

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS) ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ

ΜΑΡΚΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΙΑΤΡΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ-Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
(Επιβλέπων)

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ-Καθηγήτρια Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Μέλος Τριμελούς Επιτροπής)

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ-Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Μέλος
Τριμελούς Επιτροπής)

ΛΑΡΙΣΑ, 2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

THE ROLE OF ROS IN THE REGULATION OF HEMOPOIESIS

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ως αιμοποίηση ορίζεται η διαδικασία παραγωγής, διαφοροποίησης και ανάπτυξης των κυττάρων του αίματος. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την διπλή ικανότητα τόσο της αυτοανανέωσης, όσο και της διαφοροποίησης προς όλους τους τύπους των κυττάρων του αίματος. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) που δημιουργούνται μέσω πολλών διεργασιών όπως η ενζυμική δραστηριότητα, η φαγοκυττάρωση και η μιτοχονδριακή αναπνοή, όταν βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα συντηρούν τις λειτουργίες αυτές. Όταν όμως υπάρξουν σε περίσσεια τις απορρυθμίζουν και συμβάλουν στην γένεση αιματολογικών κακοηθειών. Υπάρχουν πολλά μόρια που συμμετέχουν σε μονοπάτια ρύθμισης των ROS, τα οποία επιδρούν είτε θετικά ή αρνητικά στην δημιουργία των παραπάνω ασθενειών. Η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων FoxO, το γονίδιο ATM και ο παράγοντας HIF-1 αποτρέπουν την παρουσία υψηλών τιμών ROS, εμποδίζοντας έτσι εν μέρει την δημιουργία κακοηθειών. Αντίθετα, η δράση της κινάσης MAPK P38 αυξάνει τα επίπεδα των ROS και τις αρνητικές συνέπειες αυτών. Στην Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία, οι ROS έχουν την ικανότητα τόσο να συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου, επάγοντας γενωμική αστάθεια, όσο και να σκοτώνουν τα λευχαιμικά κύτταρα. Στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία επίσης βρίσκονται αυξημένες οι ROS, οι οποίες προκαλούν περαιτέρω λάθη στην διαδικασία επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA και άρα μεταλλαξιγένεση. Επίσης η συνεχής έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF-2 (NF-E2 Related Factor 2), ρυθμιστή των αντιοξειδωτικών μονοπατιών, φαίνεται να προκαλεί αντίσταση της ΟΜΛ στην χημειοθεραπεία. Τέλος, σε ό,τι αφορά στα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα (πλην της ΧΜΛ) οι ROS δρουν εν πολλοίς συνεργικά με την JAK2 κινάση προκαλώντας γενωμική αστάθεια και μεταλλάσσοντας το αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο.

ABSTRACT

Hematopoiesis is the procedure of the production, differentiation and development of the blood cells. The hematopoietic stem cells (HSC) have both the abilities to self-renew and to differentiate to all blood cell types. The Reactive Oxygen Species (ROS) are created through many procedures like the enzymatic activity, phagocytosis and mitochondrial respiration. When their levels remain low, they sustain the normal activities of the blood cells. On the contrary, when ROS levels are in excess, they can contribute to the pathogenesis of haematological malignancies. There are many molecules that regulate ROS and have either positive or negative impact to the creation of these malignancies. The transcription factor family FoxO, the gene ATM and the factor HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) prevent the accumulation of ROS, making it partly difficult for the malignancies to occur. But the presence of P38K kinase raises the ROS levels and their negative consequences. In Chronic Myeloid Leukemia (CML), ROS have the ability to promote the disease by provoking genomic instability, but also to kill the leukemic cells. In Acute Myeloid Leukemia (AML), ROS are also high promoting mistakes in the DNA repairing system and thus mutagenesis. The constant expression of NRF-2 (NF-E2 Related Factor 2), a regulator of the antioxidative paths, seems to be partly responsible for the chemoresistance in AML. Finally, regarding to the Myelo Proliferative Neoplasms (MPNs)-apart from CML- ROS act synergically with JAK2 kinase leading to genomic instability and to mutation of the HSC.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην φυσιολογική αιμοποίηση

1. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών
2. Ρύθμιση των επιπέδων των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο εσωτερικό των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων
 - 2.1 Ρύθμιση του περιεχομένου των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο μικροπεριβάλλον των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων
 - 2.2 Ενδογενείς κυτταρικοί παράγοντες που καθορίζουν τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα
3. Η απόκριση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων στην βλάβη του DNA και ο σπουδαίος ρόλος της ρύθμισης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην διατήρηση της χρωμοσωμικής σταθερότητας
4. Η δράση της P38 MAPK στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα

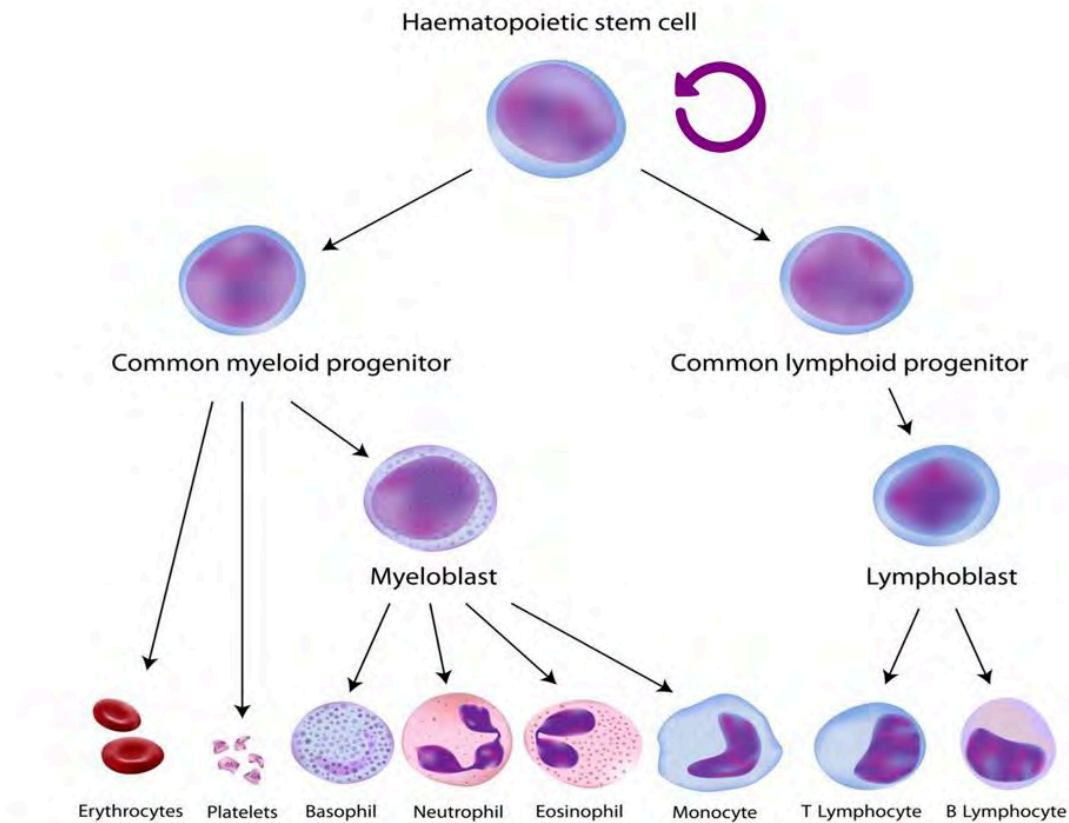
B. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στις αιματολογικές κακοήθειες

1. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία
 - 1.1 Το γονίδιο bcr-abl 1 και η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου
 - 1.2 Η σχέση των ROS με τα κύτταρα της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας
 - 1.3 Ο ρόλος του NRF-2 στην θεραπεία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας
2. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο και στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία
 - 2.1 Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην παθογένεια της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας
 - 2.2 Πως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οδηγούν σε ταχύτερη εκτροπή του Μυελοδυσπλαστικού Συνδρόμου σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία
 - 2.3 Ο ρόλος του NRF-2 στην θεραπεία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας
3. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα Μυελοϋπερπλαστικά Νοσήματα
 - 3.1 Η JAK2 κινάση και η σχέση της με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στα Μυελοϋπερπλαστικά Νοσήματα
 - 3.2 Η απώλεια του Foxo3 οδηγεί στην ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου μυελοϋπερπλαστικού νοσήματος στα ποντίκια

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως αιμοποίηση ορίζεται η διαδικασία παραγωγής, διαφοροποίησης και ανάπτυξης των κυττάρων του αίματος. Τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα ή αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (Hematopoietic Stem Cells-HSC) αποτελούν την βάση του ενήλικου συστήματος αιμοποίησης και είναι υπεύθυνα για την καθημερινή, συνεχή παραγωγή όλων των ώριμων κυτταρικών σειρών του αίματος. Χαρακτηρίζονται από την διπλή ικανότητα τόσο της αυτοανανέωσης, όσο και της διαφοροποίησης προς όλους τους τύπους των κυττάρων του αίματος (Εικόνα 1) [1].

Κατά την εμβρυϊκή ζωή η αιμοποίηση λαμβάνει χώρα στον λεκυθικό ασκό, στο ήπαρ, στον σπλήνα και στον μυελό των οστών. Από τον πέμπτο μήνα της κύησης και μετά την γέννηση του ανθρώπου, η αιμοποίηση γίνεται φυσιολογικά στον μυελό των οστών ο οποίος αποτελείται από ερυθροκύτταρα, μυελοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, μεγακαρυοκύτταρα, οστεοβλάστες, οστεοκλάστες και στρωματικά κύτταρα. Σε ορισμένες, σπάνιες, παθολογικές καταστάσεις ο σπλην, το ήπαρ και οι λεμφαδένες ανακτούν την ικανότητα παραγωγής άωρων κυττάρων του αίματος (εξωμυελική αιμοποίηση) [1].



Εικόνα 1: Το πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο αυτοανανεώνεται ή διαφοροποιείται σε πολυδύναμο λεμφοκύτταρο (Common Lymphoid Progenitor-CLP) είτε σε πολυδύναμο κύτταρο της μυελικής σειράς (Common Myeloid Progenitor-CMP). Τα κύτταρα αυτά οδηγούν έπειτα στην δημιουργία περισσότερο διαφοροποιημένων πρόδρομων κυττάρων για να καταλήξουν στην γέννηση των ώριμων κυττάρων του αίματος: ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια, βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα, ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα, ηωσινόφιλα κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα, κύτταρα και B-λεμφοκύτταρα. Σε όλη την διαδικασία μεσολαβούν κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι υποστηρίζουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση κάθε κυτταρικού τύπου [1].

Ο ρόλος του αίματος είναι η μεταφορά οξυγόνου, θρεπτικών συστατικών και ορμονών στους ιστούς, η απομάκρυνση άχρηστων προϊόντων και διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς και η διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού μέσω της δράσης του αίματος ως ρυθμιστικό διάλυμα. Η ύπαρξη αιματολογικής κακοήθειας πλήττει αυτόν τον ρόλο με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία του οργανισμού και σε πολλές περιπτώσεις τον θάνατο. Συχνές αιματολογικές κακοήθειες αποτελούν η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, η οξεία μυελογενής λευχαιμία καθώς και τα μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα [1,2].

Τα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα οφείλονται σε αύξηση του αριθμού των κυττάρων της μυελικής σειράς. Οφείλονται συνήθως σε μεταλλάξεις με δράση τυροσινικής κινάσης με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των προγονικών μυελικών κυττάρων. Στην φυσική τους εξέλιξη είναι πάντα υπαρκτό το ενδεχόμενο εκτροπής σε οξεία λευχαιμία. Ταξινομούνται στις: Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ), αληθή πολυκυτταραιμία (Polycythemia Vera-PV), ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση (Essential Thrombocythemia-ET) και πρωτοπαθή μυελοϊνώση (Primary Myelofibrosis-PM) [2].

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία αποτελεί νόσημα του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. Εμφανίζει μία μοναδική χρωμοσωμική διαταραχή η ύπαρξη της οποίας αρκεί για την εμφάνιση της νόσου, το χρωμόσωμα Philadelphia (Ph). Η μετάλλαξη αυτή οφείλεται σε μετάθεση τμήματος του χρωμοσώματος 9 (ογκογονίδιο ABL1), σε περιοχή του χρωμοσώματος 22 (γονίδιο BCR). Το νέο χιμαιρικό γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη (BCR-ABL1) με δράση τυροσινικής κινάσης. Η ηλικία εμφάνισης είναι τα 50-60 έτη. Οι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα αναιμίας, κόπωση, εφιδρώσεις και απώλεια βάρους τα οποία είναι αποτέλεσμα μίας υπερμεταβολικής κατάστασης. Παρόλα αυτά, κατά τη διάγνωση οι περισσότεροι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί. Η κλινική πορεία της νόσου αποτελείται από την χρόνια φάση που ενδέχεται να διαρκέσει αρκετά έτη (κατά μέσο όρο 5), από την επιταχυνόμενη φάση με διάρκεια έως και ένα έτος κα από την βλαστική κρίση, η οποία αν δεν αντιμετωπιστεί άμεσα οδηγεί σε θάνατο. Η διάγνωση της ΧΜΛ γίνεται με FISH (Fluorescence in-situ hybridization) και τα τελευταία έτη οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης (Tyrosine Kinase Inhibitors-TKIs) αποτελούν την θεραπεία εκλογής, με κύριο εκπρόσωπο την ιματινίβη (imatinib) [2].

Η αληθής πολυκυτταραιμία περιλαμβάνει είτε μόνο την αύξηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή σε συνδυασμό με αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις του Janus Kinase 2 (JAK2) γονιδίου που ανήκει στην οικογένεια των τυροσινικών κινασών, με αποτέλεσμα την συνεχή ενεργότητά του. Αυτό το

γεγονός οδηγεί σε εκσεσημασμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων ανεξάρτητα από την δράση της ερυθροποιητίνης (η οποία φυσιολογικά διεγείρει την παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν πληθωρικό προσωπείο, κεφαλαλγία και εμβοές ωτών, κνησμό ενίοτε μετά από ζεστό μπάνιο, αιμορραγίες αλλά και θρομβώσεις πολλών συστημάτων. Οι θρομβώσεις αποτελούν ένα σημαντικό αίτιο θανάτου. Το 30% των ασθενών θα αναπτύξει μυελοϊνώση και περίπου το 2% θα αναπτύξει οξεία λευχαιμία. Η θεραπεία περιλαμβάνει αφαιμάξεις, μυελοκατασταλτικά φάρμακα και ιντερφερόνη-α [2].

Η ιδιοπαθής θρομβοκυττάρωση σχετίζεται με σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια JAK2, MPL και CARL με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή αιμοπεταλίων ανεξαρτήτως της θρομβοποιητίνης και συνδυάζεται με διαταραχή της λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν θρομβώσεις και αιμορραγίες. Το προσδόκιμο επιβίωσης σε αυτούς τους ασθενείς μοιάζει με το φυσιολογικό για τη ηλικία τους. Παράγοντες κινδύνου αποτελούν τα θρομβωτικά επεισόδια και η εκτροπή της νόσου [2].

