uniform expression in the rest treatment phases. Its levels were higher in the high-risk (HR) group compared to the medium-risk (MR) group.

As far as Ang-1 expression is concerned, in the two cell subpopulations of MNCs and MSCs, and the different treatment groups our results showed that, similar to SDF-1a, stromal cells secreted statistically significant higher amounts of this growth factor. No difference was found in the comparison of diagnosis with treatment groups. The Ang-1 levels of the MSC population were independent of the risk group as no difference was observed between HR and MR patients.

#### **Discussion**

Mesenchymal stromal cells support and regulate hematopoiesis, constituting a major component of the bone marrow microenvironment, although they represent only a small proportion of nucleated cells. The structure that represents the hematopoietic niche has a key role in the functional maintenance of hematopoietic stem cells by protecting them from harmful external factors. Maintaining homeostasis of the hematopoietic system requires a balance between self renewal, differentiation and apoptosis of hematopoietic cells and interaction with the bone marrow microenvironment. MSCs participate in the organization of the haematopoietic niche, exercising a key role in homing, mobilization and expansion of HSCs. Their presence is necessary for the installation and maintenance of HSCs and, moreover, they regulate the normal function of hematopoietic cells and maintain homeostasis in the niche, via secretion of growth factors. There are indications that haematological malignancies are associated with deregulation in the microenvironment of the bone marrow and that MSCs participate in the process of developing neoplasia by modifying the phenotype of tumours of the hematopoietic system.

Acute lymphoblastic leukemia is a heterogeneous disease of the hematopoietic tissue, as a result of accumulation of mutations and abnormal proliferation of progenitor B lymphocytes. It is the most common malignancy in children. The potential role or contribution of MSCs in the disease onset and the subsequent course of it and in the response to treatment is not yet studied. Also, there has been shown that mesenchymal bone marrow cells of children are not similar to those of adults.

The data obtained for the proliferation capacity, the clonogenicity and the trilineage differentiation ability of mesenchymal cells, suggest that the presence of blasts in the diagnosis of acute lymphoblastic leukemia affects these characteristics, while the application of chemotherapeutic agents during treatment has no effect.

The last decade the hypothesis that disturbances in the cell cycle regulation and the sequence of events of apoptosis lead to genetic instability, resulting in predisposition to malignant transformation, is gaining interest. In particular, there is the possibility of the involvement of deregulation between self renewal of blood cells and their ability to lead to apoptosis in pathogenesis, but also in the development of leukemia. Our results confirm the stability of bone marrow MSCs in long-term culture conditions, both in the diagnosis of leukemia and in treatment phases.

Finally, we evaluated the levels of SDF-1a and Ang-1, recently revealed as major regulators in the crosstalk between hematopoietic progenitors and their microenvironment. Data reporting the expression of SDF-1a by BM MSCs in patients with hematological malignancies are limited. SDF-1a in the supernatant of MSCs at diagnosis of ALL was slightly increased compared to that from treatment phases, although this difference was not statistically verified. Interestingly, high-risk patients exhibited higher levels compared to the medium-risk ones, a difference no longer occurring upon treatment initiation. We found that the lowest amount of Ang-1 was expressed in MSC culture supernatant from diagnosis, albeit not statistically differently from treatment phases.

In conclusion, biological characteristics and functional properties of MSCs are affected at the onset of leukemia. Most defects persist throughout passages. MSCs recover after treatment initiation and remission achievement and are not affected by chemotherapy. Their secretory profile remains unaltered by the disease. The summing of these data clearly indicates that any effect on MSCs from the leukemic clones in childhood ALL is transient and ceases upon treatment initiation.

## ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

MO	:Μυελός των Οστών
ΟΛΛ	:Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία
ΧΜΘ	:Χημειοθεραπεία
MNC	:Μονοπύρρηνα Κύτταρα
MK, MSC	:Μεσεγχυματικά Κύτταρα
a-MEM	:Minimum Essential Media
FCS	:Fetal Calf Serum, ορός εμβρύου βοός
FGF-2	:Fibroblast Growth Factor-2, αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-2
EDTA	:Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
PBS	:Phosphate Buffered Saline
7-AAD	:7-αμινο-ακτινομυκίνη D
PI	:Propidium Iodide, ιωδιούχο προπίδιο
FSC	:Forward Light Scatter, πρόσθια σκεδαζόμενο φως
SSC	:Side Light Scatter, πλάγια σκεδαζόμενο φως
TMB	:Τεταμεθυλοβενζιδίνη
SEM	:Standard error of the mean, τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής
SPSS	:Στατιστικό πακέτο για εφαρμογή στις Κοινωνικές Επιστήμες
p-value	:Μεταβλητή p
DT	:Doubling Time, χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού
CFU-F	:Colony Forming Unit-Fibroblast, σχηματισμός αποικίας ινοβλαστών
SDF-1a	:Stroma Derived Factor-1a
Angio-1	:Αγγειοποιητίνη-1
HSC,AAK	:Hematopoietic Stem Cells, αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα
BFU-E	:Burst forming unit-erythroid
CFU-E	:Colony forming unit-erythroid
EPO	:Ερυθροποιητίνη
TPO	:Θρομβοποιητίνη
GM-CSF	:Granulocyte-Macrophage- Colony Stimulating Factor, αυξητικός παράγοντας των ουδετεροφίλων-μονοκυττάρων
G-CSF	:Granulocyte- Colony Stimulating Factor, αυξητικός παράγοντας των ουδετεροφίλων
IL-3	:Ιντερλευκίνη 3
IL-5	:Ιντερλευκίνη 5
IL-6	:Ιντερλευκίνη 6
ΚΝΣ	:Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
MRD	:Minimal Residual Disease, ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος



## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Αιμοποίηση

#### 1.1 Φυσιολογική αιμοποίηση

Αιμοποίηση καλείται το σύνολο των διεργασιών που επιτελούνται κατά τη συνεχή αναπαραγωγή των κυττάρων του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια). Είναι η διαδικασία γένεσης ώριμων κυττάρων που συντηρείται από μια μικρή δεξαμενή ( $1-2 \times 10^6$ /άτομο) αδιαφοροποίητων κυττάρων, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (AAK). Κατά την εμβρυική ζωή, τα κύρια αιμοποιητικά όργανα είναι το ήπαρ και ο σπλήνας, ενώ, από τα τελικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης και σε όλη την ενήλικη ζωή, κύριο αιμοποιητικό όργανο είναι ο μυελός των οστών (Ding et al., 2013).

Εικόνα 1. Φυσιολογική αιμοποίηση

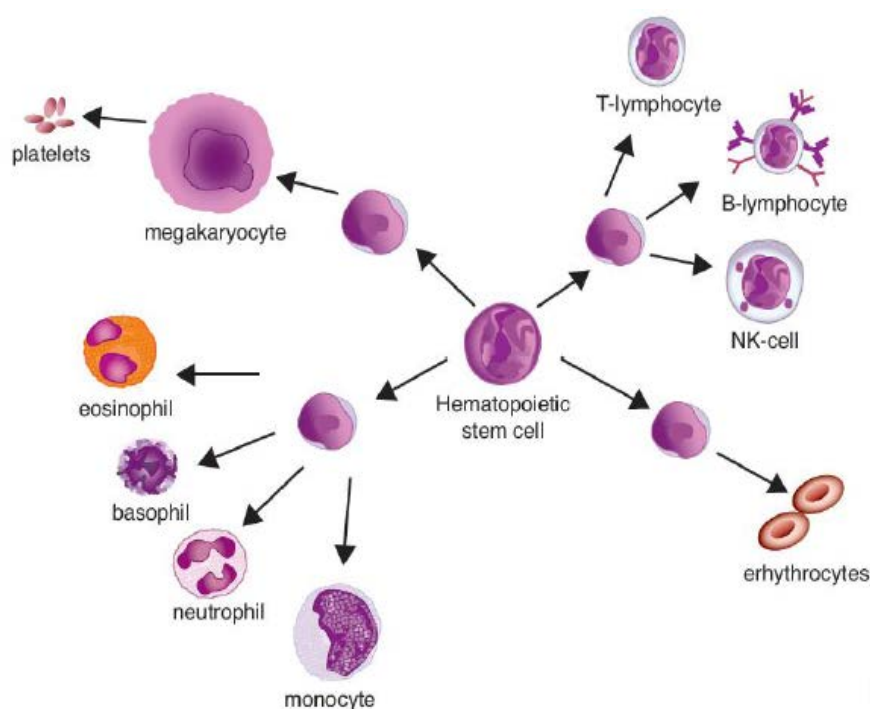
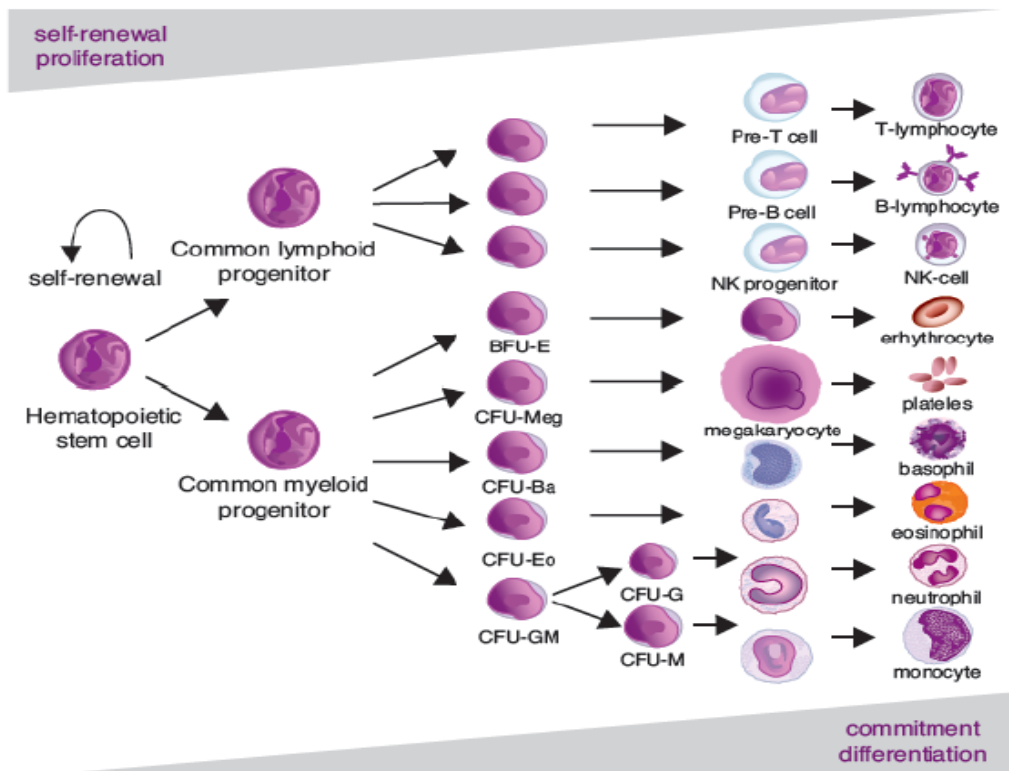


FIGURE 1:  
*Hematopoiesis.*

(Από: ASHImageBank, at: [ashimagebank.hematology.org](http://ashimagebank.hematology.org))



(Από: ASHImageBank, at: [ashimagebank.hematology.org](http://ashimagebank.hematology.org))

## 1.2 Αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από τις εξής βασικές ιδιότητες:

- α) ικανότητα αυτοανανέωσης (self renewal capacity), ώστε να διατηρείται σταθερός ο πληθυσμός τους
- β) ικανότητα παραγωγής απογόνων όλων των αιμοποιητικών σειρών (pluripotential capacity)
- γ) ικανότητα διαφοροποίησης σε πιο ώριμα προγονικά κύτταρα τα οποία προορίζονται για συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (differentiation capacity)
- δ) ικανότητα να παραμένουν σε ηρεμία (quiescence, G<sub>0</sub> φάση) σε συνεχή ισορροπία με την έκφραση αυξητικών αιμοποιητικών παραγόντων. Ανάλογα με τις προκύπτουσες ανάγκες του οργανισμού, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα δεσμεύονται προς μια αιμοποιητική κυτταρική σειρά και καταλήγουν σε ώριμα κύτταρα συγκεκριμένης σειράς.
- ε) ικανότητα να αποκαταστήσουν την αιμοποίηση πχ μετά από μεταμόσχευση (Gomes et al., 2016, Shen et al., 2012)

Συχνά αποτελούν στόχο για μεταλλαγή σε λευχαιμικά κύτταρα.

Τα προγονικά (progenitor) κύτταρα σε αντίθεση με τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα:

- α) δεν αυτοανανεώνονται
- β) έχουν περιορισμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα
- γ) εμφανίζουν μη αναστρέψιμη διαφοροποίηση προς κάποια σειρά

δ) δεν έχουν ικανότητα να αποκαταστήσουν την αιμοποίηση (πχ μετά από μεταμόσχευση)(Gomes et al., 2016)

Ιστορικά, η πρώτη αναφορά στην ύπαρξη ενός αρχέγονου πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου με δυνατότητα γένεσης όλων των αιμοποιητικών σειρών έγινε το 1898 (θεωρία Parrenheim). Η θεωρία επιβεβαιώθηκε το 1961 από τους McCulloch και Till, οι οποίοι περιέγραψαν το πρώτο αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen), το οποίο ήταν ικανό να δώσει αποικίες αιμοποιητικών κυττάρων της ερυθράς και της κοκκιώδους σειράς στο σπλήνα θανατηφόρα ακτινοβολημένου ποντικού, μετά από έγχυση καλλιεργημένων κυττάρων μυελού των οστών. Η κλωνικότητα (κοινή προέλευση από έναν πρόγονο) των κυττάρων των σπληνικών αποικιών αποδείχθηκε με την παρουσία χρωμοσωμικής ανωμαλίας, ως αποτέλεσμα της ακτινοβολίας.

Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα ανήκουν στα μονοπύρρηνα και έχουν μορφολογία λεμφοκυττάρου. Δεν είναι μορφολογικά αναγνωρίσιμα κύτταρα και η ταυτοποίησή τους γίνεται έμμεσα με την ανίχνευση ειδικών δεικτών/αντιγόνων επιφανείας (ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες), τη μελέτη του σχηματισμού αποικιών μετά από καλλιέργεια και τα πειραματικά μοντέλα επαναποικισμού του μυελού των οστών.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χαρακτηρίζουν τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα είναι τα:

-CD34

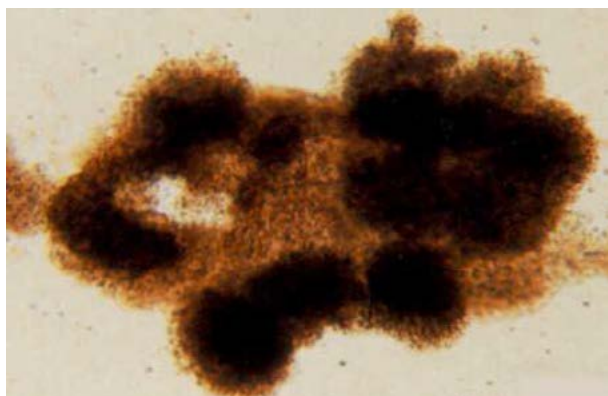
-CD90, TPO, c-kit ligand, Flt3 ligand (υποδοχείς κυτταροκινών, υπομεμβρανικά μόρια)

-μόρια προσκόλλησης και οι υποδοχείς αυτών

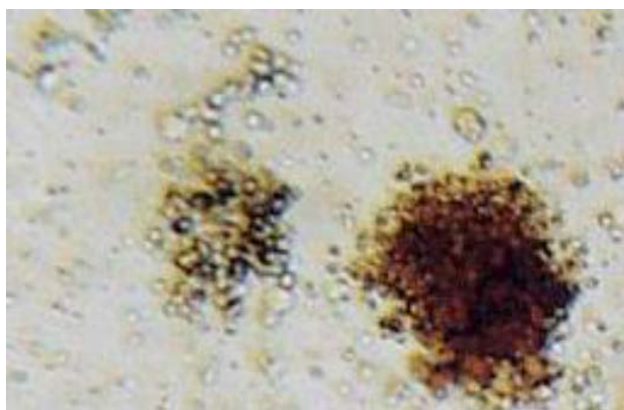
Οι ανοσοφαινοτυπικοί δείκτες μεταβάλλονται ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης.

Η κλωνογονική ικανότητα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ελέγχεται μετά από καλλιέργεια σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Τα αιμοποιητικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, σχηματίζοντας ευδιάκριτες συναθροίσεις κυττάρων (αποικίες) και αυτά τα κύτταρα χαρακτηρίζονται ως κλωνογόνα προγονικά κύτταρα (colony forming cells-CFC). Τα κύτταρα των αποικιών διαφοροποιούνται καθώς πολλαπλασιάζονται, με αποτέλεσμα, μετά από ορισμένο χρόνο, να έχουν ωριμάσει στο σύνολό τους και το μέγεθος της αποικίας να παραμένει σταθερό (αν παραμείνουν σε καλλιέργεια, θα ακολουθήσει απόπτωση των ώριμων κυττάρων). Αυτό το χαρακτηριστικό πρότυπο ανάπτυξης των αποικιών, μας δίνει τη δυνατότητα να αναγνωρίσουμε τα στάδια ανάπτυξης των προγονικών κυττάρων, αφού όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος μιας αποικίας τόσο πιο άωρα είναι τα κύτταρα που τη σχημάτισαν (μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού). Η ιδιότητα αυτή φαίνεται χαρακτηριστικά στις αποικίες της ερυθράς σειράς, οι οποίες διακρίνονται σε BFU-E (burst forming unit-erythroid) και CFU-E (colony forming unit-erythroid) και διαφέρουν στο ότι τα BFU-E αποτελούν πρωιμότερα κύτταρα, με υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και ικανότητα σχηματισμού μεγαλύτερων αποικιών.

**Εικόνα 2.** Αποικία BFU-E



**Εικόνα 3.** Αποικίες CFU-E



### **1.3 Αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες**

Κατά τη διαδικασία της φυσιολογικής αιμοποίησης και σε όλα τα στάδια διαφοροποίησης και παραγωγής των έμμορφων στοιχείων του αίματος, ενεργοποιούνται αυξητικοί αιμοποιητικοί παράγοντες, οι οποίοι επάγουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, μετά από σύνδεση με τους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς. Δρουν σε διαφορετικά στάδια της αιμοποίησης και η δράση τους είναι πλειοτροπική (ένας παράγοντας μπορεί να δράσει σε περισσότερα του ενός είδη κυττάρων και αντιστρόφως πολλοί παράγοντες μπορούν να δράσουν σε ένα είδος κυττάρων). Ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι πλήρως καθορισμένος, όμως φαίνεται ότι δρουν είτε ως μιτογόνα, επάγοντας την κυτταρική διαίρεση, είτε συντηρούν τον πληθυσμό των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, αναστέλλοντας την απόπτωση. Μπορεί να έχουν είτε ενδοκρινή είτε παρακρινή είτε αποκρινή τρόπο δράσης (Pelagiadis et al., 2015). Πρέπει να τονιστεί ότι αρκετές από τις πρωτεΐνες των ογκογονιδίων είναι στην πραγματικότητα πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες ή υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων, γεγονός που

δείχνει ότι παρέκκλιση της έκφρασης των παραγόντων ή των υποδοχέων τους μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και εμφάνιση υπερπλασίας ή κακοήθειας.

Διακρίνονται σε:

-αυτούς που διατηρούν την αρχεγονότητα και προάγουν την επιβίωση των HSC:

SCF, IL-6, IL-9, LIF, TPO, Flt-3ligand

-αυτούς που προάγουν τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των HSC:

GM-CSF, CSF-1, IL-3, IL-4, IL-11, EPO

-αυτούς που έχουν ανασταλτική ρυθμιστική δράση στην αιμοποίηση:

TGF-β, MIP-1, IFNγ, TNFα

**SCF:** το γονίδιό του εδράζεται στο χρωμόσωμα 12q22-24, ενώ ο υποδοχέας του (c-kit ligand) ανήκει στην υπερικογενεία τυροσινικής κινάσης τύπου-I. Ευοδώνει την κυτταρική επιβίωση, αναστέλλοντας την p53 εξαρτώμενη απόπτωση, όχι όμως και την p53 προκαλούμενη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/S. Στα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, ενώ στις καλλιέργειες εμφανίζει συνέργεια με τους αυξητικούς παράγοντες IL-3, GM-CSF και τον υποδοχέα Flt-3ligand. Έκφραση του υποδοχέα του c-kit έχει βρεθεί σε κύτταρα στρώματος μυελού των οστών, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και λευχαιμικές κυτταρικές σειρές. Οι παράγοντες TGF-β και IL-4 αναστέλλουν την έκφραση του c-kit, ενώ δεν έχει αναγνωριστεί κυτοκίνη που να την επάγει. Σε καλλιέργειες κυττάρων στρώματος μυελού των οστών η έκφραση του SCF ποικίλει, όμως σε καλλιέργειες μακράς διάρκειας δε διαπιστώνεται σημαντική δραστηριότητα στο υπερκείμενο, παρά το γεγονός ότι παράγεται διαλυτός παράγοντας, πιθανόν λόγω αποθήκευσής του στην εξωκυττάρια ουσία και μεταφοράς του στα στελεχιαία κύτταρα. Τα κύτταρα στρώματος επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται για ημέρες ή εβδομάδες χωρίς να διαφοροποιούνται, ενώ αυτά που δεν είναι σε επαφή με την εξωκυττάρια ουσία αποπίπτουν (Linnekin et al., 1997). Σχετικά με την κλωνογονικότητα, δρα συνεργικά με τους παράγοντες IL-3, GM-CSF, EPO, TPO υποστηρίζοντας την ανάπτυξη αποικιών BFU-E, CFU-GEMM, CFU-Mk.

**IL-3:** πρόκειται για πολυδύναμο αυξητικό παράγοντα, με ποικίλες άμεσες και έμμεσες δράσεις στη διαδικασία της αιμοποίησης. Συντίθεται και εκκρίνεται από ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα και εμφανίζει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στη διαφοροποίηση κυττάρων της ερυθράς σειράς και προγονικών μεγακαρυοκυττάρων. Επάγει το σχηματισμό πολυδύναμων αποικιών σε καλλιέργειες προγονικών κυττάρων μυελού των οστών, όμως η δράση της μεγιστοποιείται σε συνδυασμό με άλλους αυξητικούς παράγοντες, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι η δράση της στα ώριμα αιμοποιητικά κύτταρα αντανακλά την ιδιότητά της να επάγει την έκφραση άλλων κυτταροκινών, οι οποίες είναι και αυτές που τελικά δρουν. Σε συνθήκες καλλιέργειας, εμφανίζει περιορισμένη, ικανότητά να προάγει την ωρίμανση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων προς ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα και προκύπτει αναγκαιότητα παρουσίας των αυξητικών παραγόντων G-CSF, GM-CSF για τα ουδετερόφιλα και M-CSF, GM-CSF για τα μονοκύτταρα, που δρουν σε πιο ώριμα στάδια της αιμοποίησης, για την τελική παραγωγή αυτών των κυττάρων.

**IL-5:** υποστηρίζει το σχηματισμό, την ανάπτυξη και την ωρίμανση των προγονικών κυττάρων των ηωσινοφίλων.

**IL-6:** πρόκειται για κυτταροκίνη με εξαιρετικό πλειοτροπισμό. Συμμετέχει στην ευόδωση του πολλαπλασιασμού των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ενώ έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των T και B κυττάρων. Πιθανότατα δρα σε πρώιμο στάδιο διαφοροποίησης και ενεργοποιεί τα προγονικά κύτταρα, αφού συνεργάζεται με παράγοντες που δρουν σε πρώιμα στάδια. Η επάρκειά της θεωρείται αναγκαία για την επιβίωση των προγονικών και των πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων πολλών σειρών, ενώ συνεισφέρει στην αποκατάσταση της αιμοποίησης μετά από ακτινοβολία/ χημειοθεραπεία, μειώνοντας τη φάση της μυελοκαταστολής. Από τις πρώιμα αναγνωρισμένες ιδιότητές της είναι η επαγωγή της μεγακαρυοποίησης (*in vitro* και *in vivo*) με ενίσχυση της ωρίμανσης των μεγακαρυοκυττάρων και όχι του πολλαπλασιασμού αυτών.

**EPO:** η ερυθροποιητίνη είναι γλυκοπρωτεΐνη, παράγεται κυρίως στους νεφρούς και λιγότερο στο ήπαρ και υποστηρίζει την ανάπτυξη και ωρίμανση των ερυθροκυττάρων. Δρα με δύο μηχανισμούς, εμποδίζοντας την απόπτωση και επάγοντας τη διαφοροποίηση, ενώ συμμετέχει και στο σχηματισμό των μεμβρανικών πρωτεϊνών, αίμης και σφαιρίνης. Από τις αποικίες της ερυθράς σειράς, οι CFU-E εκφράζουν υποδοχείς EPO σε ποσοστό 80%, οι BFU-E έχουν μικρή έκφραση, ενώ η έκφραση σταδιακά μειώνεται όσο προχωρά η ωρίμανση της ερυθράς σειράς, ώστε στο στάδιο της ορθοχρωματικής ερυθροβλάστης οι εναπομείναντες υποδοχείς να είναι ελάχιστοι. Αποτελεί ισχυρό παράγοντα επιβίωσης των CFU-E, αφού επί απουσίας της αποπίπτουν εξαιρετικά γρήγορα.

**TPO:** η θρομβοποιητίνη είναι γλυκοπρωτεΐνη, παράγεται κυρίως στο ήπαρ και λιγότερο στους νεφρούς, αρχικά σαν πρόδρομη πρωτεΐνη 353 αμινοξέων, ενώ το λειτουργικό μόριο προκύπτει με την αποκοπή ενός πεπτιδίου μήκους 21 αμινοξέων (Geddis et al., 2002). Μικρή συμμετοχή στην παραγωγή της έχουν και τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών. Υποστηρίζει την ανάπτυξη και ωρίμανση των προγονικών κυττάρων των μεγακαρυοκυττάρων και την παραγωγή λειτουργικών αιμοπεταλίων, ενώ ασκεί συνεργική δράση στην ανάπτυξη των πρόδρομων κυττάρων της κοκκιδώδους και της ερυθράς σειράς, όταν συνδυάζεται με άλλους αυξητικούς παράγοντες όπως η EPO και ο SCF (Sitnicka et al., 1996). Έχει περιγραφεί δράση θρομβοποιητίνης και σε άλλους αυξητικούς αιμοποιητικούς παράγοντες, όπως ο GM-CSF, ο SCF και οι ιντερλευκίνες IL-1, IL-3, IL-6, IL-11 (Kuter et al., 2002). Η *in vitro* επίδραση της TPO στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα αντικατοπτρίζεται και *in vivo* όταν, με την γονιδιακή απαλοιφή αυτής ή του υποδοχέα της, παρατηρείται εξάντληση των πολυδύναμων και των δεσμευμένων αιμοποιητικών κυττάρων πολλαπλών σειρών (Kaushansky et al., 1996).

**GM-CSF:** ο αυξητικός παράγοντας των ουδετεροφίλων-μονοκυττάρων είναι γλυκοπρωτεΐνη, που παράγεται από T- λεμφοκύτταρα και ασκεί αποτελεσματική επαγωγική δράση στο σχηματισμό αποικιών κοκκιοκυττάρων και μονοκυττάρων.

**G-CSF:** ο αυξητικός παράγοντας των ουδετεροφίλων παράγεται από τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών, μονοκύτταρα και μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες και επάγει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση της κοκκιδώδους σειράς και τον τελικό σχηματισμό των ουδετεροφίλων και την ενεργοποίησή τους. Επιπλέον, δρα συνεργικά με άλλους αυξητικούς παράγοντες (GM-CSF, IL-3, IL-6)

κινητοποιώντας τα προγονικά κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία στο μυελό των οστών, ενώ εμφανίζει άμεση επίδραση στον πολλαπλασιασμό και στην ωρίμανση της μεγακαρυωτικής κυτταρικής σειράς (σαφώς ασθενέστερη δράση από τη θρομβοποιητίνη). Στην κλινική πράξη, η χρήση του παράγοντα μειώνει την ουδετεροπενία και τις επιπλοκές της και προκαλεί παροδική κινητοποίηση των αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων στο αίμα, ιδιότητα η οποία βρίσκει ευρεία χρήση στη συλλογή μοσχευμάτων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων περιφερικού αίματος για αυτόλογη και αλλογενή μεταμόσχευση.

**FGF:** οι ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες αντιπροσωπεύουν μια από τις ευρύτερες οικογένειες πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων και παραγόντων διαφοροποίησης κυττάρων με μεσοδερμική και νευροεκτοδερμική προέλευση, που περιλαμβάνει 23 διαφορετικά μέλη, μεταξύ αυτών τον όξινο και το βασικό ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα (FGF-1 και FGF-2, αντίστοιχα). Είναι μιτογόνοι παράγοντες για τα επιθηλιακά, μεσεγχυματικά και νευροεκτοδερμικά κύτταρα, λειτουργίες απαραίτητες κατά την οργανογένεση στο έμβρυο. Στην ενήλικη ζωή, συμμετέχουν στη φλεγμονώδη διαδικασία, στην επούλωση ιστών, στην αιμοποίηση και στην αγγειογένεση. Μια από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες λειτουργίες τους είναι η παραγωγή νέων αιμοφόρων αγγείων κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης όγκων και η αύξηση της διηθητικότητας συγκεκριμένων καρκινικών τύπων (προστάτη, κύστεως, νεφρών, μαστού, παγκρέατος)..

Ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF-2) αλληλεπιδρά με ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και χαρακτηρίζεται από την έλλειψη αλληλουχίας σήματος για την έκκρισή του. Διευκολύνει τη μετανάστευση των κυττάρων και τη μιτογένεση και ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, ενώ στο αιμοποιητικό σύστημα διεγείρει την παραγωγή κοκκιοκυττάρων και μεγακαρυοκυττάρων και προάγει την επιβίωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, ασκώντας αντιαποπτωτική δράση. Συμμετέχει τόσο στην φυσιολογική όσο και στην παθολογική αιμοποίηση και έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προάγει την μυελοποίηση σε καλλιέργειες. Κύτταρα του μυελού των οστών που παράγουν FGF-2 είναι οι ινοβλάστες, τα μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος και τα κύτταρα των αιμοποιητικών σειρών. Επιπλέον, ο βασικός FGF είναι παρών σε πολλά καρκινικά κύτταρα και καρκινικές κυτταρικές σειρές, γεγονός που υποδεικνύει τη συσχέτισή του με την νεοπλασματική αγγειογένεση (κυριότερος παράγοντας μαζί με τον VEGF). Με δεδομένο το ευρύ φάσμα δράσης του FGF-2 και το γεγονός ότι η απορρύθμιση του παράγοντα ή των υποδοχέων του μπορεί να συνδέεται με αρκετά νοσήματα, διαφαίνεται η χρησιμότητά του ως δυναμικού θεραπευτικού παράγοντα (στένωση στεφανιαίων αγγείων, έμφραγμα μυοκαρδίου, δωδεκαδακτυλικό έλκος, τραύματα δέρματος και οφθαλμών).

#### **1.4 Μικροπεριβάλλον μυελού των οστών- Αιμοποιητική φωλεά (niche)**

Ο μυελός των οστών αποτελεί ένα πολύπλοκο δίκτυο ενδοθηλιακών και μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων, περιλαμβανομένων των αρχέγονων και προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων, των οστεοκυττάρων (οστεοβλάστες και οστεοκλάστες), των χονδροκυττάρων και των λιποκυττάρων, αλλά και μεγακαρυοκυττάρων, μακροφάγων και κυττάρων του συμπαθητικού συστήματος (Beerman et al., 2017).

Ο όρος αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον αναφέρεται στο υπόστρωμα του μυελού των οστών που επάγει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των αιμοποιητικών προ-βαθμίδων και ρυθμίζει τη ροή των ώριμων αιμοποιητικών κυττάρων στην κυκλοφορία. Σχηματικά, πρόκειται για ένα τρισδιάστατο πλέγμα αποτελούμενο από ινώδη ιστό, αγγεία και κύτταρα που συγκρατούνται από άμορφη εξωκυττάρια πρωτεϊνική ουσία (matrix), με κύρια λειτουργία τη διατήρηση της ομοιόστασης του αιμοποιητικού ιστού. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εντοπίζονται στην ενδοοστική επιφάνεια των μακρών οστών σε εγγύτητα με τους οστεοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα που επικαλύπτουν τα αιμοφόρα αγγεία και αυτή η δομή αντιπροσωπεύει τις αιμοποιητικές φωλεές, ο βασικός ρόλος των οποίων είναι η λειτουργική συντήρηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και η προστασία από εξωγενείς βλαπτικούς παράγοντες. Το 1978, πρώτος ο Schofield εισήγαγε την έννοια της φωλεάς στο αιμοποιητικό σύστημα, όμως το ερέθισμα για την αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος δόθηκε με τις μελέτες στον οργανισμό *Drosophila* το 2002 (Lander et al., 2012). Οι αιμοποιητικές φωλεές διακρίνονται σε ενδοοστικές και αγγειακές (Scadden, 2006), που συσχετίζονται με τα αδρανή και τα ενεργοποιημένα AAK αντίστοιχα. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η ενδοστική φωλεά, λόγω του χωροταξικού εντοπισμού της, επιτελεί λειτουργικό και ρυθμιστικό ρόλο στη φυσιολογική αιμοποίηση, ενώ η αγγειακή φωλεά λειτουργεί ως «πύλη» μετανάστευσης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Ειδικότερα, στην ενδοστική φωλεά τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα συνδέονται με σταθερές διακυτταρικές συνδέσεις, μέσω της N-καντερίνης. Οι οστεοβλάστες ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των AAK διατηρώντας τα σε κατάσταση ηρεμίας, μέσω της έκφρασης της αγγειοποιητίνης, της θρομβοποιητίνης και του παράγοντα SDF-1 και ευοδώνοντας την αυτοανανέωσή τους, μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού Notch (Arai et al., 2012, Calvi et al., 2003). Η ενδοστική φωλεά δεν αποτελεί σταθερή δομή, αλλά εμφανίζει πλαστικότητα στα πλαίσια τόσο της αυτορρύθμισης όσο και της συστηματικής ρύθμισης, παρά το γεγονός ότι τα οστά είναι σκληρά και άκαμπτα όργανα. Πρόκειται λοιπόν για σχηματισμό ευάλωτο στην επίδραση της ακτινοβολίας ή/και της χημειοθεραπείας, όμως οι βλάβες και η ομοιόστασή της αποκαθίστανται ταχύτατα. Από την άλλη πλευρά, η αγγειακή φωλεά ρυθμίζει τη διαφοροποίηση και την κινητοποίηση των AAK στην περιφερική κυκλοφορία (Nakamura-Ishizu et al., 2013). Ρυθμιστές των λειτουργιών αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων αποτελούν οι παράγοντες VCAM-1, SCF, τα ιόντα ασβεστίου και η πίεση O<sub>2</sub> (Mendez-Ferrer et al., 2010).

Παρά την ανατομική διάκριση (ενδοστική και αγγειακή), η θεωρία της ύπαρξης δύο ξεχωριστών και διαφορετικών φωλεών τείνει να αντικατασταθεί από την υπόθεση ότι μεταξύ ενδοστικής και αγγειακής φωλεάς υφίστανται στενές επαφές και αλληλεπιδράσεις και ότι τα AAK μπορούν με σχετική ευκολία να κυκλοφορούν ανάμεσα στα δύο τμήματα και λαμβάνουν ετερόπλευρα σήματα ταυτόχρονα (Trumpf et al., 2010, Kopp et al., 2005). Άλλωστε, η ενδοστική περιοχή παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή αγγειοβρίθεια.

Τα κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών διακρίνονται σε εγγενή (αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα, λιποκύτταρα, ιστικά μακροφάγα), που σχηματίζουν το στρώμα και σε κύτταρα που αποικίζουν το μικροπεριβάλλον (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα). Αυτοί οι κυτταρικοί πληθυσμοί παράγουν κυτταροκίνες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και διαφοροποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων.

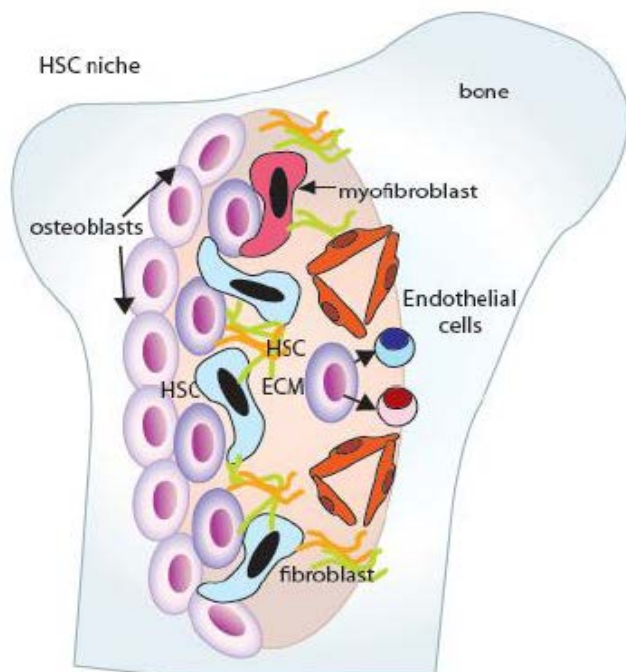


Τα μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος εμφανίζουν ετερογένεια σε ό,τι αφορά την προέλευση, τους δείκτες και τη λειτουργία τους, οπότε θα πρέπει να απομονωθούν οι ειδικοί υποπληθυσμοί της αιμοποιητικής φωλεάς και να καθοριστούν οι αλληλεπιδράσεις τους και οι λειτουργίες τους στη ρύθμιση των ΑΑΚ.

Στο εξωκυττάριο στρώμα σημαντικό ρόλο έχουν οι πρωτεΐνες κολλαγόνο VI, κολλαγόνο IV, φιβρονεκτίνη και τενασίνη-C. Ειδικότερα, το κολλαγόνο VI είναι βασικό συστατικό του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών διότι αποτελεί ισχυρό υπόστρωμα προσκόλλησης για διάφορους τύπους αιμοποιητικών κυττάρων (Klein et al., 1995, ενώ η τενασίνη-C είναι απαραίτητη για την ορθή ανανέωση του αιμοποιητικού ιστού διότι προωθεί τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo* (Nakamura-Ishizu et al., 2012).

Η διατήρηση της ομοιόστασης του αιμοποιητικού συστήματος προϋποθέτει την ισορροπία μεταξύ αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης και απόπτωσης των αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και την αδιατάρακτη αλληλεπίδρασή τους με το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Τα κύτταρα της αιμοποιητικής φωλεάς διασφαλίζουν τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από υπέρμετρο πολλαπλασιασμό, που θα οδηγούσε σε ανάπτυξη νεοπλασίας, αλλά και από τη συσσώρευση γονιδιακών μεταλλάξεων, που θα οδηγούσαν στη νεοπλασματική εκτροπή τους. Αυξανόμενες ενδείξεις προτείνουν ότι η απορρύθμιση της αιμοποιητικής φωλεάς κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην παθογένεια εκφυλιστικών νοσημάτων και νεοπλασιών του αιμοποιητικού συστήματος (Jones et al., 2008).

**Εικόνα 4.** Μικροπεριβάλλον μυελού των οστών-Αιμοποιητική φωλεά



**FIGURE 6:**

*Bone marrow microenvironment.*

(Από: ASHImageBank, at: [ashimagebank.hematology.org](http://ashimagebank.hematology.org))

Για τη ρύθμιση της αιμοποίησης λειτουργεί ένα πολύπλοκο αλλά αποτελεσματικό δίκτυο επικοινωνίας ανάμεσα στα αιμοποιητικά κύτταρα και τα κύτταρα του στρώματος, είτε με άμεση επαφή μέσω επιφανειακών υποδοχέων, είτε μέσω κυτταροκινών. Η αιμοποιητική φωλεά δεν είναι στατικός σχηματισμός, αλλά ανταποκρίνεται σε ερεθίσματα από το μικροπεριβάλλον και υπόκειται σε διαρκή επαναδιαμόρφωση, πιθανότατα με κιρκάδιο ρυθμό.

Δύο ομάδες κυττάρων, οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της δυναμικής του σκελετικού συστήματος.

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από τα μεσεγχυματικά κύτταρα, είναι τα βασικά κύτταρα σχηματισμού των οστών και αποτελούν κύρια λειτουργικά κύτταρα και κρίσιμους ρυθμιστές της ενδοστικής φωλεάς, αν και η ετερογένειά τους χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, κατά την ωρίμανσή τους, διασχίζουν την εσωτερική επιφάνεια του ενδόστεου του μυελού των οστών, το οποίο είναι επενδυμένο με οστεοβλάστες σε ειδική χωροταξική πόλωση και δρα σαν φυσικός «οικότοπος», παραμένοντας ενεργός ακόμα και μετά από έκθεση σε ακτινοβολία (θανατηφόρα) ή χημειοθεραπεία. Όταν πάψει να υφίσταται η επαφή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων με του οστεοβλάστες, αυτά χάνουν την ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποιούνται στους αντίστοιχους κυτταρικούς πληθυσμούς, ανάλογα με τη δέσμευσή τους.

Οι οστεοκλάστες είναι βασικοί αρνητικοί ρυθμιστές της οστεογένεσης, συμμετέχοντας στη δυναμική διαδικασία αποδόμησης και ανασύνθεσης του οστού, σε απάντηση ερεθισμάτων και απαιτήσεων του οργανισμού σε ασβέστιο. Παράγουν μια σειρά ενζύμων, με κύριο εκπρόσωπο την όξινη φωσφατάση, τα οποία αποδομούν οργανικά συστατικά (κολλαγόνο) και ανόργανα συστατικά (ασβέστιο, φωσφόρος), επάγοντας την «επαναρρόφηση» του οστού. Θεωρούνται απαραίτητοι για τη συντήρηση και την κινητοποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων. Μετέχουν στην κινητοποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, μέσω ενζυμικής διάσπασης ενδοστικών συστατικών, ενώ σε καταστάσεις αναστολής της λειτουργίας των οστεοκλαστών, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα δεν διατηρούν τη φάση ηρεμίας του κυτταρικού τους κύκλου και ο συνολικός πληθυσμός τους ελαττώνεται.

Δεδομένα της συμμετοχής των κυττάρων του στρώματος στη ρύθμιση των AAK προέρχονται από τις μελέτες των Araí και συν. το 2004 και των Nilsson και συν. το 2005. Οι πρώτοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οστεοβλάστες με έκφραση της Angio-1 και AAK με έκφραση του Tie-2 συν-εντοπίζονται στην αιμοποιητική φωλεά (τα σηματοδοτικά μόρια Tie-2/ Angio-1 προάγουν την παραμονή των AAK σε κατάσταση ηρεμίας). Οι δεύτεροι έδειξαν ότι η γλυκοπρωτεΐνη του στρώματος οστεοποντίνη, που εκφράζεται από τους οστεοβλάστες του ενδόστεου, είναι αρνητικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των AAK.

