



Εργαστήριο Πειραματικής Φυσιολογίας
Ιατρική Σχολή-Πανεπιστήμιο Αθηνών
Καθηγητής κ. Μ. Κουτσιλιέρης

Alexandra Vacarciuc
Αριθμός Μητρώου: 20120251

Διπλωματική Εργασία
«Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin»

Αθήνα
2014

Περιεχόμενα

| | |
|--|-----------|
| I. Γενικό Μέρος | 5 |
| 1.Κυτταρική Γήρανση | |
| 1α. Εισαγωγή | |
| 1β. Γήρανση εξαρτώμενη από τα τελομερή | 7 |
| 1γ. Χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων | 10 |
| 1δ. Κυτταρική γήρανση και καταστολή ογκογένεσης | 12 |
| 1ε. Κυτταρική γήρανση και εξέλιξη νεοπλασιών | 16 |
| 1στ. Η κυτταρική γήρανση ως παθοφυσιολογικό φαινόμενο | 18 |
| 1ζ. Φαινόμενο in vivo | 18 |
| 1ζι. Γήρανση κατά την αντιγραφή in vivo | |
| 1ζii. Γήρανση προκαλούμενη από ογκογονίδια (OIS) in vivo | 20 |
| 1ζiii.Γήρανση λόγω απώλειας ογκοκαταστολής in vivo | 21 |
| 1η. Πρώιμη κυτταρική γήρανση In vitro | 21 |
| Στρες in vitro | 21 |
| Γήρανση λόγω ενεργοποίησης ογκογονιδίων (OIS) in vitro | 22 |
| Γήρανση λόγω απώλειας ογκοκαταστολής in vitro | 23 |
| 1θ. Τρόποι μελέτης της κυτταρικής γήρανσης | 23 |
| 2. Λεμφώματα | |
| 2α. Λέμφωμα Hodgkin (HL)-Επίπτωση, συχνότητα | |
| 2β. Διάγνωση | 27 |
| 2γ. Ταξινόμηση | 28 |
| 2δ. Κλινική εικόνα | 31 |
| 2ε. Σταδιοποίηση κατά Ann-Arbor/Cotswolds | 34 |
| 2ζ.Πρόγνωση-Θεραπεία | 36 |
| 2η.Απόπτωση και λέμφωμα Hodgkin | 37 |
| II. Ειδικό μέρος | 38 |
| 1. Σκοπός | 41 |
| 2. Υλικό | 39 |
| 3. Μέθοδος | 40 |
| 4. Αποτελέσματα | 41 |
| 5. Συζήτηση | 45 |
| Βιβλιογραφία | 49 |

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Εμβρυολογίας-Ιστολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Υ. Δούση-Αναγνωστοπούλου για το χρόνο που μου διέθεσε.

Απευθύνω τις ευχαριστίες μου στην Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του «Αγ. Σάββα», κύρια Ν. Αρνογιαννάκη, για την προθυμία της να διαθέσει το υλικό του εργαστηρίου για την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Τέλος, απευθύνω ευχαριστίες στη βιολόγο του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του «Αγ. Σάββα», Ν. Σωτηριάδου που βοήθησε στη τέλεση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων καθώς και στα μέλη της Ομάδας Μοριακής Καρκινογένεσης του Εργαστηρίου Εμβρυολογία-Ιστολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Ελένη Γεωργακοπούλου, κ. Δέσποινα Μωυσίδου και κ. Κώστα Ευαγγέλου για τη βοήθειά τους στη διαμόρφωση του τελικού πρωτοκόλλου για την τέλεση των ιστοχημικών χρώσεων και για τις βοηθητικές συζητήσεις σχετικά με την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Περίληψη

Το λέμφωμα Hodgkin είναι συχνό λέμφωμα στο Δυτικό κόσμο και συνήθως προσβάλλει νεαρούς ενήλικες. Μορφολογικό χαρακτηριστικό του λεμφώματος Hodgkin είναι η παρουσία σπάνιων νεοπλασματικών κυττάρων, των κυττάρων Reed-Sternberg (HRS) κύτταρα στο κατάλληλο υπόστρωμα. Αν και η ενεργοποίηση των φυσιολογικών κυττάρων από όλα τα σηματοδοτικά μονοπάτια ελέγχεται αυστηρά, στα κύτταρα HRS αρκετά σήματα και οδοί παρουσιάζουν διαταραχές. Η διαφυγή από την αποπτωτική διαδικασία είναι ένα σημαντικό γεγονός στη διαδικασία της καρκινογένεσης και παρατηρείται ιδιαίτερα στα HRS κύτταρα.