Η πρωτοπαθής μυελοϊνώση εμφανίζεται σε άτομα άνω των 60 ετών και περιλαμβάνει την εναπόθεση ιών κολλαγόνου στον μυελό των οστών. Αυτό οδηγεί σε καταστολή του μυελού και επομένως σε αιματολογικές πενίες. Στην νόσο ως επακόλουθο είναι ανεπτυγμένη η εξωμυελική αιμοποίηση. Διακρίνεται σε πρωτοπαθή (σχετίζεται με PV και ET) και δευτεροπαθή (σχετίζεται με τοξική δράση φαρμάκων, κακοήθειες όπως το λέμφωμα Hodgkin, η λευχαιμία και το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο). Οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις των JAK2 και MPL. Τα σημεία και συμπτώματα περιλαμβάνουν οργανομεγαλία (λόγω εξωμυελικής αιμοποίησης), αναιμία, απώλεια βάρους, νυχτερινές εφιδρώσεις και πυρετό. Οι ασθενείς επίσης ενδέχεται να παραμένουν ασυμπτωματικοί για αρκετούς μήνες. Η μέση επιβίωση είναι περίπου πέντε έτη από την στιγμή της διάγνωσης και αίτια θανάτου αποτελούν κυρίως οι βαριές λοιμώξεις, τα θρομβοαιμορραγικά επεισόδια και η εκτροπή σε οξεία μυελογενή λευχαιμία. Το ruxolitinib αποτελεί θεραπεία εκλογής για έλεγχο των συμπτωμάτων [2].

Ακόμα μία σημαντική αιματολογική κακοήθεια είναι η οξεία μυελογενής λευχαιμία στην οποία συμβαίνει κακοήθης εξαλλαγή και ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός ενός ανώμαλα διαφοροποιημένου μυελικού προγονικού κυττάρου. Το γεγονός αυτό οδηγεί εντός εβδομάδων σε καταπίεση των φυσιολογικών μυελικών σειρών και ανάπτυξη αναιμίας, θρομβοπενίας και ουδετεροπενίας. Αποτελεί τον συνηθέστερο τύπο λευχαιμίας στους ενήλικες και όσον αφορά την αιτιολογία της έχουν κατηγορηθεί ιοί, η ακτινοβολία, κυτταροστατικά φάρμακα και προϋπάρχουσες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, όπως το σύνδρομο Down και η αναιμία Fanconi. Οι πλέον συνηθείς μεταλλάξεις είναι των γονιδίων

FLT-3, NPM1 και CEBRA. Οι ασθενείς παρουσιάζονται με σημεία λοίμωξης, αιμορραγίες και πολλές φορές διόγκωση σπληνός και ήπατος. Η πρόγνωση διακρίνεται σε ευνοϊκή, ενδιάμεση και κακή με 5ετή επιβίωση 70%, 48% και 15% αντίστοιχα και εξαρτάται από παράγοντες κινδύνου όπως η ηλικία, ο πολύ υψηλός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων στην διάγνωση ($50 \times 10^9 / L$) και οι συνυπάρχουσες μοριακές μεταλλάξεις. Η έναρξη θεραπείας οφείλει να είναι άμεση και περιλαμβάνει αλκυλιωτικούς παράγοντες, κορτικοειδή, ανθρακυκλίνες, ασπαραγινάση και κυτταροστατικά φάρμακα. Η μεταμόσχευση μυελού των οστών αποτελεί επίσης μία θεραπευτική επιλογή [2].

Τέλος, τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (Myelodysplastic Syndrome-MDS) είναι μια ομάδα κλωνικών αιματολογικών νοσημάτων που αφορά το αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο και χαρακτηρίζεται από δυσπλασία σε μία ή περισσότερες από τις μυελικές σειρές, κυτταροπενίες λόγω μη αποδοτικής αιμοποίησης και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Αφορά ασθενείς με μέσο όρο ηλικίας τα 70 έτη και εκδηλώνονται με αναιμία, ουδετεροπενία, θρομβοπενία, ενίοτε με ηπατοσπληνομεγαλία ενώ συχνά παραμένουν χωρίς συμπτώματα για καιρό. Το αίτιο είναι συνήθως άγνωστο, αλλά παράγοντες όπως το βενζόλιο, η ακτινοβολία και οι αλκυλιωτικές ενώσεις έχουν ενοχοποιηθεί για την δημιουργία του. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που συνυπάρχουν περιλαμβάνουν απαλοιφές, διπλασιασμούς και δομικές ανωμαλίες. Η θεραπεία προσανατολίζεται στην υποστήριξη των συμπτωμάτων και σε μερικές περιπτώσεις σε μεταμόσχευση μυελού των οστών [2].

Ένας από τους ρυθμιστικούς παράγοντες των παραπάνω νοσημάτων και της αιμοποίησης γενικότερα είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS). Οι ROS είναι οργανικά και ανόργανα μόρια που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα. Όταν οξειδώνονται μέσω του μεταβολισμού, το μόριο του οξυγόνου ανάγεται σε νερό κι έτσι δημιουργείται η ενδιάμεση ROS που περιλαμβάνει ρίζες υδροξυλίου ($OH\bullet$), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2\bullet^-$). Η δισμουτάση του σουπεροξειδίου (Super Oxide Dismutase-SOD) είναι το κύριο ένζυμο που καταλύει αυτές τις αντιδράσεις. Τα παραπάνω μόρια είναι πολύ ασταθή και ενεργά, καθώς το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο αυξάνει τη δραστηριότητά τους γιατί προσπαθεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα άτομα για να σχηματίσει ζεύγος. Η διαδικασία αυτή είναι ικανή να δημιουργήσει άμεσα οξειδωτική βλάβη. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι ROS δημιουργούνται μέσω πολλών διεργασιών όπως η ενζυμική δραστηριότητα, η φαγοκυττάρωση και η μιτοχονδριακή αναπνοή αλλά και μέσω της

NAPDH οξειδάσης. Οι διεργασίες αυτές γεννούν ROS μέσω της φυσιολογικής τους πορείας. Παρότι υψηλά επίπεδα ROS μπορούν να προκαλέσουν κυτταρική καταστροφή μέσω βλάβης του DNA και επακολούθως απόπτωσης, μέτρια επίπεδα είναι απαραίτητα για την αιμοποίηση κατά την εμβρυϊκή ζωή αλλά και για την διατήρηση της αιματολογικής ομοιοστασίας των ενηλίκων. Στα αρχέγονα κύτταρα τα επίπεδα των ROS διατηρούνται χαμηλά, υποστηρίζοντας έτσι την ικανότητά τους να αναγεννώνται και να διαφοροποιούνται [1-3].

Οι οργανισμοί σε αερόβια περιβάλλοντα εκτίθενται συνεχώς σε ROS. Η ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων των ROS και της σηματοδότησης μέσω αυτών, διατηρεί την ισορροπία μεταξύ αυτοανανέωσης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης συστατικών κάποιων ομάδων βλαστοκυττάρων. Αύξηση των ROS σε συγκεντρώσεις πάνω από το φυσιολογικό ενδέχεται να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και βλάβη του DNA [4]. Το οξειδωτικό στρες υπολογίζεται πως βλάπτει περίπου 10.000 βάσεις ανά ημέρα ανά ανθρώπινο κύτταρο και θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες πρόκλησης βλάβης του DNA και μεταλλάξεων [5]. Η πλειοψηφία των βλαβών αυτών επιδιορθώνονται μέσω του συστήματος επιδιόρθωσης εκτομής βλάβης (Base Excision Repair-BER), αν και επίμονη βλάβη ή βλάβη στις δύο αντίθετες αλυσίδες, σε κοντινά όμως νουκλεοτίδια, που θα οδηγήσει σε θραύση της διπλής έλικας του DNA απαιτεί μη ομόλογη σύνδεση άκρων (non-homologous end-joining) ή ομόλογο ανασυνδυασμό (homologous recombination) για την επιδιόρθωσή της. Οι ROS και οι βλάβες του DNA που μπορεί να προκαλούν, έχουν την δυνατότητα να πυροδοτούν πολλαπλά μονοπάτια απόκρισης στην βλάβη αυτή. Τα αποτελέσματα της σηματοδότησης και της κυτταρικής απόκρισης στην διακύμανση των ROS, είναι ποικίλα. Κυμαίνονται από κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση αλλά και την παύση της ανάπτυξης του κυττάρου, γήρανση και κυτταρικό θάνατο. Το ποιο από τα παραπάνω θα επικρατήσει εξαρτάται από την ποσότητα των ROS, τη βλάβη που προκαλούν και από τον εκάστοτε κυτταρικό τύπο. Έχει αρχίσει να επικρατεί η αντίληψη πως η ανικανότητα ρύθμισης των υψηλών επιπέδων των ROS, η οποία οδηγεί σε μεταβολή της κυτταρικής ομοιοστασίας ή σε αναποτελεσματική επιδιόρθωση της βλάβης, έγκειται στη βάση των ασθενειών, η οποία σχετίζεται με νευροεκφυλισμό και με ανεπάρκεια του μυελού των οστών [6-10]. Οι αιματολογικές κακοήθειες λοιπόν φαίνεται να αντικατοπτρίζουν την ικανότητα των κυττάρων να ανταποκρίνονται στις μεταβολές των ROS, γεγονός που υποδηλώνει την ομοιότητα των ασθενειών αυτών και σε κυτταρικό επίπεδο [10]. Στο παρόν σύγγραμμα θα αναλυθεί η επίδραση των ROS στη φυσιολογική αιμοποίηση αλλά και ο ρόλος τους στις αιματολογικές κακοήθειες με έμφαση στα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, στα μυελοδυσπλαστικά νοσήματα και στην οξεία μυελογενή λευχαιμία.

A. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην φυσιολογική αιμοποίηση

1. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων του μυελού των οστών

Τα προγονικά μεσεγχυματικά κύτταρα του μυελού των οστών αποτελούν έναν μικρό πληθυσμό αδιαφοροποίητων κυττάρων που έχουν την ικανότητα τόσο να αυτοανανεώνονται διατηρώντας έτσι έναν σταθερό αριθμό προγονικών κυττάρων όσο και να διαφοροποιούνται δημιουργώντας ώριμα κύτταρα. Ακόμα ένα χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι ότι μεταναστεύουν από τον μυελό των οστών στο περιφερικό αίμα. Η διαδικασία αυτή ενισχύεται σε καταστάσεις στρες. Όλο και περισσότερα δεδομένα δείχνουν πως το οξειδωτικό στρες και συγκεκριμένα το περιεχόμενο των ROS επηρεάζει την μετανάστευση, την ανάπτυξη και την αυτοανανέωση των προγονικών (βλαστικών) κυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι ROS παράγονται μέσα από μία σειρά in vivo διεργασιών, όπως η ενζυμική δραστηριότητα και η μιτοχονδριακή αναπνοή. Αν και τα υψηλά επίπεδά τους μπορεί να βλάψουν τα κύτταρα, προκαλώντας ζημιά στο DNA και προωθώντας την απόπτωση, εν τούτοις μέτρια επίπεδα ROS είναι απαραίτητα για την εμβρυϊκή αιμοποίηση και την διατήρηση της αιματολογικής αιμόστασης στην ενήλικη ζωή [11,12]. Στα βλαστικά κύτταρα, οι ROS διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα, υποστηρίζοντας έτσι τη μεγάλη ικανότητα διαφοροποίησής τους. Αυξημένα επίπεδά τους οδηγούν σε κύτταρα με περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης και έπειτα σε κύτταρα μυελικής σειράς, όπως έχει φανεί σε πειραματικά μοντέλα ποντικών αλλά και στη δροσόφιλα (Εικόνα 2) [13-15].

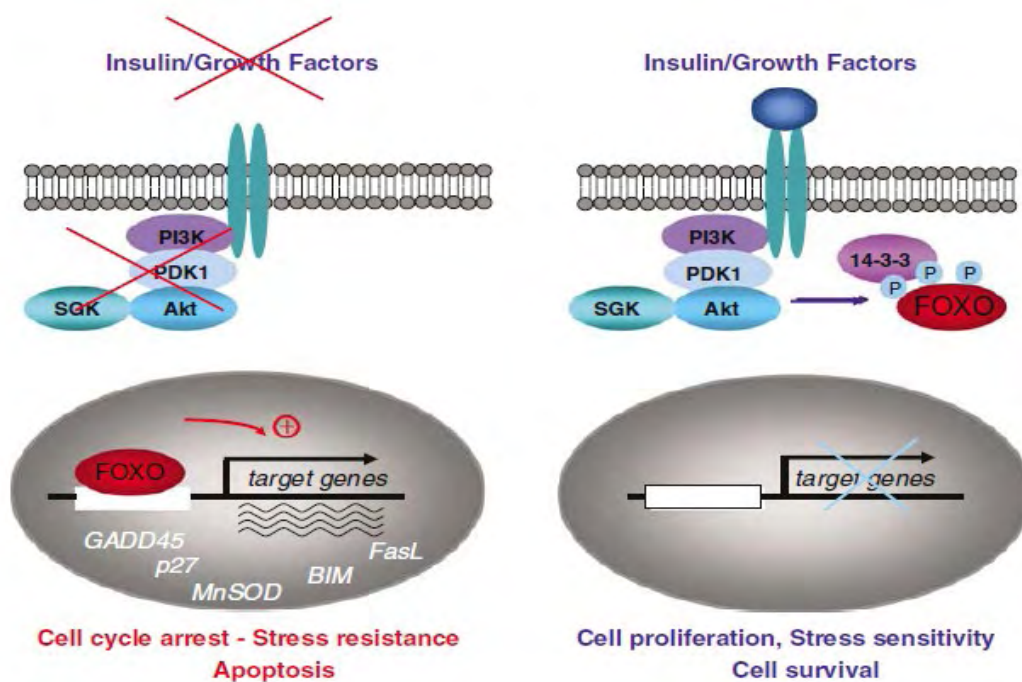


Εικόνα 2: Οι ενδοκυττάριας ROS στην αυτοανανέωση και στην ενεργοποίηση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα ROS. Αύξησή τους στα βλαστοκύτταρα δυνητικά προκαλεί δημιουργία κυττάρων με μικρή ικανότητα διαφοροποίησης. Τα υψηλά επίπεδα των ROS είναι αναστρέψιμα και μείωσή τους στα κύτταρα αυτά επάγει την αποκατάσταση του δυναμικού διαφοροποίησής τους. Περίσσεια ROS αντίθετα, θα οδηγήσει σε γήρανση και απόπτωση, γεγονός μη αναστρέψιμο [11].

Διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες και συγκεκριμένα η οικογένεια FoxO φάνηκε πρόσφατα πως παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του οξειδωτικού στρες στην αιμοποίηση. Οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO1, FoxO3, FoxO4, FoxO6 είναι τα ομόλογα του DAF-16 (DAUER Formation-16) στα θηλαστικά, ο οποίος ρυθμίζει τον χρόνο ζωής του υποδοχέα ινσουλίνης [16]. Ενεργοποίηση του DAF-16 οδηγεί σε σημαντική αύξηση της διάρκειας ζωής του *C. Elegans*, εν μέρει μέσω της άμυνας που παρέχει ενάντια στο οξειδωτικό στρες [17,18]. Με όμοιο τρόπο, ενεργοποίηση του FoxO3 σε καλλιέργειες ινοβλαστών, νευρικών κυττάρων και σε πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα ποντικών, οδηγεί σε αντίσταση στο οξειδωτικό στρες [19,20]. Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει μέσω μετάφρασης των ενζύμων SOD2 και καταλάσης. Συγκεκριμένα, ο FoxO3 προσδένεται *in vivo* απευθείας στον εκκινητή

του SOD2 όπως έχει φανεί σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου μέσω της δοκιμασίας ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης [19]. Ο FoxO3 ανταποκρίνεται στο κυτταρικό στρες (συμπεριλαμβανομένου και του οξειδωτικού στρες) επάγοντας παύση του κυτταρικού κύκλου, επιδιόρθωση του DNA που έχει υποστεί βλάβη και απόπτωση μέσω ενεργοποίησης γονιδίων που είναι σημαντικοί ρυθμιστές αυτών των διαδικασιών [21-24]. Σε αυτό το μονοπάτι ο FoxO3 μοιάζει με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, με την οποία έχει πολλούς κοινούς στόχους και πολλά κοινά μονοπάτια ρύθμισης [25].

Οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO είναι υποστρώματα φωσφορυλίωσης της κινάσης σερίνης-θρεονίνης (AKT) ως απάντηση σε κυτταρικά ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες και ογκοπρωτεΐνες. Η πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα στον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης διεγείρει την ενεργοποίηση της κινάσης PI3, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί μία σειρά κινασών συμπεριλαμβανομένης και της οικογένειας κινασών σερίνης θρεονίνης (AKT/SGK) [3]. Ο φωσφορυλιωμένος FoxO μεταφέρεται στο κυττόςολιο, όπου μακριά από μεταγραφικούς στόχους αδυνατεί να προκαλέσει έκφραση γονιδίων [21]. Αντίστροφα, στρεσογόνο ερέθισμα ή καταστολή των κινασών PI3/AKT οδηγεί σε ενεργοποίηση του FoxO (Εικόνα 3) [16]. Τουλάχιστον στους ινοβλάστες, οι ROS προκαλούν φωσφορυλίωση (από την κινάση JNK) των καταλοίπων του FoxO που δεν έχουν ήδη φωσφορυλιωθεί από την AKT. Με αυτόν τον τρόπο η JNK ανταγωνίζεται το στρες (συμπεριλαμβανομένου και του στρες που προκαλούν οι ROS), παρατείνοντας το χρόνο ζωής της δροσόφιλας και του *C. Elegans* [26-28].



Εικόνα 3: Η ρύθμιση των FoxO από αυξητικούς παράγοντες και στρεσογόνα ερεθίσματα. Ως απάντηση στους αυξητικούς παράγοντες, το μονοπάτι των κινασών PI3K/Akt αναστέλει την FoxO-εξαρτώμενη μεταγραφή μέσω φωσφορυλίωσης και ακινητοποίησης των FoxO στο κυτταρόπλασμα. Σε απόκριση σε στρεσογόνο ερέθισμα, η JNK κινάση φωσφορυλιώνει τους παράγοντες FoxO, μετατοπίζοντας έτσι τις πρωτεΐνες FoxO στον πυρήνα. Αν και η φωσφορυλίωση των FoxO από την JNK δεν αναστέλει ευθέως την πρόσδεση των πρωτεϊνών 14-3-3, η άμεση φωσφορυλίωση των 14-3-3 από την JNK είναι που προκαλεί την απελευθέρωση των υποστρωμάτων 14-3-3. Η ενεργότητα της JNK αρκεί για να ξεπεραστεί η αναστολή των FoxO από την Akt. Οι παράγοντες FoxO στη συνέχεια μεταγράφουν μία ομάδα γονιδίων που εμπλέκονται στην αντίσταση στο στρες [16].

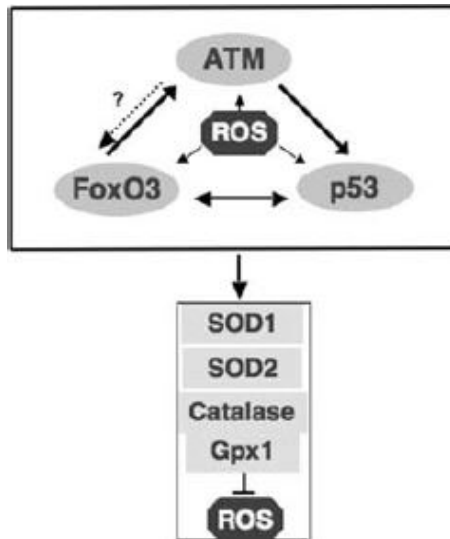
Οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO, όπως έχει αναφερθεί, είναι μεσολαβητές της απόκρισης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων στο οξειδωτικό στρες. Απώλεια των FoxO1, FoxO3, FoxO4 οδήγησε σε μειωμένο αριθμό αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και ελαττωματική λειτουργία τους που σχετίστηκε με μεγάλη συσσώρευση ROS (όπως μετρήθηκε με την δοκιμασία ανοσοφθορισμού DCF-DA). Αν και ποντίκια χωρίς ενεργό FoxO εμφάνισαν μυελούπερπλασία, η αυξανόμενη συσσώρευση των ROS περιορίστηκε στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα και δεν παρατηρήθηκε στα μυελικά προγονικά κύτταρα. Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα βγήκαν από την φάση ηρεμίας και μπήκαν στον κυτταρικό κύκλο υποδηλώνοντας έτσι πως οι ROS ενισχύουν την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο [29]. Συμπερασματικά, φάνηκε πως οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO παίζουν σπουδαίο ρόλο στην καταστολή των ROS και στην ρύθμιση της ηρεμίας των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων.

Μεταξύ των FoxO, αυτός που φαίνεται να παίζει τον πιο σημαντικό ρόλο είναι ο FoxO3 όσον αφορά στην παραγωγή των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, μιας και είναι ο περισσότερο εκφραζόμενος FoxO στον μυελό των οστών αλλά και στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα [30-32]. Το τελευταίο αποδεικνύεται από το γεγονός ότι ο FoxO3 εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα στα κύτταρα αυτά. Επιπρόσθετα, απώλεια του FoxO3 οδήγησε σε σημαντικές βλάβες στην συχνότητα και στην ενεργότητα των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων σε νεαρά και γερασμένα ποντίκια, μέσω ευαισθητοποίησης στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου [31,32].

Άλλο ένα γονίδιο που εμπλέκεται σημαντικά στην ρύθμιση της αιμοποίησης από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι αυτό της αταξίας-τηλεαγγειεκτασίας (ATM-Ataxia/Telangiectasia Mutated gene). Μετάλλαξη με απώλεια της λειτουργίας του οδηγεί σε

κλινική εικόνα αταξίας, τηλεαγγειεκτασίας, νευρολογικού εκφυλισμού, ανοσοανεπάρκειας, σε γενετική αστάθεια, προδιάθεση για λεμφώματα και άλλες κακοήθειες και μεγάλη ευαισθησία στην ιονίζουσα ακτινοβολία [33,34]. Η κινάση σερίνης-θρεονίνης του ATM είναι καθοριστικό ένζυμο στην ρύθμιση της απόκρισης σε βλάβη του DNA προκαλούμενη από στρες και ιδιαίτερα στην επιδιόρθωση της θραύσης της διπλής αλυσίδας του DNA. Μελέτες έχουν πρόσφατα δείξει πως ρύθμιση των ROS από το ATM είναι εξαιρετικά σημαντική για την αυτοανανέωση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων. Κάτι τέτοιο δικαιολογείται από το γεγονός ότι απώλεια του ATM οδηγεί σε εξάντληση του αριθμού των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων και επομένως σε ανεπάρκεια του μυελού των οστών, σε μελέτη που έγινε σε γηρασμένα ποντίκια [35].

Το ATM ενεργοποιεί το p53 μέσω διάφορων μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένης και της φωσφορυλίωσης. Έτσι αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, στα οποία το p53 φαίνεται να είναι ενεργό, η έκφραση του ATM ήταν σημαντικά μειωμένη [32]. Η μείωση αυτή της έκφρασης του ATM σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα χωρίς FoxO3 ήταν ανεξάρτητη από τις ROS. Το ATM μπορεί επαρκώς να ρυθμίσει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα που δεν εκφράζουν FoxO3. Βέβαια χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να ξεκαθαρίσει την γενετική αλληλεπίδραση των FoxO3 και ATM στην ρύθμιση δραστηριότητας των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων μέσω ROS. Επιπλέον σε ότι αφορά στην ρύθμιση της έκφρασης του ATM, έχει φανεί πως ο FoxO3 αλληλεπιδρά άμεσα μαζί του, γεγονός ζωτικής σημασίας για την ενίσχυση της φωσφορυλίωσης του ATM και έπειτα της απόκρισης σε βλάβη του DNA [36]. Δεδομένων όλων των παραπάνω, γίνεται εύκολα αντιληπτός ο ρόλος-κλειδί των ATM και FoxO3 στην ρύθμιση του οξειδωτικού στρες και της βλάβης του DNA. Επιπλέον, ο συνδυασμός τους με το p53 δημιουργεί ένα ογκοκατασταλτικό δίκτυο που προστατεύει τα βλαστοκύτταρα από βλάβη, εξασφαλίζοντας γενωμική σταθερότητα και άρα τον πολλαπλασιασμό τους (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ο άξονας ATM/FoxO3/p53-ελέγχου των ROS στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Οι ROS ενεργοποιούν τα ATM, FoxO3 και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, τα οποία ανεξάρτητα ή και μαζί, μέσω ενός καταρράκτη επάγουν την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων που θα καταστείλουν τις ROS [3] .

2. Ρύθμιση των επιπέδων των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο εσωτερικό των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων

2.1 Ρύθμιση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο μικροπεριβάλλον των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων

Τα βλαστοκύτταρα κατοικούν σε συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, το οποίο τους εξασφαλίζει μία κατάσταση ηρεμίας. Κάτω από συνθήκες στρες, το μικροπεριβάλλον αυτό θα δώσει στα αδιαφοροποίητα προγονικά κύτταρα το ερέθισμα να διαφοροποιηθούν και να πολλαπλασιαστούν ώστε να ανταπεξέλθουν στις αυξημένες απαιτήσεις του ανοσοποιητικού συστήματος για λευκοκύτταρα και για ερυθροκύτταρα. Τα προγονικά κύτταρα γειτονεύουν με τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα νευρικά, τα μυελικά και τα αιμοποιητικά κύτταρα τα οποία δρουν συνεργικά παράγοντας κυτταροκίνες και σηματοδοτώντας αδρενεργικά μονοπάτια για να διατηρήσουν τον αριθμό και την λειτουργικότητα των προγονικών κυττάρων [11].

Οι ενδοοστικές και περιαγγειακές περιοχές του οστού θεωρούνται περιοχές μορφολογικού σχηματισμού των βλαστοκυττάρων. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται ανάμεσα στο ασβεστοποιημένο οστό και τους κόλπους, τα οποία αποτελούν τμήμα της αγγείωσης του μυελού των οστών. Στην ενδοοστική περιοχή, κοντά στα ασβεστοποιημένα όρια του οστού, οι πρόδρομοι οστεοβλάστες επικοινωνούν και υποστηρίζουν τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, τα οποία κατοικούν σε περιοχές χαμηλής αιμάτωσης [37,38]. Τα βλαστοκύτταρα αυτά βρίσκονται σε κατάσταση υποξίας, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί με μετρήσεις της μερικής πίεσης οξυγόνου στον μυελό των οστών ποντικών, οι οποίες αποκάλυψαν την κατάσταση υποξίας με διαφορά στις περιαγγειακές περιοχές [39]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως, αν τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα απομακρυνθούν από τους κόλπους οδηγούμενα περιαγγειακά, θα βιώσουν υποξικές συνθήκες.

Η υποξία, η οποία ορίζεται ως χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου, επηρεάζει τα κύτταρα μέσω της οικογένειας των παραγόντων HIF (hypoxia-inducible factors, δηλαδή παραγόντων επαγόμενων από υποξία). Στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα η υποξία ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω HIF, το οποίο οδηγεί σε κυτταρικό μεταβολισμό. Ενεργοποίηση των HIF και συγκεκριμένα του HIF-1α μετατοπίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό σε γλυκόλυση και όχι σε μιτοχονδριακή αναπνοή, μειώνοντας έτσι την γέννηση ROS [40]. Επιπλέον η υποξία μειώνει την ενεργότητα της NADPH οξειδάσης και επομένως

την παραγωγή των ROS. Πρέπει να σημειωθεί πως ο HIF-1α ενεργοποιείται και από κυτταροκίνες ανεξάρτητες από υποξία, όπως η ιντερλευκίνη 1β και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου α (Tumor Necrosis Factor α-TNFα), υποδηλώνοντας πως οι ROS ενδέχεται να αλλάζουν χωρίς να προηγηθεί υποξική μεταβολή. Καταστάσεις μειωμένης θρέψης και υποξίας επηρεάζουν την μεταβολική ενεργότητα και έτσι την παραγωγή ROS μέσω προγονικών κυττάρων. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως τα κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών συμμετέχουν στην ρύθμιση των επιπέδων των ROS στα βλαστοκύτταρα, με σκοπό να ελέγξουν και να ισορροπήσουν το περιεχόμενο τους στα προγονικά κύτταρα. Τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα έχει φανεί πως εισάγουν ROS από τα βλαστικά στα στρωματικά κύτταρα μέσω δεσμών κονεξίνης, με αποτέλεσμα να την μείωση των ROS στα προγονικά κύτταρα. Αυτό φάνηκε σε δεσμούς κονεξίνης-43, οι οποίοι φάνηκε να έχουν υψηλή έκφραση στα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα [41,42]. Επιπλέον, η προσταγλανδίνη E2 η οποία εκκρίνεται από μακροφάγα, διατηρεί χαμηλά επίπεδα ROS στα βλαστοκύτταρα αναστέλλοντας την φωσφορυλίωση του AKT [43]. Συμπερασματικά, τα υποστηρικτικά κύτταρα που έρχονται σε επαφή με τα προγονικά κύτταρα μειώνουν τα επίπεδα των ROS στα βλαστοκύτταρα, εξασθενώντας έτσι τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, τα οποία με την σειρά τους θα οδηγούσαν σε εξάντληση των βλαστοκυττάρων. Από την άλλη, τα προγονικά κύτταρα από μόνα τους έχουν την δυνατότητα να αντιμετωπίζουν τις καταστάσεις υποξίας μέσω διάφορων ενδογενών μηχανισμών.

2.2 Ενδογενείς κυτταρικοί παράγοντες που καθορίζουν τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα

Τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα μπορούν να διακριθούν σε κύτταρα με μικρή ή μεγάλη αναδιπλασιαστική ικανότητα, αναλόγως της ποσότητας των ROS που περιέχουν. Τα προγονικά κύτταρα με χαμηλά επίπεδα ROS έχουν μεγαλύτερη αναδιπλασιαστική ικανότητα, σε σύγκριση με αντίστοιχα κύτταρα υψηλής περιεκτικότητας σε ROS. Τα τελευταία μάλιστα εμφανίζουν μία προτίμηση διαφοροποίησης σε μυελοειδή κύτταρα. Επιπλέον τα επίπεδα των ROS είναι δυναμικά μεταβαλλόμενα και άρα τα βλαστοκύτταρα ενδέχεται να αλλάξουν από υψηλής περιεκτικότητας σε ROS προς χαμηλής περιεκτικότητας σε ROS και αντίστροφα, τροποποιώντας έτσι τον φαινότυπο και την λειτουργία τους αναλόγως [14]. Αυτό σημαίνει ότι περιορισμός των ROS in vivo, παρεμποδίζει την εξάντληση των κυττάρων αυτών.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που ρυθμίζουν τα επίπεδα των ROS στα ανώριμα κύτταρα. Ένας παράγοντας πολύ σημαντικός για την διατήρηση των βλαστοκυττάρων είναι ο HIF-1α (Hypoxia Inducible Factor-1α). Αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζεται αρνητικά από την παρουσία οξυγόνου και θετικά από την παρουσία κυτταροκινών και χυμοκινών, οι οποίες παίζουν ρόλο στην διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των βλαστοκυττάρων [44]. Ο HIF-1α από μόνος του, μειώνει τα επίπεδα των ROS ενδοκυττάρια [45]. Σταθεροποιείται στα βλαστοκύτταρα σε καταστάσεις σταθερότητας και είναι καταλυτικός για την μακροχρόνια αναδιπλασιαστική τους ικανότητα και για την πρόληψη της γήρανσής τους και του θανάτου τους. Χωρίς τον HIF-1α τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα χάνουν την ικανότητα ρύθμισης των ROS, των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται, με αποτέλεσμα να χάνουν τις ιδιότητες της ηρεμίας και της μεγάλης αναδιπλασιαστικής τους ικανότητας. Βέβαια, μεγάλη σταθεροποίηση του HIF-1α οδηγεί σε μειωμένη ανασύσταση και λειτουργικότητα των βλαστοκυττάρων [46,47].