Το αν η δέσμευση των αρχέγονων και προγονικών κυττάρων στην αιμοποιητική φωλεά είναι μονόδρομος ή αποτελεί αναστρέψιμο γεγονός, μένει να απαντηθεί. Η μελέτη των Baba και συν. (2005) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεσμευμένα προγονικά αιμοποιητικά κύτταρα που εκφράζουν β-κατενίνη μπορούν να επανακτήσουν ορισμένες ιδιότητες των αρχέγονων κυττάρων.

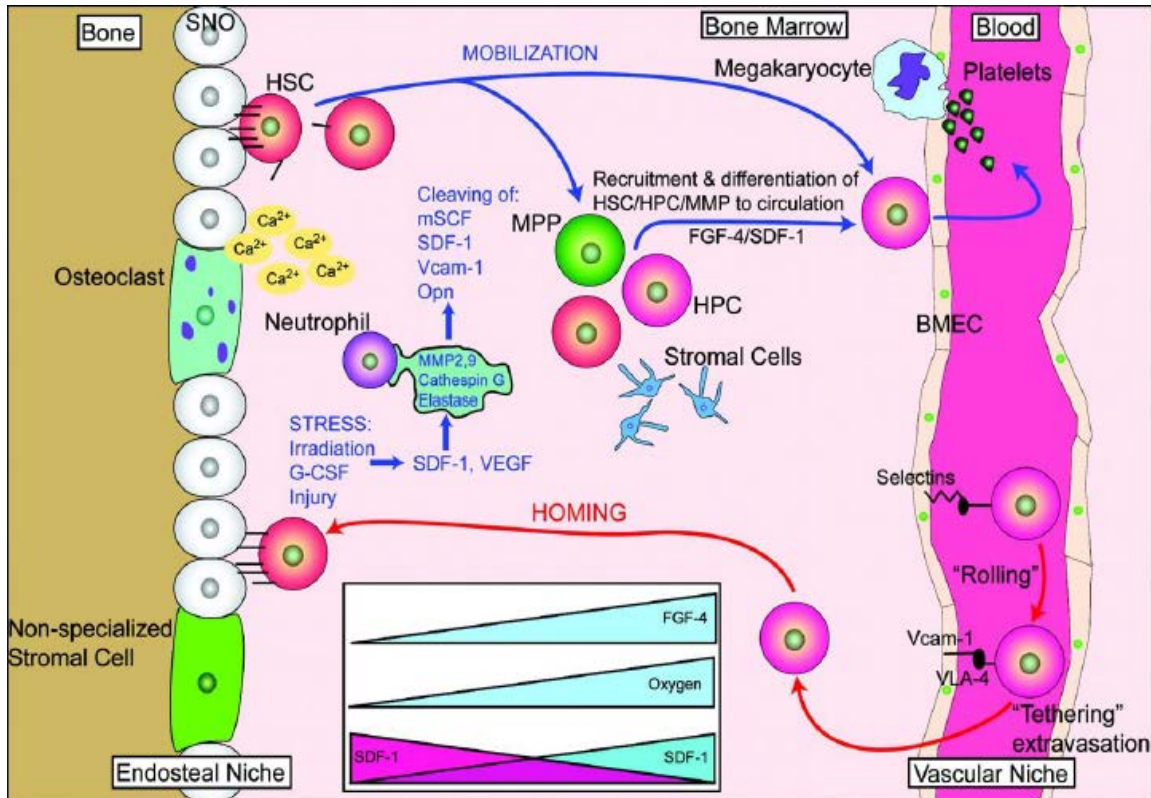
Είναι γνωστό ότι αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εντοπίζονται και σε ιστούς χωρίς οστεοβλάστες. Επομένως, παραμένει να καθοριστεί η συμμετοχή των κυττάρων του στρώματος και των περιαγγειακών κυττάρων στη λειτουργία της αιμοποιητικής φωλεάς. Σε

πειράματα που έγιναν σε διαγονιδιακούς ποντικούς στους οποίους είχαν αφαιρεθεί οι οστεοβλάστες (Visnjic et al., 2004), ο μυελός των οστών ήταν απλαστικός και έλαβε χώρα εκσεσημασμένη εξωμυελική αιμοποίηση, μελέτη που εγείρει ερωτηματικά για τον εντοπισμό αιμοποιητικών φωλεών και σε άλλους ιστούς. Το αν οι απομακρυσμένες φωλεές περιέχουν ενεργά AAK δεσμευμένα προς διαφοροποίηση και το αν τα AAK μπορούν να διακινούνται μεταξύ των διαφορετικών φωλεών, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, αν και έχει προταθεί (Wright et al., 2001) ότι τα AAK κυκλοφορούν και επιστρέφουν στο μυελό των οστών.

Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να κατευθυνθεί στη ανάπτυξη *in vitro* συστημάτων που να αναπαριστούν με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια τις *in vivo* λειτουργίες της αιμοποιητικής φωλεάς και θα πρέπει να διευκρινιστεί ο τρόπος με τον οποίο συνδυάζονται τα ενδοφωλεακά σήματα που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο και οι μακρομοριακές ανοσολογικές συνάψεις στις διακυτταρικές επαφές. Επιπλέον, πρέπει να αποσαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο οι αιμοποιητικές φωλεές μεταβάλλονται υπό την επήρεια παραγόντων stress, αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις, αλλά και η πιθανότητα τα AAK σε διαφορετικές καταστάσεις να απαιτούν διαφορετική αιμοποιητική φωλεά και, εναλλακτικά, διαφορετικές αιμοποιητικές φωλεές να αποτυπώνουν διακριτές καταστάσεις AAK.

Η πρόσφατη πρόοδος στον προσδιορισμό διαφορετικών μεσεγχυματικών και ενδοθηλιακών κυτταρικών πληθυσμών στο μυελό των οστών και αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων ενίσχυσε την κατανόηση της αιμοποιητικής φωλεάς και των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης. Η αιμοποιητική φωλεά διατηρεί την ομοιότητα των AAK, όμως εμπλέκεται και στην παθογένεια αιματολογικών διαταραχών και κακοηθειών (Kunisaki et al., 2012, Tsai et al., 2013). Ο χαρακτηρισμός των εξωγενών ρυθμιστών και των κυτταρικών συναφειών αλληλεπίδρασης φωλεάς και AAK αποτελεί ορόσημο για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών παρέμβασης στο πεδίο της αναγέννησης του αιμοποιητικού ιστού, ενώ η αποκωδικοποίηση του ρόλου της αιμοποιητικής φωλεάς στην εμφάνιση και εξέλιξη της λευχαιμίας θα δώσει τη δυνατότητα στοχευμένων θεραπευτικών παρεμβάσεων και, φυσικά, ακόμη καλύτερων ποσοστών ίασης.

Εικόνα 5. Μεταβατική ζώνη οστού και μυελού των οστών



(Από: ASHImageBank, at: ashimagebank.hematology.org)

## 2. Μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος (ΜΚ)

### 2.1 Ιστορική αναδρομή- Χαρακτηριστικά ΜΚ

Η πρώτη περιγραφή των μεσεγχυματικών κυττάρων έγινε το 1966 από τον Friedenstein και τους συνεργάτες του, οι οποίοι τα απομόνωσαν από ποντικό και τα περιέγραψαν ως κύτταρα μη αιμοποιητικά, με μορφολογία ινοβλαστών και με ικανότητα επαγωγής προς διαφοροποίηση σε οσσεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα (Friedenstein et al., 1974). Η ονομασία μεσεγχυματικά κύτταρα (mesenchymal stem cells, MSCs) δόθηκε από τον Carlan το 1991 (Carlan, 1991), ενώ το 2006 η Επιτροπή Μεσεγχυματικών και Ιστικών Αρχέγονων Κυττάρων της Διεθνούς Εταιρίας Κυτταρικής Θεραπείας (Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cell Therapy, ISCT) θέσπισε κριτήρια για το χαρακτηρισμό τους (Horwitz et al., 2005, Dominici et al., 2006).

#### Κριτήρια χαρακτηρισμού μεσεγχυματικών κυττάρων:

- ικανότητα προσκόλλησης σε πλαστική επιφάνεια, υπό καθορισμένες συνθήκες καλλιέργειας
- έκφραση των αντιγόνων επιφανείας CD73, CD90, CD105 και απουσία έκφρασης των αντιγόνων επιφανείας CD34, CD45, CD14 ή CD11b, CD79 ή CD19, HLA-DR

-ικανότητα τριδύναμης διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα, μετά από κατάλληλη διέγερση

Παρά το μεγάλο και διαρκώς αυξανόμενο αριθμό μελετών, μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί η αρχεγονότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων (ικανότητα αυτοανανέωσης και απόδοσης διαφοροποιημένων κυττάρων από διαφορετικούς ιστούς). Για το λόγο αυτό, αλλά και στην προσπάθεια τυποποίησης της ορολογίας, μείωσης της υφιστάμενης σύγχυσης και ενιαίας ερμηνείας των αποτελεσμάτων μελετών, η ίδια επιτροπή, το 2005, είχε προτείνει τον ορισμό πολυδύναμα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, ανεξαρτήτως του ιστού προέλευσης και τη διατήρηση του όρου αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα για τον υποπληθυσμό αυτών των κυττάρων που πληροί τα κριτήρια αρχεγονότητας.

Με τις σημερινές τεχνικές και μεθόδους, τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν εύκολα να απομονωθούν, εκτός από το μυελό των οστών, και από πληθώρα ετερογενών ιστών, όπως ο ομφάλιος λώρος, ο πλακούντας, ο λιπώδης ιστός, οι σκελετικοί μύες, οι τένοντες, τα οστά, το δέρμα, οι πνεύμονες, το ήπαρ, ο οδοντικός πολφός κ.α (Pelagiadis et al., 2015). Ο μυελός των οστών και ο λιπώδης ιστός αντιπροσωπεύουν τις κύριες πηγές ΜΚ, με σημαντικές, όμως, διαφορές στις ιδιότητές τους (Kourosch et al., 2016). Μείζον πρόβλημα στο χαρακτηρισμό των ΜΚ παραμένει η δυσκολία διάκρισής τους από άλλα πιο ώριμα στρωματικά κύτταρα, όπως οι ινοβλάστες, που βρίσκονται σε πληθώρα στο μεσεγχυματικό ιστό, γεγονός που οφείλεται στην απουσία ειδικών δεικτών επιφανείας (Battula et al., 2009).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των μεσεγχυματικών κυττάρων αποτελεί η πλαστικότητα, δηλαδή η ικανότητα φαινομενικά πλήρως διαφοροποιημένων προγονικών κυττάρων μιας σειράς να αλλάζουν προς άλλη σειρά διαφοροποίησης. Η φαινοτυπική πλαστικότητα πιστεύεται ότι καθορίζεται από επιγενετικούς μηχανισμούς.

Αναφορικά με την προέλευσή τους, η οποία παραμένει μερικώς αδιευκρίνιστη, έχει προταθεί η μεσοδερμική και η νευροεκτοδερμική προέλευση, αλλά και η διττή.

## 2.2 Έκπτυξη ΜΚ

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα ανευρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση, 1ανά  $3.4 \times 10^4$  κύτταρα, στο μυελό των οστών, απ' όπου εύκολα μπορούν να απομονωθούν και να εκπτυχθούν *in vitro*, λόγω της ικανότητας προσκόλλησης σε πλαστική επιφάνεια. Στις υγρές καλλιέργειες πολλαπλασιάζονται έχοντας ατρακτοειδή μορφή (μορφολογία ινοβλάστη) και μπορούν να επανακαλλιεργηθούν διαδοχικά για 50 διπλασιασμούς πληθυσμού (όριο Hayflick), εκτός αν στο καλλιεργητικό μέσο προστεθούν κυτοκίνες ή αυξητικοί παράγοντες που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, με την προσθήκη του παράγοντα ανάπτυξης ινοβλαστών (Fibroblast Growth Factor-FGF-2), επάγεται η έκπτυξη των μεσεγχυματικών κυττάρων και ταυτόχρονα διατηρείται η ικανότητα διαφοροποίησής τους (Solchaga et al., 2005).

Οι πειραματικές εφαρμογές και οι κλινικές δοκιμές των ΜΚ είναι ένα ερευνητικό πεδίο με ραγδαία αύξηση και ευρείες δυνατότητες, γεγονός που καθιστά επιτακτική την ανάγκη ενιαίας προσέγγισης για την απομόνωση και την έκπτυσή τους. Σε μελέτη σύγκρισης διαφορετικών συνθηκών καλλιέργειας, με σκοπό την πρόταση του βέλτιστου πρωτοκόλλου για την παραγωγή ΜΚ σε μεγάλη κλίμακα και ταυτόχρονη διατήρηση των χαρακτηριστικών τους, διαπιστώθηκε ότι το τελικό αποτέλεσμα μπορεί να επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό

παραγόντων όπως: το καλλιεργητικό μέσο, τα χαρακτηριστικά του ορού εμβρύου βοός (Fetal Calf Serum, FCS), τη συγκέντρωση γλυκόζης, την παρουσία γλουταμίνης, την ποιότητα του πλαστικού υλικού καλλιέργειας, τη συγκέντρωση μονοπύρηνων κυττάρων μυελού των οστών και τη συγκέντρωση μεσεγχυματικών κυττάρων στην επανακαλλιέργεια.

### **2.3 Ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός MK**

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών εκφράζουν σταθερά, όπως προαναφέρθηκε, τα επιφανειακά αντιγόνα CD73, CD90 και CD105 και στερούνται έκφρασης για τους δείκτες αιμοποιητικών κυττάρων (Lv et al., 2014). Αναλυτικότερα, το CD73 και το CD90 μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του μυελού των οστών, ενώ το CD105 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση προς χονδροκύτταρα και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αιμοποιητικών και μεσεγχυματικών κυττάρων στο μυελό των οστών. Επίσης, τα MK εκφράζουν τους δείκτες CD146 (η έκφραση σχετίζεται με τις διαφορές των κυττάρων αναλόγως της χωροταξικής τους εντόπισης και τη συγκέντρωση O<sub>2</sub> στο μυελικό μικροπεριβάλλον) , CD166 (εκφράζεται σε αδιαφοροποίητα κύτταρα και εξαφανίζεται μετά την *in vitro* διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα), CD44 (εμπλέκεται σε λειτουργίες των αιμοποιητικών κυττάρων όπως η πρόσφυση στο στρώμα του μυελού των οστών, ο πολλαπλασιασμός και η κινητοποίηση), ενώ εκφράζουν και άλλους δείκτες όπως CD71, CD29, CD13, CD106, CD58, CD120a και CD124.

### **2.4 Φυσιολογικός ρόλος MK στο μυελό των οστών**

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών είναι τα πιο καλά μελετημένα, κυρίως για τη συμμετοχή τους στην αιμοποιητική φωλεά και τη ρύθμιση της αιμοποίησης. Στο μυελό των οστών τα MK αποτελούν ένα μικρό μόνο ποσοστό των εμπύρηνων κυττάρων, όμως θεωρούνται «συστατικό» κλειδί του μυελικού μικροπεριβάλλοντος. Με τη συμμετοχή τους στην οργάνωση της αιμοποιητικής φωλεάς, ασκούν καθοριστικό ρόλο στη δέσμευση, κινητοποίηση και έξοδο των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, μέσω μιας πολύπλοκης αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα, η παρουσία των MK είναι απαραίτητη για την εγκατάσταση και διατήρηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Επιπλέον, τα MK, μέσω έκκρισης αυξητικών παραγόντων, ρυθμίζουν τη λειτουργία των αιμοποιητικών κυττάρων και διατηρούν την ομοιότητα της φωλεάς. Πρόσφατα, εντοπίστηκαν MK θετικά στη νεστίνη, που συνδέονται με HSC και νευρικές ίνες του συμπαθητικού συστήματος και εκφράζουν γονίδια που διατηρούν την αωρότητα των HSC. Αντίστοιχα, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα είναι ικανά να επάγουν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς οστεοκύτταρα (Smith et al., 2013).

### **2.5 MK και ογκογένεση-λευχαιμογένεση**

Επειδή τα μεσεγχυματικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν σημαντικό συστατικό της αιμοποιητικής φωλεάς και του ρυθμιστικού μικροπεριβάλλοντος της αιμοποίησης (Mendez-Ferrer et al., 2015), θεωρήθηκε φυσικό επόμενο η συμμετοχή τους στην ανάπτυξη αιματολογικών νεοπλασιών.

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι οι αιματολογικές νεοπλασίες συνδέονται με μη φυσιολογικό μικροπεριβάλλον στο μυελό των οστών και ότι τα ΜΚ συμμετέχουν στη διαδικασία ανάπτυξης νεοπλασίας είτε ενισχύοντας τη δημιουργία είτε τροποποιώντας το φαινότυπο όγκων του αιμοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, οι μεταβολές του στρώματος σε γενετικά τροποποιημένους ποντικούς μπορεί να οδηγήσει, μεμονωμένα ή συνεργικά, σε γενετική βλάβη των αιμοποιητικών κυττάρων ικανή να ευοδώσει την ανάπτυξη μυελοπερπλαστικών όγκων. Μελέτη των Raaijmakers και συν. (2010) αναφέρει ότι ανώριμος υποπληθυσμός οστεοκυττάρων με miRNA ή ριβοσωμιακή διαταραχή μπορεί να οδηγήσει σε μυελοδυσπλασία με σπάνιο αποτέλεσμα την οξεία μυελογενή λευχαιμία, ενώ στη μελέτη των Kode και συν. (2014) αναφέρεται ότι η ενεργοποίηση β-κατενίνης σε ώριμους οστεοβλάστες μπορεί να προκαλέσει οξεία μυελογενή λευχαιμία με αυξημένη διεισδυτικότητα, μέσω της ενεργοποίησης του άξονα Notch. Επιπλέον, συγκεκριμένα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, όπως τα μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος και οι συμπαθητικοί νευρώνες, δύναται να ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα από κακοήθη κύτταρα με συγκεκριμένες αλλαγές στην έκφραση κυτοκινών, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργική εκτροπή των αιμοποιητικών κυττάρων και την εξέλιξή τους σε νεοπλασματικά κύτταρα (Arranz et al., 2014, Schepers et al., 2013). Ακόμη, το μικροπεριβάλλον μπορεί να τροποποιήσει την ευαισθησία των κακοηθών κυττάρων στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, προκαλώντας ανθεκτικότητα (Levesque et al., 2013). Τα πειράματα των Walkley και συν. (2007) και Wei και συν. (2008) σε ποντικούς κατέληξαν ότι η εμφάνιση μυελοϋπερπλαστικής διαταραχής προϋποθέτει την συνύπαρξη Rb διαγραφής στα αιμοποιητικά και στα μεσεγχυματικά κύτταρα και ότι η εκδήλωση οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (MLL-AF9) ήταν διαφορετική, ανάλογα με την ανοσοκαταστολή που είχε υποστεί το στέλεχος πριν την μεταμόσχευση, αντίστοιχα. Επίσης, όπως προέκυψε από τη μελέτη των Kaplan και συν. (2005), τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να οργανώνουν τη δημιουργία φωλεάς που ευνοεί τη μετάσταση. Επομένως, η πλήρης κατανόηση της απορρύθμισης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων κατά την καρκινογένεση και την εξέλιξη νεοπλασιών, απαιτεί την συνδυασμένη περιγραφή εγγενών διεργασιών και λειτουργικής ανάλυσης των φωλεών που σχηματίζουν τα καρκινικά στελεχιαία κύτταρα.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα και τα φυσιολογικά κύτταρα που σχηματίζουν την αιμοποιητική φωλεά επηρεάζονται αμφίδρομα και αυτή η αλληλεπίδραση παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη και την εξέλιξη των αιματολογικών νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένης της λευχαιμίας.

Σχετικά με το ρόλο των μεσεγχυματικών κυττάρων στη λευχαιμία, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι αλλαγές στον πληθυσμό των ΜΚ μπορεί να έχουν καθοριστικό ρόλο στην τροποποίηση της φυσιολογικής αιμοποιητικής λειτουργίας, πρόταση που χρήζει περαιτέρω επιβεβαίωσης.

Μεσεγχυματικά κύτταρα με χαρακτηριστικά αρχεγονότητας και ικανότητα αυτοανανέωσης μπορούν να μεταμοσχευθούν σε διαδοχικά πειράματα και εμφανίζουν τη δυνατότητα τόσο της εντοπισμένης μετανάστευσης όσο και της μετακίνησης μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Αν προκύψουν μεταλλάξεις στα ΜΚ που υποστηρίζουν τα αιμοποιητικά κύτταρα, θα υπάρξουν μεταβολές στο μυελό των οστών με πιθανή τη δημιουργία καρκινογόνου φωλεάς (Park et al., 2012).

Η υπόθεση ότι ένας παθολογικός κυτταρικός πληθυσμός στην αιμοποιητική φωλεά μπορεί να τροποποιήσει το μικροπεριβάλλον προς όφελός του έχει ενισχυθεί με τη μελέτη των Colmone και συν. (2008), στην οποία λευχαιμική κυτταρική σειρά επηρέασε την αλληλεπίδραση των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων με τα κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών, αλλάζοντας την ικανότητα κινητοποίησής τους. Επίσης, στη μελέτη των Schepers και συν. (2013), δείχτηκε ότι η BCR/ABL σύντηξη στα αιμοποιητικά κύτταρα είχε σαν συνέπεια ελαττωμένη έκφραση μορίων που υποστηρίζουν τη φυσιολογική αιμοποίηση (CXCL12) από τα μεσεγχυματικά κύτταρα οστεοβλαστικής σειράς, με αποτέλεσμα τη μειονεκτικότητα των φυσιολογικών αρχέγονων και προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και τη δημιουργία υποστηρικτικού περιβάλλοντος για τα λευχαιμικά κύτταρα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι γενετικές βλάβες στα AAK οδηγούν σε αλλαγές στα MK τα οποία, με τη σειρά τους, προωθούν παθολογικούς πληθυσμούς αιμοποιητικών κυττάρων. Μελέτη των Wiserman και συν. (2011) αναφέρει την υποτροπή ασθενών μετά από αλλογενή μεταμόσχευση για οξεία μυελογενή λευχαιμία, προσθέτοντας μια ακόμη ένδειξη ότι το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών ευνοεί τη λευχαιμογένεση.

Σε μελέτη ασθενών με οξεία μυελογενή λευχαιμία (Meyer et al., 2013), διατυπώθηκε η ενδιαφέρουσα υπόθεση ότι τα MK του μυελού των οστών παρουσίαζαν μειωμένη οστεογενετική και αυξημένη λιπογενετική διαφοροποίηση και ότι αυτή η μη ισορροπημένη δέσμευση μπορεί να οδηγήσει σε μειονεκτική φυσιολογική αιμοποίηση προς σχετικό όφελος της λευχαιμογένεσης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δεν έχουν επιβεβαιωθεί.

Σε παρόμοια μελέτη ασθενών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Zlotnik et al., 2006), επίσης διαπιστώθηκε ελαττωματική οστεογενετική διαφοροποίηση των MK του μυελού των οστών, χωρίς αντίστοιχη αύξηση της διαφοροποίησης προς λιποκύτταρα. Στην περίπτωση αυτή, οι μοριακοί μηχανισμοί που υπεισέρχονται είναι η ελαττωμένη έκφραση του παράγοντα CXCL12, μέσω ενεργοποίησης της οδού Notch.

Η έρευνα την τελευταία δεκαετία έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι τα παθολογικά-νεοπλασματικά κύτταρα που εντοπίζονται στην αιμοποιητική φωλεά συμμετέχουν σε λειτουργική συμβίωση με τα φυσιολογικά κύτταρα και προκύπτει το ερώτημα αν ο καρκίνος είναι νόσημα συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου ή συγκεκριμένου ιστού και, σε επέκταση, αν η αντιμετώπιση της νεοπλασίας θα πρέπει να έχει στόχο το καρκινικό κύτταρο ή τη φωλεά. Πρόσφατα πειράματα (Krause et al., 2013) έδειξαν ότι η απενεργοποίηση του υποδοχέα της παραθορμόνης, γενετικά ή φαρμακευτικά, στα μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών, ελαχιστοποίησε τον πληθυσμό των στελεχιαίων λευχαιμικών κυττάρων *in vivo*. Επομένως, θα πρέπει να αποσαφηνιστεί αν οι μεταβολές στα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη παρεγχυματικών όγκων και αν αυτό πρόκειται για διαδικασία επιλογής ή αν οφείλεται στην αυξημένη υποστήριξη αυξητικών παραγόντων από το μικροπεριβάλλον.

## **2.6 Εφαρμογή MK στη μεταμόσχευση ιστών και στην Αναγεννητική Ιατρική**

Η έκπτυξη και χρήση των μεσεγχυματικών κυττάρων έχει ευρεία εφαρμογή στη μεταμόσχευση ιστών και στην Αναγεννητική Ιατρική, λόγω συγκεκριμένων σημαντικών χαρακτηριστικών τους που περιλαμβάνουν:

-την ικανότητα διαφοροποίησης



- την ικανότητα μετανάστευσης σε σημεία ιστικής βλάβης
- τις ανοσοτροποποιητικές τους ιδιότητες
- τις αντιφλεγμονώδεις τους ιδιότητες
- την ικανότητα να εκκρίνουν κυτοκίνες και παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως οι HB-EGF, b-FGF, PDGF-B, VEGF, KGF και αγγειοποιητίνες. Όλοι οι προαναφερθέντες παράγοντες, έχει αποδειχθεί ότι διευκολύνουν την επιδιόρθωση της ιστικής βλάβης *in vivo*.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για την ικανότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων να σχηματίζουν μύες, νευρικά κύτταρα και ηπατικά κύτταρα αποτελέσματα ενθαρρυντικά στον τομέα της Αναγεννητικής Ιατρικής (Kode et al., 2009, De Becker et al., 2016, De Becker et al., 2015). Η *in vivo* χρήση των MK μελετάται για εφαρμογή στη δημιουργία τεχνητών καρδιακών βαλβίδων και αγγείων, στην αποκατάσταση χρόνιων εκφυλιστικών βλαβών και εστιακών μετατραυματικών αλλοιώσεων του αρθρικού χόνδρου και στην αποκατάσταση ιστικών βλαβών μετά από εγκαύματα, μετά μαστεκτομή, καθώς και αυτές που οφείλονται στις επιπλοκές του ΣΔ (Bianco et al., 2013).

## 2.7 Ανοσολογικές ιδιότητες MK

Πειράματα *in vitro* και προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα διαθέτουν σημαντικές ανοσοτροποποιητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, χρήσιμες για τη θεραπεία ανοσοεξαρτώμενων νοσημάτων, όπως τα χρόνια αυτοάνοσα (ρευματοειδής αρθρίτιδα), τα χρόνια φλεγμονώδη (νόσος Crohn) νοσήματα, η σκλήρυνση κατά πλάκας (Le Blanc et al., 2005) κλπ. Τα MK εκφράζουν μόρια MHC τάξης I χωρίς αντίστοιχη έκφραση μορίων MHC τάξης II. Έτσι διαφεύγουν της ανοσολογικής αναγνώρισης και δεν προκαλούν ανοσολογική αντίδραση όταν χορηγούνται σε αλλογενείς δέκτες (ανοσολογικά αδρανή), ιδιότητα ιδιαίτερα σημαντική στην κλινική πράξη. Πρέπει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι, σε συνθήκες φλεγμονής, τα MK εκφράζουν και μόρια MHC τάξης II και αποκτούν αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα στα T λεμφοκύτταρα (Kode et al., 2009). Ένας διαρκώς αυξανόμενος αριθμός μελετών, υποδεικνύει τα MK ως υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση αυτοάνοσων νοσημάτων, για τη βελτιστοποίηση της εγκατάστασης των αιμοποιητικών μοσχευμάτων, για τη διαχείριση της απόρριψης μεταμοσχευμένων οργάνων και, κυρίως, για την πρόληψη ή τη θεραπεία της νόσου μοσχεύματος εναντίον ξενιστή (Le Blanc et al., 2004).

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα εκφράζουν επιφανειακές πρωτεΐνες (ιντεγκρίνες και μόρια προσκόλλησης) που προάγουν την αλληλεπίδραση με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ η ανοσολογική τους συμπεριφορά επηρεάζεται από την απάντηση στις κυτοκίνες (πλαστικότητα). Εμφανίζουν τις ανοσοτροποποιητικές τους δράσεις αλληλεπιδρώντας με κύτταρα που συμμετέχουν τόσο στη φυσική όσο και στην επίκτητη ανοσία, με ετερογενείς μηχανισμούς, που αφορούν τις φάσεις της ανοσιακής απάντησης και συγκεκριμένα:

- ρυθμίζουν τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων, τροποποιώντας το φαινότυπό τους (κυρίως αναστέλλοντας την ωρίμανση) και επηρεάζοντας αρνητικά την αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα, με αποτέλεσμα τα T λεμφοκύτταρα να μην ωθούνται προς ισχυρή ανοσιακή απάντηση, ενώ τα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών που εκκρίνονται (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) είναι ελαττωμένα

-τροποποιούν τη διαδικασία ενεργοποίησης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των λεμφοκυττάρων, κυρίως επάγοντας την ενεργοποίηση και την έκπτυξη των ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την καταστολή των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων  
-επηρεάζουν τη δραστηριότητα των Β λεμφοκυττάρων και τροποποιούν την απάντηση της χυμικής ανοσίας και, ειδικότερα, αυξάνουν τον αριθμό και τη δραστηριότητα των Β ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων, υποομάδα η οποία, μέσω έκκρισης κυτοκινών, συμμετέχει στην ανοχή του ανοσοποιητικού συστήματος  
-επηρεάζουν τη λειτουργία των NK κυττάρων, αναστέλλοντας τα ενεργοποιημένα κύτταρα, εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό τους και την ικανότητά τους να εκκρίνουν ειδικές κυτοκίνες (Kode et al., 2009, Lazarus et al., 1995).

### **3. Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία (ΟΛΛ)**

#### **3.1 Επιδημιολογία**

Οι λευχαιμίες αποτελούν τα συχνότερα κακοήθη νοσήματα της παιδικής ηλικίας, αντιπροσωπεύοντας ποσοστό 41% των νεοπλασμάτων στα παιδιά ηλικίας < 15 ετών. Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία αντιπροσωπεύει ποσοστό > 80% της παιδικής λευχαιμίας. Στις ΗΠΑ, διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο περίπου 3,000 παιδιά και έφηβοι με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Η νόσος παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερη επίπτωση στις ηλικίες 3-5 ετών, ενώ είναι συχνότερη στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια σε όλες τις ηλικίες (ποσοστά 55% και 45% αντίστοιχα), καθώς και στη λευκή σε σχέση με τη μαύρη φυλή. Επιπλέον, η ΟΛΛ είναι συχνότερη σε παιδιά με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως σύνδρομο Down, σύνδρομο Bloom, σύνδρομο Fanconi, σύνδρομο αταξίας-τηλαγγειεκτασίας κ.α. Μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων, ο κίνδυνος ανάπτυξης ΟΛΛ για το δεύτερο παιδί είναι >70% αν το πρώτο από τα δίδυμα διαγνωστεί σε ηλικία < 1 έτους, ενώ ο κίνδυνος είναι τουλάχιστον διπλάσιος του γενικού πληθυσμού, αν η ηλικία διάγνωσης είναι μεταξύ 5 και 7 ετών (Hunger et al., 2015).

#### **3.2 Αιτιολογία**

Οι λευχαιμίες μπορούν να οριστούν σαν ομάδα νεοπλασματικών νοσημάτων στις οποίες οι γενετικές ανωμαλίες στο αιμοποιητικό κύτταρο οδηγούν σε κλωνικό πολλαπλασιασμό κυττάρων που δεν υπόκειται πλέον σε ρύθμιση, με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και μειωμένο ρυθμό απόπτωσης σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Το αποτέλεσμα είναι τελικά η δυσλειτουργία και η καταστολή του μυελού των οστών. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, η αιτιολογία είναι άγνωστη, ενώ έχουν προσδιοριστεί αρκετοί προδιαθεσικοί παράγοντες (Bhojwani et al., 2015, Pui et al., 2015, Woo et al., 2014) (Πίνακας 1).

Η οξεία λεμφοβλαστική αναιμία μπορεί να είναι Β κυτταρικής αρχής, αντιπροσωπεύοντας ποσοστό 80-85% της ΟΛΛ και στην οποία η παρούσα εργασία αναφέρεται ή Τ κυτταρικής αρχής. Η Τ-ΟΛΛ αντιπροσωπεύει ποσοστό 10-15% της λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας και έχει δυσμενέστερη πρόγνωση, παρά τη βελτίωση των ποσοστών επιβίωσης με την εφαρμογή εντατικοποιημένης θεραπείας, ειδικότερα μετά από υποτροπή (Bhojwani et al., 2015). Σπάνιοι ανοσοφαινότυποι μικτής σειράς αντιπροσωπεύουν ποσοστό <5% και

πρόκειται είτε για αδιαφοροποίητες λευχαιμίες είτε για λευχαιμίες με δείκτες και των δύο σειρών, B και T Cooper et al., 2015).

**Πίνακας 1.** Προδιαθεσικοί παράγοντες ΟΛΛ

<b>Γενετικοί</b>	Σύνδρομο Down
	Σύνδρομο Bloom
	Σύνδρομο Fanconi
	Σύνδρομο αταξίας-τηλαγγειεκτασίας
	Σύνδρομο Turner
	Σύνδρομο Klinefelter
	Αναιμία Diamond-Blackfan
	Σύνδρομο Schwachman
	Σύνδρομο Li-Fraumeni
	Σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια
	Νευρινωμάτωση τύπου 1
	Παροξυσμική νυκτερινή αιμοσφαιρινουρία
<b>Περιβαλλοντικοί</b>	Ακτινοβολία
	Φάρμακα
	Αλκυλιωτικοί παράγοντες
	Έκθεση σε βενζόλιο
	Προχωρημένη ηλικία μητέρας

### 3.3 Παθογένεια

Η Β-ΟΛΛ είναι μια κλινικά και βιολογικά ετερογενής νόσος, που παθογενετικά προκύπτει από τη συσσώρευση γενετικών τροποποιήσεων στα προγονικά Β λεμφοκύτταρα, με αναχαιτίση της διαφοροποίησης και ανώμαλο πολλαπλασιασμό.

Σε ποσοστό περίπου 75% των περιπτώσεων ανευρίσκεται, με συμβατικές κυτταρογενετικές μεθόδους, μια επαναλαμβανόμενη χρωμοσωμική ανωμαλία. Οι χαρακτηριστικές αυτές ανωμαλίες διακρίνονται σε αριθμητικές εκτροπές και δομικές αλλαγές, αρκετές από τις οποίες συσχετίζονται με την έκβαση των ασθενών. Παρά το γεγονός ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αποτελούν κρίσιμα πυροδοτικά συμβάματα της λευχαιμογένεσης, δεν είναι αρκετά για να οδηγήσουν σε λευχαιμία, υποδεικνύοντας ότι πρόσθετες συνεργικές γενετικές βλάβες απαιτούνται (Harrison, 2009, Ghazavi et al., 2015, Mullighan et al., 2007).

Με τις τεχνολογίες ανάλυσης των αντιγράφων DNA, ταυτοποίησης της μικροακολουθίας γονιδιακής έκφρασης και της, πρόσφατα αναπτυγμένης, ακολουθίας νέας γενιάς (NGS), ο αριθμός των επιβεβαιωμένων βλαβών έχει αυξηθεί, έχουν ανακαλυφθεί μεταλλάξεις γονιδίων σε μονοπάτια κλειδιά και έχουν ταυτοποιηθεί νέοι υπότυποι Β-ΟΛΛ. Με την εφαρμογή νέων τεχνολογιών, έχουν ταυτοποιηθεί νέες μεταλλάξεις και αλλαγές αντιγράφων (copy number alterations, CNAs), οι οποίες επηρεάζουν γονίδια που υπεισέρχονται στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση και τη μεταγραφή των λεμφοκυττάρων στη Β-ΟΛΛ, καθώς και ογκοκατασταλτικά γονίδια (Mullighan, 2012, Harrison et al., 2002).

### 3.4 Κλινική εικόνα

Τα αρχικά συμπτώματα της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας είναι μη ειδικά και περιλαμβάνουν ανορεξία, καταβολή και διαλείπουσα δεκατική πυρετική κίνηση. Καθώς η νόσος προχωρά, τα σημεία και τα συμπτώματα είναι ενδεικτικά της διήθησης και της καταστολής του μυελού των οστών, όπως ωχρότητα και εύκολη κόπωση λόγω της αναιμίας, εκχυμώσεις, πετέχειες και αιμορραγία λόγω της θρομβοπενίας και λοιμώξεις λόγω της ουδετεροπενίας. Χαρακτηριστικά είναι τα συμπτώματα από το μυοσκελετικό σύστημα, όπως οστικά άλγη (μπορεί να αφυπνίζουν) και οι αρθραλγίες/ αρθρίτιδες. Συχνή είναι η διήθηση του ήπατος, του σπλήνα, των λεμφαδένων και του μεσοθωρακίου κατά τη διάγνωση της ΟΛΛ, ενώ η εξωμυελική διήθηση του ΚΝΣ ή των όρχεων και των ωοθηκών απαιτεί ειδική τροποποίηση της θεραπείας (Inaba et al., 2013).

### 3.5 Διάγνωση

Από την εξέταση του περιφερικού αίματος προκύπτει αναιμία, θρομβοπενία και λευκοπενία, καθώς και παρουσία λεμφοβλαστών στη μικροσκοπική εξέταση του επιχρίσματος. Η οριστική διάγνωση τίθεται με εξέταση δείγματος μυελού των οστών, που λαμβάνεται με αναρρόφηση, και βιοψία, επί ταυτοποίησης λεμφοβλαστών σε ποσοστό > 25% για τα περισσότερα θεραπευτικά πρωτόκολλα, παρόλο που δεν απαιτείται κατώτερο όριο ποσοστού βλαστών. Χαρακτηριστικά, οι λεμφοβλάστες έχουν αυξημένη αναλογία πυρήνα/ κυτταροπλάσματος, διασκορπισμένη πυρηνική χρωματίνη και έντονους πυρηνίσκους. Πάντα απαιτείται εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού, για αποκλεισμό ή επιβεβαίωση της διήθησης του ΚΝΣ.

Για την ταξινόμηση και τη σταδιοποίηση της ΟΛΛ χρησιμοποιούνται τα μορφολογικά, ανοσοφαινοτυπικά, κυτταρογενετικά και μοριακά χαρακτηριστικά των κακοηθών κυττάρων στο μυελό των οστών (Hunger et al., 2015). Σε συντριπτικό ποσοστό 85% των περιπτώσεων ΟΛΛ πρόκειται για Β κυτταρικής αρχής ΟΛΛ, ενώ σε ποσοστό 15% για Τ κυτταρικής αρχής ΟΛΛ. Οι Β-λεμφοβλάστες εκφράζουν σταθερά τα επιφανειακά αντιγόνα CD19, CD79a, CD22, CD24, TdT και ποικιλοτρόπως τα CD10 (συχνά αρνητικό στη βρεφική ΟΛΛ), CD20, CD34.

### 3.6 Διαφορική διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας γίνεται από άλλα πρωτοπαθή αίτια καταστολής του μυελού των οστών, όπως απλαστική αναιμία (συγγενής και επίκτητη), ουδετεροπενία (συγγενής ή επίκτητη), αυτοάνοση θρομβοπενία, παροδική ερυθροβλαστική αναιμία, μυελοϊνωση κ.α. και από άλλα μυελοδιηθητικά κακοήθη νοσήματα, όπως οξεία μυελογενής λευχαιμία, νευροβλάστωμα, ρετινοβλάστωμα, ραβδομυοσάρκωμα, σάρκωμα Ewing κ.α. Ακόμη, στη διαφορική διάγνωση της ΟΛΛ περιλαμβάνονται η λοιμώδης μονοπυρήνωση και η ρευματοειδής αρθρίτιδα.

### **3.7 Θεραπεία**

Η πρώτη περιγραφή παροδικής ύφεσης της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας μετά από χημειοθεραπεία έγινε το 1948. Έκτοτε, η ΟΛΛ στα παιδιά αποτελεί πρότυπο βελτιωμένης επιβίωσης μεταξύ ασθενών με κακοήθειες (Gaynon et al., 2010). Με την προοδευτική εφαρμογή νέων και αποτελεσματικότερων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και τη στρατηγική χρήση των προγνωστικών παραγόντων για τον καθορισμό των θεραπευτικών πρωτοκόλλων, τα ποσοστά επιβίωσης φτάνουν σήμερα το 90%, από λιγότερο του 10% στη δεκαετία του 1960. Ορόσημο στάθηκε η δημιουργία του εντατικού οκταπλού συνδυασμού φαρμάκων από τους Rjehm και συνεργάτες, που σήμερα αναφέρεται ως πρωτόκολλο I και αποτελεί τη βάση του πρωτοκόλλου BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) (Gaynon et al., 2010).

Οι φάσεις θεραπείας της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας είναι οι εξής τέσσερις και βασίζονται στη συνδυασμένη χρήση φαρμάκων για την αποφυγή ανάπτυξης αντίστασης (Cooper et al., 2015):

#### **A) φάση επαγωγής στην ύφεση**

Διαρκεί 4-6 εβδομάδες και έχει στόχο την πλήρη εισαγωγή στην ύφεση με την ολοκλήρωσή της, γεγονός που επιτυγχάνεται σε ποσοστό 95%. Το ποσοστό αποτυχίας οφείλεται είτε στην αποτυχία εισαγωγής στην ύφεση είτε στη θνητότητα λόγω επιπλοκών της χημειοθεραπείας. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι τα κορτικοστεροειδή, η βινκριστίνη και η ασπαραγινάση, ενώ σε κάποια πρωτόκολλα προστίθενται και ανθρακυκλίνες (αποφεύγονται σε ασθενείς χωρίς παράγοντες κινδύνου). Από τα κορτικοστεροειδή, χρησιμοποιούνται η πρεδνιζόνη ή η δεξαμεθαζόνη, με τη δεξαμεθαζόνη να έχει καλύτερη διείσδυση στο ΚΝΣ και μικρότερο κίνδυνο υποτροπής, αλλά και μεγαλύτερη τοξικότητα.

#### **B) φάση εδραίωσης και ενίσχυσης της ύφεσης**

Διαρκεί 6-9 μήνες και έχει στόχο την εξάλειψη της υπομικροσκοπικής υπολειπόμενης νόσου, που παραμένει μετά την ολοκλήρωση της πρώτης φάσης. Χρησιμοποιείται συνδυασμός φαρμάκων, διαφορετικών αυτών της προηγούμενης φάσης, ώστε να υπάρχει η μεγαλύτερη δυνατή συνέργεια με τη μικρότερη δυνατή ανθεκτικότητα. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι η μερκαπτοπουρίνη, η μεθοτρεξάτη, η θειογουανίνη, η κυκλοφωσφαμίδη, η ετοποσίδη και η κυταραβίνη.