Σε σταθερές συνθήκες, το γονίδιο ATM που δρα προστατευτικά σε βλάβες DNA επαγόμενες από στρες, είναι απαραίτητο για να διατηρήσει την αυτοανανέωση και την ηρεμία των βλαστοκυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται περιορίζοντας τις ROS στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και άρα παρεμποδίζοντας την γήρανσή τους. Η γήρανση των κυττάρων αυτών διαφορετικά θα προερχόταν από την ενεργοποίηση του γονιδίου p16/ρετινοβλαστώματος μέσω ROS [35].

Σηματοδοτικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένης και της πρωτεΐνης FoxO3a απαιτούνται για να διατηρηθούν χαμηλά τα επίπεδα των ROS στα πρόδρομα κύτταρα και άρα να μην εξαντληθούν. Ο FoxO3a αναστέλλει τον AKT, ο οποίος όπως και ο mTOR έχει φανεί πως ενεργοποιεί τον παράγοντα διέγερσης των κοκκιοκυττάρων G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) στα βλαστικά κύτταρα μέσω ROS [48,49]. Ο mTOR επάγει αύξηση των ROS στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, η οποία προκαλεί κινητοποίηση των βλαστοκυττάρων [50]. Επίσης ο FoxO3 έχει φανεί πως προκαλεί αυτοφαγία στα βλαστοκύτταρα [51,52]. Η αυτοφαγία αποτελεί μία διαδικασία του ίδιου του κυττάρου κατά την οποία τα κύτταρα αποδομούν και ανακυκλώνουν μακρομόρια και οργανίδια και τα παραδίδουν στα λυσοσώματα. Η αυτοφαγία προστατεύει τα κύτταρα από κακοήθη εξαλλαγή, προλαμβάνοντας βλάβες εξαιτίας μεταβολικού στρες όταν ανεπαρκούν τα θρεπτικά συστατικά. Αυτό επιτυγχάνεται με απομάκρυνση τοξικών πρωτεϊνών και κατεστραμμένων μιτοχονδρίων, τα οποία αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ROS. Η αυτοφαγία βασίζεται σε οξειδωτικές συνθήκες και διεγείρεται από τις ROS. Έλλειψη θρεπτικών συστατικών ενεργοποιεί τον PI3K, ο οποίος με την σειρά του προκαλεί λιπιδίωση του Atg8-γεγονός

απαραίτητο για την αυτοφαγία. Η λιπιδίωση του Atg8 ενισχύεται περαιτέρω από την συσσώρευση των ROS, η οποία αναστέλλει τον Atg4. Η ενέργεια αυτή επίσης είναι απαραίτητη διότι ο ενεργός Atg4 προκαλεί απολιπιδίωση του Atg8 [53]. Έλλειψη αυτοφαγίας προκαλούμενη από απαλοιφή του Atg7 σε ποντίκια, οδήγησε σε συσσώρευση προγονικών κυττάρων με πολλά μιτοχόνδρια, με συνέπεια την αύξηση των ROS στα διαφοροποιήτα κύτταρα και τελικά την εξάπλωση των πρόδρομων πληθυσμών στον μυελό των οστών με τρόπο που προσομοιάζει στην οξεία μυελογενή λευχαιμία [51].

3. Η απόκριση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων στην βλάβη του DNA και ο σπουδαίος ρόλος της ρύθμισης των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην διατήρηση της χρωμοσωμικής σταθερότητας

Η βλάβη του DNA παίζει μεγάλο ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου, στη γήρανση και στη δυσλειτουργία των βλαστοκυττάρων [54]. Το DNA οφείλει να παραμείνει σταθερό σε όλη την διάρκεια ζωής του κυττάρου, παρ'όλη την βλάβη που έχει συσσωρεύσει. Το γεγονός αυτό καθιστά τα κύτταρα ιδιαίτερα ευάλωτα στην βλάβη του DNA. Επιπλέον, το DNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε διάφορες αυτόματες χημικές αντιδράσεις μέσα στο κύτταρο και στα παραπροϊόντα που δημιουργούνται, δηλαδή στις ROS που προκαλούν οξείδωση των βάσεων και θραύση της διπλής αλυσίδας του DNA, αλλά και σε εξωτερικούς παράγοντες όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία και τα χημικά [55,56]. Μεταλλάξεις του DNA μπορεί να συσσωρευτούν λόγω λαθών κατά την διάρκεια της αντιγραφής των διαιρούμενων κυττάρων. Αθροιστικά ένα κύτταρο μπορεί να υποστεί πάνω από 10^5 βλάβες στο DNA του καθημερινά [57].

Το φαινόμενο της συσσώρευσης βλαβών στο DNA μπορεί να πάρει μεγάλες διαστάσεις στα βλαστοκύτταρα, δεδομένης της μακροζωίας τους. Επιπλέον η ικανότητα των βλαστοκυττάρων να αυτοανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε πρόδρομα κύτταρα, επιτρέπει στην βλάβη να διαιωνίζεται μέσω των βλαστοκυττάρων και στα σωματικά κύτταρα, επηρεάζοντας έτσι ολόκληρο τον ιστό. Δυσλειτουργία των βλαστοκυττάρων προκύπτει είτε από βλάβη που επηρεάζει την αυτοανανέωση και την διαφοροποίησή τους ή από βλάβη τόσο σοβαρή που θα προκαλέσει απευθείας γήρανση και απόπτωσή τους [58].

Η αναγνώριση της βλάβης του χρωμοσώματος αποτελεί το αρχικό βήμα στη σηματοδότηση της απόκρισης της επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA [59]. Στην περίπτωση θραύσης της διπλής έλικας του DNA, η βλάβη αναγνωρίζεται από την πολυμεράση PARP (polyADP-ribosepolymerase), από τα γονίδια Ku70/Ku80 και MRN (Mre11-Rad50-Nbs1). Μόλις αναγνωριστεί η βλάβη παρουσιάζονται η πρωτεΐνη ATM και μία πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το ATR και πυροδοτούν φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση ενός καταρράκτη επιδιορθωτικών ενζύμων. Η ATM φωσφορυλιώνει μία σειρά από πρωτεΐνες ειδοποιώντας έτσι το κύτταρο πως υπάρχει θραύση της διπλής έλικας, ενώ η ATR πρωτεΐνη φωσφορυλιώνει λιγότερες πρωτεΐνες και εμπλέκεται στην διατήρηση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών από την ATM [60]. Επιπλέον, η ATM παίζει ρόλο στην καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου και στην πορεία που θα ακολουθήσει το κύτταρο αφού υποστεί βλάβη στο DNA. Μελέτες σχετικές με το πως η ATM εμπλέκεται σε αυτήν την πορεία αποκάλυψαν

πως και οι ROS αποτελούν σημαντικό κομμάτι της πορείας αυτής. Φάνηκε σε ποντίκια πως δυσλειτουργία της ATM οδηγεί σε απορρύθμιση της ομοιοστασίας των ROS [61]. Επίσης υπάρχουν δεδομένα που μιλούν για ενεργοποίηση του γονιδίου ATM από οξειδωτικό στρες μέσω της διαδικασίας επιδιόρθωσης βλάβης DNA [62,63]. Δηλαδή συμπεραίνουμε πως οι ROS δρουν σαν ενεργοποιητής του ATM, αλλά και σαν μεσολαβητής της δράσης του.

Το γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 συμμετέχει επίσης στο μονοπάτι της απόκρισης για την επιδιόρθωση της βλάβης του DNA. Το γονίδιο αυτό επάγει την επιδιόρθωση της βλάβης είτε μέσω παύσης του κυτταρικού κύκλου όταν η βλάβη είναι επιδιορθώσιμη, είτε επάγοντας την απόπτωση ή την γήρανση όταν η βλάβη είναι πολύ σοβαρή [64-66]. Αν και φυσιολογικά τα αντίγραφα του p53 είναι αυξημένα στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, όταν τα κύτταρα δεν υφίστανται στρες η πρωτεΐνη p53 ουβικουιτινιλιώνεται από την E3 λιγάση και αποδομείται στο πρωτεάσωμα [67-69]. Παρόλα αυτά, μικρή δράση του p53 θεωρείται πλέον απαραίτητη για την διατήρηση της λειτουργικότητας των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα ποντικών με κανένα αντίγραφο p53 φάνηκε να έχουν μειωμένη αναδιπλασιαστική ικανότητα και αύξηση του αριθμού τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα βλαστοκύτταρα αυτά έμπαιναν μεν στον κυτταρικό κύκλο αλλά με μικρή αναδιπλασιαστική ικανότητα αδυνατούσαν να διατηρήσουν την διαδικασία της αιμοποίησης [70-72]. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι τα χαμηλά επίπεδα p53 μειώνουν τις τιμές των ROS και άρα το κυτταρικό στρες, γεγονός ελαφρώς παράδοξο δεδομένης της προ-οξειδωτικής δράσης του p53 όταν επάγει την απόπτωση [73].

Συμπεραίνουμε λοιπόν πως οι ROS πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα ώστε να προλαμβάνεται η ιστική καταστροφή αλλά και για την διατήρηση της αυτοανανέωσης των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Μικρές τιμές ROS επιτρέπουν στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα να βγουν από την κατάσταση ηρεμίας. Όταν οι ROS είναι πολύ αυξημένες, όπως σε σοβαρή βλάβη του DNA και μεγάλη παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια, η έξοδος από την ηρεμία οδηγεί σε προοδευτική απώλεια της λειτουργικότητας των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων.

4. Η δράση της P38 MAPK στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα

Η P38 MAPK είναι μία κινάση που εμπλέκεται στην ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένων της παύσης του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και της γήρανσης. Ενεργοποιείται σε κυτταρικό στρες όπως σε παρουσία ROS, υπερϊώδους ακτινοβολίας, ιονίζουσας ακτινοβολίας και φλεγμονωδών κυτταροκινών. Αναστολή της P38 MAPK προστατεύει τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα από την διαταραχή της ηρεμίας και της ικανότητας αυτοανανέωσης που επάγουν οι ROS. Σε πειράματα με σειρές αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων φάνηκε πως παρατεταμένη θεραπεία με αναστολέα της P38 MAPK παρατείνει τον χρόνο ζωής των κυττάρων [13]. Σε ανθρώπους, θεραπεία με αναστολέα P38 MAPK, όπως οι SB203580 και SCIO-469, αποκαθιστά την αιμοποίηση σε ασθενείς με απλαστική αναιμία ή με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS) *in vitro* [74,75]

Έκθεση ποντικών σε μεγάλη δόση ιονίζουσας ακτινοβολίας (6.5Gy) βλάπτει τα διαμερίσματα των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, τα οποία ως επακόλουθο αυξάνουν κυτταρικούς βιοδείκτες γήρανσης [76]. Κάτι τέτοιο υποδηλώνει πως η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία επάγει την γήρανση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων *in vivo*. Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν η εξάντληση των κυττάρων αυτών οφείλεται σε συσσώρευση των ROS ή στην ενεργοποίηση της P38 MAPK λόγω της βλάβης του DNA.

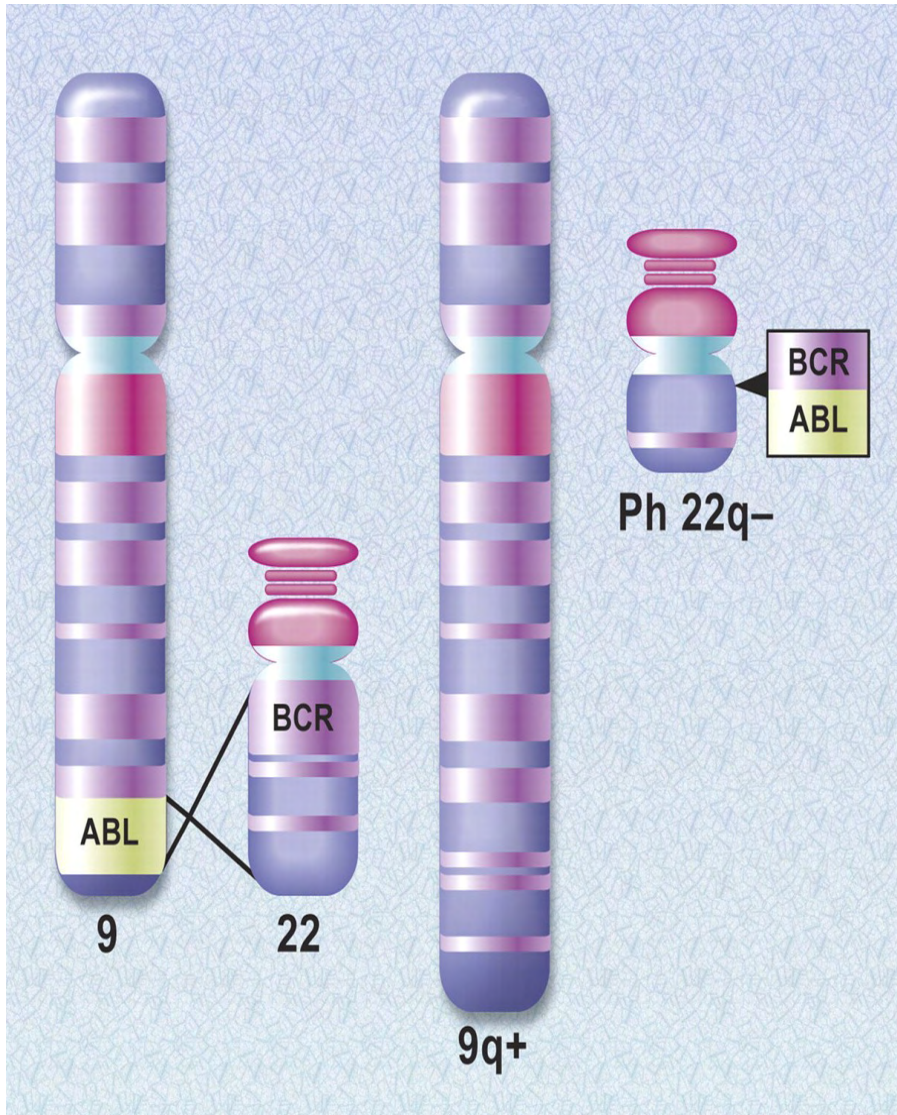
Αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα με ψηλές τιμές ROS εμφανίζουν ελαττωματική ικανότητα αυτοανανέωσης και μεγαλύτερα επίπεδα φωσφορυλίωσης της P38 MAPK συγκριτικά με αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα με χαμηλές τιμές ROS. Θεραπεία με τον αναστολέα της P38 MAPK, SB203580, αποκαθιστά την δράση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων που έχουν ψηλές τιμές ROS. Αντίθετα, θεραπεία με αναστολείς άλλων πρωτεϊνικών κινάσων που εμπλέκονται στο μονοπάτι, δεν φάνηκε να αποκαθιστά την δράση τους [14]. Συνεπώς, η P38 MAPK αποτελεί έναν διαμεσολαβητή που ενεργοποιείται στοχευμένα στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα ως απάντηση στα υψηλά επίπεδα ROS. Κάτι τέτοιο φανερώνει πως ο ενδοκυττάριος έλεγχος των ROS και η σωστή λειτουργία της P38 MAPK είναι ζωτικής σημασίας για την διατήρηση της ικανότητας αυτοανανέωσης των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων.

B. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στις αιματολογικές κακοήθειες

1. Ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία

1.1 Το γονίδιο bcr-abl και η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ) οφείλεται σε αμοιβαία μετάθεση τμημάτων των χρωμοσωμάτων 9 και 22 στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, η οποία οδηγεί μείωση του χρωμοσώματος 22-το γνωστό χρωμόσωμα Philadelphia που περιέχει το χιμαιρικό γονίδιο bcr-abl (Εικόνα 5) [77]. Το προϊόν του γονιδίου αυτού είναι η πρωτεΐνη bcr-abl1 και έχει δράση τυροσινικής κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει πολλούς στόχους συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που εμπλέκονται στον καρκίνο. Η σημαντικότερη δράση της πρωτεΐνης bcr-abl1 θεωρείται η αυξημένη αντίσταση κατά της απόπτωσης που προσφέρει στα κύτταρα [78].



Εικόνα 5: Σχηματικό διάγραμμα της αμοιβαίας μετάθεσης που δημιουργεί το χρωμόσωμα Philadelphia. Τα γονίδια ABL και BCR εδρεύουν στα μακρά σκέλη των χρωμοσωμάτων 9 και 22, αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα της αμοιβαίας μετάθεσης (9;22) προκύπτει το γονίδιο BCR-ABL που βρίσκεται πλέον στο χρωμόσωμα 22 [77].

Παρά το γεγονός ότι οι ROS αυξάνονται σε πολλούς καρκίνους, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί εάν αποτελούν αίτιο ή συνέπεια της ΧΜΛ. Φαίνεται πως μπορούν να συμβούν και τα δύο. Αν ένα κύτταρο εκτεθεί στις ROS προκαλώντας βλάβη σε γονίδιο επιδιόρθωσης του DNA, θα προκύψει αύξηση της πιθανότητας συσσώρευσης βλαβών του DNA στις επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις. Αυτό με την σειρά του θα οδηγήσει σε γονιδιακή αστάθεια και άρα σε μεγαλύτερη πιθανότητα μετάλλαξης ογκοσχετιζόμενου γονιδίου. Από την άλλη, βλάβη της επιδιόρθωσης του DNA οδηγεί σε φτωχότερο έλεγχο των ενδοκυττάρων ROS και έτσι σε αύξησή τους στον καρκίνο παρά το γεγονός ότι οι ROS απουσιάζουν ως αρχικό αίτιο

καρκινογένεσης. Όμως σε συγκεκριμένα είδη καρκίνου το αίτιο των ROS είναι εξαρτώμενο από ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της εκάστοτε κακοήθειας. Αυτό είναι που συμβαίνει και στην ΧΜΛ [79].

Η bcr-abl1 φάνηκε να διεγείρει την παραγωγή ROS σε αιμοποιητικά κύτταρα ποντικών, καθώς το ερέθισμα αυτό σταματούσε με ιματινίμπη, η οποία αποτελεί αναστολέα τυροσινικής κινάσης [80]. Γι' αυτόν το λόγο η bcr-abl1, η οποία αποτελεί την αιτία της ΧΜΛ, επάγει παραγωγή ROS και οξειδωτικό στρες που είναι χαρακτηριστικό πολλών ειδών καρκίνου. Όταν το στρες προερχόταν από υπεροξείδιο του υδρογόνου σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα προέκυπταν πολλά γεγονότα τυπικά για κύτταρα που εκφράζουν την bcr-abl1. Επομένως, η παραπάνω έρευνα φανερώνει δύο πράγματα. Πρώτον, πως η ΧΜΛ μπορεί να ξεκινήσει από σηματοδότηση της bcr-abl1 για πολλαπλασιασμό και αποφυγή απόπτωσης, αλλά η εξέλιξη της νόσου μπορεί να σχετιστεί με οξειδωτικό στρες επαγόμενο από την bcr-abl1. Δεύτερον, η πορεία της ΧΜΛ μπορεί να επηρεαστεί από χημικές ουσίες που ρυθμίζουν τα επίπεδα των ROS, συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών μορίων χαμηλού μοριακού βάρους [79].

Έχει δειχθεί ότι το κατάλοιπο Tyr177 της πρωτεΐνης bcr-abl1 αποτελεί σημαντική ρυθμιστική περιοχή στην παραγωγή ROS από κύτταρα που εκφράζουν την bcr-abl1. Δύο είναι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ενίσχυση της παραγωγής ROS από τα κύτταρα αυτά: η αύξηση στον μεταβολισμό της γλυκόζης και η αυξημένη ενεργότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια [81]. Η συσχέτιση της bcr-abl1 και του μονοπατιού της γλυκόζης φαίνεται στην αναστολή του μεταβολισμού της γλυκόζης, η οποία οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης. Γενικότερα, η αύξηση της παραγωγής ROS σε κύτταρα που εκφράζουν την bcr-abl1 εξαρτάται από το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/mTOR. Μάλιστα, από μόνη της η ενεργοποίηση της PI3K φάνηκε να είναι αρκετή για υπερπαραγωγή ROS σε κύτταρα που εκφράζουν την bcr-abl1. Καθώς η PI3K εμπλέκεται στην πρόσληψη και τον μεταβολισμό της γλυκόζης, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως ο μεταβολισμός της γλυκόζης είναι σημαντικός για την παραγωγή ROS από την bcr-abl1 [79,81]. Αυξημένη παραγωγή ROS που οφείλεται στην bcr-abl1 οδηγεί σε αύξηση της γονιδιωματικής αστάθειας σε κύτταρα της ΧΜΛ, γεγονός που συνήθως μεταφράζεται ως απόρροια της ικανότητας του γονιδίου bcr-abl1 να προκαλέσει γονιδιωματική αστάθεια ανεξάρτητα από την λευχαιμογένεση που αυτό προκαλεί. Παρόλα αυτά κάτι τέτοιο δεν ισχύει πάντοτε καθώς πρώτον περιορίζεται στην έναρξη της νόσου και δεύτερον, η γονιδιωματική αστάθεια και η σχετιζόμενη με αυτή μεταλλαξιγένεση μπορεί να αποδοθεί και στην εξέλιξη της νόσου της ΧΜΛ [79,82].

Έχουν περιγραφεί δύο θεωρίες γονιδιωματικής αστάθειας προκαλούμενης από το γονίδιο bcr-abl1. Η μία μιλά για εμπλοκή του bcr-abl1 στην επιδιόρθωση του DNA. Ενώ η δεύτερη θεωρία υποστηρίζει πως το bcr-abl1 επάγει τόσες πολλές μεταλλάξεις που ξεπερνούν την επιδιορθωτική ικανότητα των κυττάρων [83].

Η συσχέτιση ανάμεσα στις ROS, η παραγωγή των οποίων διεγείρεται από το bcr-abl1 και τη μεταλλαξιγένεση θεωρείται μερικές φορές ως πηγή τροφοδότησης: το bcr-abl1 αυξάνει την επέκταση των ROS που με τη σειρά τους επιτίθενται στο γονίδιο, επάγοντας μεταλλάξεις. Το μεταλλαγμένο bcr-abl1 παράγει περισσότερες ROS, οδηγώντας σε αυτομεταλλαξιγένεση και αστάθεια στη γενωμική σταθερότητα. Κατά συνέπεια, αυτός ο αυτοτροφοδοτούμενος κύκλος μπορεί να θεωρηθεί ως ένας φαύλος κύκλος που οδηγεί σε απόπτωση των κυττάρων που εκφράζουν το bcr-abl1. Επειδή προφανώς αυτή η θεώρηση είναι δύσκολο να ισχύει, θα πρέπει να υπάρχει κάποιος μηχανισμός ελέγχου αυτής της αυτομεταλλαξιγένεσης και της επίδρασης της στη γενωμική σταθερότητα. Έχει δειχτεί ότι το bcr-abl1 ρυθμίζει την επιδιόρθωση του DNA και αυτή η ρύθμιση εκφράζεται σαν αύξηση της αποτελεσματικότητας της επιδιόρθωσης του DNA, συμπεριλαμβανομένης της αποτελεσματικότητας της απομάκρυνσης οξειδωτικών βλαβών του DNA [84-90]. Αυτή η ρύθμιση της επιδιόρθωσης του DNA μέσω bcr-abl1 μπορεί να επηρεάζει την αυτομεταλλαξιγένεση που προκαλείται από τις ROS, με τέτοιο τρόπο που να την προσαρμόζει σε βαθμό ικανό να διεγείρει την καρκινική μετάλλαξη των κυττάρων της ΧΜΛ. Αυτή η διέγερση γίνεται κάτω από συγκεκριμένο ουδό, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει ανεκτή από το κύτταρο οδηγώντας στην απόπτωσή του. Αυτή η κατάσταση περιπλέκεται ακόμα περισσότερο αν αναλογιστεί κανείς ότι η επιπρόσθετη επιδιόρθωση του DNA που ενεργοποιείται από το bcr-abl1 μπορεί να μην είναι πιστή και να οδηγεί σε αύξηση της μεταλλαξιγένεσης στα κύτταρα που εκφράζουν το bcr-abl1, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου bcr-abl1 καθαυτού [89,90]. Ωστόσο, η περιγραφή αυτή παριστά μάλλον μια γενική θεώρηση και περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την πλήρη αποσαφήνιση του προβλήματος, που θα μπορούσε να αποβεί σημαντικό για τη θεραπεία της ΧΜΛ σε ασθενείς με νόσο ανθεκτική στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης. Παρ' όλα αυτά, αυτό φαίνεται να παραμένει ένα άλυτο πρόβλημα θεωρώντας τον πληθυσμό των κυττάρων της ΧΜΛ ως ομοιογενή. Θα πρέπει λοιπόν να εξεταστεί πιο προσεκτικά η ενδογενής ετερογένεια των κυττάρων της ΧΜΛ.

1.2 Η σχέση των ROS με τα κύτταρα της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Σύμφωνα με τη θεωρία των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου, ο καρκίνος εξαρτάται από ένα μικρό πληθυσμό «καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Cancer Stem Cells)» που είναι υπεύθυνος για τη συντήρηση του καρκίνου, ιδιαίτερα σε αντίξοες συνθήκες για την ανάπτυξη του, όπως κατά την παρουσία ενός αντικαρκινικού φαρμάκου στο άμεσο περιβάλλον του. Είναι γενικά παραδεκτό ότι τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν την ρίζα της ΧΜΛ, αλλά δεν έχει επιτευχθεί ακόμη ακριβής ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός τους [91]. Τα καρκινικά κύτταρα της ΧΜΛ θεωρείται ότι ανήκουν σε $Lin^-CD34^+CD38^-$ πληθυσμό, ενώ τα πρόδρομα κύτταρα της ΧΜΛ χαρακτηρίζονται από $Lin^-CD34^+CD38^+$ φαινότυπο. Τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα μπορεί να είναι υπεύθυνα για την έναρξη και συντήρηση της νόσου, ενώ τα πρόδρομα κύτταρα για την περαιτέρω ανάπτυξή της. Σε ό,τι αφορά τη γενική θεραπευτική στρατηγική της θεραπείας της ΧΜΛ, σημαντική είναι η γνώση ότι οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης στοχοποιούν κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ενεργής διαίρεσης, ενώ τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα βρίσκονται συνήθως σε ηρεμία. Τόσο τα καρκινικά βλαστοκύτταρα όσο και τα πρόδρομα κύτταρα της ΧΜΛ εμφανίζουν αυξημένο αριθμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου, ανεξάρτητα από τη θεραπεία με αναστολέα τυροσινικής κινάσης ATK [92-95]. Η P13K εμπλέκεται στην αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου από τα κύτταρα που εκφράζουν το bcr-abl1. Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο RAC2, το οποίο επηρεάζει την P13K, θα μπορούσε να ευθύνεται για την αύξηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα βλαστικά και πρόδρομα καρκινικά κύτταρα, μεταβάλλοντας τη ροή ιόντων από το αναπνευστικό σύμπλεγμα III [94].

Έχει επίσης δειχθεί, ότι η ενεργοποίηση της AKT πρωτεΐνης, ένας παράγοντας κλειδί στη σηματοδότηση της βλάβης του DNA, πιθανόν να αναστέλλεται από τα κύτταρα που εκφράζουν bcr-abl1 [81]. Αναστολή της ενεργοποίησης της AKT παρατηρήθηκε σε καρκινικά βλαστοκύτταρα και πρόδρομα καρκινικά κύτταρα υπό θεραπεία με ιματινίμη, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα που δεν έλαβαν θεραπεία [92]. Βρέθηκε επίσης ότι η AKT ρυθμίζει την κυτταρική αντίδραση σε οξειδωτικές βλάβες του DNA στα καρκινικά πρόδρομα κύτταρα, αλλά όχι στα καρκινικά βλαστοκύτταρα. Πρόκειται για εύρημα αναπάντεχο, καθώς η AKT κινάση διαδραματίζει καίριο ρόλο στη σηματοδότηση της βλάβης του DNA στα βλαστοκύτταρα, και η στοχοποίηση αυτής της κινάσης αποτελεί θεραπευτική προσέγγιση για την εξάλειψη των πιο πρωτόγονων καρκινικών βλαστοκυττάρων [96].

1.3 Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στην θεραπεία της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας με αναστολείς τυροσινικής κινάσης

Εκτός από τη συμμετοχή τους στην φυσιολογική κυτταρική σηματοδότηση, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να συνεισφέρουν και στην καρκινική κυτταρική μετατροπή που επάγεται από ογκογόνες κινάσες τυροσίνης [97]. Η ιματινίμη και άλλοι αναστολείς τυροσινικής κινάσης μειώνουν τα επίπεδα των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα κύτταρα που είναι θετικά για bcr-abl1 και αυτό το φαινόμενο ενισχύεται περισσότερο από την επίδραση των αναστολέων αυτών με την κινάση, παρά από τη εκκαθαριστική επίδραση τους με το κυτταρικό αντιοξειδωτικό σύστημα. Συνεπώς, η θεραπεία της ΧΜΛ με αναστολείς τυροσινικής κινάσης μπορεί να ενισχυθεί με τη χρήση συστημάτων εκκαθάρισης ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Έχει επίσης δειχτεί ότι η Ν-ακετυλοκυστεΐνη, ένας αναστολέας των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, αυξάνει την απόπτωση που επάγεται από την ιματινίμη στα κύτταρα που είναι θετικά για bcr-abl1, τόσο στα ευαίσθητα όσο και στα κύτταρα που είναι ανθεκτικά σε αυτό το φάρμακο [98]. Αυτή επίδραση σχετίζεται με την παραγωγή νιτρικού οξειδίου που διαμεσολαβείται από τη συνθάση του στο ενδοθήλιο. Αντίθετα, η γλουταθειόνη, ένας «καθαριστής» ελεύθερων ριζών οξυγόνου, μετριάζει κάπως αυτό το φαινόμενο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενίσχυση της δράσης της ιματινίμης από αναστολείς ελεύθερων ριζών οξυγόνου μπορεί να προκύπτει από διαφορετικούς μηχανισμούς εκτός από αυτόν της άμεσης καταστροφής τους.

Οι αναστολείς αποακετυλίωσης των ιστονών (HDACi) επάγουν μια πιο ανοικτή δομή της χρωματίνης, επιτρέποντας ευκολότερη πρόσβαση στις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο. Αποδείχτηκε επίσης ότι ενισχύουν τη θανάτωση των κυττάρων που είναι θετικά για bcr-abl1 από τη KW-2449, έναν αναστολέα τυροσινικής κινάσης που στοχεύει το bcr-abl1 και Src κινάσες, σε κύτταρα ευαίσθητα και μη στην ιματινίμη [99]. Αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με αύξηση της παραγωγής ελεύθερων ριζών οξυγόνου, και αυξημένη έκταση των θραύσεων της διπλής έλικας του DNA, όπως αξιολογείται έμμεσα από την φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX. Παρόμοια αποτελέσματα εξάχθηκαν από τη συνδυασμένη θεραπεία κυττάρων ΧΜΛ με άλλον ένα HDACi, το vorinostat, αλλά και το BI2536, μία επιπλέον κινάση (polo-like kinase 1), ανεξάρτητα από την απόκριση των κυττάρων στην ιματινίμη (ευαίσθητα ή όχι) [100].

Αυτά και άλλα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να συνεισφέρουν στην εξολόθρευση κυττάρων που είναι θετικά για bcr-abl1, πιθανώς μέσω

μηχανισμών σχετιζόμενων με την αύξηση της γενωμικής σταθερότητας σε βαθμό που δεν είναι ανεκτός από το κύτταρο. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να περιλαμβάνουν διάφορες διεργασίες, όπως οι βλάβες του κυττάρου που οφείλονται στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, οι βλάβες στο DNA, η παρέμβαση στα *bcr-abl1* σήματα υπέρ της επιβίωσης και η ρύθμιση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Γίνεται κατανοητό ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να κατέχουν διπλό ρόλο στην πορεία των κυττάρων της ΧΜΛ. Αφενός μπορούν να επάγουν γενωμική αστάθεια και να επιταχύνουν την εξέλιξη της ΧΜΛ, τη σχετιζόμενη με επίκτητη αντοχή στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης και στην απόπτωση. Αφετέρου, μπορούν να συνεισφέρουν στη θανάτωση των κυττάρων της ΧΜΛ. Υπάρχει δηλαδή μια λεπτή ισορροπία ανάμεσα σε κακοήθη και «αντικακοήθη» επίδραση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα κύτταρα της ΧΜΛ. Συμπερασματικά, η χρήση εκκαθαριστών ελεύθερων ριζών οξυγόνου σε συνδυασμό με αναστολείς τυροσινικής κινάσης και άλλους παράγοντες που διαμεσολαβούν στην εξολόθρευση των κυττάρων της ΧΜΛ, θα πρέπει να γίνεται με σύνεση για την αποφυγή ανεπιθύμητων ενεργειών [79].

Η θεραπεία της ΧΜΛ με βάση την ιματινίμη μπορεί να συμπληρωθεί από χημικούς παράγοντες που αναστέλλουν τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η έκφραση ενός ενζύμου-κλειδί αυτού του συστήματος, του SOD1, φαίνεται να αυξάνεται σε CD34+ υποπληθυσμούς των *bcr-abl1* θετικών για K562 κυτταρικών σειρών, σε σύγκριση με τους εναπομείναντες CD34- υποπληθυσμούς [101]. Η αυξημένη έκφραση αυτού του αντιοξειδωτικού ενζύμου θα μπορούσε να αποδοθεί σε λευχαιμικά καρκινικά βλαστοκύτταρα που θεωρούνται υπεύθυνα για την υποτροπή της νόσου και την αντοχή στην ιματινίμη. Η εκρίζωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων είναι ο πρωταρχικός στόχος της θεραπείας της ΧΜΛ. Παρατηρήθηκε ότι απώλεια της έκφρασης του SOD1 γονιδίου δεν άλλαξε την ανάπτυξη των CD34+ κυττάρων που εκφράζουν *bcr-abl1*, αλλά τα ευαισθητοποίησε στην ιματινίμη [101]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι το NAC, ένας «καθαριστής» ελεύθερων ριζών οξυγόνου, αναστέλλει την αποπτωτική επίδραση της απώλειας έκφρασης του SOD1, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αυξημένη δραστηριότητα του SOD1 θα μπορούσε να σχετίζεται με βλαστικά κύτταρα της ΧΜΛ. Το NAC επίσης αντιστρέφει την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της ΧΜΛ που προκαλείται από την οξειδωτική βλάβη του DNA, η οποία οφείλεται στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου [102].

Η ισορροπία ανάμεσα στην καρκινογόνο και αντικαρκινογόνο δράση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα κύτταρα της ΧΜΛ αποκτά ιδιαίτερη σημασία όταν παρατηρείται αντοχή στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης, καθώς τα κύτταρα που ανθίστανται στην ιματινίμη εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ελεύθερων ριζών σε σύγκριση με τα αντίστοιχα, ευαίσθητα

στην ιματινίμμη κύτταρα. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να σχετίζεται με δράσεις που διαμεσολαβούνται από μιτοχόνδρια, συμπεριλαμβανομένων βλαβών στο μιτοχονδριακό DNA, μιτοχονδριακή ενίσχυση και έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων [103,104].

2. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο και στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

2.1 Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην παθογένεια της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Οι οξείες λευχαιμίες αποτελούν διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, στην οποία τα λευχαιμικά βλαστοκύτταρα αποκτούν μεταλλάξεις που τους παρέχουν ικανότητες αυτοανανέωσης, αυξημένης διαφοροποίησης και πρόκλησης διαταραχών στη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων. Στο αιμοποιητικό σύστημα των φυσιολογικών θηλαστικών οι ROS παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα. Βέβαια τα πρόδρομα μυελοκύτταρα παράγουν σημαντικά υψηλότερες ποσότητες ROS από τα φυσιολογικά λευκοκύτταρα. Τα λευχαιμοκύτταρα υφίστανται ενδογενώς οξειδωτικό στρες και γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο είναι και πιο ευάλωτα σε περαιτέρω στρες. Το να προσπαθούν να εξουδετερώσουν τις ROS τα αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα μέσω *in vivo* διεργασιών, τα καθιστά ελαττωματικά στην διαφοροποίησή τους σε ώριμα κύτταρα. Αντίθετα, αύξηση των επιπέδων ROS σε επίπεδα πάνω από το κανονικό, οδηγεί σε πρόωρη διαφοροποίηση των ώριμων μορφών των αιμοποιητικών κυττάρων όπως έχει φανεί στην δροσόφιλα [105]. Στην προσπάθεια αναγνώρισης των γονιδίων που σχετίζονται με διαφοροποίηση των λευχαιμικών κυττάρων, έχει αναφερθεί έκτοπη υπερέκφραση του *mda-7/IL-24* και της παραλλαγής του με έλλειψη του εξονίου 5. Η υπερέκφραση αυτή προκαλεί παραγωγή ROS πάνω από τα όρια που μπορεί να διαχειριστεί το λευχαιμικό κύτταρο, με αποτέλεσμα την διαφοροποίησή του [106]. Επιπλέον, η αναστολή της ογκοπρωτεΐνης *mucin1-C*, με ROS σχετιζόμενο μηχανισμό, επάγει την διαφοροποίηση των μυελοκυττάρων σε λευχαιμικά κύτταρα και βλάστες [107].

Η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (ΟΜΛ) σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ROS. Η AKT κινάση παραμένει ενεργή στα περισσότερα κύτταρα της νόσου και ακολουθείται από αναστολή της λειτουργίας του FoxO και αύξηση των ROS [108,109]. Φαίνεται δηλαδή πως τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ROS εξαρτώνται από την AKT, η οποία σε συνδυασμό με το γονίδιο FLT3 (Fms Like Tyrosine Kinase 3) ρυθμίζουν την επιβίωση των λευχαιμικών κυττάρων και την αντίσταση που μπορεί αυτά να εμφανίσουν στην χημειοθεραπεία [110].

Κάποια από τα σημαντικότερα ογκογονίδια όπως το *bcr-abl*, το RAS και το *c-myc*, όταν είναι ενεργοποιημένα φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή ROS [111,112].

Το στρες που επάγεται από τις ROS προκαλεί θραύση της διπλής αλυσίδας του DNA και λάθη στην επιδιόρθωση οδηγώντας έτσι σε γονιδιακές αλλαγές και καρκινογένεση. Αλλαγές στην μη ομόλογη σύνδεση άκρων (non homologous end-joining-NHEJ), η οποία αποτελεί μείζον επιδιορθωτικό μονοπάτι της βλάβης αυτής του DNA, οδηγεί σε λανθασμένη επιδιόρθωση και χρωμοσωμικές απαλοιοφές και μεταθέσεις [113]. Γενετική αστάθεια λόγω αυξημένων βλαβών DNA και κακής επιδιόρθωσης απορρέει στη δημιουργία τόσο κληρονομικών, όσο και σποραδικών λευχαιμιών [114].

Η αυξημένη παραγωγή ROS ενισχύει τη ρυθμιστική δράση των ογκοπρωτεϊνών. Έχει φανεί πως ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του υποδοχέα του γονιδίου FLT3, οι οποίες μάλιστα ανευρίσκονται στο 30% των ασθενών με OML, σχετίζονται με φτωχότερη πρόγνωση και επιθετικότερη κλινική συμπεριφορά της νόσου. Μεταλλάξεις του FLT3 μέσω διαδοχικού αναδιπλασιασμού οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ROS στα αντίστοιχα κύτταρα και άρα σε περισσότερες θραύσεις της διπλής έλικας του DNA και σε λάθη επιδιόρθωσης [115]. Εναλλακτικά, τα μόρια των ROS εμπλέκονται δευτερογενώς στον ενδοκυττάριο σηματοδοτικό καταρράκτη, οδηγώντας σε άμεση βλάβη του DNA και αυξάνοντας τον ρυθμό μετάλλαξης στα διαιρούμενα κύτταρα. Τέλος, μελέτες έχουν δείξει πως ενδογενή επίπεδα 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνης, ένα οξειδωμένο νουκλεοσίδιο του DNA, ήταν υψηλότερα σε καρκινικούς ιστούς σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς, γεγονός που υποδηλώνει πως οξειδωτική βλάβη του DNA συμβάλλει στην ανάπτυξη της OML [116].

2.2 Πως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου οδηγούν σε ταχύτερη εκτροπή του Μυελοδυσπλαστικού Συνδρόμου σε Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως μία ομάδα μηχανισμών κυτταρικής ομοιόστασης λειτουργούν μαζί για να ελαττώσουν την κυτταρική βλάβη που προκαλούν οι ROS και να διατηρήσουν την επιβίωση των κυττάρων. Η αυτοφαγία αποτελεί έναν σημαντικό μηχανισμό κυτταρικής ομοιόστασης. Οι ROS και η αυτοφαγία παίζουν σπουδαίο ρόλο στην κυτταρική απόκριση στο στρες και μέσω διάφορων πολύπλοκων μηχανισμών και μορίων [117-121]. Μία ποικιλία παραγόντων όπως η στέρση θρεπτικών υλικών, η υποξία, η ισχαιμία και το κυτταρικό στρες δύνανται να αυξήσουν την ενδοκυττάρια παραγωγή ROS και ως συνέπεια να επάγουν την αυτοφαγία. Η αλληλουχία αυτών των γεγονότων έχει περιγραφεί όχι μόνο στον καρκίνο αλλά και σε μία σειρά άλλων παθήσεων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η καρδιακή ανεπάρκεια και η κυστική

ίνωση [122]. Εκτός των ανωτέρω, μία σειρά εξωγενών ουσιών μπορεί να επάγει την αυτοφαγία, αυξάνοντας τα επίπεδα των ROS. Τα μονοπάτια που εμπλέκονται στην διαδικασία αυτή επηρεάζονται από πάρα πολλούς παράγοντες, όπως ο κυτταρικός τύπος και το πειραματικό περιβάλλον. Μελέτες επίσης έχουν δείξει πως μερικοί τύποι καρκινικών κυττάρων όπως του καρκίνου του μαστού, του ηπατοκυτταρικού καρκίνου, του καρκίνου του στομάχου, του ορθοσιγμοειδούς και του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας κατέχουν υψηλότερη δραστηριότητα αυτοφαγίας [123-126]. Τα καρκινικά κύτταρα συνήθως κατοικούν σε περιβάλλον υποξίας με στέρηση θρεπτικών συστατικών. Η αυτοφαγία φαίνεται να αποτελεί σημαντικό μηχανισμό επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων, η οποία μέσω του κατακερματισμού των ενδοκυττάρων οργανιδίων και πρωτεϊνών παρέχει ενέργεια και θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Ακόμη, η αυτοφαγία έχει την ικανότητα να απομακρύνει ή να επιδιορθώσει DNA που έχει υποστεί βλάβη από τις ROS, μειώνοντας την κυτταρική τοξικότητα και έτσι προστατεύοντας τα κύτταρα [126-128]. Ωστόσο, η αυτοφαγία μπορεί να αποτύχει να απομακρύνει την περίσσεια των ROS όταν τα επίπεδά τους υπερβαίνουν την αυτοφαγική ικανότητα, οδηγώντας σε υπερβολική αυτοφαγία και αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο [129].

Είναι γνωστό πως τα μιτοχόνδρια αποτελούν το κυριότερο οργανίδιο παραγωγής και αποδόμησης ROS. Είναι όμως και πολύ ευαίσθητα σε βλάβη οφειλόμενη στις ROS. Ανώμαλα μιτοχόνδρια όπως για παράδειγμα αυξημένος αριθμός τους με ανώμαλη μορφολογία και κατεστραμμένη μήτρα, έχουν παρατηρηθεί και σε λευχαιμικά κύτταρα [130]. Γι' αυτόν ακριβώς τον λόγο θεωρείται πως τα χαρακτηριστικά υπεροξειδίου του οξυγόνου που έχουν τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στην λευχαιμογένεση [131].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το Μυελοδυσπλαστικό Σύνδρομο (Myelo Dysplastic Syndrome-MDS) είναι μία αιματολογική ασθένεια που οφείλεται σε ανώμαλο πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου. Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών με MDS εν τέλει θα αναπτύξουν OMA. Φαίνεται πως αυξημένα επίπεδα ROS σε συνδυασμό με μιτοχονδριακή βλάβη, ανιχνεύονται σε μονοπύρηνια κύτταρα του μυελού των οστών σε ασθενείς με MDS [132]. Ποσοτική ανάλυση μιτοχονδριακού DNA σε περιφερικό αίμα ασθενών με OMA σε σύγκριση με υγιή πληθυσμό ανέδειξε ύπαρξη του σε μεγαλύτερα ποσοστά στους πάσχοντες από OMA. Το γεγονός αυτό υπέδειξε πως το ελάττωμα της μιτοχονδριακής αυτοφαγίας ενδέχεται να υπάρχει λευχαιμικά κύτταρα, οδηγώντας σε αύξηση στον αριθμό των μιτοχονδρίων και επίσης πως ενδέχεται εμπλέκεται στην ανάπτυξη της OMA [133]. Άλλη μία μελέτη αναφέρει πως η μιτοφαγική δραστηριότητα στα πρόδρομα ερυθροκύτταρα είναι σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με

MDS αυξημένου κινδύνου για ανάπτυξη OMA, σε σύγκριση με ασθενείς με MDS μειωμένου κινδύνου για ανάπτυξη OMA. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει πως η μιτοφαγία αποτελεί σημαντικό προστατευτικό μηχανισμό ενάντια στην αποικοδόμηση των ανώμαλων μιτοχονδρίων και στην αναστολή συσσώρευσης ROS στα κύτταρα [134]. Τέλος με βάση όλα τα παραπάνω και την θεωρία που φαίνεται να υποστηρίζεται ολοένα και περισσότερο, ότι δηλαδή υψηλά κυτταρικά επίπεδα ROS προκαλούν βλάβη στο DNA και αυξάνουν το ρίσκο ανάπτυξης OMA, μπορεί κανείς να συμπεράνει πως η αυτοφαγία είναι μηχανισμός πρόληψης εκτροπής του MDS σε OMA [135].