#### **Γ) φάση διατήρησης της ύφεσης**

Διαρκεί 2 έτη και έχει στόχο την ελαχιστοποίηση του κινδύνου υποτροπής. Πρόκειται για πιο «ήπια» φάση, με ακρογωνιαίο λίθο τους αντιμεταβολίτες μεθοτρεξάτη και μερκαπτοπουρίνη, ενώ μέγιστη σημασία έχει η πλήρης συμμόρφωση. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Harvey et al., 2010), οι ασθενείς με ποσοστό συμμόρφωσης < 90% διατρέχουν τετραπλάσιο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλά ποσοστά συμμόρφωσης (> 90%). Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες φαρμακογενετικής, κάποιοι πολυμορφισμοί επηρεάζουν το μεταβολισμό αυτών των φαρμάκων, γεγονός ιδιαίτερα

σημαντικό, αφού στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο βαθμός μυελοκαταστολής συνδέεται με τον κίνδυνο υποτροπής (Schmiegelow et al., 2010).

Συγκεκριμένα, πολυμορφισμοί του ενζύμου μεθυλοτρανσφεράση σχετίζονται με αυξημένα ποσοστά μυελοκαταστολής και άλλων ανεπιθύμητων ενεργειών, ενώ άλλοι πολυμορφισμοί σχετίζονται με «υπερμεταβολισμό» και μειωμένα επίπεδα ενεργού μεταβολίτη.

#### ***Δ) Θεραπεία ΚΝΣ***

Η σημασία αυτής της θεραπείας έχει εδραιωθεί από το 1970 και αφορά τόσο σε ασθενείς με διήθηση του ΚΝΣ στη διάγνωση όσο και στην προφύλαξη του ΚΝΣ ή πιο σωστά θεραπεία της υποκλινικής νόσου του ΚΝΣ, αφού, χωρίς την εφαρμογή της, ήταν συχνή η υποτροπή της νόσου στο ΚΝΣ, ακόμη και σε παιδιά με ύφεση της νόσου στο μυελό των οστών (Pui et al., 2009). Για τη θεραπεία/ προφύλαξη του ΚΝΣ εφαρμόζεται ενδοραχιαία έγχυση χημειοθεραπείας (συνήθως τριπλή, με μεθοτρεξάτη, κυταραβίνη και υδροκορτιζόνη) από τη φάση επαγωγής στην ύφεση και μέχρι το τέλος της θεραπείας (σε άλλα πρωτόκολλα δε συνεχίζεται στη φάση διατήρησης της ύφεσης), συστηματική χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων που περνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (υψηλές δόσεις μεθοτρεξάτης, δεξαμεθαζόνη, κυταραβίνη και ασπαραγινάση). Η ακτινοβολία του ΚΝΣ έχει εγκαταλειφθεί, λόγω της τοξικότητας και των δευτεροπαθών κακοηθειών, και έχει αντικατασταθεί από την εντατικοποίηση της ενδοραχιαίας και συστηματικής χημειοθεραπείας και για τους ασθενείς με προσβολή του ΚΝΣ στη διάγνωση (Pui et al., 2009).

#### ***Αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων***

Εφαρμόζεται σε ασθενείς εξαιρετικά υψηλού κινδύνου υποτροπής ή αποτυχίας και γίνεται, συνήθως, αφού συμβεί η υποτροπή, παρά κατά τη διάρκεια της αρχικής θεραπείας (Hochberg et al., 2013). Ιδανικός δότης είναι ο συμβατός αδερφός, ενώ υπάρχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα από μεταμοσχεύσεις με εναλλακτικές πηγές δοτών. Της μεταμόσχευσης προηγείται ολοσωματική ακτινοβολία.

#### ***Στοχευμένη θεραπεία και Ανοσοθεραπεία***

Η πρόσφατη πρόοδος στην αποκωδικοποίηση της γενετικής βάσης της ΟΛΛ και η ανάπτυξη θεραπειών που έχουν στόχο τις μοριακές βλάβες που ευοδώνουν την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων οδήγησαν στη στοχευμένη θεραπεία της αιματολογικής νεοπλασίας (Collins et al., 2015). Χαρακτηριστικό παράδειγμα στοχευμένης θεραπείας αποτελεί η χρήση των αναστολέων τυροσινικής κινάσης (imatinib) σε παιδιά με χρωμόσωμα Ph(+) ΟΛΛ σε συνδυασμό με κυταροτοξική ΧΜΘ, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Schultz et al., 2014, Biondi et al., 2012).

Η ανοσοθεραπεία αποτελεί ένα ευρύ και πολλά υποσχόμενο πεδίο ανάπτυξης προηγμένων θεραπειών για την οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, βασιζόμενη στην ανοσιακή απάντηση των Τ λεμφοκυττάρων εναντίον των λευχαιμικών κυττάρων (Grupps et al., 2014). Το επιφανειακό αντιγόνο CD19 ανιχνεύεται σε μεγάλη πυκνότητα στην πλειοψηφία των κυττάρων της Β-ΟΛΛ. Με τη μεταφορά (αυτόλογη μεταμόσχευση) τροποποιημένων Τ λεμφοκυττάρων (χμαιρικών υποδοχέων αντιγόνων), δίνεται η εντολή επανακατεύθυνσης στα κυταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα, ώστε να αναγνωρίζουν και να θανατώνουν τα λευχαιμικά κύτταρα (Stephen et al., 2015). Το Blinatumomab είναι ένα γενετικά

τροποποιημένο αντίσωμα με ειδικότητα σύνδεσης τόσο για τα CD19 (εκφράζεται στους βλάστες) όσο και τα CD3 (εκφράζεται στα T λεμφοκύτταρα), ώστε να φέρνει σε άμεση επαφή τα T λεμφοκύτταρα με τους βλάστες, επιτρέποντας την κυτταροτοξική δράση των πρώτων και τη θανάτωση των λευχαιμικών κυττάρων, ενώ, τελευταία, χρησιμοποιείται και μόνο του ως μονοκλωνικό αντίσωμα στις υποτροπές της νόσου, αλλά και ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας 1<sup>ης</sup> γραμμής (Topp et al., 2015).

### 3.8 Πρόγνωση

Ορόσημο στη βελτίωση αντιμετώπισης της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας αποτελεί η ταυτοποίηση των προγνωστικών παραγόντων που καθορίζουν την αυξημένη ή μειωμένη πιθανότητα επιτυχίας της θεραπείας. Οι προγνωστικοί παράγοντες λαμβάνονται υπόψη στα πρωτόκολλα χημειοθεραπείας και στην επιλογή ασθενών για αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Οι ασθενείς χωρίς επιβαρυντικούς παράγοντες αντιμετωπίζονται με πρωτόκολλα μικρότερης τοξικότητας, ενώ στους ασθενείς υψηλού κινδύνου εφαρμόζεται πιο επιθετική αγωγή (Coustan-Smith et al., 2000, Roberts et al., 2015). Οι κύριοι προγνωστικοί παράγοντες είναι: τα κλινικά χαρακτηριστικά στη διάγνωση, τα βιολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά των λευχαιμικών κυττάρων και η ενωρίς απάντηση στη θεραπεία (Zhang et al., 2011, Meyer et al., 2013, Harrison et al., 2014) (Πίνακας 5).

**Πίνακας 2.** Προγνωστικοί παράγοντες ΟΛΛ

<b>Κλινικά χαρακτηριστικά</b>	<b>Καλή πρόγνωση</b>	<b>Κακή πρόγνωση</b>
Ηλικία	1-10 ετών	< 1 έτους, ≥ 10 ετών
Φύλο	Κορίτσια	Αγόρια
Φυλή	Λευκή, Ασιάτες	Μαύρη, Ισπανόφωνοι
Λευκά αιμοσφαίρια	< 50,000/mm <sup>3</sup>	≥ 50,000mm <sup>3</sup>
<b>Βιολογικά και γενετικά χαρακτηριστικά λευχαιμικών κυττάρων</b>	<b>Καλή πρόγνωση</b>	<b>Κακή πρόγνωση</b>
Ανοσοφαινότυπος	B-ΟΛΛ	T-ΟΛΛ
Κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά	Υπερδιπλοειδία, ETV6-RUNX1, ERG del	Υποδιπλοειδία, BCR-ABL1, MLL, Ph-like ALL IKZF1 del/mut
<b>Ενωρίς απάντηση στη θεραπεία</b>	<b>Καλή πρόγνωση</b>	<b>Κακή πρόγνωση</b>
Απάντηση στη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή	Βλάστες <1,000/mm <sup>3</sup>	Βλάστες ≥ 1,000/mm <sup>3</sup>
Βλάστες στο ΜΟ μετά 1 <sup>η</sup> -2 <sup>η</sup> εβδομάδα χημειοθεραπείας	Βλάστες < 5%	Βλάστες ≥ 5%
Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (MRD) στο τέλος της θεραπείας εισαγωγής στην ύφεση	MRD < 0,01%	MRD ≥ 0,01%
Ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (MRD) στους 3-4 μήνες	MRD < 0,01%	MRD ≥ 0,01%

Ο ισχυρότερος και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας της ΟΛΛ στα παιδιά, είναι ο χρόνος που απαιτείται για τον περιορισμό του λευχαιμικού φορτίου σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα-ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος (MRD) (Coustan-Smith et al., 2000). Η ελάχιστη υπολειπόμενη νόσος προσδιορίζεται με τεχνικές PCR και κυτταρομετρία ροής. Ο κίνδυνος αποτυχίας της θεραπείας είναι 3-5 φορές μεγαλύτερος στα παιδιά με ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο  $\geq 0,01\%$  σε σχέση με τα παιδιά με ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο  $< 0,01\%$ , τόσο στο τέλος της θεραπείας επαγωγής στην ύφεση όσο και αργότερα (Conter et al., 2010). Η εντατικοποίηση της θεραπείας σε ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου, αύξησε την επιβίωση. Η ανακάλυψη και εφαρμογή νέων τεχνικών προσδιορισμού της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου, θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για την ανίχνευση λευχαιμικών κυττάρων κάτω από τα επίπεδα που οι μέχρι σήμερα διαθέσιμες τεχνικές μπορούν να εντοπίσουν (Smith et al., 2010).

### 3.9 Υποτροπή

Παρά τη σημαντική πρόοδο στη θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, υποτροπή συμβαίνει σε ποσοστό 15-20% των παιδιών και σχετίζεται με σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά ίασης (Irving, 2015). Με την εφαρμογή εντατικής θεραπείας, η οποία ενδέχεται να περιλαμβάνει και αλλογενή μεταμόσχευση, το συνολικό ποσοστό επιβίωσης φτάνει το 40% (Bhojwani et al., 2013).

Όπως στη διάγνωση της νόσου, έτσι και στην υποτροπή, οι ασθενείς ταξινομούνται σε ομάδες κινδύνου. Στους προγνωστικούς παράγοντες στην υποτροπή, περιλαμβάνονται ο χρόνος της υποτροπής (όσο μικρότερος ο χρόνος από την έναρξη της θεραπείας τόσο χειρότερη η πρόγνωση), ο ανοσοφαινότυπος της λευχαιμίας (η υποτροπή της T-ΟΛΛ έχει χειρότερη πρόγνωση) και η θέση της υποτροπής (η μυελική υποτροπή έχει χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με την εξωμυελική). Επιπλέον, όπως στη διάγνωση, έτσι και στην υποτροπή, η απάντηση στη θεραπεία εισαγωγής στην ύφεση (εκτίμηση ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου) έχει προγνωστική αξία. Η εφαρμογή των κυτταρογενετικών ανωμαλιών στον καθορισμό των ομάδων κινδύνου στην υποτροπή είναι περιορισμένη, με λίγες αναφορές θετικής προγνωστικής σημασίας (π.χ. μετάλλαξη ETV6-RUNX1) και αντίστοιχα αρνητικής προγνωστικής σημασίας (π.χ. μετάλλαξη TP53) (Bhojwani et al., 2013).

Παθογενετικά, στις περισσότερες περιπτώσεις και όπως προκύπτει από συνδυασμένη ανάλυση δειγμάτων διάγνωσης και υποτροπής, τα λευχαιμικά κύτταρα στην υποτροπή σχετίζονται με έναν κυρίαρχο ή υπολειπόμενο κλώνο που είναι παρών στη διάγνωση. Σε πολύ πρόσφατη μελέτη που περιλάμβανε ασθενείς με ενωρίς υποτροπή, προτείνεται ότι οι προϋπάρχοντες κλώνοι στη διάγνωση εξαλείφθηκαν με τη θεραπεία, ενώ υπολειπόμενοι υποκλώνοι, παρόντες στη διάγνωση, επέζησαν, μεταλλάχθηκαν και οδήγησαν στην υποτροπή (Irving, 2015, Davidsson et al., 2010). Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Beesley et al., 2005), η υποτροπή μπορεί να αποτελεί, σε πολύ μικρό ποσοστό, δεύτερη λευχαιμία, όπως αποδεικνύεται από την απουσία κοινών γενετικών ανωμαλιών μεταξύ βλαστών στη διάγνωση και στην υποτροπή. Στην περίπτωση αυτή, η πρόγνωση είναι αρκετά ευνοϊκότερη, γεγονός που, ίσως αντανάκλα τη μεγαλύτερη χημειοθεραπεία της λευχαιμίας στη διάγνωση σε σχέση με την υποτροπή.

Γενικά, η υποτροπή της ΟΛΛ είναι ανθεκτικότερη στη χημειοθεραπεία σε σχέση με την πρωτοδιάγνωση, όπως υποδεικνύεται από τα μικρά ποσοστά αρνητικής ελάχιστης



υπολειπόμενης νόσου, παρά την εντατικότερη θεραπεία. Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται τόσο στη χημειοευαισθησία των λευχαιμικών κυττάρων, όσο και σε γονιδιακούς πολυμορφισμούς των ασθενών (Beesley et al., 2005). Καθοριστικός παράγοντας είναι η ελαττωμένη χημειοευαισθησία ή η ανθεκτικότητα των λευχαιμικών κυττάρων, που μπορεί να υφίσταται *de novo* (παράγοντες που επάγουν την αντίσταση προϋπάρχουν στα λευχαιμικά κύτταρα στη διάγνωση) ή να είναι επίκτητη. Στη βιβλιογραφία (Beesley et al., 2005) αναφέρεται ότι, τα λευχαιμικά κύτταρα ασθενών που υποτροπίασαν ενωρίς φέρουν μεταλλάξεις που μειώνουν την ευαισθησία στα κοινά χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Το υψηλότερο επίπεδο ανθεκτικότητας αφορά στα γλυκοκορτικοειδή. Αναφορικά με τους γονιδιακούς πολυμορφισμούς, έχει βρεθεί ισχυρή συσχέτιση με το μεμονωμένο νουκλεοτιδικό πολυμορφισμό στο γονίδιο PYGL, ακόμη και σε παιδιά με αρνητική ελάχιστη υπολειπόμενη νόσο, που υπεισέρχεται στην απάντηση στη χορήγηση μεθοτρεξάτης.

Στην υποτροπή της ΟΛΛ, σημαντικό ρόλο παίζει η αρνητική ρύθμιση μονοπατιών τα οποία υπεισέρχονται στην ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία και στην επιλογή του κλώνου. Τα κύρια μονοπάτια είναι τα RAS (MAPK) και JAK STAT, ο κυτταρικός κύκλος, ο μεταβολισμός νουκλεοτιδίων, η επιδιόρθωση DNA, η ανάπτυξη των B κυττάρων, η απάντηση στα γλυκοκορτικοειδή και η επιγενετική ρύθμιση. Η στοχοποίηση αυτών των μονοπατιών αποτελεί λογική στρατηγική θεραπείας και μπορεί να προσφέρει νέες προοπτικές.

Τέλος, σε κάποιες περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις που προκαλούνται από τη χημειοθεραπεία μπορεί συμβάλλουν στην εξέλιξη της υποτροπής (Krentz et al., 2013). Είναι γνωστό ότι τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα προκαλούν καταστροφή του γενετικού υλικού και επάγουν μεταλλάξεις. Στην περίπτωση της ΟΛΛ, φάρμακα που ευθύνονται για ογκογόνες μεταλλάξεις είναι οι ανθρακυκλίνες και οι αντιμεταβολίτες. Αν αυτές οι μεταλλάξεις προϋπήρχαν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ή δημιουργήθηκαν με τη μακροχρόνια χημειοθεραπεία, είναι δύσκολο προς το παρόν να εξακριβωθεί.

Η θεραπεία επανεισαγωγής στην ύφεση μετά από υποτροπή είναι επιτυχής σε ποσοστό 65-85% και περιλαμβάνει τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα βινκριστίνη, ασπαραγινάση, στεροειδή και ανθρακυκλίνες, ενώ η συνέχεια του θεραπευτικού πρωτοκόλλου καθορίζεται από τους παράγοντες κινδύνου.

#### **4. Κυτταρικός κύκλος**

Ο κυτταρικός κύκλος είναι ο βασικός μηχανισμός αναπαραγωγής των ευκαρυωτικών κυττάρων και χαρακτηρίζεται από τις συντονισμένες διεργασίες της κυτταρικής αύξησης, της αντιγραφής του DNA, της κατανομής των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα και της κυτταρικής διαίρεσης (Hartwell et al., 1994). Διαιρείται σε 4 φάσεις και ειδικότερα, στη φάση M (μίτωση), στη φάση G1 (μεταξύ μίτωσης και έναρξης αντιγραφής DNA, προσυνθετική φάση), στη φάση S (αντιγραφή DNA, συνθετική φάση) και στη φάση G2 (προετοιμασία μίτωσης, μετασυνθετική ή προμιτωτική φάση). Αντίστοιχα, οι περίοδοι του κυτταρικού κύκλου είναι η μίτωση και η μεσόφαση – το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο κυτταρικών διαιρέσεων, ενώ ως φάση G0 χαρακτηρίζεται η περίοδος κατά την οποία το κύτταρο βρίσκεται “εκτός κυτταρικού κύκλου”, σε κατάσταση ηρεμίας. Η μίτωση M διακρίνεται σε 5 στάδια, την πρόφαση, την προμετάφαση, την μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση (Hrtwell et al., 1994).

Ο κυτταρικός κύκλος υπόκειται σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς οι οποίοι περιλαμβάνουν μηχανισμούς ελέγχου του ίδιου του κύκλου και μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων (Lundberg et al., 1999). Συγκεκριμένα, τα 4 συστήματα ελέγχου είναι ο έλεγχος της μεταγωγής των σημάτων που πυροδοτούν την έναρξη του κυτταρικού κύκλου (signal transduction pathway), ο έλεγχος της αλληλοδιαδοχής των φάσεων, μέσω του συμπλέγματος κυκλινών-κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) και της αρνητικής ρύθμισης από τους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CKIs), και η ενδεχόμενη παύση στα σημεία ελέγχου (checkpoints) (Besson et al., 2008), ο έλεγχος της παραγωγής των δομικών στοιχείων και ο έλεγχος της διάταξης και λειτουργίας τους. Το σύστημα ελέγχου ενεργοποιεί κατά καθορισμένη τάξη και ακολουθία τα ένζυμα και τις πρωτεΐνες που διεκπεραιώνουν την κάθε διεργασία και τα απενεργοποιεί, πάλι κατά καθορισμένη τάξη και ακολουθία, μόλις ολοκληρωθεί η αντίστοιχη διεργασία. Η ενεργοποίηση και απενεργοποίηση λαμβάνουν χώρα με κύριο μηχανισμό την φωσφορυλίωση και, αντίστοιχα, την αποφωσφορυλίωση κρίσιμων πρωτεϊνών, ενώ, χαρακτηριστικά, τα επίπεδα έκφρασης των κυκλινών μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Λειτουργικά, οι κυκλίνες διακρίνονται σε 2 κύριες οικογένειες (Besson et al., 2008). Η οικογένεια G1/S περιλαμβάνει τις κυκλίνες C, D1, D2, D3 και E, που είναι σημαντικές για τη δίοδο του κυττάρου από τη φάση G1 και την είσοδό του στη φάση S. Η οικογένεια G2/M περιλαμβάνει τις κυκλίνες A, B1, B2. Η κυκλίνη A εμπλέκεται στη σύνθεση του DNA, στην ολοκλήρωση της φάσης S και στην προετοιμασία του κυττάρου για τη μετάβαση στη μίτωση, ενώ οι κυκλίνες B1, B2 ρυθμίζουν την μη αναστρέψιμη είσοδο του κυττάρου στη μίτωση, την αλληλουχία των γεγονότων και την ολοκλήρωση της φάσης M.

Η σύνθεση του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα ξεκινά από πολλά διαφορετικά και ανεξάρτητα σημεία (origins of replication), διότι, αν υπήρχε ένα μόνο σημείο έναρξης της αντιγραφής, η διάρκεια της φάσης S θα ήταν υπερβολικά μεγάλη και οι πιθανότητες λάθους αυξημένες. Στα σημεία έναρξης σχηματίζεται προς το τέλος της φάσης G1 το προ-αντιγραφικό σύμπλεγμα, το οποίο είναι απαραίτητο για την δράση των CDKs της φάσης S. Επιπλέον, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται από τα ογκοκατασταλτικά μονοπάτια p53 (ρυθμίζει την στάση του κυττάρου στις φάσεις G1 και G2), Rb (ρυθμίζει το περιοριστικό σημείο G1-S) και p27 (δρα ως μεσολαβητής της στάσης του κυττάρου στη φάση G1-S) (Kato et al., 1994, Bai et al., 2007).

Οι παραπάνω μηχανισμοί εξασφαλίζουν την αντιγραφή και την κατανομή του γενετικού υλικού, όμως δε διασφαλίζουν την πιστότητα της αντιγραφής και την ισοκατανομή του γενετικού υλικού ούτε δίνουν την δυνατότητα μετα-μιτωτικής διαφοροποίησης. Επομένως, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει αρνητικούς μηχανισμούς ρύθμισης και ελέγχου (checkpoints) του κυτταρικού κύκλου, με σκοπό την ικανότητα διαφοροποίησης, υπό καθορισμένες συνθήκες, και την άμυνα στο περιβαλλοντικό γενοτοξικό stress.

Την τελευταία δεκαετία υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τον κυτταρικό κύκλο, που βασίζεται στην υπόθεση ότι διαταραχές στην ρύθμισή του οδηγούν σε γενετική αστάθεια, με αποτέλεσμα την προδιάθεση σε νεοπλασματική εξαλλαγή (Sherr et al., 2000, Malumbres et al., 2001).

## 5. Απόπτωση

Η απόπτωση, δηλαδή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μια γενετικά καθορισμένη διαδικασία με σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση και την ανάπτυξη, τη ρύθμιση των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος και τη διατήρηση της ομοιόστασης (Afford et al., 2000). Διαταραχές στην αλληλουχία των γεγονότων που χαρακτηρίζουν την απόπτωση μπορεί να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις, όπως αυτοάνοσα νοσήματα, ιογενείς λοιμώξεις και νεοπλασίες (Kerr et al., 1994). Ειδικότερα, τα τελευταία χρόνια κερδίζει έδαφος η υπόθεση ότι στην παθογένεια, αλλά και την εξέλιξη της λευχαιμίας εμπλέκεται και η απορρύθμιση της ισορροπίας ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αίματος και στην ικανότητά τους να οδηγηθούν σε απόπτωση (Peters et al., 1998, Lowe et al., 2000, Johnstone et al., 2002).

Η απόπτωση είναι ενεργητική κυτταρική λειτουργία, η οποία πυροδοτείται από μια ποικιλία ενδογενών και εξωγενών ερεθισμάτων και οδηγεί σε αλληλουχία μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών στο κυτταρικό επίπεδο. Τα πυροδοτικά ερεθίσματα μπορεί να είναι η θεραπεία με κυτταροτοξικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ή ακτινοβολία, η έλλειψη σημάτων επιβίωσης, οι ελαττωματικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών του γενετικού υλικού και άλλα (Hacker et al., 2000). Οι μορφολογικές μεταβολές στο κύτταρο κατά τη διαδικασία της απόπτωσης είναι η εμφάνιση προεξοχών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, η συσσώρευση της χρωματίνης στην πυρηνική μεμβράνη, η συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος και η συμπύκνωση, κατάτμηση και διασπορά του πυρήνα. Η αποπτωτική αλληλουχία ολοκληρώνεται με τον κατακερματισμό του κυττάρου και το σχηματισμό των αποπτωτικών σωμάτων, τα οποία τελικά, υπό φυσιολογικές συνθήκες, φαγοκυτταρώνονται (Reed, 2000, Afford et al., 2000). Η πλειοψηφία των μορφολογικών και βιοχημικών μεταβολών προκαλούνται από την ενεργοποίηση μιας ομάδας ενδοκυττάρων πρωτεασών, των κασπασών (caspases, cysteine-dependent aspartate-specific proteases), ένζυμα τα οποία χαρακτηρίζονται από ομολογία και εξελικτική συντήρηση (Hengartner, 2000). Τόσο ο γενετικός έλεγχος όσο και η ρύθμιση της απόπτωσης υπόκειται σε 2 βασικούς μηχανισμούς, την εξωγενή σηματοδοτική οδό των υποδοχέων και την ενδογενή σηματοδοτική οδό των μιτοχονδρίων, που προϋποθέτουν τη δράση διαφορετικής κασπάσης (Lodish et al., 2000). Έχουν αναγνωρισθεί γονίδια που ευοδώνουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Bcl-xs, Bax, BH3) και αντίστοιχα γονίδια που αναστέλλουν την απόπτωση (Bcl-2, Bcl-xl), ενώ ως κυριότεροι ρυθμιστικοί παράγοντες αναφέρονται τα ογκογονίδια myc, Ras και p53 και η πρωτεΐνη Fas. Οι περισσότεροι τύποι οξείας λευχαιμίας έχουν σχετιστεί με την ταυτοποίηση χαρακτηριστικών χρωμοσωμικών μεταβολών (μετατοπίσεις), οι οποίες οδηγούν στην απορρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που επιταχύνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (c-myc) ή αυξάνουν την έκφραση γονιδίων που αναστέλλουν την απόπτωση (Bcl-2). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι το μόριο Bcl-2 δεν παίζει σημαντικό ρόλο στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο στη λευχαιμία παιδικής ηλικίας, ενώ το πρότυπο έκφρασης και ρύθμισης των γονιδίων Bcl-2 και Bcl-xl είναι διαφορετικό στην ΟΛΛ στα παιδιά (Kroemer, 1997, Findley et al., 1997).

Όπως αναφέρθηκε, τις τελευταίες δεκαετίες υποστηρίζεται η άποψη ότι η διαδικασία της απόπτωσης μπορεί να επιδράσει στον καρκινικό φαινότυπο και ότι η διαταραχή και απορρύθμιση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ενισχύει τη μεταναστευτική ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων (Lowe et al., 2000). Σε κυτταρικούς πληθυσμούς

με υψηλό δείκτη διαίρεσης, όπως είναι το αιμοποιητικό σύστημα, έχει μεγάλη σημασία η σωστή ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης. Επομένως, ο συνδυασμός ελαττωματικής οδού απόπτωσης και ογκογενετικών νεοπλασματικών εξαλλαγών μπορεί, δυνητικά, να οδηγήσει σε ανάπτυξη λευχαιμίας, αλλά και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη θεραπεία. Η ικανότητα των λευχαιμικών κυττάρων να διαφεύγουν της απόπτωσης αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό που ευοδώνει την επιβίωση και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους, ενώ, αντίστοιχα, η αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας ή της ακτινοθεραπείας που εφαρμόζεται βασίζεται στη στοχευμένη πυροδότηση της αποπτωτικής διαδικασίας, με σκοπό την εξουδετέρωση των νεοπλασματικών κυττάρων (Fulda, 2009, Melet et al., 2008, Fulda, 2009). Επιπλέον, στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν υψηλά ποσοστά απόπτωσης σε όγκους που εμφάνισαν αυτόματη υποστροφή και σε όγκους που αντιμετωπίστηκαν με κυτταροτοξικά χημειοθεραπευτικά πρωτόκολλα (Kerr et al., 1994).

## 6. Αγγειοποιητίνη 1 (Angio-1)

Οι αγγειοποιητίνες κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ομοίωση του αγγειακού ενδοθηλίου (Daly et al., 2004). Από τα μέλη της οικογένειας των αγγειοποιητινών, οι καλύτερα μελετημένες στον ανθρώπινο οργανισμό είναι οι αγγειοποιητίνες 1 και 2 (Angio-1 και 2). Ανήκουν στους αυξητικούς παράγοντες, ασκούν απευθείας δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποτελούν συνδέτες για τον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης Tie2, ο οποίος εκφράζεται, σχεδόν αποκλειστικά, στα ενδοθηλιακά και στα πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα (μπορεί να εκφραστεί στην επιφάνεια μονοκυττάρων και ηωσινοφίλων που σχετίζονται με όγκους)(De Palma et al., 2005).

Από την πρώτη περιγραφή της το 1996, η Αγγειοποιητίνη 1 έχει καθιερωθεί ως σημαντικός παράγοντας για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της αγγειογένεσης, ενώ σύμφωνα με τα σημερινά βιβλιογραφικά δεδομένα (Fiedler et al., 2006), καταδεικνύεται ότι οι αγγειοποιητίνες και ο υποδοχέας τους Tie2 δε συμμετέχουν στην αγγειογενετική φάση κατά την εμβρυική ζωή, αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειακή αναδόμηση και ωρίμανση, αφού είναι απαραίτητες για την επικοινωνία μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων και μεσεγχύματος και τη διατήρηση σταθερών κυτταρικών και βιοχημικών αλληλεπιδράσεων.

Η Angio-1 με τη σύνδεσή της στον υποδοχέα Tie2 οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση αυτού, μέσω της οδού της PI3-K, και την ενεργοποίηση της Akt. Η Akt απενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα FKHR-1, ο οποίος, ως πιθανός επαγωγέας της έκφρασης της Angio-2, εμποδίζει την παραγωγή της. Με τον τρόπο αυτό, η Angio-1 εμποδίζει την κυτταρική απόπτωση και την ενεργοποίηση του ενδοθηλίου, δηλαδή η φωσφορυλίωση του υποδοχέα Tie2 οδηγεί σε σταθεροποίηση του ενδοθηλίου. Η Angio-1, σταθεροποιώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αναστέλλοντας την αγγειακή διαπερατότητα, επάγει την ανάπτυξη, την ανακατασκευή και την ωρίμανση του αγγειακού ενδοθηλίου (Yuan et al., 2009).

Η Angio-2 λειτουργεί ως αυτοκρινής μεσολαβητής του ενδοθηλίου και αποθηκεύεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συνδέεται στον υποδοχέα Tie2, εμποδίζοντας την αυτοφωσφορυλίωσή του, και ανταγωνίζεται τη σύνδεση της Angio-1. Η Angio-2 μπορεί να δράσει ως ανταγωνιστής του υποδοχέα Tie2 παρουσία της Angio-1, αλλά και ως ασθενής

αγωνιστής του υποδοχέα Tie2 απουσία της Angio-1 και ως δοσοεξαρτώμενος ανταγωνιστής. Συμβάλλει ενεργά στην αποσταθεροποίηση του αγγειακού ενδοθηλίου και στην αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, ενώ καθιστά τα ενδοθηλιακά κύτταρα ευαίσθητα στη δράση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και του παράγοντα VEGF.

Συμπερασματικά, η ισορροπία Angio-1/Angio-2 καθορίζει τη λειτουργική κατάσταση του αγγειακού σχηματισμού (Fukuhara et al., 2009, Arai et al., 2004).

Επιπλέον, το σύστημα των αγγειοποιητινών 1 και 2 με τον υποδοχέα τους συμμετέχει στην αγγειογένεση των συμπαγών όγκων και στη βιολογία των αιματολογικών νεοπλασιών. Σύμφωνα με τα δεδομένα της τρέχουσας βιβλιογραφίας (Arai et al., 2004, De Palma et al., 2005), η αγγειοποιητίνη 1 παράγεται κυρίως από αρχέγονους πληθυσμούς κυττάρων στο μυελό των οστών στους ενήλικες, διατηρεί την ικανότητα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων να αποκαθίστανται πληθυσμιακά *in vivo*, αναστέλλοντας την κυτταρική διαίρεση, και προάγει την *in vivo* φάση G0 του κυτταρικού κύκλου των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, προσφέροντας προστασία από ποικίλα ερεθίσματα “stress”. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι ο υποδοχέας Tie2 εκφράζεται στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα που βρίσκονται στις ενδοστικές φωλεές σε κατάσταση ηρεμίας, ενώ το μονοπάτι Angio-1/Tie2 προάγει την προσκόλληση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στον οστικό μυελό, διατηρώντας τα ανώριμα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους *in vitro* (Arai et al., 2004). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, καταδεικνύεται ένα νέο μοντέλο κατά το οποίο η αγγειοποιητίνη 1, που παράγεται από κύτταρα που υποστηρίζουν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, ενεργοποιεί τον υποδοχέα Tie2 στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ευόδωση της προσκόλλησής τους στο στρώμα του μυελού των οστών και, τελικά, τη διατήρηση των κυττάρων σε φάση ηρεμίας και την αυξημένη επιβίωσή τους.

## 7. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1α)

Οι χημειοκίνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια κυτταροκινών, με χαρακτηριστική κοινή ιδιότητα την ικανότητα να προκαλούν χημειοταξία των κυττάρων που φέρουν τους υποδοχείς τους. Κατατάσσονται σε 4 υποομάδες, ανάλογα με τη μοριακή τους δομή, που καθορίζεται από τον αριθμό καταλοίπων κυστεΐνης, και συγκεκριμένα:

- C χημειοκίνες (ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ κυστεϊνών)
- CC χημειοκίνες (δύο δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ κυστεϊνών)
- CXC χημειοκίνες (δύο δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ κυστεϊνών και μεταξύ των γειτονικών καταλοίπων παρεμβάλλεται κατάλοιπο διαφορετικού αμινοξέος)
- CX3C χημειοκίνες (δύο δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ κυστεϊνών και μεταξύ των γειτονικών καταλοίπων παρεμβάλλονται 3 κατάλοιπα διαφορετικού αμινοξέος)(Zlotnik et al., 2006).

Ο παράγοντας CXCR4 είναι ο υποδοχέας της χημειοκίνης SDF-1/CXCL12. Το γονίδιο του βρίσκεται στο μακρύ (q) σκέλος του χρωμοσώματος 2, στη θέση 21 (Yu et al., 2006, Shirozu et al., 1995). Η μεταξύ τους αλληλεπίδραση θεωρούνταν αποκλειστική, σε αντίθεση με άλλες χημειοκίνες και τους υποδοχείς τους. Ωστόσο, νεότερα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η SDF-1 δύναται να συνδεθεί και με έναν επιπλέον υποδοχέα με επτά διαμεμβρανικές έλικες, τον CXCR7 (Sun et al., 2010). Το σύστημα SDF-1/CXCR4 έχει σημαντικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη (η απενεργοποίηση του CXCR4 στο έμβρυο είναι θανατηφόρα, Balkwill et al., 2004), στην ομοιόσταση (ο παράγοντας SDF-1 είναι ομοιοστατική χημειοκίνη, εκφράζεται συνεχώς από στρωματικά κύτταρα σε πολλούς ιστούς και ρυθμίζει την κίνηση των

αιμοποιητικών κυττάρων και την αρχιτεκτονική του δευτεροβάθμιου λεμφικού ιστού, Van Overstraeten-Schlogel et al., 2006) και στις φλεγμονώδεις νόσους (προσέλκυση κυττάρων στο σημείο της φλεγμονής και παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών, σύνδεση με ιστικές βλάβες, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμία των άκρων και βλάβες των ιστών μετά ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία, Yu et al., 2006). Τέλος, σε πρόσφατες μελέτες, αποδείχθηκε ότι η δέσμευση του παράγοντα SDF-1 με τον υποδοχέα του CXCR4, που εκφράζεται στα ενδοθηλιακά, αλλά και σε άλλα κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών, οδηγεί στη διάσωση της χημειοκίνης από αποικοδόμηση στο περιφερικό αίμα (De La Luz Sierra et al., 2004).

Η χημειοκίνη SDF-1 αποτελεί βασικό ρυθμιστή της φυσιολογικής κινητικότητας των κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και μετά τη γέννηση, ενώ, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα (Balkwill, 2004, Zlotnik, 2006), εμπλέκεται στην παθολογική κινητικότητα των κυττάρων στην καρκινογένεση και τη μετάσταση των όγκων. Εκφράζεται συστηματικά από τα στρωματικά, τα ενδοθηλιακά, τα δενδριτικά και άλλα κύτταρα και συνεχώς σε διάφορα όργανα συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, της καρδιάς, του ήπατος, των νεφρών, του εγκεφάλου, των σκελετικών μυών, του δέρματος και του μυελού των οστών. Η έκφραση του SDF-1 υπόκειται σε θετική ρύθμιση από τις κυτταροκίνες TGF-β1, VEGF, bFGF και σε αρνητική ρύθμιση από τις κυτταροκίνες IL-5, IFN-α, IFN-γ (Nie et al., 2008). Αξίζει να σημειωθεί πως πρόκειται για αυξητικό παράγοντα εξαιρετικά συντηρημένο μεταξύ των ειδών, όπως προκύπτει από την ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων. Λειτουργική πρωτεΐνη του υποδοχέα CXCR4 ανιχνεύεται σε λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος, μονοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, πρώιμα B κύτταρα, CD16<sup>-</sup> NK κύτταρα, CD34<sup>+</sup> προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, σε δενδριτικά κύτταρα, μαστοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, αστροκύτταρα και νευρώνες, καθώς και σε επιθηλιακά κύτταρα εντέρου, αμφιβληστροειδή και οδόντων. Τα κακοήθη κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς χημειοκινών, γεγονός που σχετίζεται με την ανάπτυξη και εξάπλωση των όγκων. Η έκφραση του υποδοχέα CXCR4 έχει ανιχνευθεί σε περισσότερους από 23 τύπους καρκίνου και αυτή η επαγωγή της έκφρασης έχει αποδοθεί στις συνθήκες υποξίας κατά την καρκινογένεση. Η δράση του SDF-1 ως χημειοτακτικού παράγοντα και η ικανότητά του να ενισχύει τη δραστηριότητα των ιντεγκρινών, οδήγησαν στην υπόθεση ότι ο υποδοχέας CXCR4 σχετίζεται με τις μεταστάσεις κακοηθών όγκων (Van Den Berk et al., 2014, Burger et al., 2006).

Μέχρι σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί έξι ισόμορφα της χημειοκίνης SDF-1, και συγκεκριμένα η SDF-1α, η SDF-1β, η SDF-1γ, η SDF-1δ, η SDF-1ε και η SDF-1φ (Yu et al., 2006). Οι καλύτερα μελετημένες ισομορφές είναι οι SDF-1α και SDF-1β, ενώ η SDF-1α είναι και η περισσότερο εκφραζόμενη. Έχουν παρόμοια λειτουργικότητα, αλλά μη ταυτόσημο μοντέλο έκφρασης. Ακόμη, η SDF-1α υπόκειται σε πρωτεόλυση στο αίμα, με αποτέλεσμα τη μείωση κατά 50% της συγγένειάς της για τον υποδοχέα CXCR4, παρατήρηση που δεν αφορά στην SDF-1β, ενώ η SDF-1β παρουσιάζει, συγκριτικά, μεγαλύτερη δραστηριότητα. Οι υπόλοιπες τέσσερις ισομορφές ανακαλύφθηκαν πιο πρόσφατα και έχουν διαφορετική ιστική κατανομή, ενώ ο ρόλος τους δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

## ΣΚΟΠΟΣ

Το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και εξ αυτού τα μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος που αποτελούν τμήμα του, έχει προταθεί ότι διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στην εμφάνιση και στην πρόοδο της λευχαιμίας. Επομένως, θα μπορούσε να ισχύσει η υπόθεση ότι και τα ΜΚ εμπλέκονται στη διαταραχή της φυσιολογικής αιμοποίησης. Ο δυνητικός ρόλος των ΜΚ στην ογκογένεση και τη λευχαιμογένεση δεν είναι διευκρινισμένος, ενώ τα αποτελέσματα των ήδη δημοσιευμένων μελετών είναι αντιφατικά. Σε *in vitro* μελέτες, τα ΜΚ από ενήλικες ασθενείς στη διάγνωση οξείας μυελογενούς και οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας εμφανίζονται να μειονεκτούν ως προς την ευόδωση της επιβίωσης των φυσιολογικών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η συγκεκριμένη λειτουργική ικανότητα αποκαθίσταται, εν μέρει, μετά τη χημειοθεραπεία.

Η πιθανή συμμετοχή των ΜΚ στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στα παιδιά έχει προταθεί πρόσφατα. Ταυτοποίηση γενετικών βλαβών που υπεισέρχονται στην παθογένεια της λευχαιμίας οδηγεί στην υπόθεση της κλωνικής συσχέτισης μεταξύ μεσεγχυματικών και λευχαιμικών κυττάρων στην ΟΛΛ στα παιδιά και της συμμετοχής των ΜΚ στην παθοφυσιολογία της νόσου.

Επιπλέον, η συμμετοχή των ΜΚ στην παθογένεια διαφόρων νεοπλασματικών νοσημάτων, μέσω της απορρύθμισης της έκκρισης χημειοκινών όπως ο SDF-1a αποτελεί ένδειξη για τη διαμεσολάβησή τους στη μετανάστευση και εγκατάσταση των κυττάρων. Οι γνώσεις για το ρόλο του στις αιματολογικές νεοπλασίες και για την πιθανή επίδραση της χημειοθεραπείας στην έκκρισή του είναι περιορισμένες, ενώ τα αποτελέσματα των μελετών είναι αντικρουόμενα. Ο παράγοντας Ang-1, αρχικά γνωστός για τον ρόλο του στην αγγειογένεση, τόσο ενδομήτρια όσο και στην ενήλικη ζωή, βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Tie2, ο οποίος εκφράζεται από τα ΑΑΚ διευκολύνοντας τη διατήρησή τους σε κατάσταση ηρεμίας στο μυελικό περιβάλλον.

Τα ΜΚ διαφορετικής πηγής προέλευσης εμφανίζουν και διαφορετικές ιδιότητες. Επιπλέον, τα ΜΚ από το μυελό των οστών έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά στα δείγματα από παιδιατρικούς ασθενείς συγκριτικά με τα δείγματα από ενήλικες.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι ο χαρακτηρισμός (μορφολογικός, ανοσοφαινοτυπικός και λειτουργικός) των μεσεγχυματικών κυττάρων στρώματος από μυελό των οστών παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στη διάγνωση της νόσου, ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή επίδραση της λευχαιμίας στα βιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Επιπλέον, θα γίνει σύγκριση των χαρακτηριστικών των ΜΚ στις φάσεις θεραπείας και στο τέλος αυτής, προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση της χημειοθεραπείας.

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα μπορούν να βρουν κλινική εφαρμογή στον τομέα της κυτταρικής θεραπείας και οι τρέχουσες μελέτες στοχεύουν στην κατεύθυνση της κατανόησης των ιδιοτήτων τους, των μηχανισμών δράσης τους και του πιθανού ρόλου τους στις αιματολογικές νεοπλασίες.