2.3 Ο ρόλος του NRF-2 στην θεραπεία της Οξείας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Η θεραπεία πρώτης γραμμής στην OMA (με εξαίρεση τον υπότυπο M3) περιλαμβάνει το συνδυασμό κυταραβίνης και νταουνορουμπικίνης. Αν και στο 70-85% των ασθενών επιτυγχάνεται αρχικά ύφεση με την εισαγωγική αυτή θεραπεία, η πενταετής συνολική επιβίωση είναι μόνο 30-40%. Το σημαντικότερο αίτιο αυτής της αποτυχίας της θεραπείας είναι η αντίσταση που εμφανίζει η νόσος στα φάρμακα [136]. Επιπλέον, φαινόμενα τοξικότητας στα παραπάνω φάρμακα περιορίζουν την επιτυχή θεραπεία σε ασθενείς με OMA και προϋπάρχουσα συννοσηρότητα [137]. Τέλος, θάνατοι σχετιζόμενοι με την θεραπεία αναφέρονται σε πάνω από το 30% των μεγαλύτερων σε ηλικία ασθενών με OMA που λαμβάνουν την παραπάνω θεραπεία εφόδου.

Μερικοί από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλουν στην αντίσταση στην φαρμακευτική αγωγή στην OMA περιλαμβάνουν την ανθεκτικότητα των λευχαιμικών κυττάρων, την διαταραχή της έκφρασης των μεταφορέων των φαρμάκων, τη διαταραχή των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και την αύξηση των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών [138-141]. Η στόχευση αυτών των μονοπατιών φαίνεται να είναι μία αποτελεσματική στρατηγική για την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων [142]. Η συνεχής έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF-2 (NF-E2 Related Factor 2), του μεγαλύτερου ρυθμιστή των αντιοξειδωτικών μονοπατιών που εμπλέκεται στον καθαρισμό και την αποτοξίνωση των ROS, οδηγεί στην αντίσταση στην χημειοθεραπεία [143-145]. Η υπερέκφραση του NRF-2 προκύπτει είτε από μεταλλάξεις ή επιγενετικές τροποποιήσεις στην KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) με την οποία προσδένεται, από μεταγραφική ενεργοποίησή του από τα ογκογονίδια RAS και c-myc ή από φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της

ουβικιτινιλίωσης του [146-148]. Το brutasol, εκχύλισμα του φυτού *bruceajavanica*, βρέθηκε πρόσφατα πως έχει πιθανή ανασταλτική δράση στα επίπεδα της NRF-2, ενισχύοντας την ουβικιτινιλίωσή της με τρόπο ανεξάρτητο από την KEAP1 [149].

Από πρόσφατη έρευνα, η οποία μελέτησε την εμπλοκή της NRF-2 στην ανθεκτικότητα της ΟΜΛ στην θεραπεία με κυταραβίνη και νταουνορουμπικίνη καθώς και το ενδεχόμενο φαρμακευτικής αναστολής της NRF-2 με brutasol, προέκυψαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Τα δείγματα που ελήφθησαν ήταν από ασθενείς με *de novo* εμφάνιση ΟΜΛ (με εξαίρεση του υπότυπου M3). Έγινε σύγκριση της έκφρασης του RNA του NRF-2 σε κύτταρα πρωτοπαθούς ΟΜΛ και σε αντίστοιχα *in vitro* κύτταρα που εκτέθηκαν σε κυταραβίνη και νταουνορουμπικίνη. Τα αποτελέσματα λοιπόν έδειξαν πως υψηλή έκφραση του NRF-2 σχετίζεται με ανθεκτικότητα στην θεραπεία με τους παραπάνω χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και στις δύο ομάδες. Επιπλέον, εφόσον μεταλλάξεις της KEAP1 φαίνεται να προκαλούν θετική ρύθμιση του NRF-2, εξετάστηκε η παρουσία μετάλλαξης της (εξόνια 2 και 6) στις μελετώμενες κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα δεν ανέδειξαν κάποια μετάλλαξη της KEAP1, υποδηλώνοντας πως η υπερέκφραση του NRF-2 είναι ανεξάρτητη μεταλλάξεων αλλά και της έκφρασής της [150].

Συμπληρωματικό αποτέλεσμα της παραπάνω μελέτης αποτελεί το γεγονός πως διακοπή της έκφρασης του NRF-2 καθιστά τις κυτταρικές σειρές της ΟΜΛ πιο ευαίσθητες στην θεραπεία με νταουνορουμπικίνη, μειώνοντας την ικανότητα απομάκρυνσης των ROS. Τέλος, φάνηκε πως φαρμακευτική αναστολή του NRF-2 με brutasol μειώνει τα επίπεδα έκφρασής του και επάγει την απόπτωση των κυττάρων με ΟΜΛ [150].

3. Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα Μυελοϋπερπλαστικά Νοσήματα

3.1 Η JAK2 κινάση και η σχέση της με τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στα Μυελοϋπερπλαστικά Νοσήματα

Τα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα είναι επίκτητες κλωνικές διαταραχές του αιμοποιητικού βλαστοκυττάρου και χαρακτηρίζονται από υπερπλασία ενός ή περισσότερων μυελικών σειρών. Όπως έχει αναφερθεί, τα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα αποτελούν η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, η ιδιοπαθής θρομβοκυττάρωση, η αληθής πολυκυτταραιμία και η πρωτοπαθής μυελοϊνωση. Μία μετάλλαξη κέρδους λειτουργίας (gain of function) στο γονίδιο που κωδικοποιεί την τυροσινική κινάση JAK2 αποτελεί καίριο γεγονός για τους περισσότερους ασθενείς που πάσχουν από αληθή πολυκυτταραιμία και περίπου για τους μισούς που πάσχουν από ιδιοπαθή θρομβοκυττάρωση και πρωτοπαθή μυελοϊνωση [151-154]. Η μεταλλαγμένη JAK2 τυροσινική κινάση μεταμορφώνει το αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο, μέσω ενεργοποίησης των μορίων που εμπλέκονται στην μεταγραφή όπως για παράδειγμα της κινάσης της 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης PI3K/AKT. Ο ρόλος της JAK2 κινάσης στην διαμόρφωση του φαινοτύπου των μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων έχει αποδειχθεί σε πολλά πειραματικά μοντέλα ποντικών στα οποία έγινε προσθήκη της λειτουργίας της JAK2 κινάσης. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με έκφραση της JAK2 κινάσης μέσω ενεργοποίησης του ενδογενούς υποκινητή της [155-159]. Στους ανθρώπους, η JAK2 κινάση διπλασιάζεται μέσω μιτωτικού ανασυνδυασμού στην πλειοψηφία των ασθενών με αληθή πολυκυτταραιμία, οδηγώντας έτσι σε ετεροζυγωτία. Πολλά δεδομένα προτείνουν διάφορους μηχανισμούς για το πως μία μόνο μετάλλαξη της JAK2 κινάσης οδηγεί σε τόσο διαφορετικές φαινοτυπικά διαταραχές [155,160,161]. Υπάρχουν βέβαια και άλλες μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί στα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, οι περισσότερες από τις οποίες έχουν να κάνουν με επιγενετική ρύθμιση και μάτισμα του RNA [162-165]. Ενδέχεται να έχουν συνεργική δράση με την JAK2 κινάση, βοηθώντας σε επικράτηση κάποιου κλώνου, τροποποιώντας τον φαινότυπο της ασθένειας ή προωθώντας την λευχαιμική μετατροπή των κυττάρων.

Όπως ακριβώς η ογκογόνος bcr-abl τυροσινική κινάση που σχετίζεται με την χρόνια μυελογενή λευχαιμία και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, έτσι ακριβώς και η JAK2 κινάση, έχει φανεί πως διεγείρει την ενδοκυττάρια παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου σε αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές [166-168]. Επίσης, έχει αποδειχτεί πως η JAK2 κινάση διεγείρει την γενετική αστάθεια μέσω απορρύθμισης του ομόλογου ανασυνδυασμού στην

επιδιόρθωση βλαβών του DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ετεροζυγωτίας της JAK2 κινάσης και αυξημένη μεταλλαξιγένεση [169]. Ενδιαφέρον προκαλεί πρόσφατη μελέτη, η οποία ανέλυσε την επίδραση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην JAK2 κινάση σε ποντίκια στα οποία εξασφαλίστηκε η έκφρασή της (knockin). Φάνηκε λοιπόν πως τα ποντίκια που εκφράζουν την JAK2 κινάση, όταν εκτίθενται σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, αναπτύσσουν ένα σοβαρό σύνδρομο με εικόνα που προσομοιάζει με μυελοϋπερπλαστικό σύνδρομο. Συγκεκριμένα, εμφανίζουν αύξηση του αιματοκρίτη, των αιμοπεταλίων και των λευκών αιμοσφαιρίων σε ηλικία τριών μηνών. Όταν τα επίπεδα ROS συγκρίθηκαν ανάμεσα στα κοινά πρόδρομα μυελικά κύτταρα και μεγακαρυωτικά-ερυθροειδή πρόδρομα κύτταρα, βρέθηκαν πιο αυξημένα στα πιο ανώριμα πρόδρομα κύτταρα παρά στα μεγακαρυωτικά-ερυθροειδή πρόδρομα κύτταρα. Αυτό πιθανώς υποδηλώνει ότι η συσσώρευση των ROS πραγματοποιείται πριν τη δέσμευσή τους στα knockin ποντίκια. Οι ROS αντιδρούν με τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες. Αξιολογώντας την έκταση των οξειδωτικών βλαβών στο DNA σε απόκριση στα αυξημένα επίπεδα ROS στα knockin ποντίκια, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα 8-oxoguanine (ανιχνευτής της πιο κοινής βλάβης DNA λόγω ελεύθερων ριζών οξυγόνου) σε knockin ζώο σε σύγκριση με τα κύτταρα wildtype. Από τη στιγμή που τα θραύσεις της διπλής αλυσίδας του DNA μπορούν να συνδεθούν με ανεπιτυχείς μετά-αντιγραφικές επιδιορθώσεις των ιδιαίτερα μεταλλαξιογενών 8-oxoguanine βλαβών στο DNA, προσδιορίστηκε η ποσότητα των θραύσεων της διπλής αλυσίδας του DNA σε πρόδρομα κύτταρα από το μυελό knockin και wildtype ποντικίων. Φάνηκε πως η συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου-προκαλούμενη από την JAK2 κινάση-in vivo στα knockin ποντίκια ίσως να συνδέεται σε αυξημένες οξειδωτικές βλάβες στο DNA με τελικό αποτέλεσμα την θραύση της διπλής έλικας ή σε στρες της αντιγραφής του DNA [170].

Για τον έλεγχο της πιθανής συνεισφοράς των αυξημένων επιπέδων ελεύθερων ριζών οξυγόνου και των θραύσεων της διπλής αλυσίδας του DNA στον φαινότυπο της ασθένειας στα knockin ποντίκια, δόθηκε in vivo θεραπεία μακράς διάρκειας με το αντιοξειδωτικό NAC (N-Acetyl-Cysteine). Μεταμοσχεύθηκε ένα μείγμα δωρητών κυττάρων μυελού από knockin και wildtype ποντίκια, σε ποντίκια που είχαν λάβει θανατηφόρο δόση ακτινοβολίας. Όλα τα knockin ποντίκια εμβολιασμένα με JAK2 θετικά κύτταρα, επέδειξαν αυξημένες τιμές ερυθρών αιμοσφαιρίων, αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων, σε σύγκριση με τα wildtype ποντίκια, έως και 14 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση [170].

Το NAC φαίνεται να στοχοποιεί με εξειδικευμένο τρόπο τα JAK2- θετικά κύτταρα, μετριάζοντας τον φαινότυπο της νόσου, ο οποίος όπως αναφέρθηκε ομοιάζει με αυτόν της

αληθούς πολυκυτταραιμίας. Το αντιοξειδωτικό NAC επίσης μειώνει τις οξειδωτικές βλάβες του DNA και τα θραύσεις της διπλής αλυσίδας του DNA στα knockin ποντίκια. Υψηλά επίπεδα των θραύσεων αυτών παρατηρήθηκαν στα κύτταρα του μυελού των knockin ποντικών σε σύγκριση με τα wildtype ποντίκια. Η in vivo θεραπεία με NAC μείωσε σημαντικά τα ποσοστά θραύσεων της διπλής έλικας του DNA στα knockin ποντίκια χωρίς να επηρεαστούν τα αντίστοιχα βασικά επίπεδα στα wildtype ποντίκια [170].

3.2 Η απώλεια του FoxO3 οδηγεί στην ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου μυελούπερπλαστικού νοσήματος στα ποντίκια

Υπενθυμίζουμε πως η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων FoxO αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα του οξειδωτικού στρες επάγοντας την έκφραση πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων [36,171]. Οι FoxO1, FoxO3 και FoxO4 εκφράζονται ευρέως ενώ ο FoxO6 εκφράζεται κυρίως στον νευρικό ιστό. Απώλεια έστω και ενός FoxO οδηγεί σε διάφορους φαινοτύπους στα ποντίκια. Συγκεκριμένα η απώλεια της έκφρασης του FoxO3 στα αιμοποιητικά βλαστικά και στα ερυθροειδή κύτταρα οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία τους στο οξειδωτικό στρες [36,172,173]. Οι FoxO επίσης ρυθμίζουν κυτταρικές αποκρίσεις που σχετίζονται με ογκοκατασταλτικές διαδικασίες. Ως απάντηση στο κυτταρικό στρες όπως είναι η βλάβη του DNA ή το οξειδωτικό στρες, οι FoxO προκαλούν παύση του κυτταρικού κύκλου, επιδιόρθωση του DNA ή απόπτωση, ρυθμίζοντας γονίδια που εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες [23,30-32]. Σε μελέτη του 2010 βρέθηκε πως ποντίκια που έχουν απωλέσει τη δυνατότητα έκφρασης του FoxO3 παρουσιάζουν φαινότυπο ενός συγκεκριμένου μυελούπερπλαστικού νοσήματος. Συγκεκριμένα, εμφανίζουν αύξηση των αριθμών των λευκών αιμοσφαιρίων και αύξηση των κυκλοφορούντων ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων, με συνακόλουθη μείωση των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων και ερυθρών αιμοσφαιρίων. Οι ανωμαλίες αυτές του περιφερικού αίματος σχετίζονται με εικόνα μυελούπερπλαστικού νοσήματος. Τα ποντίκια αυτά επιπλέον εμφανίζουν σπληνομεγαλία και εξωμυελική αιμοποίηση. Επακόλουθα, ο μυελός των οστών είναι υποκυτταρικός με μειωμένη παραγωγή ώριμων B κυττάρων και ερυθροειδών κυττάρων. Η ιστοπαθολογική ανάλυση ενισχύει τα παραπάνω ευρήματα, φανερώνοντας αυξημένη εξωμυελική αιμοποίηση με ερυθροειδή και μυελοειδή κύτταρα στον σπλήνα και στο ήπαρ των εξεταζόμενων ποντικών. Όπως είναι αναμενόμενο σε ένα μυελούπερπλαστικό νόσημα, έτσι και εδώ, δηλαδή στα ποντίκια με απώλεια έκφρασης του FoxO3, ο χώρος παραγωγής πρόδρομων

μυελοειδών κυττάρων είναι ιδιαίτερα ενισχυμένος στο μυελό των οστών, στο σπλήνα και στο περιφερικό αίμα [174].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι πλέον παραπάνω από σαφής η σημασία των ROS στην ρύθμιση της αιμοποίησης. Ξέρουμε πια πως χαμηλά επίπεδά τους διατηρούν την ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, ενώ αντίθετα όταν υπάρχουν σε περίσσεια συμβάλουν στην δημιουργία κακοηθειών. Στην πορεία αυτή μεσολαβούν πολλά μόρια, όπως για παράδειγμα μεταγραφικοί παράγοντες και κινάσες, τα οποία την ρυθμίζουν είτε θετικά ή αρνητικά. Έτσι λαμβάνοντας υπόψιν πολλές παράμετρους, οι ROS έχει δειχθεί πως μπορεί να συμβάλουν στην πρόκληση της ΧΜΛ αλλά και στην καταστολή της. Επίσης διαταράσσουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA στην ΟΜΛ, με τον μεταγραφικό παράγοντα NRF-2 να παίζει ρόλο στην αντίσταση της ΟΜΛ στην χημειοθεραπεία. Τέλος, οι ROS με τη συμβολή των JAK κινασών οδηγούν στην ανάπτυξη των μυελοϋπερπλαστικών νοσημάτων (πλην της ΧΜΛ). Με βάση τα παραπάνω, περαιτέρω πειράματα είναι απαραίτητα προκειμένου να μελετήσουν το πως κάποια μόρια όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO, το ATM γονίδιο και ίσως ο παράγοντας HIF-1 θα μπορούσαν να τροποποιηθούν στοχευμένα και να συμβάλουν στην διατήρηση της εύρυθμης παραγωγής και λειτουργικότητας των έμμορφων στοιχείων του αίματος. Μια άλλη ιδιότητα των ROS που θα ήταν χρήσιμο να εκμεταλλευτεί και να μελετήσει κανείς για την καταπολέμηση της ΧΜΛ, είναι η αλληλεπίδρασή τους με τους αναστολείς αποακετυλίωσης της ιστόνης, με στόχο ίσως την θανατηφόρα για τα λευχαιμοκύτταρα αύξηση των ROS. Στο ερευνητικό πεδίο εισάγονται φυσικά τα μιτοχόνδρια, τα οποία όταν κάνουμε λόγο για ROS οφείλουν να είναι πάντα στην συζήτηση, με πρωταγωνιστή την μιτοφαγία και την προστατευτική της δράση έναντι της συσσώρευσης των ROS. Δεδομένων των ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων της μελλοντικής έρευνας πάνω στον τομέα των ROS, θα μπορούσε κανείς να ελπίζει σε θεραπευτικές προτάσεις που θα οδηγήσουν σε μεγάλη αύξηση της συνολικής επιβίωσης των ατόμων που νοσούν από τις παραπάνω αιματολογικές νεοπλασίες και ενδεχομένως σε ορισμένες περιπτώσεις και σε ίαση κάποιων από αυτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Mary and Turgeon. *Clinical Hematology Theory and Procedures*. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005, p 73-79
2. Jon et al. *Pathophysiology of blood disorders*. 2nd Edition. United States: McGraw-Hill Education; 2017, p 291-342
3. Ghaffari (2008), *Antioxid Redox Signal*, 10(11):1923-1940
4. Davies (1995), *BiochemSoc Symp*, 61: 1–31
5. Beckman and Ames (1997), *J Biol Chem*, 272: 19633–19636
6. Olinski et al. (2002), *Free Radic Biol Med*, 33: 192–200
7. Wang (2003), *Dev Cell*, 5: 811–816
8. Rossi et al. (2008), *Cell*, 132: 681–696
9. Trushina et al. (2007), *Neuroscience*, 145: 1233–1248
10. Richardson et al. (2015), *Int J Mol Sci* 16(2):2366-2385
11. Ludin et al. (2014), *Antioxid Redox Signal*, 21(11):1605-1619
12. Harris et al. (2013), *Blood*, 121: 2483–2493
13. Ito et al. (2006), *Nat Med*, 12: 446–451
14. Jang and Sharkis (2007), *Blood*, 110: 3056–3063
15. Owusu-Ansah and Banerje (2009), *Nature*, 461: 537–541
16. Greer and Brunet (2005), *Oncogene*, 24: 7410–7425
17. Lehtinen et al. (2006), *Cell*, 125: 987–1001
18. Lin et al. (1997), *Science* 278: 1319–1322
19. Kops et al. (2002), *Nature* 419: 316–321
20. Nemoto and Finkel (2002), *Science*, 295: 2450–2452
21. Brunet et al. (1999), *Cell*, 96: 857–868
22. Dijkers et al. (2000), *Mol Cell Biol* 20: 9138–9148
23. Ghaffari et al. (2003), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 6523–6528
24. Martinez-Gac et al. (2004), *Mol Cell Biol*, 24: 2181–2189
25. You and Mak (2005), *Cell Cycle*, 4: 37–38
26. Oh et al. (2005), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 4494–4499
27. Wang et al. (2005), *Cell*, 121:115–125
28. Wang et al. (2003), *Dev Cell*, 5: 811–816
29. Tothova et al. (2007), *Cell*, 128: 325–339
30. Marinkovic et al. (2007), *J Clin Invest*, 117: 2133–2144

31. Miyamoto et al. (2007), *Cell Stem Cell*, 1: 101–112
32. Yalcin et al. (2008), *J Biol Chem*, 283(37):25692–25705
33. Barlow et al. (1996), *Cell*, 86: 159–171
34. Kamsler et al. (2001), *Cancer Res*, 61: 1849–1854
35. Ito et al. (2004), *Nature*, 431: 997–1002
36. Tsai et al. (2008), *Nat Cell Biol*, 10: 460–467
37. Calvi et al. (2003), *Nature*, 425: 841–846
38. Zhang et al. (2003), *Nature*, 425:836–841
39. Spencer et al. (2014), *Nature*, 508: 269–273
40. Wheaton and Chandel (2011), *Am J Physiol Cell Physiol*, 300: C385–C393
41. Mendez-Ferrer et al. (2010), *Nature*, 466: 829–834
42. Schajnovitz et al. (2011), *Nat Immunol*, 12: 391–398
43. Ludin et al. (2012), *Nat Immunol*, 13: 1072–1082
44. Westra et al. (2007), *Ann N Y Acad Sci*, 1108:340–348
45. Suda et al. (2011), *Cell Stem Cell*. 9: 298–310
46. Forristal et al. (2013), *Blood*, 121: 759–769
47. Takubo et al. (2010). *Cell Stem Cell*, 7: 391–402
48. Golan et al. (2012), *Blood*, 119: 2478–2488
49. Tesio et al. (2011), *Blood*, 117: 419–428
50. Gan et al. (2008), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 19384–19389
51. Mortensen et al. (2011), *Autophagy*, 7: 1069–1070
52. Warr et al. (2013), *Nature*, 494: 323–327
53. Scherz-Shouval et al. (2007), *EMBO J*, 26: 1749–1760
54. Hanahan and Weinberg (2011), *Cell*, 144:646–674
55. Hoeijmakers (2009), *N Engl J Med*, 361:1475–1485
56. Brnzei and Foiani (2008), *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 297–308
57. Lindahl (1993), *Nature*, 362:709–715
58. Weiss and Ito (2014), *Blood Cells Mol Dis*, 52(1):12–18
59. Ciccia and Elledge (2010), *Mol Cell*, 40: 179–204
60. Barzilai et al. (2002), *DNA Repair (Amst)*, 1: 3–25
61. Kamsler et al. (2001), *Cancer Res*, 61:1849–1854
62. Guo et al. (2010), *Cell Cycle*, 9:4805–4811
63. Guo et al. (2010), *Science*, 330:517–521
64. Fei and El-Deiry (2003), *Oncogene*, 22:5774–5783

65. Vousden and Prives (2009), *Cell*, 137:413–431
66. Vousden and Lane (2007), *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:275–283
67. Haupt et al. (1997), *Nature*, 387:296–299
68. Collavin et al. (2010), *Cell Death Differ*, 17:901–911
69. Forsberg et al. (2005), *PLoS Genet*, 1: e28
70. Liu et al. (2009), *Cell Stem Cell*, 4: 37–48
71. Akala et al. (2008), *Nature*, 453:228–232
72. TeKippe et al. (2003), *Exp Hematol*, 31:521–527
73. Sablina et al. (2005), *Nat Med*, 11:1306–1313
74. Navas et al. (2006), *Blood*, 108: 4170–4177
75. Verma et al. (2002), *J Immunol*, 168: 5984–5988
76. Wang et al. (2006), *Blood*, 107: 358–366
77. Druker (2008), *Blood*, 112: 4808–4817
78. Leber (2011), *Curr Oncol*, 18m: e185–e190
79. Antoszewska-Smith et al. (2017), *Acta Biochim Pol*, 64(1):1-10
80. Sattler et al. (2000), *J Biol Chem*, 275: 24273–24278
81. Kim et al. (2005), *Blood*, 105: 1717–1723
82. Quintas-Cardama and Cortes (2009), *Blood*, 113: 1619–1630
83. Ilaria (2002), *Leuk Res*, 26: 971–973
84. Slupianek et al. (2013), *Leukemia*, 27: 629–634
85. Muvarak et al. (2015), *Mol Cancer Res*, 13: 699–712
86. Nieborowska-Skorska et al. (2006), *Cell Cycle*, 5: 994–1000
87. Somsedikova et al. (2014), *Neoplasma*, 61: 617–625
88. Wang et al. (2014), *PLoS Genet*, 10: e1004414
89. Brady et al. (2003), *Cancer Res*, 63: 1798–1805
90. Takagi et al. (2013), *DNA Repair (Amst)*, 12: 500–507
91. Zhou and Xu (2015), *Protein Cell*, 6: 403–412
92. Nieborowska-Skorska et al. (2014), *Leukemia*, 28: 2416–2418
93. Nieborowska-Skorska et al. (2013), *Leukemia*, 27: 2253–2254
94. Nieborowska-Skorska et al. (2012), *Blood*, 119: 4253–4263
95. Bolton-Gillespie et al. (2013), *Blood*, 121: 4175–4183
96. Shimura et al. (2012), *Oncogenesis*, 1: e12
97. Bourgeois et al. (2013), *JAKSTAT*, 2: e25764
98. Rakshit et al. (2009), *Apoptosis*, 14: 298–308

99. Nguyen et al. (2011), *Clin Cancer Res*, 17: 3219–3232
100. Dasmahapatra et al. (2013), *Clin Cancer Res*, 15: 404–414
101. Liu et al. (2011), *Med Oncol*, 28: 835–839
102. Wu et al. (2015), *PLoS One*, 10: e0123314
103. Blasiak et al. (2016), *Acta Biochim Pol*, 63: 365–370
104. Synowiec et al. (2015), *Biomed Res Int*, 2015: 673512
105. Owusu-Ansah and Banerjee (2009), *Nature*, 461: 537–541
106. Yang et al. (2011), *Mol Cancer Ther*, 10: 615–625
107. Yinet al. (2011), *Blood*, 117: 4863–4870.
108. Tothova and Gilliland (2007), *Cell Stem Cell*, 1: 140 –152
109. Xu et al. (2003), *Blood*, 102: 972–980
110. Zenget al. (2006), *Cancer Res*, 66: 3737–3746
111. Vafa et al. (2002), *Mol Cell*, 9: 1031–1044
112. Behrend et al. (2003), *Biochem Soc Trans*, 31: 1441–1444
113. Sallmyr et al. (2008), *Cancer Lett*, 270: 1–9
114. Popp and Bohlander (2010), *Genes Chromosomes Cancer*, 49: 1071–1081
115. Sallmyr et al. (2008), *Blood*, 111: 3173–3182
116. Zhou et al. (2010), *J Biol Chem*, 285: 15010 –15015
117. Underwood et al. (2010), *Hum Mol Genet*, 19: 3413–3429
118. Xu et al. (2006), *J Biol Chem*, 281: 19179–19187
119. Cao et al. (2009), *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 949–953
120. Kongsuphol et al. (2009), *J Pineal Res*, 46: 199–206
121. Chen et al. (2014), *Mediators Inflamm*, 2014: 426740
122. Essick and Sam (2010), *Oxid Med Cell Longev*, 3: 168–177
123. Ahn et al. (2007), *APMIS*, 115: 1344–1349
124. Tang et al. (2009), *Hepatology*, 49: 60–71
125. Karantza-Wadsworth and White (2007), *Autophagy*, 3: 610–613
126. Sun et al. (2010), *Cancer Lett*, 294: 204–210
127. Lisanti et al. (2010), *Cancer Biol Ther*, 10: 537–542
128. He and Klionsky (2009), *Annu Rev Genet*, 43: 67–93
129. Dadakhujaev et al. (2009), *Autophagy*, 5: 103–105
130. Iwama and Eguchi (1986), *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 51: 375–384
131. Lyu et al. (2008), *Theor Biol Med Model*, 5: 23

132. Farquhar and Bowen (2003), *Int J Hematol*, 77: 342–350
133. Boulwood et al. (1996), *Br J Haematol*, 95: 426–431
134. Houwerzijl et al. (2009), *Leukemia*, 23: 886–891
135. Watson et al. (2011), *ABBV Cell Cycle*, 10: 1719–1725
136. Pulte et al. (2010), *AnnOncol*, 21:335–341
137. Ofran et al. (2016), *Blood*, 128:488–496
138. Lapidot et al. (1994), *Nature*, 367:645–648
139. Dean et al. (2005), *NatRevCancer*, 5: 75–284
140. Furukawa (1998), *Cell*, 11:81–92
141. Hole et al. (2013), *Blood*, 122:3322–3330
142. Townsend et al. (2005), *MethodsEnzymol*, 401:287–307
143. Rushmore et al. (1991), *J Biol Chem*, 266 :11632–11639
144. Hu et al. (2013), *AsianPac J CancerPrev*, 14:5231–5235
145. Gao et al. (2013), *Carcinogenesis*, 34: 1806–1814
146. Ohta et al. (2008), *CancerRes*, 68:1303–1309
147. Hanada et al. (2012), *BMCCancer*, 12: 66
148. Li et al. (2006), *FreeRadicBiolMed*, 41:1079-1091
149. Ren et al. (2011), *ProcNatlAcadSciU S A*, 108: 1433–1438
150. Karathedath et al. (2017), *PLoS One*, 12(5): e0177227
151. Baxter et al. (2005), *Lancet*, 365: 1054–1061
152. James et al. (2005), *Nature*, 434: 1144–1148
153. Kralovics et al. (2005), *N Engl J Med*, 352: 1779–1790
154. Levine et al. (2005), *Cancer Cell*, 7: 387–397
155. Lacout et al. (2006), *Blood*, 108: 1652–1660
156. Marty et al. (2010), *Blood*, 116: 783–787
157. Shide et al. (2008), *Leukemia*, 22: 87–95
158. Tiedt et al. (2009), *Blood*, 113: 1768–1777
159. Wernig et al. (2006), *Blood*, 107: 4274–4281
160. Dupont et al. (2007), *Blood*, 110: 1013–1021
161. Tiedt et al. (2008), *Blood*, 111: 3931–3940
162. Gelsi-Boyer et al. (2009), *Br J Haematol*, 145: 788–800
163. Lasho et al. (2012), *Blood*, 120: 4168–4171
164. Shih et al. (2012), *Nat Rev Cancer*, 12: 599–612
165. Vainchenker et al. (2011), *Blood*,118: 1723–1735

166. Koptyra et al. (2006), *Blood*,108: 319–327
167. Sallmyr et al. (2008), *Blood*,112: 1413–1423
168. Walz et al. (2006), *J Biol Chem*,281: 18177–18183
169. Plo et al. (2008), *Blood*,112: 1402–1412
170. Marty et al. (2013), *Leukemia*, 27(11):2187-95
171. Tothova et al. (2007), *Cell*, 128:325–339
172. Castrillon et al. (2003), *Science*, 301:215–218
173. Hosaka et al. (2004), *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:2975–2980
174. Yalcin et al. (2010), *EMBO J*, 29(24):4118-4131