## **ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **1. Ασθενείς και υλικό**

Το υλικό της μελέτης περιλαμβάνει δείγματα μυελού των οστών (ΜΟ) από παιδιά με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ) και διήθηση του ΜΟ σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90% στη διάγνωση. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν:

- 28 δείγματα στη διάγνωση
- 12 δείγματα τη 15η και 20 δείγματα την 33η ημέρα της φάσης επαγωγής στην ύφεση
- 33 δείγματα στη φάση εδραίωσης της ύφεσης
- 19 δείγματα στη φάση διατήρησης της ύφεσης
- 20 δείγματα στο τέλος της χημειοθεραπείας (ΧΜΘ), μετά την ολοκλήρωση του θεραπευτικού πρωτοκόλλου.

Οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες, την ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου (MR) και την ομάδα υψηλού κινδύνου (HR), με βάσει τους προγνωστικούς παράγοντες της ΟΛΛ. Συγκεκριμένα, στην ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου εντάχθηκαν τα δείγματα ασθενών ηλικίας 1-10 ετών, με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων  $< 50,000/\text{mm}^3$  στη διάγνωση, χωρίς επιβαρυντικά ανοσοφαινοτυπικά και κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά και με ικανοποιητική ενωρίς απάντηση στη θεραπεία (βλάστες  $< 1,000/\text{mm}^3$  στο αίμα την 8<sup>η</sup> μέρα μετά τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, βλάστες  $< 5\%$  στο μυελό τη 15<sup>η</sup> ημέρα επαγωγής στην ύφεση, MRD  $< 0,01\%$  στο τέλος της φάσης επαγωγής στην ύφεση). Αντίστοιχα, στην ομάδα υψηλού κινδύνου εντάχθηκαν τα δείγματα ασθενών ηλικίας  $< 1$  έτους ή  $\geq 10$  ετών, με αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων  $\geq 50,000/\text{mm}^3$  στη διάγνωση, με επιβαρυντικές κυτταρογενετικές αλλοιώσεις και μη ικανοποιητική απάντηση στη θεραπεία (βλάστες  $\geq 1,000/\text{mm}^3$  στο αίμα την 8<sup>η</sup> μέρα μετά τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, βλάστες  $\geq 5\%$  στο μυελό τη 15<sup>η</sup> ημέρα επαγωγής στην ύφεση, MRD  $\geq 0,01\%$  στο τέλος της φάσης επαγωγής στην ύφεση).

Όλοι οι ασθενείς έλαβαν θεραπεία σύμφωνα με το χημειοθεραπευτικό πρωτόκολλο ALL BFM-2000.

Την ομάδα ελέγχου αποτελούν 12 παιδιά με συμπαγείς όγκους, χωρίς διήθηση του ΜΟ και πριν την έναρξη της ΧΜΘ.

Η ηλικία των ασθενών κυμαίνεται από 1.2 έως 18 έτη, με διάμεση τιμή τα 6 έτη.

Η μελέτη έγινε αποδεκτή από την Επιτροπή Ηθικής Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης.

### **2. Απομόνωση Μονοπύρηνων Κυττάρων (MNC), Καλλιέργεια και έκπτυξη Μεσεγγυματικών Κυττάρων (MK, MSC) από τα δείγματα μυελού των οστών**

Στα πειράματα της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα κύτταρα ΜΟ. Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε υπό στείρες συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής.

Για την απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από τα δείγματα του ΜΟ, ακολουθήθηκαν τα διαδοχικά στάδια της ανάδευσης και αραίωσης με θρεπτικό υλικό a-



MEM (Minimum Essential Media) χωρίς νουκλεοτίδια (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) σε αναλογία 1:2, του διαχωρισμού με φικόλη (Ficoll-Hyraque, d=1077g/ml; Lymphoprep-Nycomed, Oslo, Norway) σε αναλογία κατά την επίστρωση 1:1, της φυγοκέντρωσης σε ταχύτητα 1800rpm για 30 λεπτά και της συλλογής της στιβάδας των μονοπύρηνων κυττάρων. Μετά τη μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου, τα μονοπύρηννα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό α-MEM χωρίς νουκλεοτίδια. Σε αυτό είχε προστεθεί 1% L-γλουταμίνη 200mM (Invitrogen), 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη 10,000 U-10 mg/ml (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) και 10% επιλεγμένος ορός εμβρύου βοός (Fetal Calf Serum, FCS; Hyclone, PerbioScience, Erembodegem-Aalst, Belgium), παρουσία 1ng/ml του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών-2 (Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2; Abcys SA, Paris, France).

Η αρχική καλλιέργεια έγινε σε φλάσκα treated 25 cm<sup>2</sup> ή 75 cm<sup>2</sup> με συγκέντρωση κυττάρων 5×10<sup>4</sup> /cm<sup>2</sup>. Η απόρριψη και ανανέωση του θρεπτικού υλικού γινόταν δύο φορές την εβδομάδα. Σε κάθε αλλαγή του θρεπτικού υλικού, εξεταζόταν η μορφολογία και το ποσοστό στρώματος των κυττάρων με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου. Η επώαση των καλλιεργειών έγινε σε κλίβανο, υπό σταθερές συνθήκες, θερμοκρασίας 37°C και συγκέντρωσης CO<sub>2</sub> 5%.

Όταν η πυκνότητα του στρώματος των καλλιεργειών έφτανε σε ποσοστό περίπου 90%, τα κύτταρα αποκολλούνταν με τη χρήση 0.25% θρυψίνης- EDTA 1X (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) και η καλλιέργεια συνεχίζονταν σε φλάσκες 75 cm<sup>2</sup> και συγκέντρωση κυττάρων 1×10<sup>3</sup> /cm<sup>2</sup>. Η καλλιέργεια μετά την πρώτη θρυψινοποίηση ονομάζεται επανακαλλιέργεια 1 (passage1; P1). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα επανακαλλιεργήθηκαν 5 φορές (passage5; P5).

### 3. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση

Για την ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των δειγμάτων μελετήθηκε η έκφραση συγκεκριμένων αντιγόνων επιφανείας σε διάφορα στάδια καλλιέργειας. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- CD105-phycoerythrin (PE)  
(Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- CD146-phycoerythrin (PE)  
(BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA)
- CD76-phycoerythrin (PE)  
(BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA)
- CD29-fluoroisothiocyanate (FITC)  
(Immunotech, Marseille, France)
- CD44- fluoroisothiocyanate (FITC)  
(Immunotech, Marseille, France)
- CD90- fluoroisothiocyanate (FITC)  
(Immunotech, Marseille, France)
- CD14- fluoroisothiocyanate (FITC)  
(Immunotech, Marseille, France)
- CD45-fluoroisothiocyanate (FITC)  
(Cytognos SL, Salamanca, Spain)
- CD34-phycoerythrin (PE)

(BD Biosciences, San Jose, CA USA)

-CD95-fluoroisothiocyanate (FITC)

(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

Σε σωληνάρια RIA, στα κύτταρα ( $1 \times 10^5$ ) προστέθηκαν 100μl PBS (Phosphate Buffered Saline) και το αντίστοιχο μονοκλωνικό αντίσωμα,. Μετά από ήπια ανάδευση (Vortex), έγινε επώαση για 20 λεπτά στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε, προσθήκη PBS + 2% FCS + 0,05% Sodium Azide, φυγοκέντρωση στις 2000rpm για 5 λεπτά και αναρροφήθηκε το υπερκείμενο. Τα σημασμένα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 400 μl διαλύματος παραφολμαλδεύδης (PFA) 2%. Ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός και ο έλεγχος της ποσοτικής έκφρασης των μονοκλωνικών αντισωμάτων έγινε σε κυτταρομετρητή Epics Coulter.

#### **4. Μελέτη ικανότητας πολλαπλασιασμού (χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού, DT)**

Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων εκφράζεται με το χρόνο κυτταρικού διπλασιασμού (DT) σε όλα τα στάδια επανακαλλιέργειας, μετά από κάθε θρυψινοποίηση.

Ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$DT = t / n = t \times \log(2) /$$

$\log$  (κύτταρα που συλλέχθηκαν / κύτταρα που άρχισαν την επανακαλλιέργεια)

όπου t το χρονικό διάστημα από την ημέρα έναρξης της καλλιέργειας μέχρι την ημέρα θρυψινοποίησης για το κάθε στάδιο P.

#### **5. Μελέτη κλωνογονικότητας-ικανότητας σχηματισμού αποικιών ινοβλαστών (Colony Forming Unit-Fibroblast, CFU-F)**

Η κλωνογονικότητα των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων μελετήθηκε με την ικανότητα σχηματισμού αποικιών ινοβλαστών (CFU-F). Τα μονοπύρηνια κύτταρα της ημέρας 0 της καλλιέργειας τοποθετήθηκαν σε πλάκα 24 θέσεων σε συγκέντρωση  $1 \times 10^5$  κύτταρα / βοθρίο εις τριπλούν, με θρεπτικό υλικό  $\alpha$ -MEM απουσία αυξητικού παράγοντα FGF-2. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα σε κάθε επανακαλλιέργεια τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri επιφάνειας 20cm<sup>2</sup> σε συγκέντρωση 10 κύτταρα /cm<sup>2</sup> εις διπλούν, με το ίδιο καλλιεργητικό υλικό. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε σταθερές συνθήκες (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) για 14 ημέρες. Μετά το διάστημα των δύο εβδομάδων, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, γίνεται έκπλυση με PBS και μονιμοποίηση των κυττάρων με μεθανόλη (LAB-SCAN; Analytical Sciences) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, απομακρύνεται η μεθανόλη και αφού τα τρυβλία στεγνώσουν στον αέρα, προστίθεται διάλυμα χρωστικής Giemsa για 5 λεπτά. Τέλος, γίνεται δύο φορές έκπλυση με απιονισμένο νερό και όταν στεγνώσουν, καταμετρώνται οι αποικίες με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου. Οι αποικίες κατηγοριοποιήθηκαν, ανάλογα με το μέγεθός τους, σε μικρές ( $\leq 50$  κύτταρα), μεσαίες (50-500 κύτταρα) και μεγάλες ( $\geq 500$  κύτταρα). Το σύνολο των αποικιών όλων των μεγεθών σημειώνεται ως CFU-Fολικά (CFU-Ftot).

Σημείωση: το διάλυμα χρωστικής Giemsa που χρησιμοποιήθηκε συνίσταται σε 3ml Giemsa σε 20ml Giemsa buffer 1x

Giemsa buffer 10x stock solution:

66,3gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 25,6gr  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  +  $\text{dH}_2\text{O}$  μέχρι το 1lt

αραίωση 1: 10 = buffer 1x έτοιμο προς χρήση.

## 6. Μελέτη ικανότητας διαφοροποίησης και ιστοχημική ανάλυση

Η ικανότητα των πολυδύναμων μεσεγχυματικών κυττάρων να διαφοροποιούνται προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα μελετήθηκε στα στάδια P2 ή P3 των καλλιιεργειών. Η ιστοχημική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρώση Oil Red O για τα λιποκύτταρα, von Kossa για τα οστεοκύτταρα και Alcian Blue για τα χονδροκύτταρα.

### 6.1. Διαφοροποίηση MK σε λιποκύτταρα και χρώση λιποκυττάρων με Oil Red O

Με σκοπό την επαγωγή της διαφοροποίησης των MK προς λιποκύτταρα έγινε καλλιέργεια σε φλάσκες επιφανείας  $25\text{cm}^2$  και θρεπτικό υλικό DMEM (Gibco BRL, Paisley, UK) με 20% FCS (Gibco), εμπλουτισμένο με  $1\mu\text{M}$  dexamethasone (Sigma),  $60\mu\text{M}$  indomethacin (Sigma),  $0,5\text{ mM}$  isobutylmethylxanthine (Sigma) και  $100\text{nM}$  rosiglitazone (Cayman Chemicals, AnnArbor, MI, USA). Τα MK σε συγκέντρωση  $4 \times 10^4/\text{cm}^2$ , φυγοκεντρήθηκαν σε ταχύτητα  $1300\text{rpm}$  για 10 λεπτά και προστέθηκε το καλλιιεργητικό υλικό. Η καλλιέργεια έγινε, σε σταθερές συνθήκες (θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$  και συγκέντρωση  $\text{CO}_2$  5%), με αλλαγή του θρεπτικού υλικού κάθε 3-4 ημέρες για 16 ημέρες. Τη 16<sup>η</sup> ημέρα, έγινε απόρριψη του θρεπτικού υλικού, έκπλυση με PBS εις διπλούν και μονιμοποίηση με 10% formalin (Sigma – Aldrich) για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και ξέπλυμα υποστρώματος ξανά με PBS. Στη συνέχεια, το διάλυμα της χρωστικής Oil Red O (σημείωση κατωτέρω) αφού φιλτραριστεί με χρήση φίλτρου σύριγγας  $0,2\mu\text{M}$  προστίθεται στα κύτταρα. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15-20 λεπτά και στη συνέχεια τα κύτταρα ξεπλένονται τρεις φορές με απεσταγμένο νερό. Τέλος, για αντιχρωματισμό, προστίθενται 2ml hematoxylin 2 eosin για 5 λεπτά, απομακρύνεται η χρωστική και οι φλάσκες αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα.

*Σημείωση:*

Το διάλυμα της χρωστικής συνίσταται σε  $5\text{mg/ml}$  Oil Red O (Sigma) σε 99% ισοπροπανόλη την ημέρα της χρώσης χρησιμοποιείται αραιωμένο ( $6\text{ml}$  από το αρχικό διάλυμα +  $4\text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$ )

### 6.2. Διαφοροποίηση MK σε οστεοκύτταρα και χρώση οστεοκυττάρων με von Kossa

Προκειμένου να επιτευχθεί επαγωγή της διαφοροποίησης των MK προς οστεοκύτταρα έγινε καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό DMEM (Gibco BRL, Paisley, UK) με 10% FCS (Gibco), εμπλουτισμένο με  $0,1\mu\text{M}$  dexamethasone,  $3\text{mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  και  $0,15\text{mM}$  ascorbate-2-phosphate (όλα Sigma). Τα MK σε συγκέντρωση  $1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ , φυγοκεντρήθηκαν στις  $1300\text{rpm}$  για 10 λεπτά και προστέθηκε το καλλιιεργητικό υλικό. Η καλλιέργεια έγινε σε φλάσκες επιφανείας  $25\text{cm}^2$ , σε σταθερές συνθήκες (θερμοκρασία  $37^\circ\text{C}$  και συγκέντρωση  $\text{CO}_2$  5%), με αλλαγή του θρεπτικού υλικού κάθε 3-4 ημέρες για 3 εβδομάδες. Με τις συνθήκες αυτές, παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας της αλκαλικής φωσφατάσης και σχηματισμός στρώματος με αυξημένη περιεκτικότητα σε ασβέστιο. Έγινε μονιμοποίηση με 10% formalin (Sigma) και προσθήκη, αρχικά υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης

(σημείωση κατωτέρω) για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια του διαλύματος χρωστικής von Kossa (Silver Nitrate 0,5gr σε 20ml dH<sub>2</sub>O). Η χρωστική παραμένει για 30 λεπτά και, αφού ξεπλυθεί, οι φλάσκες αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα.

*Σημείωση:* παρασκευή υποστρώματος αλκαλικής φωσφατάσης

2 mg Naphthol ASMX phosphate (Sigma N4875) διαλύονται σε 80μl NN-DMF (Sigma D4551) και προστίθενται σε 19.92 ml Tris-HCl 0,1M (Invitrogen).

Μετά από καλή ανάδευση, σε αυτό προστίθενται 10mg Red violet LB salt (Sigma F3381- διατηρείται στους -20oC).

Πριν τη χρώση το υπόστρωμα φιλτράρεται.

### **6.3. Διαφοροποίηση MK σε χονδροκύτταρα και χρώση χονδροκυττάρων με Alcian Blue**

Για την επαγωγή της διαφοροποίησης των MK προς χονδροκύτταρα έγινε καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό DMEM (100 ml) Gibco BRL, Paisley, UK) εμπλουτισμένο με 0,1μM dexamethasone, 1mM sodium pyruvate, 0,17mM ascorbate-2-phosphate, 0,35mM proline, 5,33 μg/ml linoleic acid (all from Sigma), 1ml of 100x ITS (Carmbrax BioScience, Wokingham, UK), BSA 75% (1660μl) και 10ng/ml TGF-β1 (R&D Systems, Abingdon, UK). Τα MK σε συγκέντρωση 2.5x10<sup>5</sup>, φυγοκεντρήθηκαν σε σωληνάρια πολυπροπυλενίου (falcon) όγκου 15ml στις 1500rpm για 5 λεπτά και προστέθηκε το καλλιεργητικό υλικό. Η καλλιέργεια έγινε σε σταθερές συνθήκες (θερμοκρασία 37°C και συγκέντρωση CO<sub>2</sub> 5%), με αλλαγή του θρεπτικού υλικού κάθε 3-4 ημέρες για 2 εβδομάδες. Υπό αυτές τις συνθήκες, παρατηρήθηκε ταχεία απώλεια της μορφολογίας των ινοβλαστών και σχηματισμός μικροσφαιριδίων. Έγινε μονιμοποίηση με 10% formalin (Sigma), σκλήνωση σε παραφίνη και χρώση με διάλυμα χρωστικής Alcian Blue (3% Alcian Blue και 3% οξείκό οξύ σε αναλογία 1:1).

## **7. Μελέτη απόπτωσης**

Ανιχνεύθηκαν τα αποπτωτικά MK στις επανακαλιέργειες P2, P4 και P6 μετά από χρώση με 7-αμινο-ακτινομυκίνη D (7-AAD; Sigma, StLouis, Missouri, USA) και κυτταρομετρία ροής. Ειδικότερα, τα κύτταρα επωάσθηκαν με 7-AAD σε συγκέντρωση 2μg/ 10<sup>5</sup>κύτταρα σε θερμοκρασία 4°C για 15 λεπτά και στη συνέχεια έγινε έκπλυση με PBS και προσθήκη 400μl παραφολμαλδευδης 2%. Τα σημασμένα κύτταρα μελετήθηκαν σε αναλυτή Epics-Coulter. Αρχικά, τα κύτταρα οριοθετήθηκαν ανάλογα με το μέγεθος/κοκκίωση (FSC/SSC) (Forward Light Scatter, FSC και Side Light Scatter, SSC) και στη συνέχεια δημιουργήθηκε ένα διάγραμμα διασποράς με το συνδυασμό FSC και 7-AAD ανοσοφθορισμού για την ποσοτικοποίηση των κυττάρων που ήταν 7-AAD<sup>negative</sup> και χαρακτηρίζονται ζωντανά, 7-AAD<sup>low</sup> και χαρακτηρίζονται πρώιμα αποπτωτικά και 7-AAD<sup>high</sup> και χαρακτηρίζονται όψιμα αποπτωτικά ή νεκρά.

## **8. Μελέτη κυτταρικού κύκλου**

Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, μελετήθηκαν τα MK στα στάδια P2, P4 και P6 των επανακαλλιεργειών. Συγκεκριμένα, μετά τη θρυψινοποίηση με 0,25% trypsin/ EDTA, τα MK φυγοκεντρήθηκαν σε ταχύτητα 250g για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C και ακολούθησε

έκπλυση με PBS. Προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό των κυττάρων σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου, έγινε χρώση των MK σε συγκέντρωση  $1 \times 10^6$  με 1 ml διαλύματος ιωδιούχου προπιδίου (propidium iodide, PI) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα περιείχε 50  $\mu\text{g/ml}$  ιωδιούχο προπίδιο και 20  $\mu\text{g}$  RNase/ml DNA staining buffer σε PBS, χωρίς  $\text{Ca}^{++}$  και  $\text{Mg}^{++}$  με pH 7.4. Ακολούθησε ανάλυση σε κυτταρομετρητή Elite Coulter (Coulter Electronics) με τη χρήση του λογισμικού Epics Listmode και τη λήψη 10,000 συμβαμάτων για κάθε δείγμα. Αρχικά, τα κύτταρα οριοθετήθηκαν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά μεγέθους και κοκκίωσης (FSC/SSC) προκειμένου να αποκλειστούν αυτά που βρίσκονται στην περιοχή της φάσης G2/ M. Η ανάλυση του κυτταρικού κύκλου έγινε με τη χρήση του λογισμικού WinMDI (v. 2.8).

## 9. Προσδιορισμός επιπέδων των παραγόντων

### Stroma Derived Factor-1a (SDF-1a) και Αγγειοποιητίνης-1 (Angio-1)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόντων SDF-1a και Angio-1 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ELISA στο υπερκείμενο διάλυμα των καλλιιεργειών των πειραμάτων.

Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA με προκατασκευασμένα kits βασίζεται στην αρχική ένωση της κυτοκίνης που μελετάται με μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο είναι ήδη, κατά περιπτώσεις, προσδεμένο στα βοθρία της μικροπλάκας του kit και στην επακόλουθη ένωση της κυτοκίνης που μελετάται με πολυκλωνικό αντίσωμα, το οποίο στο άλλο άκρο είναι σημασμένο με ένζυμο. Στο σύμπλοκο που δημιουργείται, προστίθεται το ενζυμικό υπόστρωμα και, από την ενζυμική αντίδραση που λαμβάνει χώρα, προκύπτει χρώμα. Μετά από καθορισμένο χρόνο επώασης, η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται και μετράται η ένταση του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της ποσότητας της δεσμευμένης κυτοκίνης. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης γίνεται σε μήκος κύματος που ορίζεται από τον κατασκευαστή. Οι συγκεντρώσεις της κυτοκίνης υπολογίζονται βάσει πρότυπης καμπύλης που προκύπτει από την απορρόφηση των γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης προς μέτρηση.

Το kit που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική έκφραση του SDF-1a ήταν το Quantikine® ELISA Human CXCL12/SDF-1a Immunoassay (R&D Systems) και το αντίστοιχο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της Angio-1 ήταν το Quantikine® ELISA Human Angiopoietin-1 Immunoassay (R&D Systems).

Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε κατά την αλλαγή του θρεπτικού υλικού στις καλλιέργειες, πριν τη θρυψινοποίηση, φυγοκεντρήθηκε και καταψύχθηκε σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ . Τόσο τα δείγματα προς ανάλυση όσο και οι πρότυπες αραιώσεις (standards), ετοιμάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα kit φυλάσσονται σε θερμοκρασία  $2-8^{\circ}\text{C}$ , ενώ όλα τα αντιδραστήρια φέρονταν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση. Στη μικροπλάκα που παρέχεται στο kit και είναι προεπικαλυμμένη με ειδικό αντίσωμα για SDF-1a ή Angio-1 προστέθηκαν 100  $\mu\text{l}$  δείγματος για προσδιορισμό SDF-1a/βοθρίο και 50  $\mu\text{l}$  δείγματος για προσδιορισμό Angio-1/βοθρίο, αντίστοιχα. Ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, αναρρόφηση των κυττάρων και έκπλυση των μη δεσμευμένων υλικών. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200  $\mu\text{l}$  ειδικού για SDF-1a ή Angio-1 πολυκλωνικού αντισώματος συνδεδεμένο με ένζυμο (HRP) και έγινε νέα επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και έκπλυση. Με την προσθήκη 200  $\mu\text{l}$  διαλύματος υποστρώματος τετραμεθυλοβενζιδίνης (TMB) στα βοθρία για 30 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου, αναπτύσσεται μπλε χρώμα σε αναλογία με την ποσότητα SDF-1a και Angio-1 που υπάρχει στο κάθε δείγμα. Η διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης γίνεται με 50μl οξέος και ο καθορισμός της οπτικής πυκνότητας σε κάθε βοθρίο μετράται στα 450nm με διόρθωση στα 570nm, με τη χρήση φωτόμετρου. Τα δείγματα και τα standards έγιναν εις διπλούν και σε θερμοκρασία δωματίου.

## **10. Στατιστική ανάλυση**

Τα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων εκφράζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (mean  $\pm$  standard error of the mean, SEM). Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Στατιστικό πακέτο για εφαρμογή στις Κοινωνικές Επιστήμες (SPSS, v18.0, SPSSInc., Chicago, IL, USA). Οι διαφορές που προέκυψαν μεταξύ των ομάδων που μελετήθηκαν, εκτιμήθηκαν με το μη παραμετρικό σύστημα Mann-Whitney U-test. Στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η διαφορά για τιμές μεταβλητής p (p-value) μικρότερες από 0.05.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

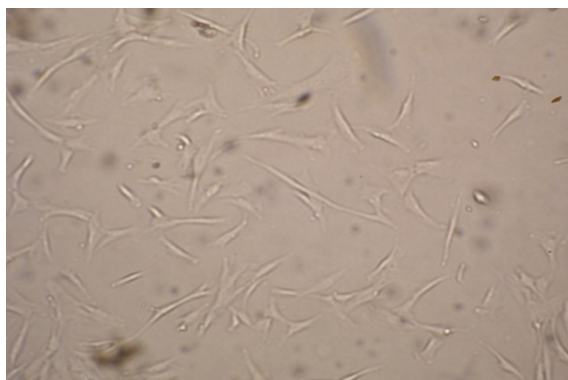
### Υπόμνημα

<b>d</b>	: διάγνωση
<b>d15</b>	: 15 <sup>η</sup> ημέρα επαγωγής στην ύφεση
<b>d33</b>	: 33 <sup>η</sup> ημέρα επαγωγής στην ύφεση
<b>cons</b>	: εδραίωση ύφεσης
<b>maint</b>	: διατήρηση ύφεσης
<b>end</b>	: τέλος θεραπείας
<b>ctl</b>	: ομάδα ελέγχου

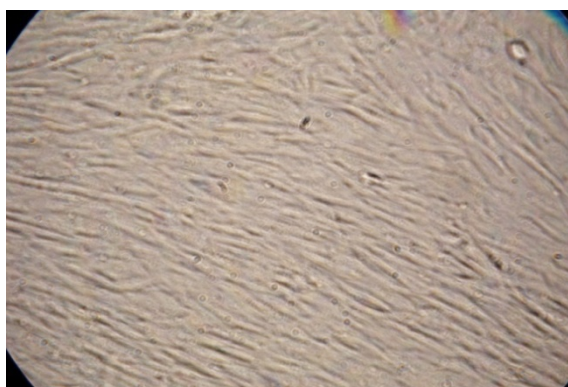
### 1. Μορφολογία

Τα μεσεγχυμικά κύτταρα του μυελού των οστών εκπύχθηκαν για πέντε διαδοχικές επανακαλλιέργειες, σε όλες τις ομάδες μελέτης. Εμφάνισαν στην πρώτη και διατήρησαν στις επόμενες το χαρακτηριστικό ατρακτοειδές σχήμα, χωρίς μορφολογικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων των διαφορετικών ομάδων.

**Εικόνα 6.** Ατρακτοειδές σχήμα ινοβλαστών.



**Εικόνα 7.** Δημιουργία στρώματος.



## 2. Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση

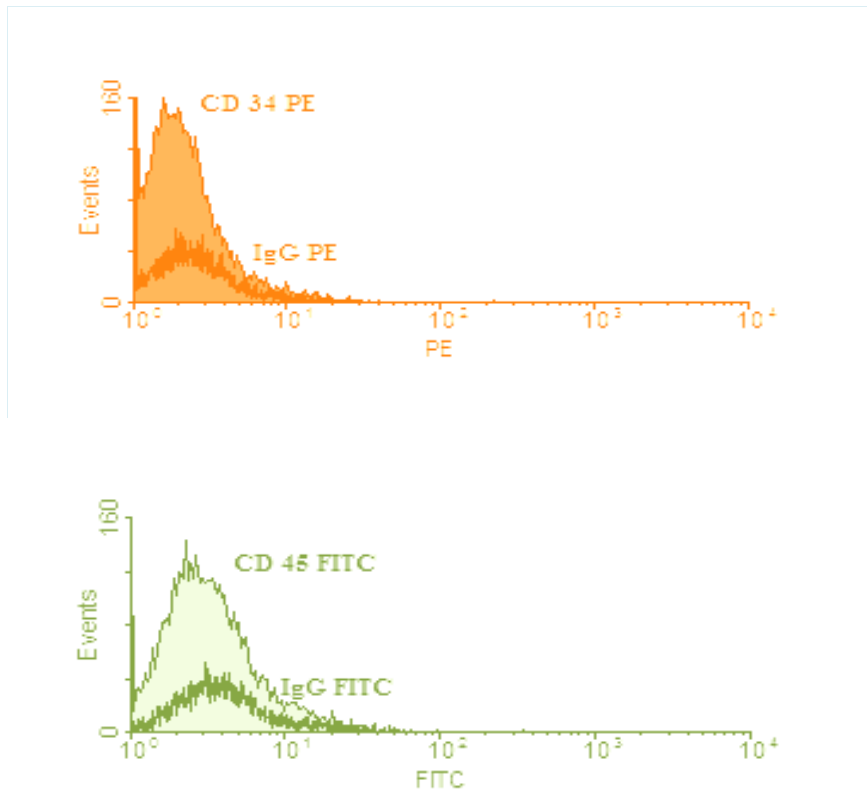
Η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στα μονοπύρρηνα κύτταρα (D0) και στα μεσεγχυματικά κύτταρα των σταδίων P2 και P4. Δεν υπήρξαν διαφορές στην έκφραση των μονοκλωνικών αντισωμάτων μεταξύ των ομάδων. Στη διάγνωση, τα μεσεγχυματικά κύτταρα εκφράζουν σε πολύ υψηλό ποσοστό τους δείκτες CD90 (99.67 ± 0.09%), CD105 (97.39 ± 0.72%), CD146 (59.55 ± 2.84%), CD29 (99.1 ± 0.12%), CD44 (98.07 ± 1.39%), CD95 (90.25 ± 2.85%) και CD73 (99.4 ± 0.4%), ενώ η έκφραση των αιμοποιητικών δεικτών CD34, CD45 και CD14 είναι μηδενική. Το ανοσοφαινοτυπικό προφίλ παραμένει ίδιο σε όλες τις φάσεις της θεραπείας, στο τέλος της χημειοθεραπείας και στην ομάδα ελέγχου.

**Πίνακας 3.** Έκφραση (%) των αντιγόνων επιφανείας στη διάγνωση, τις φάσεις θεραπείας και στην ομάδα ελέγχου.

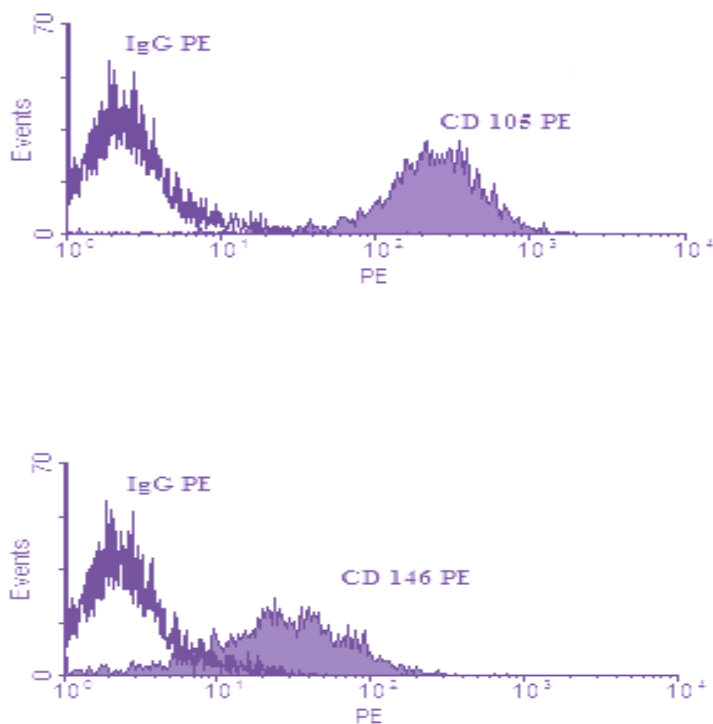
<b>P2</b>	<b>CD90</b>	<b>CD105</b>	<b>CD146</b>	<b>CD29</b>	<b>CD44</b>	<b>CD95</b>	<b>CD73</b>
<b>d</b>	99.67	97.42	74.00	99.10	98.07	93.10	99.80
<b>d15</b>		97.39	82.36			98.10	98.84
<b>d33</b>	98.97	96.76	86.50	99.40	98.87	99.75	100.00
<b>maint</b>	97.42	93.67	81.98	96.30	93.95	96.80	99.70
<b>end</b>	92.98	92.42	88.43	98.36	96.16	90.55	
<b>P4</b>	<b>CD90</b>	<b>CD105</b>	<b>CD146</b>	<b>CD29</b>	<b>CD44</b>	<b>CD95</b>	<b>CD73</b>
<b>d</b>	96.90	99.50	97.00	99.00	97.10	99.70	99.80
<b>d15</b>		99.60	81.27			94.15	99.65
<b>d33</b>	99.70	99.83	94.75	99.60	99.10	98.60	99.80
<b>maint</b>		99.36	87.06			99.50	99.60
<b>end</b>	98.70	94.47	96.80	95.50	96.20	99.05	99.75



**Διάγραμμα 1Α.** Χαρακτηριστική έκφραση αντιγόνων επιφανείας αιμοποιητικών κυττάρων στο P2.



**Διάγραμμα 1Β.** Χαρακτηριστική έκφραση αντιγόνων επιφανείας μεσεγχυματικών κυττάρων στο P2.

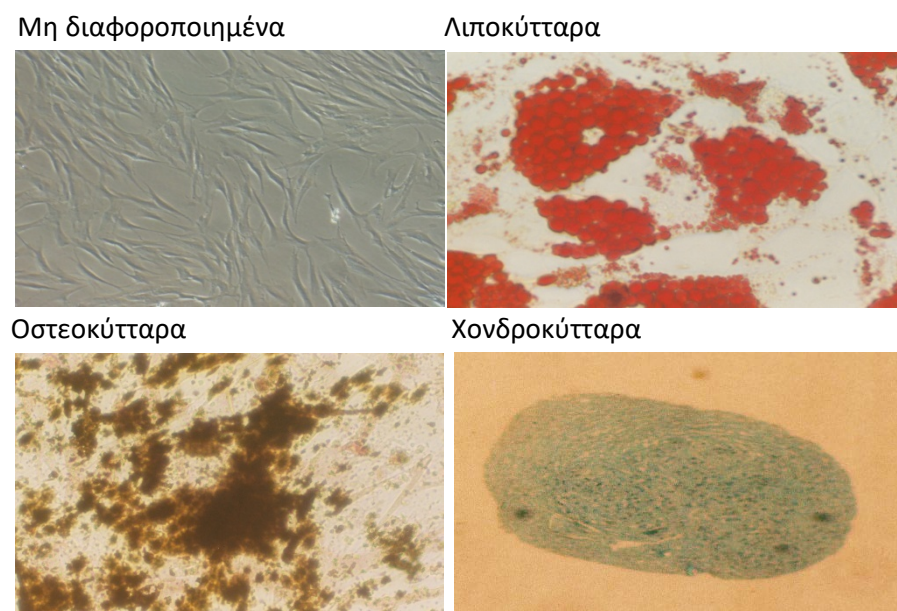


### 3. Διαφοροποίηση

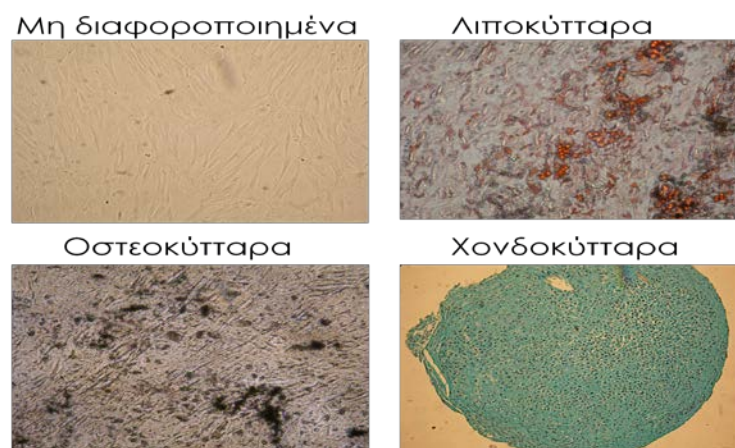
Τα *ex vivo* εκπυγμένα μεσεγχυματικά κύτταρα των παιδιατρικών ασθενών με λευχαιμία διαφοροποιήθηκαν επιτυχώς προς τους τρεις κυτταρικούς τύπους λιποκύτταρα (A), οστεοκύτταρα (O), χονδροκύτταρα (C) υπό τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας. Η εκτίμηση έγινε μετά από ιστοχημική χρώση με τη χρήση ανάστροφου και κοινού οπτικού μικροσκοπίου.

Οι καλλιέργειες των λιποκυττάρων παρουσίασαν εκτεταμένο σχηματισμό λιπιδικών κυστιδίων, μετά από χρώση με Oil Red O. Στις καλλιέργειες των οστεοκυττάρων παρατηρήθηκε εκτεταμένη εναπόθεση ασβεστίου, μετά από χρώση με von Kossa. Στις καλλιέργειες των χονδροκυττάρων τα μικροσφαιρίδια των χονδροκυττάρων ήταν θετικά στη χρώση Alcian Blue. Στη διάγνωση η διαφοροποίηση και προς τις τρεις σειρές ήταν φτωχότερη σε σύγκριση με τις φάσεις θεραπείας της λευχαιμίας, όπου παρατηρήθηκε ίδια ικανότητα διαφοροποίησης με την ομάδα ελέγχου.

**Εικόνα 8.** Διαφοροποίηση προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα.



**Εικόνα 9.** Διαφοροποίηση στις 3 κυτταρικές σειρές μεσεγχυματικών κυττάρων διάγνωσης.

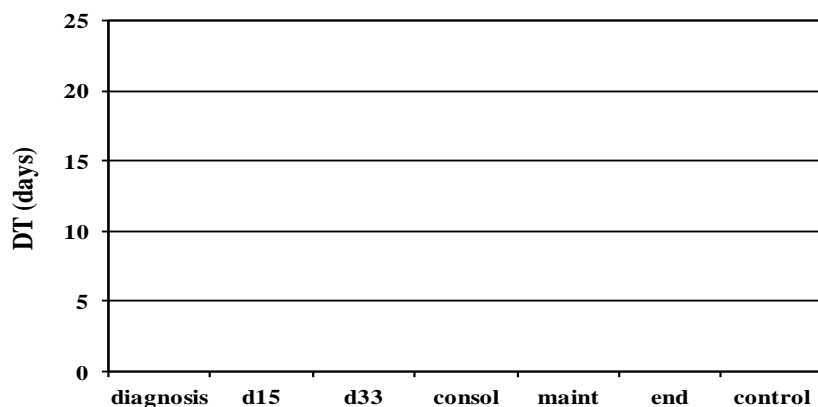


#### 4. Χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού (DT)

Η ικανότητα και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των μεσεγχυματικών κυττάρων εκτιμήθηκαν με τον υπολογισμό του χρόνου κυτταρικού διπλασιασμού (DT).

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα στο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων (D0) χρειάστηκαν, στη διάγνωση,  $20.71 \pm 1.24$  ημέρες, ενώ στο τέλος της θεραπείας,  $15.10 \pm 0.63$  ημέρες, για το σχηματισμό στρώματος ( $p=0.002$ ). Αντίστοιχα, ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού είχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη διάγνωση σε σχέση με όλες τις φάσεις θεραπείας, και συγκεκριμένα,  $p=0.042$  για την ημέρα 15 επαγωγής στην ύφεση,  $p=0.007$  για την ημέρα 33 επαγωγής στην ύφεση,  $p=0.001$  για τη φάση εδραίωσης της ύφεσης,  $p=0.022$  για τη φάση διατήρησης της ύφεσης και  $p=0.002$  για το τέλος της χημειοθεραπείας. (Διάγραμμα 2)

**Διάγραμμα 2.** DT στο κλάσμα των MNCs (d0) στη διάγνωση, τις φάσεις θεραπείας και την ομάδα ελέγχου.



Στις επανακαλλιέργειες, ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού ήταν παρόμοιος σε όλες τις ομάδες των δειγμάτων (διάγνωση λευχαιμίας, ημέρα 15 και 33 επαγωγής στην ύφεση, εδραίωση της ύφεσης, διατήρηση της ύφεσης και τέλος θεραπείας). (Πίνακας 4)

**Πίνακας 4.** DT στη διάγνωση, τις φάσεις θεραπείας και την ομάδα ελέγχου στις επανακαλλιέργειες .

	P1	P2	P3	P4	P5
<b>d</b>	3.30±0.41	3.07±0.58	4.20±0.80	5.37±1.06	4.75±0.95
<b>d15</b>	2.39±0.31	5.49±1.18	4.80±1.22	3.83±0.97	3.82±0.69
<b>d33</b>	2.57±0.24	2.86±0.35	3.47±0.42	3.85±0.61	3.82±0.41
<b>cons</b>	2.59±0.19	2.72±0.23	3.24±0.30	4.12±0.61	4.50±0.93
<b>maint</b>	3.44±0.53	5.98±1.17	3.57±0.49	3.18±0.52	4.21±0.50
<b>end</b>	2.49±0.20	2.59±0.25	2.57±0.32	3.41±0.38	3.73±0.40
<b>ctl</b>	2.34±0.11	3.03±0.31	2.42±0.25	4.41±1.07	4.47±2.13

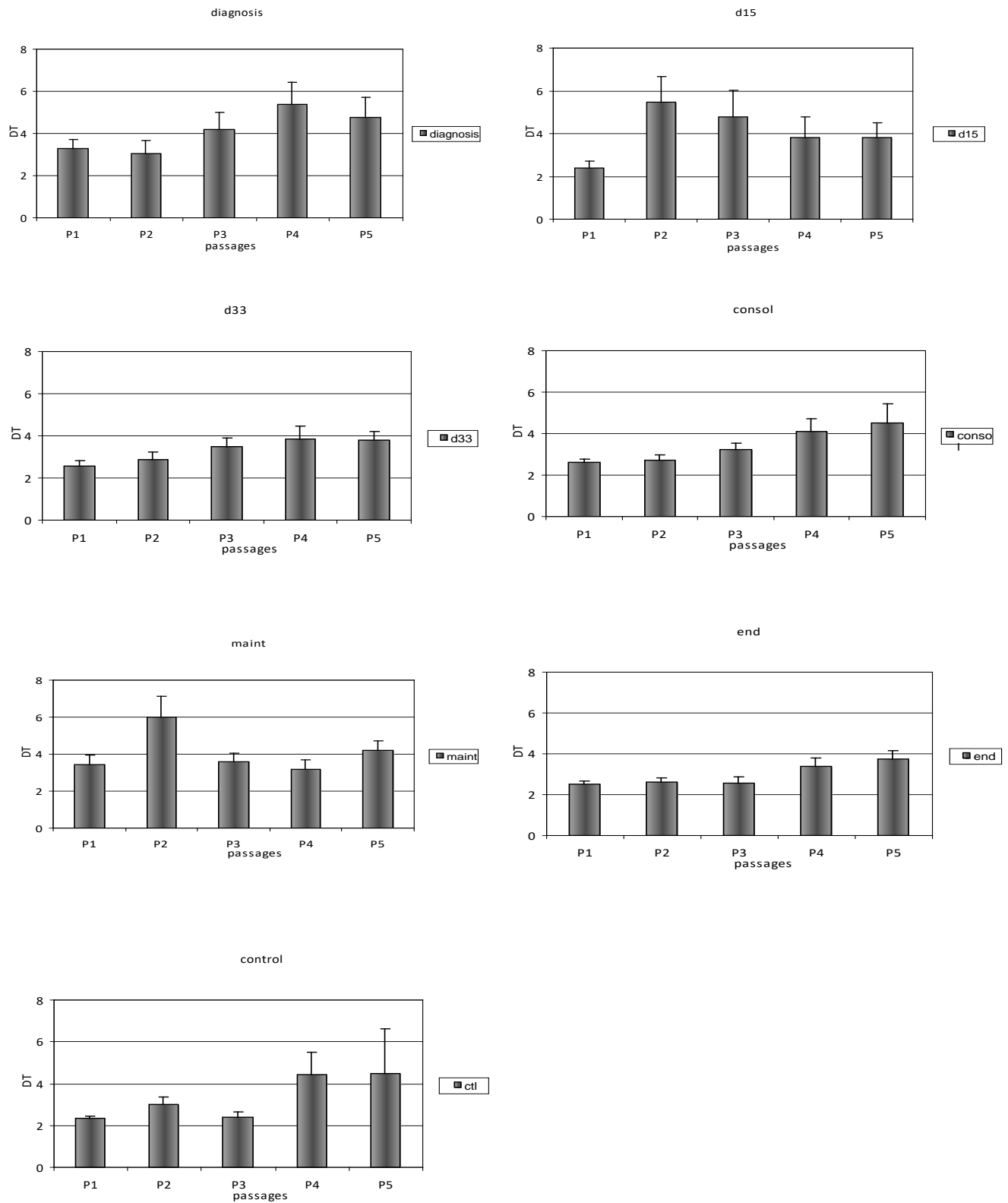
Τα αποτελέσματα αυτά, καταδεικνύουν ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα στο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων στη διάγνωση, που απαρτίζεται κυρίως από λεμφοβλάστες, παρουσιάζουν βραδύτερο ρυθμό έκπτυξης σε σχέση με τα μεσεγχυματικά κύτταρα στις φάσεις θεραπείας της λευχαιμίας και της ομάδας ελέγχου. Η μειονεκτική αυτή ικανότητα πολλαπλασιασμού αποκαθίσταται γρήγορα, με την πρόοδο των καλλιεργειών.

Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο ρυθμό έκπτυξης των μεσεγχυματικών κυττάρων μεταξύ των υπολοίπων ομάδων δειγμάτων, σε όλες τις επανακαλλιέργειες.

Διαπιστώθηκε ότι, όσο πιο προχωρημένο ήταν το στάδιο επανακαλλιέργειας, τόσο μεγαλύτερος ήταν και ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού (βραδύτερος ρυθμός πολλαπλασιασμού) σε όλες τις ομάδες δειγμάτων, χωρίς διαφορές μεταξύ των φάσεων της θεραπείας, αλλά και της ομάδας ελέγχου. (Διάγραμμα 3)

Σε ό,τι αφορά στην εκτίμηση του χρόνου κυτταρικού διπλασιασμού μετά από διαχωρισμό των ασθενών σε ομάδα υψηλού κινδύνου (HR) και ενδιάμεσου κινδύνου (MR), παρατηρήθηκε ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα των ασθενών υψηλού κινδύνου είχαν μικρότερο χρόνο κυτταρικού διπλασιασμού στη διάγνωση, στην αρχική καλλιέργεια και στα πρώτα στάδια επανακαλλιέργειας (μέχρι το P2). Όμως, η σύγκριση μεταξύ της ομάδας υψηλού και της ομάδας ενδιάμεσου κινδύνου δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στο χρόνο κυτταρικού διπλασιασμού, εκτός από τη σύγκριση στη διάγνωση για την επανακαλλιέργεια P1 και στη φάση διατήρησης της ύφεσης για την επανακαλλιέργεια P2. (Πίνακας 5, Διάγραμμα 4)

**Διάγραμμα 3.** DT (ημέρες) των MSCs των ομάδων που μελετήθηκαν στις επανακαλλιέργειες.

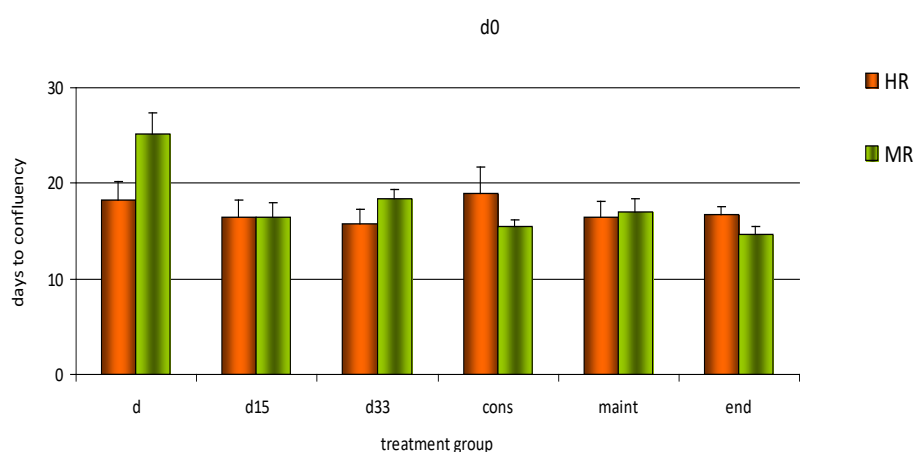


**Πίνακας 5.** DT στις ομάδες υψηλού κινδύνου (HR) και ενδιάμεσου κινδύνου (MR)  
 Στατιστικά σημαντική διαφορά (\*) παρατηρήθηκε  
 στη διάγνωση (d) στη d0 (p=0.04) και στην επανακαλλιέργεια P1 (p=0.01)  
 και στη φάση διατήρησης ύφεσης (maint) στην επανακαλλιέργεια P2 (p=0,021)

HR	d0	P1	P2	P3	P4	P5
d	19.45±1.21*	2.80±0.47*	2.44±0.26	5.13±1.21	6.20±1.25	5.26±1.23
d15	17.00±1.41	2.42±0.76	5.38±3.70	6.85±2.73	5.02±1.89	5.62±0.92
d33	14.11±1.21	2.32±0.23	2.60±0.26	3.11±0.53	2.70±0.36	3.79±0.65
cons	16.38±2.06	2.34±0.18	2.78±0.29	3.69±0.44	4.75±0.89	3.29±0.36
maint	16.50±1.38	3.35±0.35	2.05±0.41*	2.98±0.48	2.75±0.14	4.52±0.94
end	15.67±0.99	2.00±0.24	2.64±0.56	2.23±0.23	2.91±0.39	3.58±0.79
MR	d0	P1	P2	P3	P4	P5
d	21.53±1.89*	3.66±0.61*	3.91±1.28	3.12±0.93	4.26±1.87	4.41±1.44
d15	16.13±1.14	2.37±0.36	5.52±1.19	3.43±0.75	2.87±0.86	2.62±0.61
d33	17.18±1.17	2.78±0.40	3.15±0.72	3.87±0.68	4.74±0.97	3.85±0.54
cons	15.50±0.69	2.76±0.30	2.67±0.36	2.64±0.34	3.35±0.78	6.23±2.10
maint	16.69±1.30	3.49±0.78	6.96±1.31*	3.92±0.72	3.48±0.90	3.99±0.85
end	14.86±0.80	2.74±0.26	2.55±0.23	2.86±0.56	3.91±0.63	3.88±0.28

**Διάγραμμα 4.** DT (ημέρες) των MNCs μεταξύ των ομάδων HR και MR.

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στη διάγνωση στη d0 (p=0.04)  
 Ανάλογη διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις υπόλοιπες φάσεις θεραπείας.

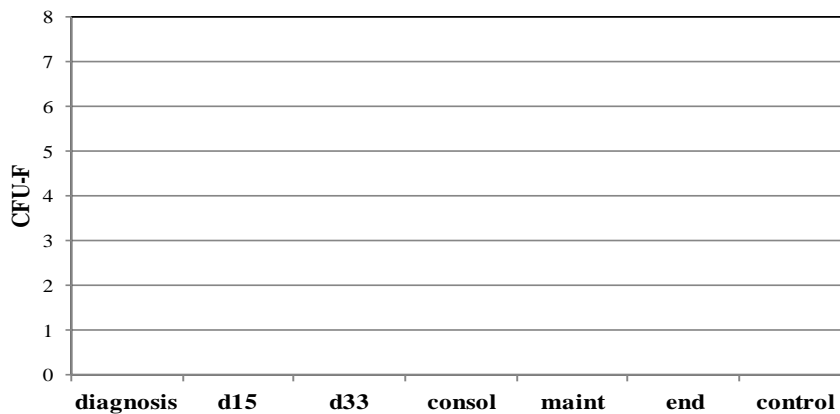


## 5. Σχηματισμός αποικιών CFU-F

Στην πρώτη καλλιέργεια, την ημέρα 0, η ικανότητα σχηματισμού αποικιών CFU-F ήταν μειονεκτική στη διάγνωση σε σχέση με τις φάσεις θεραπειάς, το τέλος της χημειοθεραπείας και την ομάδα ελέγχου. Ο αριθμός των CFU-F σταδιακά αυξάνεται ήδη από τη d15, αλλά εξακολουθεί να υπολείπεται έως και τη d33 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες φάσεις θεραπείας. (Διάγραμμα 5)

**Διάγραμμα 5.** Ανάπτυξη αποικιών CFU-F στο κλάσμα των MNCs (d0).

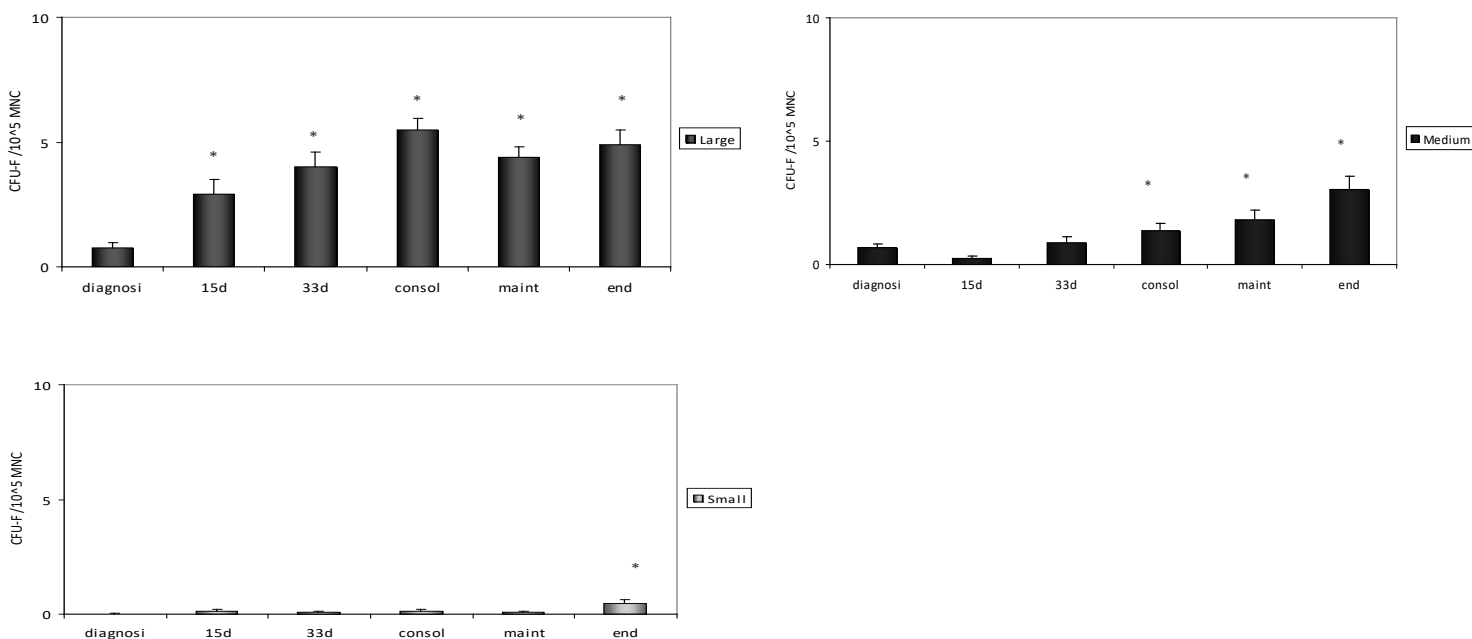
Ο μικρότερος αριθμός CFU-F αναπτύχθηκε στη διάγνωση.



Αναλύοντας τις αποικίες σύμφωνα με το μέγεθός τους στη φάση αυτή, φαίνεται ότι στο συνολικό αριθμό συντελούν οι μεγάλοι μεγέθους αποικίες, αυτές που θεωρούνται ότι προέρχονται από πλέον άωρα κύτταρα. (Διάγραμμα 6)

**Διάγραμμα 6.** Ανάπτυξη αποικιών CFU-F μεγάλο, μεσαίου και μικρού μεγέθους από τα MK στο κλάσμα των MNCs (d0).

Στη διάγνωση προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τις λοιπές φάσεις θεραπειάς για τις αποικίες μεγάλο και μεσαίου μεγέθους.



Αντίστοιχα, και στις επανακαλλιέργειες, οι αποικίες κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με το μέγεθός τους σε μικρού, μεσαίου και μεγάλου μεγέθους. Διαπιστώθηκε ότι τα μεσεγχοματικά κύτταρα της διάγνωσης σχημάτισαν λιγότερες αποικίες τόσο μικρού όσο και μεσαίου και μεγάλου μεγέθους, σε σχέση με τις φάσεις θεραπείας και το τέλος χημειοθεραπείας. (Πίνακας 6)

Στα αρχικά στάδια προεξάρχουν οι αποικίες μεγάλου μεγέθους, ενώ σε προχωρημένα στάδια επανακαλλιέργειας ο πληθυσμός των CFU-F αποικιών απαρτίζεται, κυρίως, από αποικίες μικρού μεγέθους.

**Πίνακας 6.** Αποτελέσματα ανάπτυξης αποικιών μικρού (small), μεσαίου (medium) και μεγάλου (large) μεγέθους.

<u>small</u>	<b>d0</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>
<b>d</b>	0.05±0.04	8.13±1.32	9.02±1.81	10.77±3.10	13.12±2.30	14.13±3.08
<b>d15</b>	0.11±0.07	8.33±1.46	7.17±1.45	15.86±3.80	11.64±2.56	5.64±1.72
<b>d33</b>	0.07±0.05	10.65±1.97	8.77±1.25	12.25±2.18	11.19±1.29	8.68±1.32
<b>cons</b>	0.17±0.08	11.8±2.37	9.78±1.34	10.44±1.37	14.93±2.63	14.03±3.01
<b>maint</b>	0.08±0.04	9.23±2.28	12.25±2.29	19.85±2.10	17.85±2.45	13.50±1.92
<b>end</b>	0.33±0.12	15.93±3.91	17.64±3.52	18.16±3.32	13.81±2.56	18.77±2.79
<u>medium</u>	<b>d0</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>
<b>d</b>	0.63±0.15	13.33±2.01	11.93±2.66	8.03±2.18	9.12±1.76	4.71±1.16
<b>d15</b>	0.19±0.08	27.04±5.06	25.08±5.23	20.36±4.14	5.32±1.69	1.91±0.76
<b>d33</b>	0.85±0.22	18.61±2.94	22.14±2.07	18.31±2.41	9.58±1.95	7.82±1.72
<b>cons</b>	1.25±0.25	19.29±2.15	18.93±2.28	11.96±1.70	9.35±1.67	10.69±2.07
<b>maint</b>	1.82±0.39	23.27±2.49	15.88±2.78	10.15±1.60	7.77±1.62	1.62±0.85
<b>end</b>	2.59±0.38	26.03±2.76	22.05±3.26	14.08±2.82	8.77±1.49	9.36±1.96
<u>large</u>	<b>d0</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>
<b>d</b>	0.65±0.16	5.33±1.57	1.54±0.73	0.81±0.38	1.35±0.36	0.63±0.43
<b>d15</b>	2.47±0.54	9.71±4.59	2.75±1.18	1.50±0.51	0.64±0.31	0.27±0.15
<b>d33</b>	4.59±0.60	9.23±2.35	10.49±3.03	1.50±0.48	0.33±0.18	0.61±0.25
<b>cons</b>	4.96±0.45	16.00±3.25	5.58±1.29	4.31±1.46	0.55±0.19	3.22±1.51
<b>maint</b>	4.10±0.48	13.65±2.89	5.46±1.96	1.93±0.73	0.88±0.41	0.00±0.00
<b>end</b>	4.11±0.48	6.38±1.28	1.50±0.64	1.96±0.91	1.92±1.04	0.86±3.39



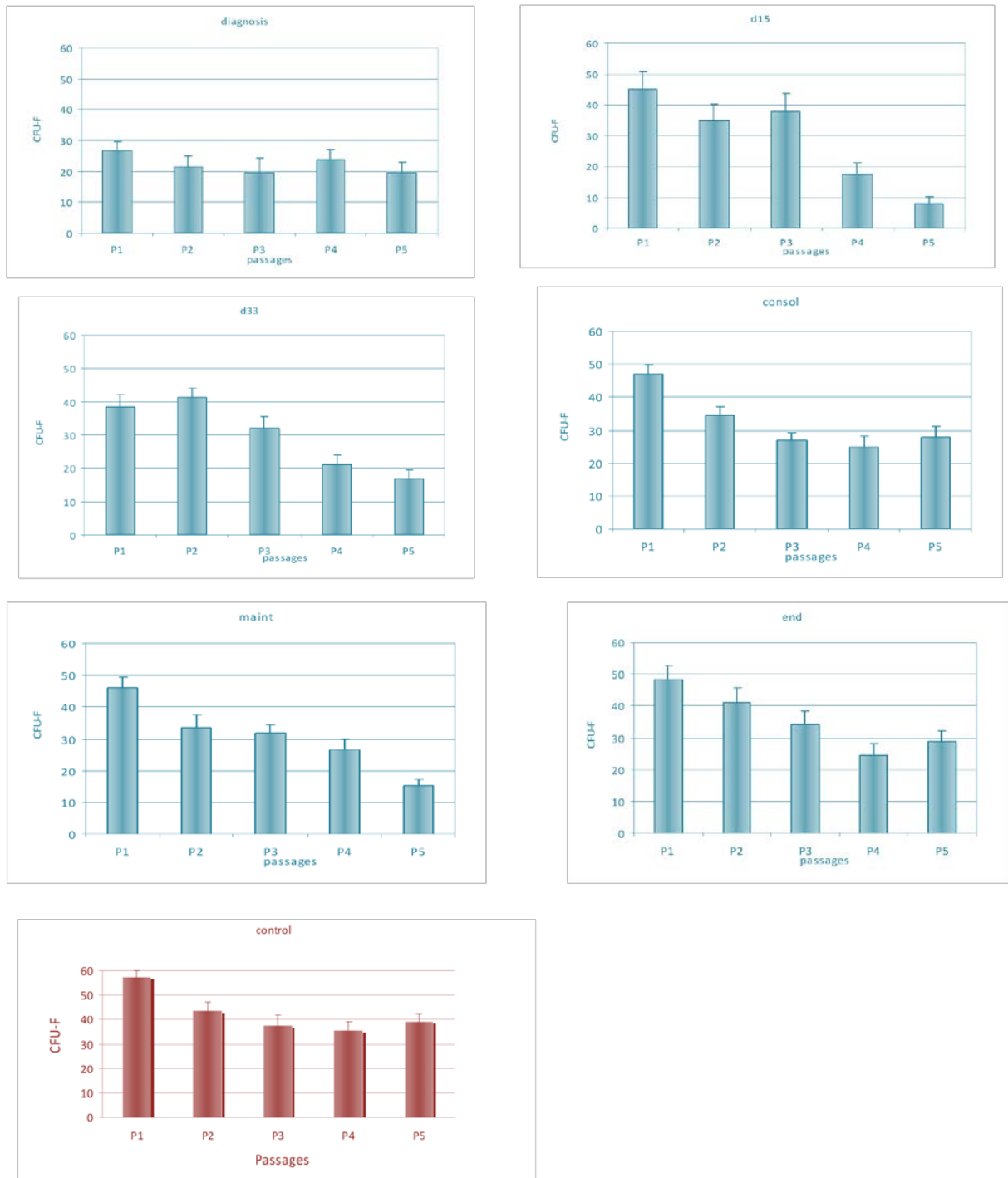
Εξετάζοντας το συνολικό αριθμό αποικιών, η μειονεκτική κλωνογονικότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων στη διάγνωση ήταν σταθερό εύρημα και παρατηρήθηκε σε όλα τα στάδια επανακαλλιέργειας. (Πίνακας 7)

**Πίνακας 7.** Ανάπτυξη αποικιών CFU-F στη διάγνωση, τις φάσεις θεραπείας και την ομάδα ελέγχου, μέχρι και την επανακαλλιέργεια P5. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη σύγκριση d15 και d33 με τις υπόλοιπες φάσεις.

	d0	P1	P2	P3	P4	P5
<b>d</b>	1.33±0.23	26.80±2.79	21.39±3.63	19.61±4.69	23.59±3.45	19.46±3.55
<b>d15</b>	2.78±0.54*	45.08±5.72*	34.96±5.44*	37.73±6.01*	17.59±3.48*	7.82±2.21*
<b>d33</b>	5.51±0.61*	38.52±3.52*	41.40±2.87*	32.06±3.51*	21.11±2.90*	17.11±2.41*
<b>cons</b>	6.37±0.47	47.10±3.10	34.47±2.68	26.78±2.30	24.83±3.33	27.94±3.25
<b>maint</b>	6.00±0.54	46.15±3.28	33.63±3.99	31.93±2.63	26.50±3.32	15.12±2.02
<b>end</b>	7.07±0.53	48.34±4.43	41.23±4.48	34.20±4.28	24.50±3.52	29.00±3.30
<b>ctl</b>	4.35±0.50	57.27±4.47	43.53±3.71	37.38±5.40	35.67±3.29	38.83±6.05

Με την πρόοδο των καλλιεργειών, ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών εμφανίζεται μειούμενος σε όλες τις φάσεις και στα δείγματα της ομάδας ελέγχου και σε προχωρημένα στάδια επανακαλλιέργειας (P4, P5) γίνεται η μείωση αυτή στατιστικά σημαντική. (Διάγραμμα 7)

**Διάγραμμα 7.** Ανάπτυξη αποικιών CFU-F στη διάγνωση, τις φάσεις θεραπείας και την ομάδα ελέγχου στις επανακαλλιέργειες από P1 έως και P5.



Ειδικότερα, και όπως παρατίθενται στον Πίνακα 8, στη διάγνωση, σχηματίστηκαν  $26.80 \pm 2.79$  αποικίες στο στάδιο P1 και  $19.46 \pm 3.55$  αποικίες στο στάδιο P5. Τη 15<sup>η</sup> ημέρα επαγωγής στην ύφεση σχηματίστηκαν  $45.08 \pm 5.72$  αποικίες στο στάδιο P1 και  $7.82 \pm 2.21$  αποικίες στο στάδιο P5. Την 33<sup>η</sup> ημέρα επαγωγής στην ύφεση σχηματίστηκαν  $38.52 \pm 3.52$  αποικίες στο στάδιο P1 και  $17.11 \pm 2.41$  αποικίες στο στάδιο P5. Στη φάση εδραίωσης της ύφεσης σχηματίστηκαν  $47.10 \pm 3.10$  αποικίες στο στάδιο P1 και  $27.94 \pm 3.25$  αποικίες στο

στάδιο P5. Στη φάση διατήρησης της ύφεσης σχηματίστηκαν  $46.15 \pm 3.28$  αποικίες στο στάδιο P1 και  $15.12 \pm 2.02$  αποικίες στο στάδιο P5. Στο τέλος θεραπείας σχηματίστηκαν  $48.34 \pm 4.43$  αποικίες στο στάδιο P1 και  $29.00 \pm 3.30$  αποικίες στο στάδιο P5. Στην ομάδα ελέγχου σχηματίστηκαν  $57.27 \pm 4.47$  αποικίες στο στάδιο P1 και  $38.83 \pm 6.05$  αποικίες στο στάδιο P5.

**Πίνακας 8.** Ανάπτυξη αποικιών CFU-F στη διάγνωση, τις φάσεις θεραπείας και την ομάδα ελέγχου, μέχρι και την επανακαλλιέργεια P5.

	P1	P2	P3	P4	P5
<b>d</b>	$26.80 \pm 2.79$	$21.39 \pm 3.63$	$19.61 \pm 4.69$	$23.59 \pm 3.45$	$19.46 \pm 3.55$
<b>d15</b>	$45.08 \pm 5.72$	$34.96 \pm 5.44$	$37.73 \pm 6.01$	$17.59 \pm 3.48$	$7.82 \pm 2.21$
<b>d33</b>	$38.52 \pm 3.52$	$41.40 \pm 2.87$	$32.06 \pm 3.51$	$21.11 \pm 2.90$	$17.11 \pm 2.41$
<b>cons</b>	$47.10 \pm 3.10$	$34.47 \pm 2.68$	$26.78 \pm 2.30$	$24.83 \pm 3.33$	$27.94 \pm 3.25$
<b>maint</b>	$46.15 \pm 3.28$	$33.63 \pm 3.99$	$31.93 \pm 2.63$	$26.50 \pm 3.32$	$15.12 \pm 2.02$
<b>end</b>	$48.34 \pm 4.43$	$41.23 \pm 4.48$	$34.20 \pm 4.28$	$24.50 \pm 3.52$	$29.00 \pm 3.30$
<b>ctl</b>	$57.27 \pm 4.47$	$43.53 \pm 3.71$	$37.38 \pm 5.40$	$35.67 \pm 3.20$	$38.83 \pm 6.05$

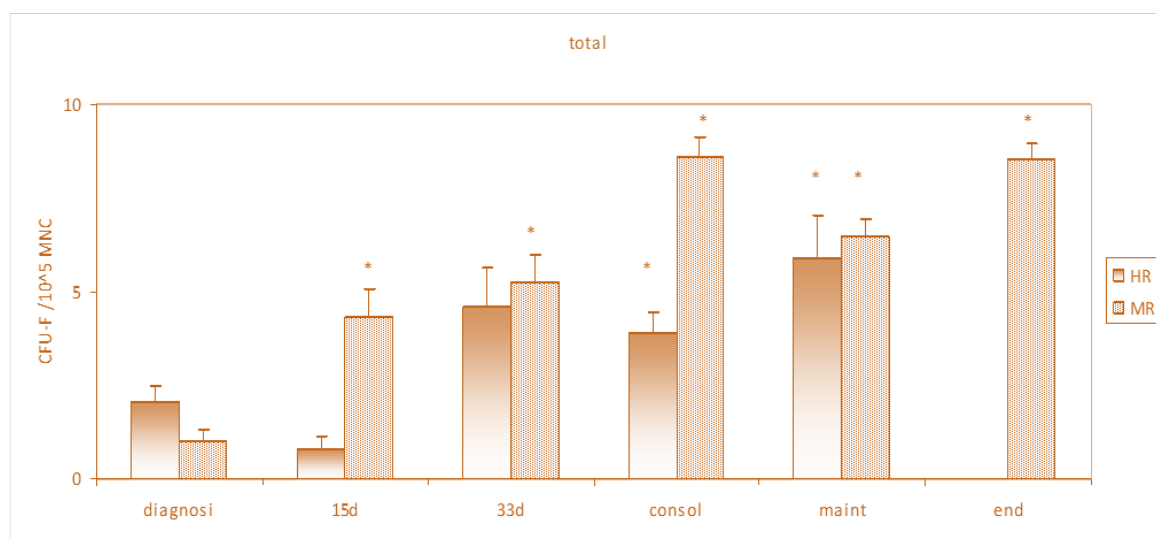
Στη μελέτη της ομάδας υψηλού κινδύνου σε σχέση με την ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών, παρά το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, τα δείγματα ασθενών υψηλού κινδύνου ανέπτυξαν λιγότερες αποικίες από τα δείγματα ασθενών ενδιάμεσου κινδύνου. (Πίνακας 9) Σημειώνεται ότι η προαναφερθείσα ελαττωμένη κλωνογονικότητα στη διάγνωση παρατηρήθηκε και στην κατάταξη στις ομάδες υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου.

**Πίνακας 9.** Ανάπτυξη αποικιών CFU-F στη διάγνωση και τις φάσεις θεραπείας μετά την κατηγοριοποίηση σε ομάδα υψηλού και σε ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου.

	d0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
<b>d</b>							
<b>HR</b>	1.36±0.38	31.15±4.57	28.28±5.26	14.52±3.31	23.06±3.74	12.53±3.78	5.36±3.31
<b>MR</b>	1.31±0.29	23.32±3.37	14.15±4.56	25.78±9.51	25.00±5.72	30.30±5.34	25.10±5.60
<b>d15</b>							
<b>HR</b>	0.58±0.28	38.25±11.79	34.25±11.61	18.75±6.85	17.87±5.70	4.87±2.09	16.50±9.34
<b>MR</b>	3.80±0.70	48.50±6.35	35.31±6.05	48.57±7.22	16.66±4.30	8.93±3.06	2.40±0.65
<b>d33</b>							
<b>HR</b>	5.84±0.98	36.35±3.62	40.37±2.71	38.66±4.36	27.68±4.24	22.50±3.42	9.00±3.10
<b>MR</b>	5.22±0.78	40.29±5.75	42.26±4.84	25.44±5.14	15.85±3.63	12.25±3.06	12.00±3.17
<b>cons</b>							
<b>HR</b>	4.25±0.57	46.70±7.23	35.81±5.06	21.90±2.85	26.13±5.13	24.85±5.07	31.20±4.95
<b>MR</b>	7.68±0.59	47.35±2.21	33.57±2.99	31.43±3.35	23.22±4.04	31.81±3.60	18.85±3.99
<b>maint</b>							
<b>HR</b>	5.33±0.95	53.40±3.05	41.40±5.77	35.75±3.29	39.75±4.10	18.10±3.22	11.50±3.49
<b>MR</b>	6.57±0.56	41.62±4.70	28.07±5.11	28.86±3.85	15.14±2.37	13.25±2.55	10.00±1.89
<b>end</b>							
<b>HR</b>	2.45±0.62	49.44±5.16	32.42±8.78	42.50±6.14	31.45±6.01	27.44±5.38	26.22±5.01
<b>MR</b>	8.51±0.43	47.85±6.06	45.33±4.98	28.66±5.54	19.61±4.47	29.91±4.69	20.50±5.34

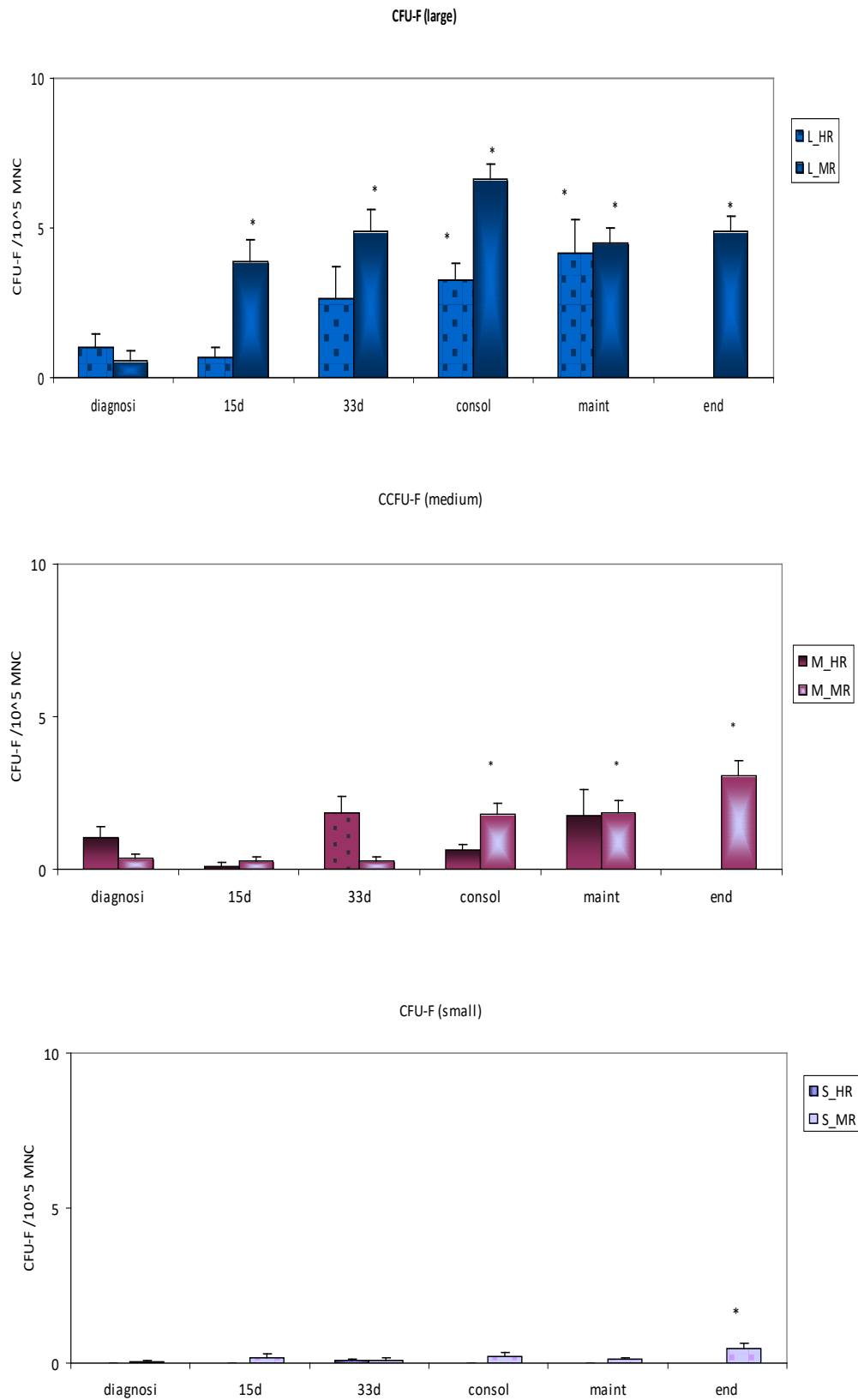
Τα ΜΚ στο κλάσμα των ΜNCs και στις 2 ομάδες κινδύνου ανέπτυξαν μικρότερο αριθμό αποικιών CFU-F στη διάγνωση συγκριτικά με τις υπόλοιπες φάσεις. (Διάγραμμα 8)

**Διάγραμμα 8.** Ανάπτυξη συνολικού αριθμού αποικιών CFU-F από τα ΜΚ στο κλάσμα των ΜNCs στις ομάδες HR και MR.



Στο αποτέλεσμα αυτό συντελούν κυρίως οι αποικίες μεγάλου μεγέθους. (Διάγραμμα 9)

**Διάγραμμα 9.** Ανάπτυξη αποικιών CFU-F μεγάλου (large), μεσαίου (medium) και μικρού (small) μεγέθους στο κλάσμα των MNCs (d0) στις ομάδες HR και MR.



Στον Πίνακα 10 παρατίθενται αριθμητικά τα αποτελέσματα σχηματισμού μεγάλων, μεσαίων και μικρών αποικιών CFU-F μετά την κατηγοριοποίηση σε ομάδα υψηλού και σε ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου.

**Πίνακας 10.** Αποικίες CFU-F μεγάλου (large) μεσαίου (medium) και μικρού (small) μεγέθους στην ομάδα υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου.

		d0	P1	P2	P3	P4	P5
<b>HR L</b>	<b>d</b>	0.50±0.22	4.25±2.48	2.67±1.39	0.71±0.35	0.94±0.36	0.00±0.00
	<b>d15</b>	0.50±0.29	0.88±0.58	1.25±0.65	0.50±0.27	0.63±0.42	0.50±0.38
	<b>d33</b>	4.37±0.96	9.57±2.08	6.19±1.78	2.39±0.87	0.63±0.39	0.83±0.47
	<b>cons</b>	3.04±0.45	14.45±6.95	4.77±1.94	0.68±0.26	0.00±0.00	0.25±0.18
	<b>maint</b>	3.94±0.73	10.50±4.37	3.60±2.40	0.83±0.37	0.08±0.08	0.00±0.00
	<b>end</b>	1.45±0.43	7.56±3.11	0.43±0.30	1.40±0.93	4.00±2.15	1.20±0.73
<b>MR L</b>	<b>d</b>	0.74±0.23	6.20±2.04	0.35±0.18	0.93±0.73	1.72±0.60	1.50±1.00
	<b>d15</b>	3.46±0.71	14.13±6.67	3.50±1.73	2.07±0.75	0.64±0.44	0.14±0.10
	<b>d33</b>	4.77±0.77	8.94±4.00	14.11±5.30	0.61±0.31	0.10±0.07	0.40±0.24
	<b>cons</b>	6.16±0.60	17.00±3.03	6.12±1.74	7.78±2.67	1.22±0.36	6.94±3.21
	<b>maint</b>	4.24±0.67	15.63±3.85	6.79±2.91	2.80±1.25	1.57±0.72	0.00±0.00
	<b>end</b>	4.94±0.54	5.85±1.28	2.00±0.92	2.33±1.40	0.14±0.10	0.58±0.40
<b>HR M</b>	<b>d</b>	0.86±0.36	18.10±3.17	17.76±4.20	8.41±2.66	10.19±2.11	3.00±0.91
	<b>d15</b>	0.08±0.08	27.25±8.94	24.50±9.98	14.50±6.16	9.88±3.80	3.25±1.52
	<b>d33</b>	1.42±0.41	20.93±3.25	25.31±2.76	22.67±3.58	13.50±2.78	11.56±2.86
	<b>cons</b>	1.11±0.31	14.10±3.49	17.45±4.22	7.91±2.13	6.18±1.85	5.70±2.04
	<b>maint</b>	1.39±0.59	25.80±3.94	18.00±5.11	8.58±1.39	11.58±2.95	3.10±2.12
	<b>end</b>	1.00±0.33	21.78±3.96	11.29±4.72	12.30±5.20	8.17±2.31	4.50±1.75
<b>MR M</b>	<b>d</b>	0.50±0.13	9.52±2.36	5.80±2.70	7.57±3.69	8.17±2.79	7.10±2.35
	<b>d15</b>	0.25±0.11	26.94±6.34	25.38±6.30	23.71±5.42	2.71±1.17	1.14±0.80
	<b>d33</b>	0.36±0.15	16.71±4.69	19.47±2.96	13.94±2.99	6.45±2.57	4.45±1.76
	<b>cons</b>	1.34±0.35	22.65±2.60	19.91±2.60	15.83±2.40	13.22±2.73	16.94±3.35
	<b>maint</b>	2.19±0.51	21.69±3.24	14.36±3.19	11.40±2.66	4.50±1.14	0.69±0.33
	<b>end</b>	3.09±0.45	27.95±3.55	27.07±3.65	15.27±3.31	9.29±1.99	13.42±2.84
<b>HR S</b>	<b>d</b>	0.00±0.00	8.80±2.13	7.86±1.40	5.41±1.20	10.88±2.13	8.71±3.26
	<b>d15</b>	0.00±0.00	10.13±2.92	8.63±2.88	3.75±1.49	7.38±2.98	1.13±0.61
	<b>d33</b>	0.05±0.05	5.86±1.27	8.88±1.68	13.61±3.14	13.56±1.67	10.11±2.16
	<b>cons</b>	0.11±0.06	18.15±4.97	13.14±2.30	13.32±1.80	19.95±4.15	18.90±4.85
	<b>maint</b>	0.00±0.00	17.10±4.51	19.80±3.82	26.33±3.46	28.08±3.00	15.00±3.39
	<b>end</b>	0.00±0.00	20.11±3.87	20.71±7.50	28.80±6.25	18.00±4.60	22.20±4.60
<b>MR S</b>	<b>d</b>	0.08±0.06	7.60±1.68	10.25±3.43	17.29±6.39	15.11±3.92	21.70±5.07
	<b>d15</b>	0.17±0.10	7.44±1.65	6.44±1.66	22.79±5.09	14.07±3.55	8.21±2.45
	<b>d33</b>	0.09±0.09	14.59±3.17	8.68±1.87	10.89±3.07	9.30±1.82	7.40±1.57
	<b>cons</b>	0.20±0.12	7.71±1.98	7.55±1.53	7.70±1.92	8.78±2.25	7.94±2.40
	<b>maint</b>	0.14±0.08	4.31±1.53	6.86±1.83	14.67±1.71	9.07±1.44	12.56±2.36
	<b>end</b>	0.43±0.15	14.05±5.41	16.20±3.94	11.07±2.39	10.21±2.42	15.92±3.33

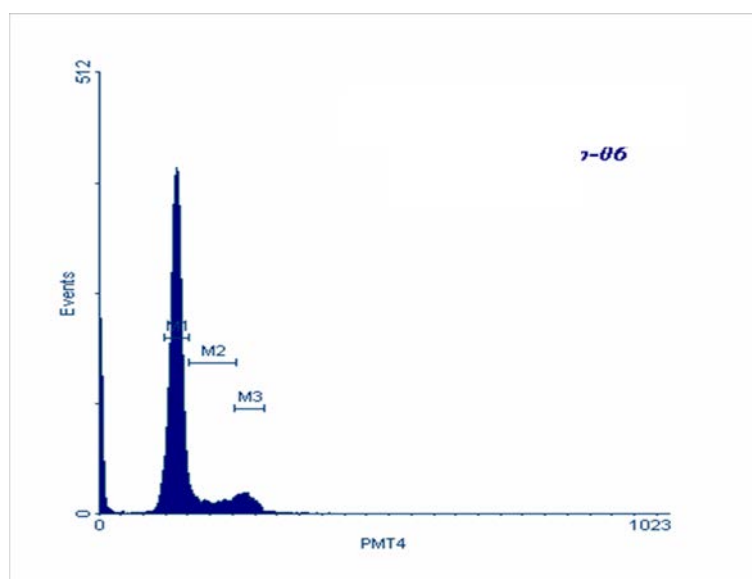
## 6. Μελέτη και ανάλυση κυτταρικού κύκλου

Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής στα στάδια επανακαλλιέργειας P2 και P4 και, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το μεγαλύτερο ποσοστό των μεσεγχυματικών κυττάρων βρίσκεται σε φάση ηρεμίας (quiescence). Συγκεκριμένα, στη φάση G0G1 είναι στη διάγνωση  $87.01 \pm 1.93\%$  των MK, τη 15<sup>η</sup> ημέρα επαγωγής στην ύφεση  $82.43 \pm 1.55\%$  των MK, την 33<sup>η</sup> ημέρα επαγωγής στην ύφεση  $78.12 \pm 3.51\%$  των MK, στη φάση εδραίωσης της ύφεσης  $82.76 \pm 4.21\%$  των MK και στο τέλος της θεραπείας  $82.48 \pm 3.48\%$  των MK. Τα ποσοστά αυτά είναι μεγαλύτερα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (ποσοστό MK στη φάση G0G1 από την ομάδα ελέγχου  $71.74 \pm 6.26\%$ ,  $p < 0.05$ ).

**Πίνακας 11 .** Αποτελέσματα κυτταρικού κύκλου στη διάγνωση, τις φάσεις θεραπείας και την ομάδα ελέγχου στο P2.

	G0G1	S	G2M
d	$87.01 \pm 1.93$	$8.00 \pm 1.11$	$4.98 \pm 1.82$
d15	$82.43 \pm 1.55$	$9.99 \pm 1.88$	$7.57 \pm 0.57$
d33	$78.12 \pm 3.51$	$13.21 \pm 2.77$	$8.67 \pm 1.97$
cons	$82.76 \pm 4.21$	$10.89 \pm 3.22$	$6.35 \pm 2.56$
end	$82.48 \pm 3.48$	$9.69 \pm 3.33$	$7.83 \pm 1.25$
ctl	$71.74 \pm 6.26$	$20.30 \pm 6.47$	$7.96 \pm 0.21$

**Διάγραμμα 10.** Αντιπροσωπευτικό γράφημα ανάλυσης του κυτταρικού κύκλου (κυτταρομετρία ροής).



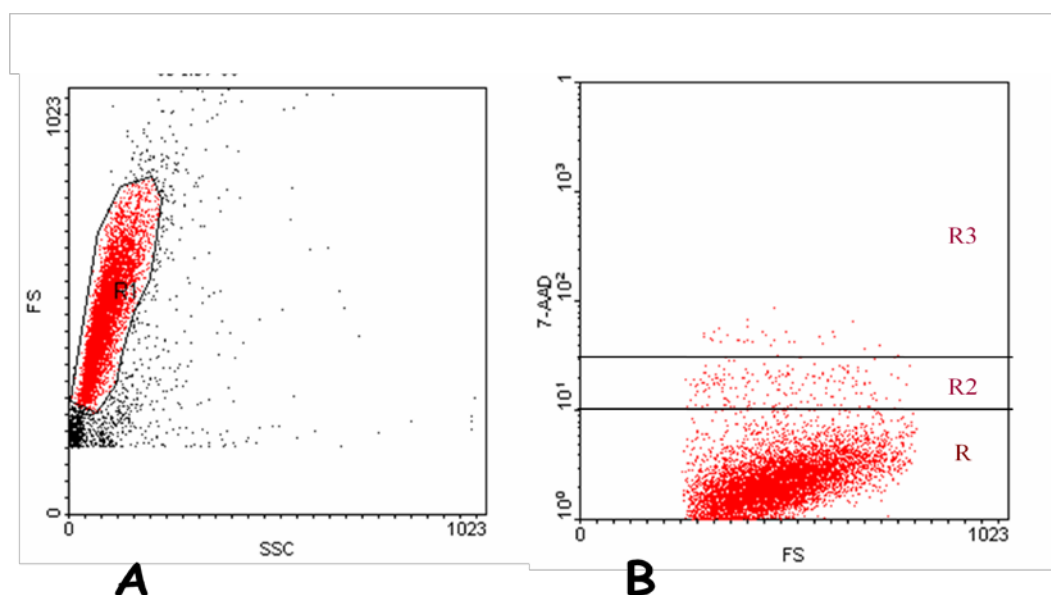
## 7. Μελέτη και ανάλυση απόπτωσης

Η μελέτη της απόπτωσης πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με 7-AAD, επίσης στα στάδια επανακαλλιέργειας P2 και P4 και επιβεβαίωσε τη σταθερότητα των ΜΚ του μυελού των οστών σε συνθήκες μακροχρόνιας καλλιέργειας, τόσο στη διάγνωση της λευχαιμίας όσο και στις φάσεις χημειοθεραπείας. Παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό απόπτωσης στις φάσεις και στο τέλος της θεραπείας σε σχέση με τη διάγνωση, με σταθερά όμως και εδώ ποσοστά στις επανακαλλιέργειες P2 και P4.

**Πίνακας 12.** Αποτελέσματα απόπτωσης στη διάγνωση, τις φάσεις θεραπείας και την ομάδα ελέγχου.

	P2	P4
<b>d</b>	4.92±2.38%	3.47±0.97%
<b>d15</b>	2.48±0.86%	2.82±0.65%
<b>d33</b>	2.65±0.59%	1.42±0.27%
<b>cons</b>	2.01±0.45%	2.20±0.32%
<b>maint</b>	1.97±0.38%	1.20±0.65%
<b>end</b>	2.94±0.93%	1.62±0.77%
<b>ctl</b>	1.75±0.29%	0.92±0.37%

**Διάγραμμα 11.** Αντιπροσωπευτικό γράφημα ανάλυσης της απόπτωσης.

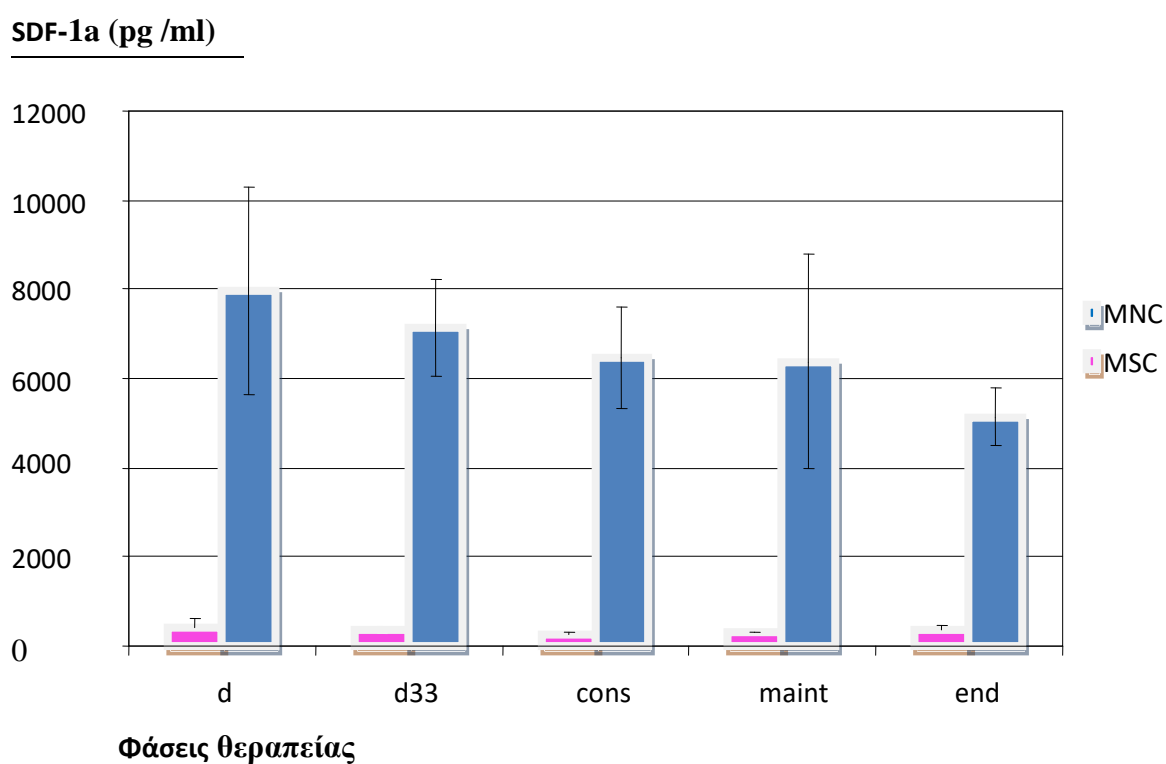




## 8. Έκφραση παραγόντων SDF-1a και Angio-1

Η έκφραση του παράγοντα SDF-1a παρουσίασε μεγάλο εύρος διακύμανσης τιμών στα υπερκείμενα των καλλιιεργειών των μεσεγγυματικών κυττάρων στη διάγνωση (median 5334.63pg/ml, range 1066.70-22480.86pg/ml), ενώ στις φάσεις της θεραπείας η έκφρασή του ήταν πιο ομοιογενής. (Διάγραμμα 12)

**Διάγραμμα 12.** Έκφραση του παράγοντα SDF-1a στο κλάσμα των MNCs και στα MSCs στη διάγνωση και τις φάσεις θεραπείας.



Στη διάγνωση της λευχαιμίας, διαπιστώθηκε μεγαλύτερο ποσοστό έκφρασης σε σχέση με τις φάσεις χημειοθεραπείας, χωρίς να υπάρξει στατιστικά σημαντική διαφορά. (Πίνακας 13)

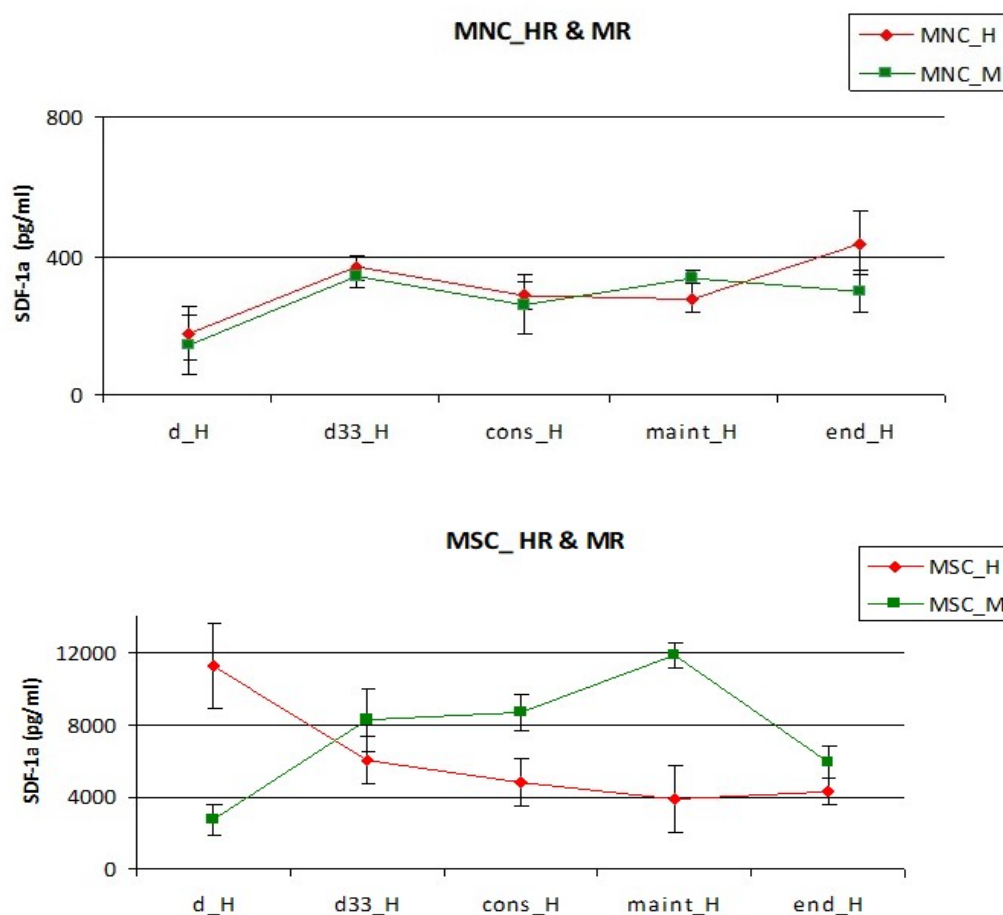
**Πίνακας 13.** Έκφραση του παράγοντα SDF-1a στο κλάσμα των MNCs και στα MSCs στη διάγνωση και τις φάσεις θεραπείας. Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean±SEM (pg/ ml).

	MNCs	MSCs
<b>d</b>	428.0014±183.77	7945.9383±2321.52
<b>d33</b>	354.1877±21.83	7141.3454±1106.68
<b>cons</b>	275.8810±38.48	6459.7165±1136.51
<b>maint</b>	301.7999±28.25	6377.4174±2408.65
<b>end</b>	380.8761±52.97	5134.8106±636.367

Επίσης, στα δείγματα της διάγνωσης, ήταν μεγαλύτερη η έκφραση του παράγοντα στους ασθενείς υψηλού κινδύνου και μικρότερη στους ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου. (Διάγραμμα 13)

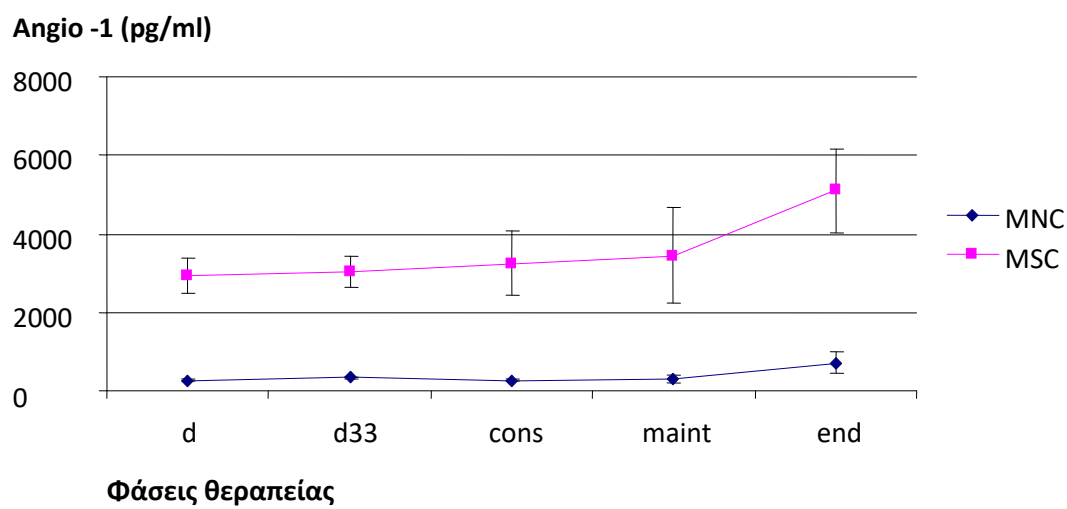
Στην ομάδα ελέγχου δε μελετήθηκε η έκφραση του παράγοντα.

**Διάγραμμα 13.** Έκφραση του παράγοντα SDF-1a στο κλάσμα των MNCs και στα MSCs στη διάγνωση και τις φάσεις θεραπείας για τις ομάδες υψηλού (HR) και ενδιάμεσου (MR) κινδύνου.



Η έκφραση του παράγοντα Ang-1 στους υποπληθυσμούς των μονοπύρηνων και των μεσεγχυματικών κυττάρων, ήταν μεγαλύτερη στα κύτταρα του στρώματος και παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά. (Διάγραμμα 14)

**Διάγραμμα 14.** Έκφραση του παράγοντα Angio-1 στο κλάσμα των MNCs και στα MSCs στη διάγνωση και τις φάσεις θεραπείας.



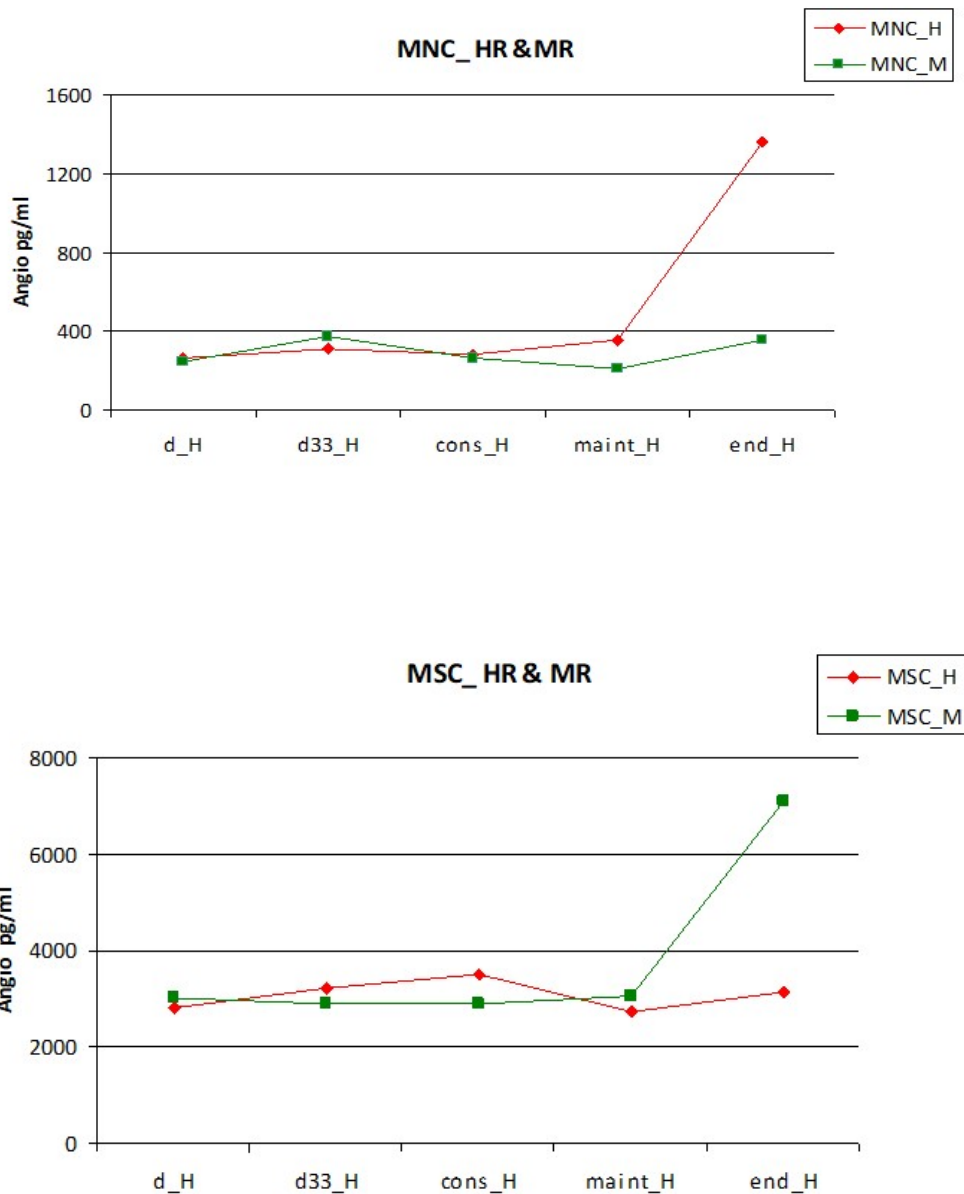
Δε διαπιστώθηκε διαφορά στην έκφραση του παράγοντα μεταξύ της διάγνωσης και των φάσεων θεραπείας. (Πίνακας 14)

**Πίνακας 14.** Έκφρασης του παράγοντα Angio-1 στο κλάσμα των MNCs και στα MSCs στη διάγνωση και τις φάσεις θεραπείας. Τα δεδομένα εκφράζονται ως mean±SEM (pg/ ml).

	MNCs	MSCs
d	260.019±16.68	2923.44±454.95
d33	343.309±25.978	3045.67±405.23
cons	273.039±28.878	3251.50±807.02
maint	298.819±85.588	3453.31±1200.71
end	715.95±268.86	5113.26±1072.42

Τα επίπεδα του παράγοντα ήταν ανεξάρτητα από το διαχωρισμό σε ομάδα υψηλού και σε ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου στη διάγνωση και στις φάσεις χημειοθεραπείας, ενώ στο τέλος της θεραπείας προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά. (Διάγραμμα 15)

**Διάγραμμα 15.** Έκφραση του παράγοντα Angio-1 στο κλάσμα των MNCs και στα MSCs στη διάγνωση και τις φάσεις θεραπείας για τις ομάδες υψηλού (HR) και ενδιάμεσου (MR) κινδύνου.



## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Τα μεσεγγυματικά κύτταρα στρώματος αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος και μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων, εδώ και δύο δεκαετίες περίπου, μετά την πρώτη περιγραφή τους το 1966 από τον Friedenstein και τους συνεργάτες του (Friedenstein et al., 1974). Ο μυελός των οστών και ο λιπώδης ιστός αντιπροσωπεύουν τις κύριες πηγές MK, με σημαντικές, όμως, διαφορές στις ιδιότητές τους. Παρά την πληθώρα πληροφοριών σχετικά με τη φύση των μεσεγγυματικών κυττάρων, δεν έχουν ακόμα πλήρως χαρακτηριστεί, ενώ δεν υπάρχει ειδικός δείκτης για την ταυτοποίησή τους.

Έχει αποδειχθεί ότι τα μεσεγγυματικά κύτταρα υποστηρίζουν και ρυθμίζουν την αιμοποίηση, ως συστατικό "κλειδί" του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, παρά το γεγονός ότι αποτελούν μικρό μόνο ποσοστό των εμπύρηνων κυττάρων. Η δομή που αντιπροσωπεύει την αιμοποιητική φωλεά έχει βασικό ρόλο στη λειτουργική συντήρηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και την προστασία τους από εξωγενείς βλαπτικούς παράγοντες. Η ενδοστική φωλεά επιτελεί λειτουργικό και ρυθμιστικό ρόλο στη φυσιολογική αιμοποίηση, διατηρώντας τα AAK σε κατάσταση ηρεμίας και προάγοντας την αυτοανανέωσή τους (Arai et al., 2012) (Calvi et al., 2003). Πρόκειται για σχηματισμό ευάλωτο στην επίδραση της ακτινοβολίας ή/και της χημειοθεραπείας, όμως οι βλάβες και η ομοιόστασή της αποκαθίστανται ταχύτατα. Αντίστοιχα, η αγγειακή φωλεά λειτουργεί ως «πύλη» μετανάστευσης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, ρυθμίζοντας τη διαφοροποίηση και την κινητοποίηση των AAK στην περιφερική κυκλοφορία (Nakamura-Ishizu et al., 2013). Παρά την ανατομική διάκριση, μεταξύ ενδοστικής και αγγειακής φωλεάς υφίστανται στενές επαφές και αλληλεπιδράσεις, με αποτέλεσμα τα AAK να κυκλοφορούν ανάμεσα στα δύο τμήματα και να λαμβάνουν ετερόπλευρα σήματα ταυτόχρονα (Garrett et al., 2009) (Trump et al., 2010). Η διατήρηση της ομοιόστασης του αιμοποιητικού συστήματος προϋποθέτει την ισορροπία μεταξύ αυτοανανέωσης, διαφοροποίησης και απόπτωσης των αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και την αδιατάρακτη αλληλεπίδρασή τους με το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών. Τα κύτταρα της αιμοποιητικής φωλεάς προφυλάσσουν τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα από υπέρμετρο πολλαπλασιασμό, που θα οδηγούσε σε ανάπτυξη νεοπλασίας, αλλά και από τη συσσώρευση γονιδιακών μεταλλάξεων, που θα οδηγούσαν σε νεοπλασματική εκτροπή. Υπάρχουν δεδομένα που προτείνουν ότι η απορρύθμιση της αιμοποιητικής φωλεάς συμμετέχει στην παθογένεια εκφυλιστικών νοσημάτων και όγκων του αιμοποιητικού συστήματος (Jones et al., 2008). Τα MK συμμετέχουν στην οργάνωση της αιμοποιητικής φωλεάς, ασκώντας καθοριστικό ρόλο στη δέσμευση, κινητοποίηση και έξοδο των AAK. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη για την εγκατάσταση και διατήρηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, ενώ, επιπλέον, ρυθμίζουν τη λειτουργία των αιμοποιητικών κυττάρων και διατηρούν την ομοιόσταση της φωλεάς, μέσω έκκρισης αυξητικών παραγόντων. Με δεδομένη την ετερογένεια των MK ως προς την προέλευση, τους δείκτες και τη λειτουργία τους, θα πρέπει να απομονωθούν οι ειδικοί υποπληθυσμοί της αιμοποιητικής φωλεάς και να καθοριστούν οι αλληλεπιδράσεις τους και οι λειτουργίες τους στη ρύθμιση των AAK.

Ο ρόλος των μεσεγγυματικών κυττάρων στην ογκογένεση-λευχαιμογένεση δεν έχει διευκρινιστεί και τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Υπάρχουν βιβλιογραφικές

ενδείξεις ότι οι αιματολογικές κακοήθειες συνδέονται με απορρύθμιση στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και ότι τα ΜΚ συμμετέχουν στη διαδικασία ανάπτυξης νεοπλασίας, είτε ενισχύοντας τη δημιουργία είτε τροποποιώντας το φαινότυπο νεοπλασιών του αιμοποιητικού συστήματος (Raaijmakers et al. 2010) (Kode et al. 2014). Επιπλέον, όπως αναφέρεται, τα μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος εμφανίζουν συγκεκριμένες αλλαγές στην έκφραση κυτοκινών, ανταποκρινόμενα σε ερεθίσματα από νεοπλασματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργική εκτροπή των αιμοποιητικών κυττάρων και την εξέλιξή τους σε νεοπλασματικά κύτταρα (Scherpers et al., 2013) (Arranz et al., 2014). Ακόμη, το μικροπεριβάλλον μπορεί να τροποποιήσει την ευαισθησία των νεοπλασματικών κυττάρων στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, προκαλώντας ανθεκτικότητα (Levesque et al., 2013). Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να οργανώνουν τη δημιουργία φωλεάς που ευνοεί τη μετάσταση (Karlan et al. 2005). Επομένως, φαίνεται να υπάρχει μια αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ νεοπλασματικών και φυσιολογικών κυττάρων στην αιμοποιητική φωλεά, ικανή να πυροδοτήσει την έναρξη και να διευκολύνει την εξέλιξη αιματολογικών νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένης της λευχαιμίας.

Αναφορικά με το ρόλο των μεσεγχυματικών κυττάρων στη λευχαιμία, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι οι αλλαγές στον πληθυσμό των ΜΚ επηρεάζουν καθοριστικά τη φυσιολογική αιμοποίηση, πρόταση που, όμως, χρήζει επιβεβαίωσης. Η μελέτη των Colmone et al. (2008) ενίσχυσε την υπόθεση ότι ένας παθολογικός κυτταρικός πληθυσμός στην αιμοποιητική φωλεά μπορεί να τροποποιήσει το μικροπεριβάλλον προς όφελός του, αφού σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, λευχαιμική κυτταρική σειρά επηρέασε την αλληλεπίδραση των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων με τα κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών, αλλάζοντας την ικανότητα κινητοποίησής τους. Επίσης, στη μελέτη των Scherpers et al (2013), δείχτηκε σε ζωικά μοντέλα ότι η BCR/ABL σύντηξη στα αιμοποιητικά κύτταρα είχε σαν συνέπεια ελαττωμένη έκφραση μορίων που υποστηρίζουν τη φυσιολογική αιμοποίηση (CXCL12) από τα μεσεγχυματικά κύτταρα οστεοβλαστικής σειράς, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υποστηρικτικού περιβάλλοντος για τα λευχαιμικά κύτταρα. Πιθανόν, λοιπόν, γενετικές βλάβες στα AAK να οδηγούν σε αλλαγές στα ΜΚ τα οποία, με τη σειρά τους, προωθούν παθολογικούς πληθυσμούς αιμοποιητικών κυττάρων. Τα νεοπλασματικά κύτταρα που εντοπίζονται στην αιμοποιητική φωλεά "συμβιώνουν" λειτουργικά με τα φυσιολογικά κύτταρα και προκύπτει το ερώτημα αν ο καρκίνος είναι νόσημα συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου ή συγκεκριμένου ιστού και, σε επέκταση, αν η αντιμετώπιση της νεοπλασίας θα πρέπει να έχει στόχο το καρκινικό κύτταρο ή τη φωλεά, ενώ δεν είναι επίσης γνωστό αν η απορρύθμιση αυξητικών παραγόντων εκκρινόμενων από το μικροπεριβάλλον, με συμμετοχή των μεσεγχυματικών κυττάρων, συμβάλλει στην ανάπτυξη παρεγχυματικών όγκων.

Η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία αποτελεί τη συχνότερη νεοπλασματική νόσο της παιδικής ηλικίας (Hunger et al., 2015). Πρόκειται για μια κλινικά και βιολογικά ετερογενή νόσο, που παθογενετικά προκύπτει από τη συσσώρευση γενετικών μεταλλαγών στα προγονικά Β λεμφοκύτταρα, με αναστολή της διαφοροποίησης και ανώμαλο πολλαπλασιασμό και τελικό αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία και την καταστολή του μυελού των οστών (Harrison, 2009). Η αιτιολογία παραμένει άγνωστη, ενώ έχουν προσδιοριστεί αρκετοί προδιαθεσικοί παράγοντες (Woo et al., 2014). Δεν έχει μελετηθεί πιθανός ρόλος ή η συμβολή των ΜΚ στην έναρξη της νόσου και στη μετέπειτα πορεία της καθώς και στην

ανταπόκριση στη θεραπεία. Παράλληλα δε, υπάρχει το δεδομένο ότι, τα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών των παιδιών δεν είναι παρόμοια με τα αντίστοιχα των ενηλίκων (Choumerianou et al, 2010).

Στην παρούσα μελέτη έγινε χαρακτηρισμός των μεσεγχυματικών κυττάρων στρώματος από δείγματα μυελού των οστών παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία Β κυτταρικής αρχής. Αξιολογήθηκε επίσης το κατά πόσο και με ποιον τρόπο επηρεάζονται βιολογικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες των μεσεγχυματικών κυττάρων από τη νόσο και από τη χημειοθεραπεία.

Παρά τις αβεβαιότητες και διαφοροποιήσεις στο χαρακτηρισμό των μεσεγχυματικών κυττάρων, υπάρχει σύγκλιση στην περιγραφή της κυτταρικής τους μορφολογίας. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα περιγράφονται ως κύτταρα με μορφολογία ινοβλαστών και χαρακτηριστικό ατρακτοειδές σχήμα (Mendez-Ferrer et al., 2010). Αυτή η μορφολογία ήταν σταθερό εύρημα σε όλα τα κύτταρα των πειραμάτων μας, ανεξαρτήτως του σταδίου της λευχαιμίας και της χημειοθεραπείας. Άρα η νόσος δε φαίνεται να έχει επίδραση σε αυτό το χαρακτηριστικό. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται (Wagner et al, 2008) ότι, σε *in vitro* συνθήκες και καθώς προχωρούν οι επανακαλλιέργειες, τα μεσεγχυματικά κύτταρα γηράσκουν και η μορφολογία τους αλλοιώνεται, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μεγαλύτερα και με ακανόνιστο και επίπεδο σχήμα. Το ότι δεν παρατηρήθηκε τέτοια αλλοίωση στα κύτταρα της παρούσας μελέτης πρέπει να οφείλεται στο ότι οι επανακαλλιέργειες μελετήθηκαν μέχρι και το P5, το οποίο θεωρείται σχετικά ενωρίς και όχι προχωρημένο στάδιο, ενώ θα πρέπει να ληφθεί επίσης υπόψη ότι προέρχονται από μυελό των οστών παιδιών, αν και διηθημένο από λευχαιμικά κύτταρα, ο οποίος όπως έχει ήδη αναφερθεί παρουσιάζει διαφορές συγκρινόμενος με τον αντίστοιχο ενήλικα (Stolzinger et al., 2008).

Ευρύς τομέας της έρευνας έχει επικεντρωθεί στην ταυτοποίηση του αντιγονικού δείκτη που θα μπορούσε να χαρακτηρίσει τα μεσεγχυματικά κύτταρα και μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί δυνατόν να προσδιοριστεί ένας τέτοιος δείκτης. Στη μελέτη, τα μεσεγχυματικά κύτταρα τόσο της διάγνωσης όσο και των φάσεων θεραπείας, σε όλες τις επανακαλλιέργειες, εμφάνισαν το προτεινόμενο ανοσοφαινοτυπικό προφίλ, δηλαδή υψηλή έκφραση δεικτών επιφανείας χαρακτηριστικών για τα μεσεγχυματικά κύτταρα και έλλειψη έκφρασης των αντίστοιχων δεικτών των αιμοποιητικών κυττάρων. Το εύρημα υποδεικνύει ομοιογένεια των καλλιέργειών των μεσεγχυματικών κυττάρων στο επίπεδο της αντιγονικής έκφρασης. Παράλληλα υποδεικνύει ότι ούτε η νόσος ούτε η θεραπεία σε όλες τις φάσεις έχουν επίδραση τόσο στην έκφραση όσο και στην ομοιογένεια των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Ανάλογα δεδομένα παραθέτουν οι Conforti και συν., οι οποίοι απομόνωσαν και καλλιέργησαν ΜΚ μυελού των οστών παιδιών με ΟΛΛ με σκοπό το χαρακτηρισμό των *in vitro* βιολογικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων και αναφέρουν απουσία αιμοποιητικών κυττάρων μετά από την επανακαλλιέργεια P3, όμως και ποσοστό 98% των μεσεγχυματικών κυττάρων να έχουν την τυπική ανοσοφαινοτυπική έκφραση.

Η ικανότητα πολλαπλασιασμού των μεσεγχυματικών κυττάρων εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό του χρόνου κυτταρικού διπλασιασμού (DT) στη διάγνωση της λευχαιμίας και στα στάδια του χημειοθεραπευτικού πρωτοκόλλου. Η άμεση σύγκριση και αντιπαραβολή με αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία εμφανίζει δυσχέρειες, οι οποίες προκύπτουν από το γεγονός ότι, παρά το ευρύ φάσμα γνώσεων, δεν υπάρχει τυποποιημένο πρωτόκολλο

απομόνωσης και καλλιέργειας των μεσεγχυματικών κυττάρων. Αυτό γίνεται πιο εμφανές σε μελέτες που περιλαμβάνουν παιδιατρικούς ασθενείς, διότι ο αριθμός των ασθενών είναι ιδιαίτερα περιορισμένος. Η ικανότητα πολλαπλασιασμού που υπολογίστηκε στα πειράματά δείχνει ότι τα ΜΚ επηρεάζονται από τη λευχαιμία. Συγκεκριμένα, στη διάγνωση της νόσου, ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού είναι μεγαλύτερος και παράλληλα απαιτείται περισσότερος χρόνος για να σχηματίσουν στρώμα τα μεσεγχυματικά κύτταρα με την πρόοδο των καλλιεργειών. Από τη μοναδική υπάρχουσα σχετική μελέτη των Conforti και συν., οι οποίοι εξέτασαν χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και, παρά την ευρεία μεταβλητότητα μεταξύ των δειγμάτων που παρατηρήθηκε στην παρούσα και κατ'αναλογία με δεδομένα που έχουν αναφερθεί προηγουμένως (Conforti et al., 2013), τα αποτελέσματά συμφωνούν σε αυτό το σημείο. Μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδα υψηλού κινδύνου (HR) και ομάδα ενδιάμεσου κινδύνου (MR) με βάσει τους προγνωστικούς παράγοντες της ΟΛΛ, διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος κυτταρικού διπλασιασμού ήταν μικρότερος στη διάγνωση και, συγκεκριμένα, στην αρχή της καλλιέργειας (D0) και στις επανακαλλιέργειες P1 και P2, στα μεσεγχυματικά κύτταρα της ομάδας υψηλού κινδύνου σε σχέση με τα κύτταρα της ομάδας ενδιάμεσου κινδύνου. Η παρατήρησή μας αποτελεί πιθανή ένδειξη ύπαρξης πιο ενεργού πληθυσμού μεσεγχυματικών κυττάρων στην ομάδα υψηλού κινδύνου.

Σε ό,τι αφορά τη μελέτη κλωνογονικότητας που εκτιμήθηκε με την ικανότητα σχηματισμού CFU-F αποικιών και καταμέτρηση τους, στη διάγνωση της λευχαιμίας και στα διάφορα στάδια της θεραπείας, τα αποτελέσματά δείχνουν ότι η κλωνογονικότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων επηρεάζεται από τη λευχαιμία, καθόσον αναπτύχθηκε ο μικρότερος αριθμός αποικιών στα δείγματα των ασθενών στη διάγνωση. Επομένως, φαίνεται πως η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία επηρεάζει το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, εκτός από τα αιμοποιητικά κύτταρα. Δεν μπορεί να λεχθεί εν τούτοις, με αυτές τις πληροφορίες, αν η βλάβη ξεκινά από τον αιμοποιητικό ιστό και πυροδοτεί τις μεταβολές στο μικροπεριβάλλον και αντίστροφα ή αν πρόκειται για ταυτόχρονα και κοινά γεγονότα. Αντίθετα η χορήγηση της χημειοθεραπείας δεν επηρεάζει την κλωνογονικότητα, αφού ο αριθμός των σχηματισμένων αποικιών ήταν μεν μικρότερος στα δείγματα όλων των σταδίων του θεραπευτικού πρωτοκόλλου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς, όμως, η παρατηρούμενη διαφορά να φτάσει σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα. Ένας ακόμη παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα σχηματισμού αποικιών είναι η διάρκεια της καλλιέργειας. Με την πρόοδο των επανακαλλιεργειών καταμετρήθηκαν λιγότερες αποικίες CFU-F σε όλες τις ομάδες, εκτός από τη διάγνωση. Η επίδραση του χρόνου καλλιέργειας είναι πιο εμφανής στις αποικίες μεγάλου και μεσαίου μεγέθους. Με δεδομένο ότι οι αποικίες μεγάλου μεγέθους προέρχονται από πιο πρωτόγονα κύτταρα, φαίνεται ότι οι πιο προχωρημένες επανακαλλιέργειες αποτελούνται από πιο ώριμα μεσεγχυματικά κύτταρα. Τέλος, τα μεσεγχυματικά κύτταρα που περιέχονται στο κλάσμα των μονοπύρηνων κυττάρων δίνουν το μικρότερο αριθμό CFU-F αποικιών, αποτέλεσμα που προκύπτει, το πιθανότερο, λόγω του μικρού αριθμού των περιεχόμενων ΜΚ. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών σε υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου, δε δείχνει οι δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες της νόσου να ασκούν επίδραση στην κλωνογονικότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων. Η δεδομένη παρατήρηση ενισχύει τα αναφερόμενα από τους Conforti και συν. ότι η παρουσία των λευχαιμικών κυττάρων δεν επιφέρει στα μεσεγχυματικά κύτταρα ενισχυμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, ενώ,



αντίθετα, προάγει τον ανεπαρκή πολλαπλασιασμό. Επομένως, τα δεδομένα της παρούσας αντικρούουν την υπόθεση ότι ο πληθυσμός των μεσεγχυματικών κυττάρων μπορεί να παίζει ρυθμιστικό και κρίσιμο ρόλο στην επαγωγή της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού των βλαστών στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Sorokina et al., 2016).

Η ικανότητα διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα και χονδροκύτταρα που μελετήθηκε στα στάδια P2 ή P3 των καλλιέργειών υπολείπεται στα μεσεγχυματικά κύτταρα των δειγμάτων της διάγνωσης σε σύγκριση με τις φάσεις θεραπείας της λευχαιμίας, όπου παρατηρήθηκε ίδια ικανότητα διαφοροποίησης με την ομάδα ελέγχου.

Συνοψίζοντας στο σημείο αυτό τα δεδομένα που προέκυψαν για την πολλαπλασιαστική δυνατότητα, την κλωνογονικότητα και την ικανότητα διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων, καταδεικνύεται ότι η παρουσία των βλαστών στη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας επηρεάζει αυτά τα χαρακτηριστικά τους, ενώ η εφαρμογή των χημειοθεραπευτικών παραγόντων δεν έχει επίδραση.

Τις τελευταίες δεκαετίες είναι έντονο το ενδιαφέρον για τον κυτταρικό κύκλο και εγείρεται η υπόθεση ότι διαταραχές στην ρύθμισή του οδηγούν σε γενετική αστάθεια, με αποτέλεσμα την προδιάθεση σε κακοήγη εξαλλαγή (Sherr, 2000). Έγινε ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των μεσεγχυματικών κύτταρων στα στάδια P2 και P4 των επανακαλλιέργειών και προέκυψε ότι η πλειοψηφία των κυττάρων όλων των ομάδων βρίσκεται στη φάση ηρεμίας του κύκλου (quiescence). Διαφοροποιούμενα από αυτά τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου, βρίσκονται σε ποσοστό 20% στη φάση S, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τις υπόλοιπες ομάδες είναι 10%. Απαιτείται περαιτέρω ανάλυση προκειμένου να διευκρινιστούν οι διαφορές που προκύπτουν στις πανομοιότυπες συνθήκες καλλιέργειας των πειραμάτων μας.

Έγινε επίσης εκτίμηση του ποσοστού της απόπτωσης των μεσεγχυματικών κυττάρων της διάγνωσης αλλά και των φάσεων θεραπείας σε διαδοχικές επανακαλλιέργειες και συγκεκριμένα στα P2 και P4. Η απόπτωση είναι ενεργητική κυτταρική λειτουργία, γενετικά καθορισμένη, πυροδοτούμενη από ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα (θεραπεία με κυτταροτοξικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ή ακτινοβολία, ελαττωματικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης βλαβών του γενετικού υλικού) που οδηγεί σε αλληλουχία μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών σε κυτταρικό επίπεδο. Διαταραχές στην αλληλουχία των γεγονότων που χαρακτηρίζουν την απόπτωση μπορεί να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις, όπως αυτοάνοσα νοσήματα, ιογενείς λοιμώξεις και νεοπλασίες. Ειδικότερα, τα τελευταία χρόνια κερδίζει έδαφος η υπόθεση ότι στην παθογένεια, αλλά και την εξέλιξη της λευχαιμίας εμπλέκεται και η απορρύθμιση της ισορροπίας ανάμεσα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αίματος και στην ικανότητά τους να οδηγηθούν σε απόπτωση (Johnstone RW et al., 2002) (Peters R et al., 1998). Δεν υπήρξε διαφοροποίηση των ποσοστών των αποπτωτικών κυττάρων ανεξάρτητα της ομάδας ή του πόσο προχωρημένη ήταν η καλλιέργεια. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν τη σταθερότητα των MK του μυελού των οστών σε συνθήκες μακροχρόνιας καλλιέργειας, τόσο στη διάγνωση της λευχαιμίας όσο και στις φάσεις χημειοθεραπείας. Σημειώνεται ότι παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό απόπτωσης στις φάσεις και στο τέλος της θεραπείας σε σχέση με τη διάγνωση, με σταθερά όμως και εδώ ποσοστά στις επανακαλλιέργειες P2 και P4. Παρόμοια δεδομένα έχουν βρεθεί (Fulda, 2009) και σε ανάλογη μελέτη μεσεγχυματικών κύτταρων από δείγματα μυελού των οστών παιδιών με καλοήγη όμως

αιματολογικά νοσήματα, ένδειξη της μη επίδρασης τη νόσου αλλά και της σταθερότητας των μεσεγχυματικών κυττάρων τουλάχιστον στις αρχικές επανακαλλιέργειες. Όσον αφορά σε πιο προχωρημένες επανακαλλιέργειες MK από MO παιδιών με λευχαιμία άλλοι συγγραφείς (Conforti και συν.) στο P18 αναφέρουν υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης. Να τονιστεί όμως ότι στην ίδια εργασία τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας για τις αρχικές επανακαλλιέργειες (P2).

Οι παράγοντες αγγειοποιητίνη-1 και SDF-1a έχουν πρόσφατα χαρακτηριστεί ως μείζονες ρυθμιστές της αλληλεπίδρασης μεταξύ προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων και μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών (Gomes et al., 2016) (Nie et al., 2006).

Ο SDF-1a αποτελεί βασικό ρυθμιστή της φυσιολογικής κινητικότητας των κυττάρων και εμπλέκεται στην παθολογική κινητικότητα τους στην καρκινογένεση και τη μετάσταση των όγκων, ενώ εκφράζεται συστηματικά από τα στρωματικά, τα ενδοθηλιακά, τα δενδριτικά και άλλα κύτταρα και συνεχώς σε διάφορα όργανα συμπεριλαμβανομένου και του μυελού των οστών (Van Overstraeten-Schlogel et al., 2006) (Sharma et al., 2012) (Burger et al., 2006). Τα δεδομένα για την έκφραση του παράγοντα SDF-1a από τα μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες είναι περιορισμένα (Balkwill, 2004) (Zlotnik, 2006). Η έκφραση του παράγοντα SDF-1a στα υπερκείμενα διαλύματα των καλλιεργειών των μεσεγχυματικών κυττάρων MO παιδιών με ΟΛΛ βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στα δείγματα της διάγνωσης της λευχαιμίας σε σύγκριση με τα δείγματα των φάσεων θεραπείας, χωρίς, όμως, να προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση της συσχέτισης με τους προγνωστικούς παράγοντες, αφού στην ομάδα των ασθενών υψηλού κινδύνου η ποσοτική έκφραση ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με την ομάδα των ασθενών ενδιάμεσου κινδύνου. Η διαφορά αυτή παύει να υφίσταται με την έναρξη της χημειοθεραπείας. Ανάλογα, οι Ge και συν., διαπίστωσαν αυξημένη έκφραση του παράγοντα SDF-1a σε εφήβους και νεαρούς ενήλικες με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία μόνο στη διάγνωση και αντιστροφή της υπεροχής με τη χημειοθεραπεία. Σε άλλες μελέτες που περιλαμβάνουν παιδιατρικούς ασθενείς με οξεία λευχαιμία (Van den Berk et al., 2014), τα επίπεδα του SDF-1a/CXCL12 διαφέρουν αναλόγως αν εκτιμώνται στο περιφερικό αίμα, στο μυελό των οστών ή στο υπερκείμενο των μεσεγχυματικών κυττάρων. Στο μεν υπερκείμενο η έκφραση δεν παρουσιάζει απόκλιση μεταξύ των νεοδιαγνωσθέντων, αυτών που έλαβαν χημειοθεραπεία και την ομάδα ελέγχου ενώ στις ίδιες ομάδες, όταν προσδιορίζονται τα επίπεδα στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών, η έκφραση είναι μειωμένη στη διάγνωση, συγκριτικά τις άλλες δυο ομάδες. Αυτά τα στοιχεία υποστηρίζουν την άποψη ότι τα λευχαιμικά κύτταρα δεν έχουν επίδραση στην παραγωγή του παράγοντα και, επομένως, τα μειωμένα επίπεδα που παρατηρούνται στον ορό δεν μπορούν να αποδοθούν στη συγκεκριμένη ικανότητα παραγωγής των μεσεγχυματικών κυττάρων. Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, υποστηρίζουν περαιτέρω αυτή την πρόταση ενώ δείχνουν ότι τα λευχαιμικά κύτταρα δεν επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή της χημειοκίνης SDF-1a από τα μεσεγχυματικά κύτταρα και ότι η ποσοτική έκφραση του παράγοντα παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας.

Η αγγειοποιητίνη 1 παράγεται από κύτταρα που υποστηρίζουν το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, έχει σημαντικό ρόλο στη δυναμική αλληλεπίδραση του συμπλέγματος κύτταρα-στρώμα-διαλυτοί παράγοντες στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών και ενεργοποιεί τον υποδοχέα Tie2 στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την

ευόδωση της προσκόλλησής τους στο στρώμα του μυελού των οστών και, τελικά, τη διατήρηση των κυττάρων σε φάση ηρεμίας και την αυξημένη επιβίωσή τους (Fukuhara et al., 2009) (Sacchetti et al., 2007) (Arai et al., 2004). Τα αποτελέσματά της παρούσας επιβεβαιώνουν τη θεωρία (De Palma et al., 2005) ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα αποτελούν τη βασική πηγή αγγειοποιητίνης 1. Οι χαμηλότερες τιμές αγγειοποιητίνης 1 που παρατηρήθηκαν εκφράζονται στο υπερκείμενο διάλυμα των καλλιέργειών των μεσεγχυματικών κυττάρων στη διάγνωση της λευχαιμίας και, μάλιστα, ανεξαρτήτως της ομάδας κινδύνου. Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μετά τη σύγκριση με τις φάσεις χημειοθεραπείας. Οι Karakurt και συν., εξετάζοντας τα επίπεδα της αγγειοποιητίνης 1 στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία στα παιδιά επίσης αναφέρουν ελαττωμένη έκφραση του παράγοντα στη διάγνωση της νόσου στα υπερκείμενα των καλλιέργειών των μεσεγχυματικών κυττάρων, αλλά και επιπλέον, στον ορό του μυελού των οστών.

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί ευρύτερα ο ρόλος των παραγόντων SDF-1a και αγγειοποιητίνης-1 στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, θα πρέπει να συνυπολογιστούν και να συνεκτιμηθούν παράγοντες όπως η έκθεση των μεσεγχυματικών κυττάρων από δείγματα μυελού των οστών στους αυξητικούς παράγοντες του ορού FBS και του αυξητικού παράγοντα FGF-b, αλλά και η μετα-μεταγραφική επίδραση της ηλικίας καλλιέργειας στην έκφραση των πρωτεϊνών.

Τα ανωτέρω δεδομένα των *in vitro* πειραμάτων δεν αντικατοπτρίζουν τις *in vivo* συνθήκες και, επίσης, η προσπάθεια προσομοίωσης της δομής και λειτουργικότητας του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών παραμένει υπό διερεύνηση, αλλά η *in vitro* μελέτη αποτελεί ένα μεγάλο πρώτο βήμα καθώς δίνει πληροφορίες για τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες των μεσεγχυματικών κυττάρων που εκτίθενται σε λευχαιμικά κύτταρα *in vivo*. Παραμένει, τέλος, σημαντική τροχοπέδη στη σύγκριση των αποτελεσμάτων τόσο αυτών της παρούσας αλλά και των άλλων μελετών, η μεγάλη διαφοροποίηση και η ετερογένεια των πρωτοκόλλων καλλιέργειας και εκτίμησης των διαφόρων χαρακτηριστικών για τα μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος.

### **Συμπεράσματα**

Τα βιολογικά χαρακτηριστικά και οι λειτουργικές ιδιότητες των μεσεγχυματικών κυττάρων που μελετήθηκαν επηρεάζονται από τη νόσο της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, καθώς οι παρατηρούμενες μεταβολές παραμένουν και στις επανακαλλιέργειες. Αντίθετα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα αναλαμβάνουν λειτουργικά με την έναρξη της χημειοθεραπείας και την επίτευξη της ύφεσης της νόσου και δεν επηρεάζονται από τη θεραπεία. Η ικανότητα έκκρισης αυξητικών παραγόντων (αγγειοποιητίνη-1) και χημειοκινών (παράγοντας SDF-1a) δεν επηρεάζεται από τη λευχαιμία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής δεν μπορούν να αποσαφηνίσουν το ρόλο των μεσεγχυματικών κυττάρων στη λευχαιμογένεση και το αν τα λευχαιμικά κύτταρα προστατεύονται ή εκτίθενται στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες από τα μεσεγχυματικά κύτταρα. Καταδεικνύουν, όμως, ότι η οποιαδήποτε επίδραση του λευχαιμικού κλώνου στα βιολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων είναι παροδική και παύει να ασκείται με την έναρξη της θεραπείας.

### Περιορισμοί της μελέτης

Περιορισμούς της μελέτης αποτελούν η ανομοιογένεια των δειγμάτων, καθώς τα δείγματα που αναλύθηκαν δεν προέρχονται, απαραίτητα, από ασθενείς που παρακολούθηθηκαν από τη διάγνωση της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και μέχρι και το τέλος της θεραπείας. Αυτό θα ήταν δύσκολο εφικτό στο χρονικό πλαίσιο από τη διάγνωση μέχρι και την ολοκλήρωση των φάσεων του χημειοθεραπευτικού πρωτοκόλλου κάθε ασθενούς. Επίσης, δεν υπήρξε παρόμοιος αριθμός ασθενών και στις δυο ομάδες στην κατηγοριοποίηση σε ομάδα υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου καθώς και σε όλες τις φάσεις της νόσου και της θεραπείας. Τέλος, θα είχε ενδιαφέρον στην αρχική αυτή μελέτη οι επανακαλλιέργειες να προχωρήσουν πέραν της επανακαλλιέργειας P5, αν και για τις εφαρμογές και τα χαρακτηριστικά των ΜΚ και προς αποφυγήν των συνεπειών της γήρανσης ή της «εξάντλησης» λόγω μακροχρόνιας καλλιέργειας, προτιμώνται οι καλλιέργειες αρχικών σταδίων.

### Προοπτική της μελέτης

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν περιγραφικά χαρακτηριστικά των ΜΚ του ΜΟ των ασθενών. Ως μελλοντική προοπτική προκύπτει η μελέτη των μηχανισμών που εμπλέκονται στις βιολογικές τους διαδικασίες. Παραμένουν να γίνουν ολοκληρωμένες μελέτες της έκφρασης των κυτταροκινών που επάγουν ή αναστέλλουν την αιμοποίηση στο υπερκείμενο διάλυμα των καλλιεργείων των μεσεγχυματικών κυττάρων και εκτίμησης του ρόλου και της έκφρασης των ογκογονιδίων και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Επιπλέον χαρακτηριστικά, όπως οι ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες κά είναι ανοιχτά σε διερεύνηση.

Επίσης, η μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών των διαφορετικών ομάδων κινδύνου θα οριστικοποιήσει τις αρχικά παρατηρηθείσες διαφοροποιήσεις. Παραμένοντας στο θέμα της ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας ενδιαφέρον θα έχει και η μελέτη των ΜΚ από παιδιά με Τ-ΟΛΛ, η οποία διαφοροποιείται νοσολογικά τόσο στη θεραπευτική της προσέγγιση όσο και στη γενικότερη πορεία. Επιπλέον, θα ήταν ενδιαφέρουσα και χρήσιμη η μελέτη των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων των μεσεγχυματικών κυττάρων, όπως και αν αυτά επηρεάζονται από τον κάθε ένα ξεχωριστά χημειοθεραπευτικό παράγοντα που χρησιμοποιείται στο πρωτόκολλο της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας.

Αν και στα θετικά βιολογικά χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων φαίνεται να έχει γίνει πρόοδος, ενδείξεις για τη συμμετοχή τους στην εμφάνιση και εξέλιξη αιματολογικών κακοηθειών, όπως η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Επομένως, η γενικότερη μελλοντική έρευνα θα πρέπει να έχει στόχο την κατανόηση και αποσαφήνιση των μηχανισμών με τους οποίους τροποποιούνται τα χαρακτηριστικά των μεσεγχυματικών κυττάρων και αν, τελικά, και με ποιόν τρόπο τα κύτταρα αυτά υπεισέρχονται στην ανάπτυξη νεοπλασιών.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Afford S, and Randhawa S. Apoptosis 2000; Mol Pathol 2000; 53(2):55-63.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/Angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell 2004; 118:149–161.
- Arai F, Hosokawa K, Toyama H, Matsumoto Y, Suda T. Role of N-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. Ann NY Acad Sci 2012; 1266:72–77.
- Arranz L, Sánchez-Aguilera A, Martín-Pérez D, Isern J, Langa X, Tzankov A, Lundberg P, Muntión S, Tzeng YS, Lai DM, et al. Nature. Published online June 22, 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13383>.
- Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S, Dar A, Peled A, Samira S, Kollet O, Hershkoviz R, Alon R, Hardan I, Ben-Hur H, Naor D, Nagler A, Lapidot T. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. Blood 2004; 103:2981–2989.
- Azab AK, Runnels JM, Pitsillides C, Moreau AS, Azab F, Leleu X, Jia X, Wright R, Ospina B, Carlson AL, Alt C, Burwick N, Roccaro AM, Ngo HT, Farag M, Melhem MR, Sacco A, Munshi NC, Hideshima T, Rollins BJ, Anderson KC, Kung AL, Lin CP, Ghobrial IM . CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. Blood 2009; 113:4341-4351.
- Bai M, Tsanou E, Skyrilas A, et al. Alterations of the p53, Rb, p27 tumour suppressor pathways in diffuse large B-cell lymphomas. Anticancer Res 2007; 27:2345-2352.
- Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. Seminars in cancer biology 2004; 14:171-179.
- Battula VL, Treml S, Bareiss PM, et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271 and mesenchymal stem cell antigen-1. Haematologica 2009; 94:173-184.
- Beerman I, Luis TC, Singbrant S, Celso CL, and Mendez-Ferrer S. The evolving view of the hematopoietic stem cell niche. Experimental Hematology 2017; 50:22–26.
- Beesley AH, Cummings AJ, Freitas JR, et al. The gene expression signature of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia : implications for mechanisms of therapy failure. Br J Hematol 2005; 131:447-456.
- Besson A, Dowdy S, and Roberts J. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. Developmental Cell 2008; 14:159-169.
- Bhojwani D, Pui CH. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. Lancet Oncol 2013; 14:205-217.

Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62:47-60.

Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance : translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature Medicine* 2013; 19:35-42.

Biondi A, Schrappe M, et al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol* 2012; 13:936-945.

Blau O, Hofmann WK, Baldus CD, Thiel G, Serbent V, Schümann E, Thiel E, Blau IW. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol* 2007; 35:221–229.

Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006; 107:1761-1767.

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425:841–846.

Campbell JJ, et al. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279:381-384.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991; 9:641–650.

Case M, Matheson E, Minto L, et al. Mutation of genes affecting the RAS pathway is common in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research* 2008; 68:6803-6809.

Choumerianou DM, Martimianaki G, Stiakaki E, Kalmanti L, Kalmanti M, Dimitriou H. Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults. *Cytotherapy* 2010; 12:881-887.

Chow A., et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* 2011; 208:261–271.

Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med* 2015; 372:793-795.

Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, and Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 2008; 322:1861–1865.

Conforti A, Biagini S, Del Bufalo F, Sirleto P, Angioni A, Starc N, Li Pira G, Moretta F, Proia A, Contoli B, Genovese S, Ciardi C, Avanzini MA, Rosti V, Lo-Coco F, Locatelli F, Bernardo ME. Biological, functional and genetic characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from pediatric patients affected by acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 2013; 8: e76989.

Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia : results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010; 115:3206-3214.

Cooper SL, M.D., Brown PA, M.D. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62:61-73.

Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96:2691-2696.

Daly C, Wong V, et al. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev* 2004; 18:1060-1071.

Dang J, Wei L, De Ridder J, et al. Pax5 is a tumor suppressor in mouse mutagenesis models of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 125:3609-3617.

Davidsson J, Paulsson K, Lindgren D, et al. Relapsed childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia : presence of preleukemic ancestral clones and the secondary nature of microdeletions and RTK-RAS mutations. *Leukemia* 2010; 24:924-931.

Davis S, Aldrich TH, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87:1161-1169.

De Becker A, Van Riet I. Homing and migration of mesenchymal stromal cells : How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells* 2016; 8:73-87.

De Becker A, Van Riet I. Mesenchymal stromal cell therapy in hematology : From laboratory to clinic and back again. *Stem Cells Dev* 2015; 24:1713-1729.

De La Luz Sierra, et al. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood* 2004; 103:2452-2459.

De Palma M, Venneri MA, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005; 8:211-226.

Dimitriou H, Linardakis E, Martimianaki G, Stiakaki E, Perdikogianni CH, Charbord P, Kalmanti M. Properties and potential of bone marrow mesenchymal stromal cells from children with hematologic diseases. *Cytotherapy* 2008; 10:125-133.

Dimitriou H, Perdikogianni Ch, Martimianaki G, Choumerianou DM, Pelagiadis J, Kalmanti M. Are mesenchymal stromal cells from children resistant to apoptosis? *Cell Prolif* 2009; 42:276–283.

Ding L, and Morrison SJ. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 2013; 495:231–235.

Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, and Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 2012; 481:457–462.

Doan PL, Russell JL, Himburg HA, et al. Tie2(+) bone marrow endothelial cells regulate hematopoietic stem cell regeneration following radiation injury. *Stem Cells* 2013; 31:327–337.

Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-317.

EL Marsafy S, Larghero J, Bennaceur-Griscelli A, Turhan A. Mesenchymal Stem Cells: Pivotal players in hematopoietic stem cell microenvironment. *J Stem Cell Res Ther* 2014; 4:225. doi:10.4172/2157-7633.1000225.

Ellis SL, Grassinger J, Jones A, Borg J, Camenisch T, Haylock D, Bertocello I, and Nilsson SK. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. *Blood* 2011; 118: 1516–1524.

Faham M, Zheng J, Moorhead M, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012; 120:5173-5180.

Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins : a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 2006; 27:552-558.

Findley HW, et al. Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997; 89:2986-2993.

Fouillard L, Francois S, Bouchet S, Bensidhoum M, Elm’selmi A, Chapel A. Innovative cell therapy in the treatment of serious adverse events related to both Chemo-Radiotherapy protocol and Acute Myeloid Leukemia syndrome : The infusion of Mesenchymal Stem Cells post-treatment reduces hematopoietic toxicity and promotes hematopoietic reconstitution. *Curr Pharm Biotechnol* 2013; 14:842-848.

Friedenstein AJ, et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; 17:331-340.

Fuchs E, Tumber T, Guasch G, et al. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004; 116:769–778.

Fukuhara S, Sako K, Noda K, Nagao K, Miura K, Mochizuki N. Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by Angiopoietin-1. *Exp Mol Med* 2009; 41:133-139.

Fulda S. Cell death in hematological tumors. *Apoptosis* 2009; 14(4):409-423.

Fulda S. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia* 2009; 23:467-476.

Galderisi U, Giordano A, Paggi Marco G. The bad and the good of mesenchymal stem cells in cancer : Boosters of tumor growth and vehicles for targeted delivery of anticancer agents. *World J Stem Cells* 2010; 2:1-12.



Gattazo F, Urciuolo A, and Bonaldo P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1840:2506-2519.

Gaynon PS, Angiolillo AL, Carroll WL, et al. Long-term results of the children's cancer group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1983-2002: a Children's Oncology Group Report. *Leukemia* 2010; 24:285-297.

Ge J, Hou R, Liu Q, Zhu R, Liu K. Stromal-derived factor-1 deficiency in the bone marrow of acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2011; 93:750-759.

Ge J, Hu Y, Gui Y, Hou R, Yang M, Zeng Q, Xia R. Chemotherapy-induced alteration of SDF-1/CXCR4 expression in bone marrow-derived Mesenchymal Stem Cells from adolescents and young adults with Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014; 36:617-623

Geddis AE, Linden HM, Kaushansky K. Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Blood* 1996 15; 87(12):4998-5005.

Ghazavi F, Lammens T, Van Roy N, Poppe B, Speleman F, Benoit Y, Van Vlierberghe P, De Moerloose B. Molecular basis and clinical significance of genetic aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* 2015; 43:640-653.

Giorgi C, Wieckowski MR, Pandolfi PP, et al. Mitochondria associated membranes (MAMs) as critical hubs for apoptosis. *Commun Integr Biol* 2011; 4(3):334-335.

Glodek AM, et al. Sustained activation of cell adhesion is a differentially regulated process in B lymphopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 2003; 197:461-473.

Gomes AC and Gomes MS. Hematopoietic niches, erythropoiesis and anemia of chronic infection. *Exp Hematol* 2016; 44:85-91.

Greco V, Guo S, et al. Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches? *Development* 2010; 137:1586-1594.

Greenbaum A, Hsu Y, Day RB, Schuettpelez LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T, Link DC. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 2013; 495:227-230.

Gruber G, Carlet M, Turtcher E, et al. Levels of glucocorticoid receptor and its ligand determine sensitivity and kinetics of glucocorticoid-induced leukemia apoptosis. *Leukemia* 2009; 23:820-823.

Grupps SA, Barrett DM, Teachey DT. Toxicity management for patients receiving novel T-cell engaging therapies. *Curr Opin Pediatr* 2014; 26:43-49.

Guezguez B, Campbell CJ, Boyd AL, Karanu F, Casado FL, Di Cresce C, Collins TJ, Shapovalova Z, Xenocostas A, and Bhatia M. Regional localization within the bone marrow influences the functional capacity of human HSCs. *Cell Stem Cell* 2013; 13:175-189.

Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research* 2000; 301:5-17.

Harrison CJ, Foroni L. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 2002; 6:91-113.

Harrison CJ, Moorman AV, Schwab C, et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia* 2014; 28:1015-1021.

Harrison CJ. Cytogenetics of pediatric and adolescent acute lymphoblastic leukemia. *Br J Hematol* 2009; 144:147-156.

Hartwell KA, Miller PG, Mukherje, S, Kahn AR, Stewart AL, Logan DJ, Negri JM, Duvet M, Järås M, Puram R, et al. Niche-based screening identifies small-molecule inhibitors of leukemia stem cells. *Nat Chem Biol* 2013; 9:840–848.

Hartwell ML, et al. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994; 266:1821-1828.

Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling : correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics and outcome. *Blood* 2010; 116:4874-4884.

Heazlewood SY, Neaves RJ, Williams B, Haylock DN, Adams TE, Nilsson SK. Megakaryocytes co-localise with hemopoietic stem cells and release cytokines that up-regulate stem cell proliferation. *Stem Cell Res* 2013; 11:782–792.

Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M, et al. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children’s oncology group studies: a report from the Children’s Oncology Group. *J Clin Oncol* 2013; 31:3397-3402.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805):77-776.

Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Critical reviews in oncology/hematology* 2006; 59:15-26.

Hochberg J, Khaled S, Forman SJ, et al. Criteria for and outcomes of allogeneic haematopoietic stem cell transplant in children, adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia in first complete remission. *Br J Hematol* 2013; 161:27-42.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7:393–395.

Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, Iwasaki H, Nakamura Y, Gomei Y, Suda T. Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood* 2010; 116:554–563.

Hunger SP, M.D., Mullighan CG, M.D. Acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med* 2015; 373:1541-1552.

Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood* 2015 May 21.

Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2013; 381:1943-1955.

Irving J. Towards an understanding of the biology and targeted treatment of pediatric relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Br J Hematol* 2015; 172:655-666.

Jeffrey P, Russo A, and Polyak K. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin-A-CDK2 complex. *Nature* 1995; 376:313-320.

Johnstone RW, Ruefli AA, and Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 2002; 108(2):153-164.

Jones DL, Wagers AJ, et al. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:11–21.

Karakurt N, Aksu T, Koksai Y, Yarali N, Tunc B, Uckan-Cetinkaya D, Ozguner M. Angiopoietins in the bone marrow microenvironment of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2016; 21:325-331.

Karaöz E, Çetinalp Demircan P, Erman G, Güngörürler E, Eker Sarıboyacı A. Comparative analyses of immune-suppressive characteristics of bone-marrow, Wharton's jelly, and adipose tissue-derived human MSCs. *Turk J Hematol* 2017; 34:213-225.

Kato J, Matsuoka M, and Polyak K. Cyclin AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 1994; 79:487-496.

Kaushansky K. Thrombopoietin: in vitro predictions, in vivo realities. *Am J Hematol.* 1996; 53(3):188-91.

Kerr JF, Winterford CM, and Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8):2013-2026.

Khandany BK, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, Balali Z, Shamsizadeh A, Arababadi MK, Ostadebrahimi H, Fatehi A, Rezazadeh M, Ahmadi Z, Karimabad MN. Evaluation of circulating concentrations of CXCL1 (Gro-alpha), CXCL10 (IP-10) and CXCL12 (SDF-1) in ALL patients prior and post bone marrow transplantation. *Pathol Res Pract* 2012; 208:615–619.

Klein G, Beck S, Müller CA. Tenascin is a cytoadhesive extracellular matrix component of the human hematopoietic microenvironment. *J Cell Biol* 1993; 123:1027–1035.

Klein G, Muller CA, Tillet E. Collagen type VI in the human bone marrow microenvironment: a strong cytoadhesive component. *Blood* 1995; 86:1740–1748.

Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N, Khiabani H, Lee A, Murty VV, Friedman R, et al. Leukemogenesis induced by an activating b-catenin mutation in osteoblasts. *Nature* 2014; 506:240–244.

Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 2009; 11:377-391.

Kopp H, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20:349–356.

Kourosch CE, Gerd K, Meltem AA, et al. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells International* 2016.

Krause DS, Fulzele K, Catic A, Sun CC, Dombkowski D, Hurley MP, Lezeau S, Attar E, Wu JY, Lin HY, et al. Differential regulation of myeloid leukemias by the bone marrow microenvironment. *Nat Med* 2013; 19:1513–1517.

Krentz S, Hof J, Mendioroz A, et al. Prognostic value of genetic alterations in children with first bone marrow relapse of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2013; 27:295-304.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3:614-620.

Krug U, Ganser A, Koefler HP. Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* 2002; 21:3457-3495.

Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 2013; 502:637–643.

Kunisaki Y, Frenette PS. The secrets of the bone marrow niche: enigmatic niche brings challenge for HSC expansion *Nat Med* 2012; 18:864–865.

Kurtz A, Oh S. Age related changes of the extracellular matrix and stem cell maintenance. *Prev Med (Baltim)* 2012; 54:S50–S56 (Suppl.).

Lander AD, Kimble J, Clevers H, Fuchs E, Montarras D, Buckingham M, Calof AL, Trumpp A, Oskarsson T. What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biol* 2012; 10:19.

Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells) : implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplantation* 1995; 16:557-564.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363:1439-1441.

Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11:321-334.

Lecoeur H, Ledru E, Prevost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol* 1997; 209:111-123.

Levesque JP, Winkler IG, and Rasko JE. Nichotherapy for stem cells: there goes the neighborhood. *Bioessays* 2013; 35: 183–190.

Levine JM, and Hille Ris Lambers J. The importance of niches for the maintenance of species diversity. *Nature* 2009; 461:254–257.

Lincz LF. Deciphering the apoptotic pathway: All roads lead to death. *Immunology and cell biology* 1998; 76:1-19.

Linnekin D, Mou S, Deberry CS, Weiler SR, Keller JR, Ruscetti FW, Longo DL. Stem cell factor, the JAK-STAT pathway and signal transduction. *Leuk Lymphoma* 1997; 27(5-6):439-44.

Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, Côté D, Rowe DW, Lin CP, Scadden DT. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 2009; 457:92–96.

Lodish H, Baltimore D, et al. *Molecular Cell Biology* 2000. Chapters 23 and 27.

Lowe SW, and Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):485-495.

Lundberg R, and Weinberg A. Control of the cell-cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999; 35:1886-1894.

Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise Review: The surface markers and identity of human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2014; 32:1408–1419.

Malumbres M, and Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1:222-231.

Melet A, Song K, et al. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Adv Exp Med Biol* 2008; 615:47-79.

Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, and Frenette, PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010; 466:829–834.

Mendez-Ferrer S, Scadden DT, et al. Bone marrow stem cells: current and emerging concepts. *Ann NY Acad Sci* 2015; 1335:32-44.

Menendez P, Catalina P, Rodriguez R, Melen GJ, Bueno C, Arriero M, García-Sánchez F, Lassaletta A, García-Sanz R, García-Castro J. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med* 2009; 206:3131–3141.

Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 2013; 27:2165-2176.

Mondal BC, Mukherjee T, Mandal L, Evans CJ, Sinenko SA, MartinezAgosto JA, and Banerjee U. Interaction between differentiating cell and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* 2011; 147:1589–1600.

Mooman AV, Richards SM, Robinson HM, Strefford JC, et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood* 2007; 109:2327-2330.

Moore KA, Lemischka IR. Stem Cells and Their Niches. *Science* 2006; 311:1880-1885.

Moorman A. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2016; 101:407-416.

Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev* 2012; 26:123-135.

Moriyama T, Relling M, Yang J. Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2015; 125:3988-3995.

Morrison SJ, Spradling AC, et al. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008:598–611.

Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 2007; 446:758-764.

Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2009; 360:470-480.

Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012; 122:3407-3415.

Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:107–116.

Nakamura-Ishizu A, Okuno Y, Omatsu Y, Okabe K, Morimoto J, Uede T, Nagasawa T, Suda T, Kubota Y. Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood* 2012; 119:5429–5437.

Nakamura-Ishizu A, Suda T. Hematopoietic stem cell niche: an interplay among a repertoire of multiple functional niches. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830:2404–2409.

Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, Konig M, et al. Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009; 23:134-143.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139:271–279.

Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med* 2008; 205:777–783.

Nilsson SK, Debatis ME, Dooner MS, Madri J, Quesenberry PJ, Becker PS. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46:371–377.

Noh YH, Yim YS, Kim DH, Lee MW, Kim DS, Kim HR, Lee SH, Chueh HW, Choi SJ, Oh WI, Yang YS, Jung HL, Yoo KH, Sung KW, Koo HH. Correlation between chemokines released from umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and engraftment of hematopoietic stem cells in non obese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice. *Pediatr Hematol Oncol* 2011; 28:682-690.

Olson TS, Caselli A, Otsuru S, Hofmann TJ, Williams R, Paolucci P, Dominici M, Horwitz EM. Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. *Blood* 2013; 121:5238–5249.

Orford KW, Scadden DT, et al. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet* 2008; 9:115–128.

Park DA, Park SG, Kim SW. Solitary lymphoblastic lymphoma of the thoracic spine. *J Korean Neurosurg Soc* 2012; 52(6):564-6.

Partanen J, Armstrong E, et al. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol* 1992; 12:1698-1707.

Pelagiadis I, Stiakaki E, Choulaki C, Kalmanti M, Dimitriou H. The role of children's bone marrow mesenchymal stromal cells in the ex vivo expansion of autologous and allogeneic hematopoietic stem cells. *Cell Biol Int* 2015; 39:1099-1110.

Peters R, Leyraz S, and Perey L. Apoptotic regulation in primitive hematopoietic precursors. *Blood* 1998; 92:2041-2052.

Philpot NJ, Turner AJ, Scopes J, et al. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* 1996; 87(6):2244-2251.

Prives P, and Hall C. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; 187:112-126.

Pui CH, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009; 360:2730-2741.

Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: progress through collaboration. *J Clin Oncol* 2015; 33:2938-2948.

Puré E, Lo A. Can targeting stroma pave the way to enhanced antitumor immunity and immunotherapy of solid tumors? *Cancer Immunol Res* 2016; 4:269-278.

Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, et al. *Nature* 2010; 464:852–857.

Ramdasi S, Sarang S, Viswanathan C. Potential of mesenchymal stem cell based application in cancer. *IJHOSCR* 2015.

Rand V, Parker H, Russel LJ, Schwab C, et al. Genomic characterization implicates *iAMP21* as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011; 117:68-48-6855.

Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157(5):1415-1430.

Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukemia: Insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12:344-357.

Rocheffort GY, Delorme B, Lopez A, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 2006; 24:2202-2208.

Roorda BD, Elst A, Kamps WA, et al. Bone marrow-derived cells and tumor growth : Contribution of bone marrow-derived cells to tumor microenvironments with special focus on mesenchymal stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 69:187-198.

Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007; 131:324–336.

Salter AB, Meadows SK, Muramoto GG, Himburg H, Doan P, Daher P, Russell L, Chen B, Chao NJ, and Chute JP. (2009). Endothelial progenitor cell infusion induces hematopoietic stem cell reconstitution in vivo. *Blood* 2009; 113:2104–2107.

Sanchez-Aguilera A, Mendez-Ferrer S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cell Mol Life Sci* 2016; doi: 10.1007/s00018-016-2306-y.

Santorius U, Schmitz I, and Kramer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* 2001; 2(1):20-29.

Scadden DT. Niche neighborhood: emerging concepts of the stem cell niche. *Cell* 2014; 157:41-50.

Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006; 441:1075–1079.

Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, Flach J, Binnewies M, Garg T, Wagers AJ, Hsiao EC, and Passegue E. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell* 2013; 13:285–299.



Schmiegelow K, Heyman M, Gustafsson G, et al. The degree of myelosuppression during maintenance therapy of adolescents with B-lineage intermediate risk acute lymphoblastic leukemia predicts risk of relapse. *Leukemia* 2010; 24:715-720.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4:7–25.

Schrappé M, Hunger SP, Pui CH, et al. Outcomes after induction failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2012; 366:1371-1381.

Schultz KR, Carroll A, et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children Oncology Group study AALL0031. *Leukemia* 2014; 28:1467-1471.

Shalapour S, Eckert C, Seeger K, Pfau M, Prada J, Henze G, Blankenstein T, Kammertoens T. Leukemia associated genetic aberration in mesenchymal stem cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Med* 2010; 88:249–265.

Sharma MB, Limaye LS, Kale VP. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro : recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. *Haematologica* 2012; 97:651-660.

Shen Y, Nilsson SK. Bone, microenvironment and hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 2012; 19:250–255.

Sherr C. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60:3689-3695.

Shirozu M, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 1995; 28:495-500.

Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, Kaushansky K. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13(1):61-73.

Smith JNP, Calvi LM. Concise review: current concepts in bone marrow microenvironmental regulation of hematopoietic stem and progenitor cells *Stem Cells* 2013; 31:1044–1050.

Smith MA, Seibel NL, Altekruze SF, et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol* 2010; 28:2625-2634.

Smith-Berdan S, Nguyen A, Hassanein D, Zimmer M, Ugarte F, Ciriza J, Li D, García-Ojeda ME, Hinck L, Forsberg EC. Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell Stem Cell* 2011; 8:72–83.

Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005; 203(2):398-409.

Sorokina T, Shipounova I, Bigildeev A, Petinati N, Drize N, Turkina A, Chelysheva E, Shukhov O, Kuzmina L, Parovichnikova E, Savchenko V. The ability of multipotent mesenchymal

stromal cells from the bone marrow of patients with leukemia to maintain normal hematopoietic progenitor cells. *Eur J Hematol* 2016; 97:245-252.

Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev.* 2008; 129:163–173.

Sun X, et al. CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer metastasis reviews* 2010; 29:709-722.

Topp MS, Gokbuget N, Stein AS, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015; 16:57-66.

Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:201–209.

Tsai JJ, Dudakov JA, Takahashi K, Shieh JH, et al. Nrf2 regulates haematopoietic stem cell function. *Nat. Cell Biol* 2013; 15:309–316.

Van den Berk LC, van der Veer A, Willems ME, Theeuwes MJ, Lujendijk MW, Tong WH, van der Sluis IM, Pieters R, den Boer ML. Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2014; 166:240-249

Van Overstraeten-Schlogel N, Beguin Y, Gothot A. Role of stromal derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur J Hematol* 2006; 76:488–493

Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 2004; 103(9):3258-64.

Wagers AJ. The stem cell niche in regenerative medicine, *Cell Stem Cell* 2012; 10:362–369.

Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative senescence of Mesenchymal Stem Cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE* 2008; 3:e2213.

Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, Fabb SA, Swann J, McArthur GA, Westmoreland SV, Chambon P, Scadden DT, and Purton LE. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell* 2007; 129:1097–1110.

Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, and Orkin SH. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell* 2007; 129:1081–1095.

Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12:643–655.

Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells, *Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010; 365:155–163.

Weber JM, Calvi LM. Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Bone* 2010; 46:281–285.

Wei J, Wunderlich M, Fox C, Alvarez S, Cigudosa JC, Wilhelm JS, Zheng Y, Cancelas JA, Gu Y, Jansen M, et al. Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell* 2008; 13:483–495.

Wilson A, Oser GM, Jaworski M, Blanco-Bose WE, Laurenti E, Adolphe C, Essers MA, Macdonald HR, Trumpp A. Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1106:64–75.

Wilson A, Trumpp A. Bone marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6:93-106.

Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, Poulton IJ, van Rooijen N, Alexander KA, Raggatt LJ, and Levesque JP. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* 2010; 116:4815–4828.

Wiseman DH. Donor cell leukemia: a review. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2011; 17:771–789.

Woo JS, et al. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia : a genetic update. *Exp Hematol and Oncol* 2014; 3:16.

Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 2001; 294(5548):1933-6.

Xie Y, Yin T, Wiegnaebe W, He XC, et al. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging, *Nature* 2009; 457:97–101.

Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, and Nakauchi H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* 2011; 147:1146–1158.

Yu L, et al. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene* 2006; 374:174-179.

Yuan HT, Khankin EV, et al. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 2009; 29:2011-2022.

Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia : a report from the Children’s Oncology Group. *Blood* 2011; 118:3080-3087.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425:836–841.

Zhao Z, Tang X, You Y, Li W, Liu F, Zou P. Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hematopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2006; 30:993–1003.

Zlotnik A. Chemokines and cancer. *International Journal of cancer* 2006; 119:2026-2029.

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **Προσωπικά στοιχεία**

**Όνομα:** Στέλλα

**Επώνυμο:** Γενίτσαρη

**Ημερομηνία γέννησης:** 07/03/1977

**Οικογενειακή κατάσταση:** Παντρεμένη, μητέρα μιας κόρης 5,5 ετών

### **Σπουδές**

**17 Ιουλίου 2000:**

Πτυχίο Ιατρικής Σχολής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**26 Ιουλίου 2000:**

Άδεια ασκήσεως Ιατρικού επαγγέλματος,

Ελληνική Δημοκρατία, Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Φθιώτιδας, Αρ.απόφασης 7978

**26 Ιουλίου 2007:**

Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με θέμα "Απομόνωση και χαρακτηρισμός μεσεγχυματικών κυττάρων από μυελό των οστών παιδιών με οξεία λευχαιμία"

**16 Νοεμβρίου 2009:**

Τίτλος ειδικότητας Παιδιατρικής,

Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης,

Ελληνική Δημοκρατία, Νομαρχιακή Αυτοδιοίκηση Ηρακλείου, Αρ.απόφασης 9616

### **Επαγγελματική εμπειρία**

**08/09/2000-07/12/2000:** 3μηνη υποχρεωτική εκπαίδευση στο ΓΝ Λαμίας

**27/12/2000-31/12/2001:** Υποχρεωτική Υπηρεσία Υπαίθρου στο ΚΥ Μακρακώμης

**10/03/2002-29/11/2002:** Εφημερεύουσα Ιατρός στη Γενική Κλινική "Ταξιάρχαι", Αθήνα

**10/03/2002-31/01/2003:** Επιστημονική συνεργάτης Παιδοενδοκρινολογικού Τμήματος, Νοσοκομείο Παίδων "Π. και Α. Κυριακού"

**21/02/2003-25/11/2003:** Ειδικότητα Παιδιατρικής στο ΓΝ Αγίου Νικολάου Κρήτης

**18/08/2006-23/08/2009:** Ειδικότητα Παιδιατρικής στο Πανεπιστημιακό ΓΝ Ηρακλείου Κρήτης

**25/02/2010-31/05/2010:** Καθηγήτρια στο ΙΕΚ "Μαρία Μανούσου-Ανδρεαδάκη", Ηράκλειο

**01/09/2010-10/01/2011:** Καθηγήτρια στο ΤΕΙ Λαμίας, Τμήμα Φυσικοθεραπείας

**14/01/2011-04/04/2011:** Επικουρική Παιδιάτρος στο ΓΝ Λαμίας

**27/04/2011 έως σήμερα:**

Ιδιώτης Παιδιάτρος

Επιστημονική συνεργάτης των Ιδιωτικών Σχολείων "Η Γελαστή Φράουλα" και "Η Ζωγραφιά" (περιοδικός έλεγχος βρεφών και νηπίων, αντιμετώπιση επειγόντων περιστατικών, κατάρτιση μηνιαίου διατροφολογίου, διαδραστικά μαθήματα σωματικής υγιεινής, ομιλίες στους συλλόγους γονέων και κηδεμόνων)

### **Ειδικές γνώσεις**

Παρακολούθηση σωματικής και ψυχοκινητικής ανάπτυξης νεογνών και βρεφών

Διάγνωση και αντιμετώπιση νεογνικών και παιδιατρικών νοσημάτων

Ανοσοποίηση

Παρεμβατικές διαγνωστικές εξετάσεις (αιμοληψία, ΟΝΠ, λήψη μυελού των οστών, οστεομυελική βιοψία, υπερηβική παρακέντηση, καθετηριασμός ουροδόχου κύστεως)

Πρωτόκολλα Καρδιοπνευμονικής Αναζωογόνησης

Τεχνικές εργαστηρίου (μικροσκοπική μελέτη περιφερικού αίματος, απομόνωση και έκπτυξη μεσεγχυματικών κυττάρων μυελού των οστών, υγρές καλλιέργειες, ανοσοφαινότυπος, ανάλυση κυτταρικού κύκλου και απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής)

Ηλεκτρονικοί Υπολογιστές

### Ξένες γλώσσες

**Αγγλικά:** Cambridge University Proficiency Certificate in English

**Γαλλικά:** Certificat de langue Francais

### Δημοσιεύσεις

#### **1. Πλήρεις δημοσιεύσεις στη διεθνή βιβλιογραφία**

##### **Biological Features of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia**

Stella Genitsari, Eftichia Stiakaki, Chryssoula Perdikogianni, Georgia Martimianaki, Iordanis Pelagiadis, Margarita Pesmatzoglou, Maria Kalmanti, and Helen Dimitriou

Turk J Haematol. 2018 Mar 1; 35(1): 19-26. doi: 10.4274/tjh.2017.0209. Epub 2017 Sep 8.

#### **2. Ξενόγλωσσες δημοσιευμένες περιλήψεις**

##### **Characteristics of mesenchymal stromal cells from bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia.**

Helen Dimitriou, Chryssoula Perdikogianni, Despoina Choumerianou, Eftichia Stiakaki, Stella Genitsari, Maria Kalmanti

12<sup>th</sup> Congress of the European Hematology Association, Haematologica 92(S1) p.4, 0012, 2007.

##### **Mesenchymal stromal cells from bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia at different treatment phases.**

Helen Dimitriou, Chryssoula Perdikogianni, Georgia Martimianaki, Despoina Choumerianou, Eftichia Stiakaki, Stella Genitsari, Maria Kalmanti

European Society of Pediatric Hematology and Immunology -ESPHI Athens 2007.

##### **Effect of therapy on the characteristics of mesenchymal stromal cells from bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia.**

Helen Dimitriou, Chryssoula Perdikogianni, Georgia Martimianaki, Despoina Choumerianou, Eftichia Stiakaki, Stella Genitsari, Maria Kalmanti

39<sup>th</sup> Annual of the International Society of Pediatric Oncology, Mumbai, India , Ped Blood & Cancer, p 499, PF 002, 2007.

### **Study of Mesenchymal Stromal Cells (MSC) in Acute Lymphoblastic Leukemia of childhood.**

Helen Dimitriou, Chryssoula Perdikogianni, Georgia Martimianaki, Stella Genitsari, Eftichia Stiakaki, Maria Kalmanti

38<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the International Society of Experimental Hematology, Athens, Greece, ExpHematol S55, P072 2009.

### **3. Ελληνικές δημοσιευμένες περιλήψεις**

#### **Μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά μεσεγχυματικών κυττάρων μυελού των οστών παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.**

Ελένη Δημητρίου, Στέλλα Γενίτσαρη, Χρυσούλα Περδικογιάννη, Ευτυχία Στειακάκη, Γεωργία Μαρτιμιανάκη, Ελένη Κουταλά, Μαρία Καλμαντή

α) 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Αθήνα, σ. 175, 204, 2006.

β) 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Διαιτητικό Αντικαρκινικό Συνέδριο, Αθήνα, σ. 215, 2007.

#### **Μελέτη των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία των παιδιών.**

Ελένη Δημητρίου, Ευτυχία Στειακάκη, Χρυσούλα Περδικογιάννη, Γεωργία Μαρτιμιανάκη, Στέλλα Γενίτσαρη, Μαρία Καλμαντή

20<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Χερσόνησος Ηρακλείου Κρήτης,, Haema 12 (Supl 1) σ. 41, 3, 2009.

### **Βραβεία**

#### **Χωρέμιο έπαθλο (Β' Βραβείο) 2007**

45ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, Χαλκιδική.

Θέμα: Επίδραση χημειοθεραπείας στα κύτταρα στρώματος μυελού των οστών παιδιών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία

Ελένη Δημητρίου, Χρυσούλα Περδικογιάννη, Γεωργία Μαρτιμιανάκη, Ευτυχία Στειακάκη, Στέλλα Γενίτσαρη, Μαρία Καλμαντή

## **ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ**

Επισυνάπτεται.



# Biological Features of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia

## Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisinde Kemik İliği Mezenkimal Stroma Hücrelerinin Biyolojik Özellikleri

Stella Genitsari<sup>1</sup>, Eftichia Stiakaki<sup>1</sup>, Chryssoula Perdikiogianni<sup>2</sup>, Georgia Martimianaki<sup>3</sup>, Iordanis Pelagiadis<sup>4</sup>, Margarita Pesmatzoglou<sup>1</sup>, Maria Kalmanti<sup>5</sup>, Helen Dimitriou<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Crete University Faculty of Medicine, University Hospital of Heraklion, Department of Pediatric Hematology and Oncology, Crete, Greece

<sup>2</sup>Crete University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Crete, Greece

<sup>3</sup>Crete University Faculty of Medicine, Division of Mother and Child Health, Crete, Greece

<sup>4</sup>Metropolitan Hospital, N. Faliro, Athens, Greece

<sup>5</sup>Private Sector

### Abstract

**Objective:** Mesenchymal stromal cells (MSCs) have a supportive role in hematopoiesis and as components of the bone marrow (BM) microenvironment may present alterations during acute lymphoblastic leukemia (ALL) and be affected by chemotherapeutic agents. We examined the biological and functional characteristics of MSCs in ALL diagnosis and treatment and their effect on MSC qualitative properties.

**Materials and Methods:** Immunophenotypic characterization, evaluation of clonogenicity, and proliferative capacity were measured. Apoptotic features, cell-cycle analysis, and stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  and angiopoietin-1 levels in MSC supernatant at diagnosis and in different phases of treatment were assessed. Chemotherapy was administered according to the Berlin-Frankfurt-Munster-2000 protocol. BM samples from children with solid tumors without BM involvement were used as the control group.

**Results:** The morphology, the immunophenotypic profile, and the apoptotic characteristics of the MSCs were not affected by leukemia. The secretion of factors involved in the trafficking of hematopoietic cells in the BM seems to be upregulated at diagnosis in comparison to the treatment phases. MSCs are influenced by the disease in terms of their functional characteristics such as clonogenicity and proliferation rate. These effects cease as soon as treatment is initiated. Chemotherapy does not seem to exert any effect on any of the MSC features examined.

**Conclusion:** MSCs from children with ALL are affected by their interaction with the leukemic environment, but this phenomenon ceases upon treatment initiation, while no effect is observed by chemotherapy itself.

**Keywords:** Bone marrow microenvironment, Childhood leukemia, Mesenchymal stromal cells, Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$

### Öz

**Amaç:** Mezenkimal stroma hücreleri (MSH) hematopoezde destek rolü oynar, kemik iliği (Kİ) mikroçevresinin parçası olduklarından akut lenfoblastik lösemide (ALL) değişikliğe uğrayabilir ve kemoterapötik ajanlardan etkilenebilirler. Bu çalışmada, ALL'de tanı anında ve tedavide MSH'lerin biyolojik ve fonksiyonel özellikleri ile bunların MSH'lerin niteliksel özellikleri üzerine olan etkilerini araştırdık.

**Gereç ve Yöntemler:** İmmünofenotipik özellikler, klonalite değerlendirilmesi ve çoğalma kapasitesi ölçümleri yapıldı. Tanıda ve tedavinin değişik evrelerinde MSH süpernatantında apoptotik özellikler, hücre döngüsü analizi ve stromal hücre türevi factor-1 $\alpha$  ile anjiyopoietin-1 düzeyleri değerlendirildi. Kemoterapi olarak Berlin-Frankfurt-Munster-2000 protokolü uygulandı. Solid tümörü olan ve Kİ tutulumu bulunmayan hastaların Kİ örnekleri kontrol grubu olarak kullanıldı.

**Bulgular:** MSH'lerin morfoloji, immünofenotipik profil ve apoptotik özellikleri açısından lösemiden etkilenmediği görüldü. Hematopoetik hücrelerinin Kİ'de yer değiştirmesi üzerine etkisi olabilen faktörlerinin salınımının tanıda, tedavi evrelerine göre upregüle olduğu tespit edildi. MSH'ler hastalıktan klonalite ve çoğalma hızı gibi fonksiyonel özellikler kapsamında etkilenmekteydi. Bu etkiler tedavi başlanması ile duraklamaktaydı. Kemoterapinin incelenen MSH özelliklerinden hiçbirisi üzerine bir etkisi olmadığı görüldü.

**Sonuç:** ALL'si olan çocuklardaki MSH'ler lösemik çevre ile ilişkilerden etkilenir, ancak bu fenomen tedavi başlanması ile duraklar ve bu çalışmada kemoterapinin bunun üzerine bir etkisi gözlenmemiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Kemik iliği mikroçevresi, Çocukluk çağı lösemisi, Mezenkimal stroma hücreleri, Stromal hücre türevi factor-1 $\alpha$



## Introduction

Mesenchymal stromal cells (MSCs) constitute part of the bone marrow (BM) microenvironment where the survival, proliferation, and differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs) take place [1]. Despite the large amount of information on the nature of MSCs, they have not been fully characterized so far. The *in vivo* counterparts or possibly precursors of culture-developed MSCs are currently considered to be perivascular cells, namely pericytes. These two-cell populations share similar properties in terms of marker expression, ability to self-renew, and potential to differentiate into multiple cell types such as adipocytes, chondrocytes, osteocytes, and myocytes under specified culture conditions [2,3]. The BM microenvironment is believed to play a pivotal role in the development and progression of leukemia [4]; thus, it is reasonable to speculate that MSCs may also be involved in the perturbation of normal hematopoiesis. Their putative role in oncogenesis and leukemogenesis has not been fully clarified and the results from the studies already published are contradictory. *In vitro* studies have shown that MSCs from newly diagnosed adult patients with leukemia (acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia) are less efficient for supporting normal hematopoietic progenitor cell survival and this functional capacity is partially restored after chemotherapy [5]. Their implication in childhood ALL has only recently been addressed, revealing that ALL-MSCs display reduced proliferative capacity and ability to support long-term hematopoiesis *in vitro* while those isolated at diagnosis did not differ from those obtained during treatment [6]. The detection of leukemia-associated genetic aberrations in MSCs implied a clonal relationship between MSCs and leukemia cells in childhood ALL and suggested the involvement of MSCs in the pathogenesis of the disease [7]. Involvement of MSCs in various malignancies via deregulation of the secretion of chemokines [8,9,10] implies that they mediate cell migration and homing [11]. Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$  or CXCL12) was found to retain and support the HSCs in the BM via the SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 axis [12,13]. CXCL12 is constitutively secreted by marrow stromal cells, being the major source for CXCL12 in adults [14]. Less is known about its role in hematological malignancies and how it could be affected during chemotherapy. The existing studies have come to conflicting results [8,15]. Angiopoietin-1 (Ang-1), initially known for its role in both embryonic and postnatal angiogenesis, has recently been reported to interact with HSC-expressed Tie-2 [3,16], enhancing the maintenance of HSCs in a quiescent state within the BM, and Ang-1 is thereby part of the network regulating the "stemness" of HSCs [17].

MSCs have been considered promising candidates for cell therapies and, in view of their potential, there are many ongoing studies to understand their properties, mechanisms of action, and putative role in hematological malignancies [7,18,19,20]. So

far MSCs from different sources have been shown to exhibit different properties [21]. Moreover, BM MSCs from children seem to be different from their adult counterparts [22].

The aim of this study is to characterize MSCs derived from the BM of children with ALL at the onset of the disease in order to evaluate the leukemic effect, if any, on their biological/functional properties. In addition, an attempt was made to compare this population with the MSCs derived from the BM during different treatment phases for the assessment of the effect of chemotherapy on these features.

## Materials and Methods

### Patients

BM samples from children with B-lineage ALL and >90% BM infiltration at diagnosis, hospitalized from 2006 to 2010 at the Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital of Heraklion, were studied. They included samples at diagnosis (d, n=28), day 15 (d15, n=12), day 33 of induction therapy (d33, n=20) when remission was achieved, at intensification-consolidation (consol, n=33), during maintenance (maint, n=19) therapy, and at the end of treatment (end, n=20), all in remission. MSCs examined at different phases of ALL treatment are not necessarily in all cases from the same patients. Patients were treated according to the ALL Berlin-Frankfurt-Munster-2000 protocol and their risk stratification [medium risk (MR) and high risk (HR)] according to the same protocol was considered in some of the employed assays. The control group (n=15) consisted of BM samples from children with solid tumors without BM involvement. Patients' ages ranged from 1.2 to 18 years (median: 6 years). The study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Heraklion.

Methods are described in more detail in the Appendix (Supplementary Materials and Methods).

### BM Mononuclear Cells (MNCs) Isolation and MSC Culture and Expansion

BM MNCs, following Ficoll-Hypaque separation (1077 g/mL; Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway), were cultured in a-MEM as described previously for MSC development [22]. MSCs were maintained for up to five passages. Assays were performed at any of P1 to P4 depending on the cell availability.

### Immunophenotyping Evaluation

Phenotypic characterization of MSCs was performed by flow cytometry at various passages using hematopoietic cell and MSC-specific monoclonal antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). One hundred thousand cells were stained with the markers as described previously [23]. At least 10,000 events were acquired for each analysis.

**Cell Doubling Time (DT)**

DT was calculated according to the formula  $DT = t/n = t \times \log(2) / \log(\text{cells harvested} / \text{cells inoculated})$ , where *t* is the time between initial plating and harvest for the respective passage.

**Colony Forming Units-Fibroblast (CFU-F) Formation**

At day 0,  $1 \times 10^5$  MNCs were seeded in each well of a 24-well plate (in triplicate) in the absence of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). At subsequent passages, MSCs were plated in 20-cm<sup>2</sup> petri plates at a concentration of 10 cells/cm<sup>2</sup> (in duplicate). The colonies that developed were categorized according to their size as small (S), medium (M), and large (L, highly proliferating) CFU-F. The sum of all sizes is denoted as CFU-F.

**Cell-Cycle Analysis - Apoptosis**

MSCs at either P2 or P3 were stained with propidium iodide in order to estimate the percentage of cells in each phase of the cell cycle. Cell-cycle analysis was performed using WinMDI software version 2.8 [24].

Apoptotic MSCs at passages P2 and P4 were detected by flow cytometry and 7-amino-actinomycin D (7-AAD; Sigma, St. Louis, MO, USA) staining [25].

**Detection of SDF-1 $\alpha$  and Ang-1 (ELISA)**

A quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technique (ELISA) was employed for the determination of both SDF-1 $\alpha$  and Ang-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in the supernatant of MSCs at any of P1 to P3 cultures (and of MNCs at d0) within the leukemia group only, at diagnosis, and during treatment phases following the instructions of the manufacturer.

**Statistical Analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean mean (SEM). Differences between groups were assessed using the nonparametric Mann-Whitney U-test and p-values lower

than 0.05 were considered as statistically significant. Analysis was performed using SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

**Results**

**Morphology and Immunophenotypic Profile**

BM MSCs from all groups were expanded until the fifth passage and all displayed the characteristic spindle-shape morphology. Immunophenotypic assays at P2 and P4 did not identify any differences among groups. MSCs at diagnosis expressed CD90 (99.67 $\pm$ 0.09%), CD105 (97.39 $\pm$ 0.72%), CD146 (59.55 $\pm$ 2.84%), CD29 (99.1 $\pm$ 0.12%), CD44 (98.07 $\pm$ 1.39%), CD95 (90.25 $\pm$ 2.85%), and CD73 (99.4 $\pm$ 0.4%), while there was no expression of hematopoietic markers such as CD34, CD45, and CD14. The same immunophenotypic profile was also observed at all treatment phases and in the control group.

**Growth Rate of MSCs (DT)**

MSCs within the MNC fraction (d0) at diagnosis reached confluency in approximately 20.71 $\pm$ 1.24 days, whereas at the end of chemotherapy they required 15.10 $\pm$ 0.63 days. The DT at

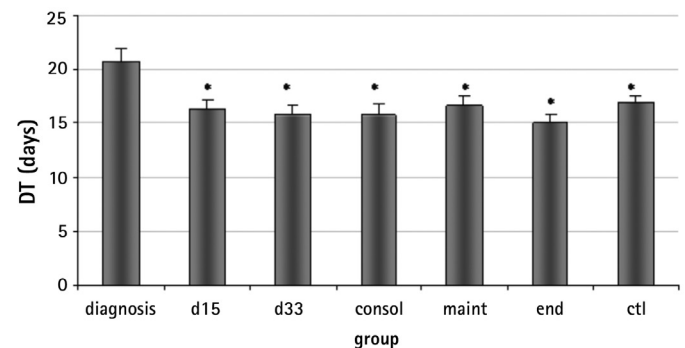


Figure 1. Days required for mesenchymal stromal cells in the mononuclear cells fraction (d0) to reach confluency. The doubling time at diagnosis differs from that of the phases of chemotherapy (p: d15=0.042, d33=0.007, consol=0.001, maint=0.022, end=0.002) and of the control (p=0.011). This defect subsides with the progression of culture (\*: ss in comparison to the d group).

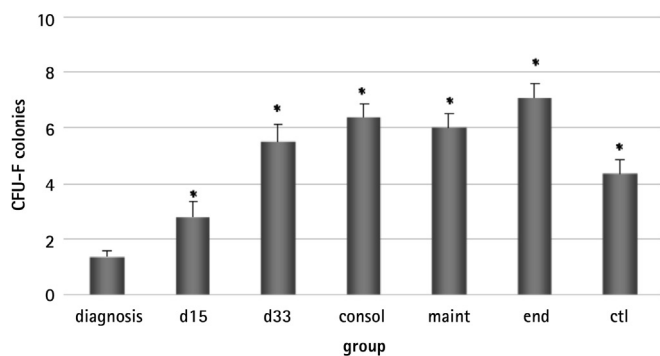
	P1	P2	P3	P4	P5
d	3.30 $\pm$ 0.41	3.07 $\pm$ 0.58	4.20 $\pm$ 0.80	5.37 $\pm$ 1.06	4.75 $\pm$ 0.95
d15	2.39 $\pm$ 0.31	5.49 $\pm$ 1.18	4.80 $\pm$ 1.22	3.83 $\pm$ 0.97	3.82 $\pm$ 0.69
d33	2.57 $\pm$ 0.24	2.86 $\pm$ 0.35	3.47 $\pm$ 0.42	3.85 $\pm$ 0.61	3.82 $\pm$ 0.41
Consol	2.59 $\pm$ 0.19	2.72 $\pm$ 0.23	3.24 $\pm$ 0.30	4.12 $\pm$ 0.61	4.50 $\pm$ 0.93
Maint	3.44 $\pm$ 0.53	5.98 $\pm$ 1.17	3.57 $\pm$ 0.49	3.18 $\pm$ 0.52	4.21 $\pm$ 0.50
End	2.49 $\pm$ 0.20	2.59 $\pm$ 0.25	2.57 $\pm$ 0.32	3.41 $\pm$ 0.38	3.73 $\pm$ 0.40
CTL	2.34 $\pm$ 0.11	3.03 $\pm$ 0.31	2.42 $\pm$ 0.25	4.41 $\pm$ 1.07	4.47 $\pm$ 2.13

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean. CTL: Cytotoxic lymphocyte

diagnosis was statistically different compared to all the phases of treatment (Figure 1). At subsequent passages, DT was similar among all groups (Table 1). This finding indicates that MSCs present in the MNC fraction at diagnosis, which was mainly constituted of lymphoblasts, expanded more slowly compared to treatment phases and the control group, but this defect subsided with the progression of culture (more advanced P). No difference was observed among all passages in all other studied groups. As the culture progressed, DT increased in all groups and the control.

**CFU-F Development**

At day 0, the CFU-F formation at diagnosis appeared to be impaired compared to the other groups (Figure 2), a result attributed to the lower number of the medium and the large-sized colonies. The impaired clonogenicity of MSCs at the time of diagnosis was a



**Figure 2.** Colony forming units-fibroblast development of mesenchymal stromal cells in the mononuclear cells fraction (d0) from all studied groups. The number of colonies at diagnosis is lower than that of the other groups (d vs. end, control: p<0.0001). Culture progression resulted in lower colony development, becoming significant at the later passages.

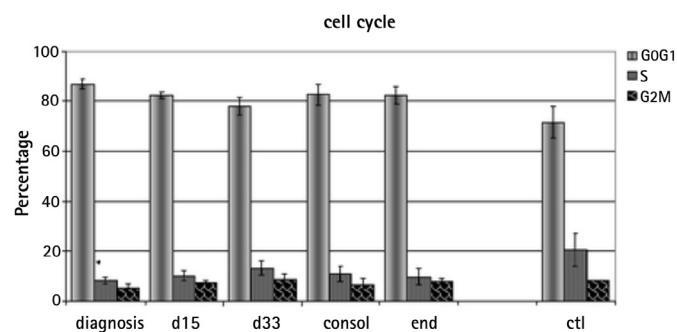
Data are expressed as mean ± SEM (\*: p<0.05 compared to diagnosis).

CFU-F: Colony forming units.

constant finding, observed at subsequent passages as well (Table 2). Culture progression resulted in lower colony development, the control included, and this became statistically significant at the later passages (P1 vs. P4 or P5, p<0.001). MSCs at diagnosis formed fewer small, medium, and large colonies compared to all other groups. Larger colonies prevailed at early passages, while at the later ones, the CFU-F population consisted of mainly small colonies (Supplementary Figure 1).

**Cell-Cycle Analysis - Apoptosis**

Most of the MSCs were in quiescence, presenting a higher percentage of cells in the G0G1 phase compared to the control group (Figure 3). The study of apoptosis in all phases of disease and treatment at P2 and P4 confirmed the stability of BM-MSCs under long-term culture expansion through serial passages. Spontaneous apoptosis was detected at P2 and it did not change at P4 in all groups (Table 3).



**Figure 3.** Analysis of the cell-cycle phases. Most of the mesenchymal stromal cells are in quiescence as the highest percentage of cells are in the G0G1 phase.

Data are expressed as mean ± SEM.

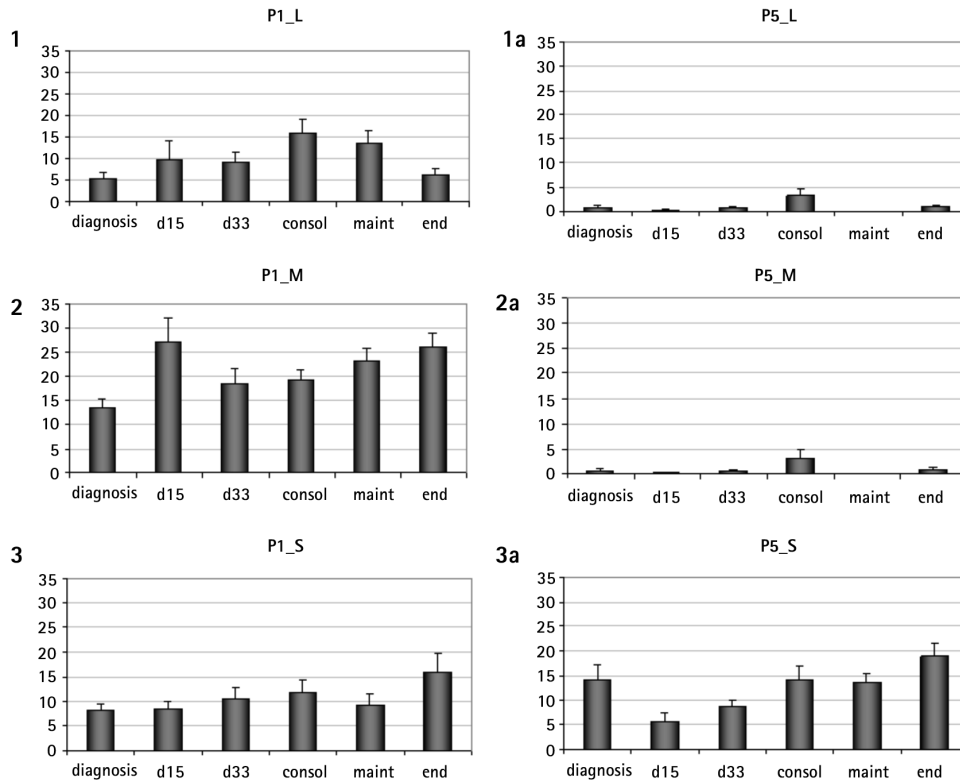
**SDF-1α and Ang-1**

SDF-1α in the MSC supernatants at diagnosis was variably expressed (median: 5334.63 pg/mL, range: 1066.70-22,480.86 pg/mL)

**Table 2. Colony forming units-fibroblast development of mesenchymal stromal cells from all studied groups (P1-P5).**

	P1	P2	P3	P4	P5
d	26.80±2.79	21.39±3.63	19.61±4.69	23.59±3.45	19.46±3.55
d15	45.08±5.72*	34.96±5.44*	37.73±6.01*	17.59±3.48	7.82±2.21
d33	38.52±3.52*	41.40±2.87*	32.06±3.51*	21.11±2.90	17.11±2.41
Consol	47.10±3.10*	34.47±2.68*	26.78±2.30*	24.83±3.33	27.94±3.25
Maint	46.15±3.28*	33.63±3.99*	31.93±2.63*	26.50±3.32	15.12±2.02
End	48.34±4.43*	41.23±4.48*	34.20±4.28*	24.50±3.52	29.00±3.30
CTL	57.27±4.47*	43.53±3.71*	37.38±5.40*	35.67±3.2*	38.83±6.05*

Data are expressed as mean ± standard error of mean.  
 \*Statistical significance in comparison to the d group, CTL: Cytotoxic lymphocyte



**Supplementary Figure 1.** Colony forming units–fibroblast (CFU-F) colonies of large (L), medium (M), and small (S) size at the initial (P1) and last (P5) passages of the study. Larger colonies prevail at early passages while at the later ones the CFU-F population consists of mainly small colonies.

**Table 3. Spontaneous apoptosis, evaluated by flow cytometry after 7-amino-actinomycin D staining of mesenchymal stromal cells at diagnosis and during treatment at passages 2 and 4 (P2, P4).**

Study group	P2 (%)		P4 (%)	
	A	D	A	D
d	4.92±2.38	2.5±0.94	3.47±0.97	2.37±1.15
d15	2.48±0.86	1.97±1.21	2.82±0.65	1.97±1.21
d33	2.65±0.59	1.07±0.56	1.42±0.27	0.52±0.25
Consol	2.01±0.45	1.4±0.38	2.2±0.32	1.05±0.21
Maint	1.97±0.38	0.97±0.57	1.2±0.65	1.67±1.2
End	2.94±0.93	3.78±1.33	1.62±0.77	1.45±1.02
CTL	1.75±0.29	0.58±0.16	0.92±0.37	0.27±0.14

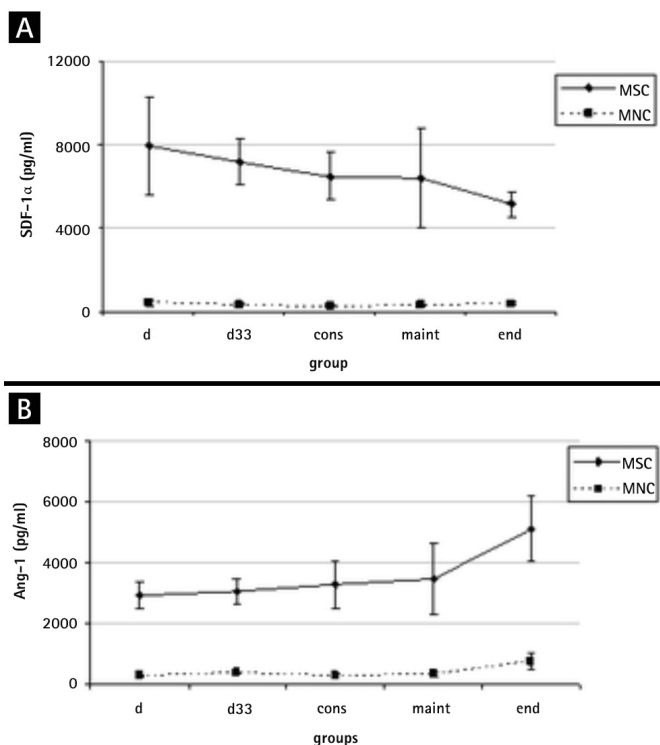
Values are expressed as mean ± standard error of mean.  
 A: Apoptotic cells, D: dead cells, CTL: Cytotoxic lymphocyte

and did not differ in comparison with the treatment phases. Its levels were higher in the HR group compared to the MR group (HR=9205.77±2721.82, MR=6686.11±4006.34, p=0.021).

As far as Ang-1 expression is concerned, in the two cell subpopulations of MNCs and MSCs, our results showed that, similar to SDF-1α, stromal cells secreted statistically significant higher amounts of this growth factor (Figure 4). No difference was found in the comparison of diagnosis with treatment groups.

### Discussion

MSCs are described as fibroblast-like cells, displaying a characteristic spindle shape, and all of our cells exhibited this feature. As in vitro culture progresses, cells enter senescence and MSCs become larger with irregular and flat shapes [26], not observed in our samples. Our source though was the BM of children, albeit leukemic BM, and our culture was followed up to P5 [27].



**Figure 4.** The stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) and angiopoietin-1 (Ang-1) expressions by both mesenchymal stromal cells (MSCs) and mononuclear cells (MNCs) at diagnosis and treatment. Stromal cells secrete higher amounts of both these factors. A) Variability in their expression was noticed at diagnosis, which became more uniform in treatment phases. B) No difference in angiopoietin-1 levels between diagnosis and treatment groups.

MSC: Mesenchymal stromal cell, MNC: mononuclear cell, Ang-1: angiopoietin-1, SDF-1 $\alpha$ : stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ .

MSCs from all groups at different passages were highly expressing MSC-related markers and lacking the hematopoietic markers, as proposed by the International Society for Cell Therapy [28,29]. This indicates that the MSC cultures were homogeneous, in agreement with Conforti et al. [6], and neither disease nor treatment had any influence on them. Clonogenicity and proliferation potential were lower at diagnosis and decreased as the culture progressed, in partial agreement with the only study, so far, examining the characteristics of pediatric ALL-MSCs [6]. The lowest number of colonies was developed at diagnosis. Although this result does not stand alone to support that it is an intrinsic defect (because of the effect of the disease on MSCs) rather than a quantitative one, due to the lower frequency of MSCs in BM infiltrated by leukemic cells combined, with the fact that it continues to be seen in subsequent passages, where the same number of MSCs are used to initiate the culture, it is more suggestive of the hypothesis that the microenvironment (as expressed by BM MSCs) is also affected by the leukemic process. This result favors the observation of Conforti et al. [6]

that leukemic cells do not confer to MSCs any preferential ability to proliferate, but they rather promote a deficient capacity, opposing the hypothesis that MSC populations might be crucial for the efficient promotion of the survival and proliferation of blasts [30]. Treatment does not affect the clonogenicity as the number of colonies produced at any time-point is similar to that of the controls. Another factor involved in colony development is the duration of the culture. Interestingly, the decrease of colony number throughout passages is more profound in large- and medium-sized colonies. Considering that large colonies derive from more primitive cells, it becomes obvious that older cultures contain more mature MSCs. Altogether, the above indicate that the presence of leukemia cells at diagnosis, but not chemotherapeutic agents, modifies BM-MSC properties.

Cell-cycle analysis revealed that most of the MSCs are in quiescence while about 20% of the cells of the control group are at the S phase, compared to less than 10% of the rest of the groups. Further analysis is required in order to fully clarify this difference found under identical culture conditions. Apoptosis remained unaltered throughout passages, a finding reported for BM-MSCs from children with benign hematological disorders [26]. Conforti et al. [6] reported different results, but they evaluated apoptosis for many passages and reported data for the latest one (P18).

Finally, we evaluated the levels of SDF-1 $\alpha$  and Ang-1, recently revealed as major regulators in the crosstalk between hematopoietic progenitors and their microenvironment [31,32]. Data reporting the expression of SDF-1 $\alpha$  by BM MSCs in patients with hematological malignancies are limited. SDF-1 $\alpha$  in the supernatant of MSCs at diagnosis of ALL was slightly increased compared to that from treatment phases, although this difference was not statistically verified. Interestingly, HR patients exhibited higher levels compared to the MR ones, a difference no longer occurring upon treatment initiation. Reduced extracellular levels of SDF-1 $\alpha$  were assessed in hematological malignancies of adults [33,34]. Others found increased SDF-1 $\alpha$  secretion from MSCs at diagnosis in adolescents and young adults with ALL, reversed by chemotherapy [6]. In pediatric patients with acute leukemia, SDF-1 $\alpha$  serum levels differed depending on whether they were evaluated in PB or BM serum (decreased expression) or MSC supernatants at diagnosis (decrease not evident) compared to the remission and control groups [15]. The above, combined with our findings, further support the notion that leukemic cells do not affect CXCL12 production and the decrease reported in serum cannot be attributed to the productive capacity of MSCs.

We found that the lowest amount of Ang-1 was expressed in MSC culture supernatant from diagnosis, albeit not statistically differently from treatment phases. There is one more study to date, on the effect of Ang-1 in childhood ALL [35], in which the authors claimed similar findings in the MSC supernatant and low levels of Ang-1 and Ang-2 in BM serum at diagnosis. Nevertheless, other factors such as age-related

post-transcriptional effect on the expression of proteins or the exposure of BM MSCs to fetal bovine serum and FGF-b [36] have to be taken into consideration in order to fully exploit the role of these molecules in leukemia.

### Study Limitation

A limitation of our study is that the samples examined at different phases of ALL are not necessarily from the same patients longitudinally. This approach ensures a reasonable number of samples within a reasonable timeframe for each group for a rather rare pediatric entity and hence a stronger statistical result.

### Conclusion

In conclusion, biological characteristics and functional properties of MSCs are affected at the onset of leukemia. Most defects persist throughout passages. MSCs recover after treatment initiation and remission achievement and are not affected by chemotherapy. Their secretory profile remains unaltered by the disease. The summing of these data clearly indicates that any effect on MSCs from the leukemic clones in childhood ALL is transient and ceases upon treatment initiation. A standard hurdle in the comparison of our data to other studies continues to be the diversity of working protocols used for MSC cultures and further evaluation.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Kaparou Maria and Fillipides Anthi for their contributions in the performance of a number of experiments, Choumerianou Despina for her contribution in experiments and helpful suggestions, and Koutala Helen for technical advice and support in flow cytometry.

### Ethics

**Ethics Committee Approval:** The study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Heraklion.

### Authorship Contributions

Medical Practices: E.S., M.K., C.P.; Concept: H.D., I.P., C.P., E.S.; Design: H.D., I.P., C.P., E.S.; Data Collection or Processing: S.G., H.D., G.M., I.P., M.P.; Analysis or Interpretation: S.G., M.P., H.D., I.P., C.P., E.S., M.K.; Literature Search: S.G., I.P., H.D., G.M., Writing: H.D.; S.G., C.P.

**Conflict of Interest:** The authors of this paper have no conflicts of interest, including specific financial interests, relationships, and/or affiliations relevant to the subject matter or materials included.

**Financial Disclosure:** This work was partially supported by the European 6<sup>th</sup> Framework Program GENOSTEM (contract no: 503161) and the University of Crete Secretariat Research Committee (KA 3769).

### References

1. El Marsafy S, Larghero J, Bennaceur-Griscelli A, Turhan A. Mesenchymal stem cells: pivotal players in hematopoietic stem cell microenvironment. *J Stem Cell Res Ther* 2014;4:225.
2. Wong SP, Rowley JE, Redpath AN, Tilman JD, Fellous TG, Johnson JR. Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacol Ther* 2015;151:107-120.
3. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007;131:324-336.
4. Sanchez-Aguilera A, Mendez-Ferrer S. The hematopoietic stem-cell niche in health and leukemia. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:579-590.
5. Sorokina T, Shipounova I, Bigildeev A, Petinati N, Drize N, Turkina A, Chelysheva E, Shukhov O, Kuzmina L, Parovichnikova E, Savchenko V. The ability of multipotent mesenchymal stromal cells from the bone marrow of patients with leukemia to maintain normal hematopoietic progenitor cells. *Eur J Haematol* 2016;97:245-252.
6. Conforti A, Biagini S, Del Bufalo F, Sirloto P, Angioni A, Starc N, Li Pira G, Moretta F, Proia A, Contoli B, Genovese S, Ciardi C, Avanzini MA, Rosti V, Lo-Coco F, Locatelli F, Bernardo ME. Biological, functional and genetic characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from pediatric patients affected by acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 2013;8:e76989.
7. Shalpour S, Eckert C, Seeger K, Pfau M, Prada J, Henze G, Blankenstein T, Kammertoens T. Leukemia-associated genetic aberration in mesenchymal stem cells of children with acute lymphoblastic leukemia. *J Mol Med (Berl)* 2010;88:249-265.
8. Ge J, Hu Y, Gui Y, Hou R, Yang M, Zeng Q, Xia R. Chemotherapy-induced alteration of SDF-1/CXCR4 expression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells from adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014;36:617-623.
9. Azab AK, Runnels JM, Pitsillides C, Moreau AS, Azab F, Leleu X, Jia X, Wright R, Ospina B, Carlson AL, Alt C, Burwick N, Roccaro AM, Ngo HT, Farag M, Melhem MR, Sacco A, Munshi NC, Hideshima T, Rollins BJ, Anderson KC, Kung AL, Lin CP, Ghobrial IM. CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. *Blood* 2009;113:4341-4351.
10. Noh YH, Yim YS, Kim DH, Lee MW, Kim DS, Kim HR, Lee SH, Chueh HW, Choi SJ, Oh WI, Yang YS, Jung HL, Yoo KH, Sung KW, Koo HH. Correlation between chemokines released from umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and engraftment of hematopoietic stem cells in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient (NOD/SCID) mice. *Pediatr Hematol Oncol* 2011;28:682-690.
11. Fouillard L, Francois S, Bouchet S, Bensidhoum M, Elm'selmi A, Chapel A. Innovative cell therapy in the treatment of serious adverse events related to both chemoradiotherapy protocol and acute myeloid leukemia syndrome: the infusion of mesenchymal stem cells post-treatment reduces hematopoietic toxicity and promotes hematopoietic reconstitution. *Curr Pharm Biotechnol* 2013;14:842-848.
12. Van Overstraeten-Schloge N, Beguin Y, Gothot A. Role of stromal derived factor-1 in the hematopoietic-supporting activity of human mesenchymal stem cells. *Eur J Haematol* 2006;76:488-493.
13. Sharma MB, Limaye LS, Kale VP. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. *Haematologica* 2012;97:651-660.
14. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006;107:1761-1767.
15. Van den Berk LC, van der Veer A, Willems ME, Theeuwes MJ, Luijendijk MW, Tong WH, van der Sluis IM, Pieters R, den Boer ML. Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2014;166:240-249.
16. Fukuhara S, Sako K, Noda K, Nagao K, Miura K, Mochizuki N. Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by angiopoietin-1. *Exp Mol Med* 2009;41:133-139.
17. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118:149-161.

18. Blau O, Hofmann WK, Baldus CD, Thiel G, Serbent V, Schümann E, Thiel E, Blau IW. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol* 2007;35:221-229.
19. Menendez P, Catalina P, Rodriguez R, Melen GJ, Bueno C, Arriero M, García-Sánchez F, Lassaletta A, García-Sanz R, García-Castro J. Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene. *J Exp Med* 2009;206:3131-3141.
20. Zhao Z, Tang X, You Y, Li W, Liu F, Zou P. Assessment of bone marrow mesenchymal stem cell biological characteristics and support hematopoiesis function in patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2006;30:993-1003.
21. Karaöz E, Çetinalp Demircan P, Erman G, Güngörürler E, Eker Sarıboyacı A. Comparative analyses of immune-suppressive characteristics of bone-marrow, Wharton's jelly, and adipose tissue-derived human MSCs. *Turk J Hematol* 2017;34:213-225.
22. Choumerianou DM, Martimianaki G, Stiakaki E, Kalmanti L, Kalmanti M, Dimitriou H. Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults. *Cytotherapy* 2010;12:881-887.
23. Dimitriou H, Linardakis E, Martimianaki G, Stiakaki E, Perdikogianni CH, Charbord P, Kalmanti M. Properties and potential of bone marrow mesenchymal stromal cells from children with hematologic diseases. *Cytotherapy* 2008;10:125-133.
24. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991;139:271-279.
25. Lecoeur H, Ledru E, Prevost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods* 1997;209:111-123.
26. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 2008;3:e2213.
27. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 2008;129:163-173.
28. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-395.
29. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2014;32:1408-1419.
30. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006;6:107-116.
31. Gomes AC, Gomes MS. Hematopoietic niches, erythropoiesis and anemia of chronic infection. *Exp Hematol* 2016;44:85-91.
32. Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med* 2008;205:777-783.
33. Ge J, Hou R, Liu Q, Zhu R, Liu K. Stromal-derived factor-1 deficiency in the bone marrow of acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 2011;93:750-759.
34. Khandany BK, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, Balali Z, Shamsizadeh A, Arababadi MK, Ostadebrahimi H, Fatehi A, Rezazadeh M, Ahmadi Z, Karimabad MN. Evaluation of circulating concentrations of CXCL1 (Gro- $\alpha$ ), CXCL10 (IP-10) and CXCL12 (SDF-1) in ALL patients prior and post bone marrow transplantation. *Pathol Res Pract* 2012;208:615-619.
35. Karakurt N, Aksu T, Koksali Y, Yarali N, Tunc B, Uckan-Cetinkaya D, Ozguner M. Angiopoietins in the bone marrow microenvironment of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* 2016;21:325-331.
36. Pelagiadis I, Stiakaki E, Choulaki C, Kalmanti M, Dimitriou H. The role of children's bone marrow mesenchymal stromal cells in the ex vivo expansion of autologous and allogeneic hematopoietic stem cells. *Cell Biol Int* 2015;39:1099-1110.

## Appendix: Supplementary Materials and Methods

### BM MNC Isolation and MSC Culture and Expansion

BM MNCs, following separation with Ficoll-Hypaque (1077 g/mL; Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway), were cultured in  $\alpha$ -MEM without nucleotides in the presence of 10% lot-selected fetal calf serum (Invitrogen Ltd., Paisley, UK) as described previously [21]. They were seeded at a concentration of  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in the presence of 1 ng/mL FGF-2 (FGF-2; Abcys SA, Paris, France). A complete medium change was performed twice a week. When layers became confluent at ~90%, cells were detached using 0.25% trypsin/1 mM EDTA (Invitrogen Ltd.) and then replated at a concentration of  $1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> (passage 1, P1). MSCs were maintained in culture for up to five passages. Assays were performed at any of P1 to P4 depending on the cell availability.

### Immunophenotyping Evaluation

Phenotypic characterization of MSCs was performed by flow cytometry at various passages using the following monoclonal antibodies: CD105-phycoerythrin (PE) CD146-PE, CD73-PE CD29-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD44-FITC, CD90-FITC, CD14-FITC, CD45-FITC, CD34-PE, and CD95-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). One hundred thousand cells were stained with the markers as described previously [21]. At least 10,000 events were acquired for each analysis.

### Cell-Cycle Analysis - Apoptosis

MSCs, at either P2 or P3, after detachment by trypsinization (trypsin/EDTA 0.25%) were centrifuged at 150 x g for 10 min at 4 °C and washed with PBS. In order to estimate the percentage of cells in each phase of the cell cycle,  $1 \times 10^6$  MSCs were stained with 1 mL of propidium iodide staining solution (50  $\mu$ g/mL propidium iodide, 1 mg/mL RNase in PBS without Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>, pH 7.4) for 30 min at room temperature. After the acquisition of at least 10,000 events for each sample, cells were gated according to forward vs. side scatter (FSC/SSC) characteristics. Cell-cycle analysis was performed using WinMDI software, version 2.8 [22].

Apoptotic MSCs at passages P2 and P4 were detected by flow cytometry and 7-aminocoumarin D (7-AAD; Sigma, St. Louis, MO, USA) staining [23]. They were initially

gated according to their morphology (FSC/SSC). Then a scattergram was generated by combining FSC with 7-AAD fluorescence to quantitate 7-AAD<sup>negative</sup> (alive), 7-AAD<sup>low</sup> (early apoptotic), and 7-AAD<sup>high</sup> (late apoptotic/dead) cells.

### Cell DT

DT was calculated according to the formula  $DT = t/n = t \times \log(2) / \log(\text{cells harvested/cells inoculated})$ , where  $t$  is the time between initial plating and harvest for the respective passage.

### CFU-F Formation

At day 0.  $1 \times 10^5$  MNCs were seeded in each well of a 24-well plate (in triplicate) in the absence of FGF-2. At subsequent passages, MSCs were plated in 20-cm<sup>2</sup> petri plates at a concentration of 10 cells/cm<sup>2</sup> (in duplicate). Following 14 days of culture at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, CFU-F was quantified after staining with Giemsa stain and categorized according to size as small CFU-F (S: <50 cells), medium CFU-F (M: 50-500 cells), and large CFU-F (highly proliferating; L: >500 cells). The sum of CFU-F of all sizes is denoted as CFU-F.

### Detection of SDF-1 $\alpha$ and Ang-1 (ELISA)

A quantitative sandwich ELISA was employed for the determination of both SDF-1 $\alpha$  and Ang-1 in the supernatant of MSCs at any of P1 to P3 cultures (and of MNCs at d0) within the leukemia group only. All subgroups were examined for the evaluation of these factors through the whole course of the disease, diagnosis, and treatment. The ELISA kits were purchased from R&D Systems, and the instructions of the manufacturer were followed. More specifically, 100  $\mu$ L for SDF-1 $\alpha$  (50  $\mu$ L for Ang-1) of standard or sample per well was added and incubated for 2 h at room temperature on a shaker. After well aspiration and washing, 200  $\mu$ L of the corresponding conjugate was added. Incubation was continued for 2 h further under the same conditions. After washing, 200  $\mu$ L of substrate solution was added to each well for 30 min at room temperature and then 50  $\mu$ L of stop solution terminated the reaction. The optical density of each well was determined at 450 nm with wavelength correction at 570 nm.