Το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης αντιστοιχεί σε μη αναστρέψιμη διακοπή του πολλαπλασιασμού και διατήρηση των κυττάρων σε μόνιμη φάση «αναμονής», παρατηρείται δε τόσο στο ανθρώπινο είδος, όσο και σε άλλα σπονδυλωτά.

Η συγκεκριμένη μελέτη αποσκοπεί στη διερεύνηση του φαινομένου της γήρανσης σε περιστατικά με κλασσικό λέμφωμα Hodgkin (cHL) στα πλαίσια διερεύνησης πιθανών μηχανισμών παθογένειας του λεμφώματος. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 11 ασθενείς με cHL. Η κυτταρική γήρανση μελετήθηκε με την ιστοχημική χρώση Sudan-Black-B (SBB), μια τεχνική ειδική για τη λιποφουσκίνη που αθροίζεται σε γηρασμένους ιστούς, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αρχιακό υλικό και πρόσφατα προτάθηκε σαν μια αξιόπιστη εναλλακτική μέθοδος της χρώσης με Β-γαλακτοσιδάση, που αποτελούσε την μέθοδο εκλογής για την εκτίμηση της κυτταρικής γήρανσης. Σε όλα τα περιστατικά τα οποία μελετήθηκαν, τα νεοπλασματικά HRS κύτταρα ήταν αρνητικά στη χρώση με το SBB, υποδηλώνοντας ότι το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης πιθανότατα δεν είναι σημαντικό στο cHL, εύρημα που συνάδει και με υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό των νεοπλασματικών HRS κυττάρων, όπως αυτό τεκμηριώνεται με την ανοσοιστοχημική χρώση με τον δείκτη Ki67. Επιπρόσθετα, και με βάση πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, η ύπαρξη ενεργοποιημένων κυττάρων του ανοσοποιητικού μπορεί να οδηγεί σε καταστροφή των γηρασμένων κυττάρων καθιστώντας αδύνατη την ταυτοποίησή τους στους ιστούς. Το αποτέλεσμα χρίζει περαιτέρω διερεύνησης σε μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών για να επιβεβαιωθεί και να εκτιμηθεί.

I. Γενικό Μέρος

1.Κυτταρική Γήρανση

1α. Εισαγωγή

Η λέξη γήρανση όπως αναφέρεται στην αγγλική γλώσσα «senescence» έχει προέλθει από τη λατινική λέξη «senex» όπου σημαίνει αύξηση της ηλικίας. Η κυτταρική γήρανση (**cell senescence**) είναι μια διαδικασία η οποία χαρακτηρίζεται από μεταβολή στη μορφολογία των κυττάρων, μη αναστρέψιμη διακοπή του πολλαπλασιασμού και διαφοροποίηση στην έκφραση των γονιδίων, περιλαμβάνοντας την αύξηση της λειτουργίας των αρνητικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (Baker και συν, 2011). Η λεγόμενη **γήρανση λόγω εξάντλησης δυναμικού πολλαπλασιασμού (Replicative senescence-RS)** περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1961 από τους ερευνητές Hayflick και Moorhead. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές παρατήρησαν σε ανθρώπινους ινοβλάστες ότι μπορούσαν να εισέλθουν σε μια μη αναστρέψιμη κατάσταση, η οποία χαρακτηριζόταν από αδυναμία αντιγραφής μετά από συγκεκριμένο αριθμό διπλασιασμών σε in vitro περιβάλλον (Baker και συν, 2011). Τότε διατυπώθηκε υπόθεση κατά την οποία το συγκεκριμένο φαινόμενο θεωρήθηκε ότι σχετιζόταν με τη γήρανση του οργανισμού. Η συγκεκριμένη υπόθεση επιβεβαιώθηκε μεταγενέστερα, δείχνοντας ότι η συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων μπορεί να επηρεάζει τη γήρανση του οργανισμού και να συνεισφέρει στην εμφάνιση παθήσεων σχετιζόμενων με την ηλικία (Baker και συν, 2011).

Η κυτταρική γήρανση είναι κοινώς αποδεκτή ως μια γενικευμένη αντι-πολλαπλασιαστική διαδικασία η οποία δρα ως σημαντικός φραγμός στην εξέλιξη του καρκίνου (Vijg & Campisi, 2008). Η μείωση του μήκους των τελομερών αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς μηχανισμούς που οδηγεί στην κυτταρική γήρανση (Hayflick, 1997), αν και είναι γνωστό ότι υπάρχουν αρκετά άλλα μονοπάτια τα οποία περιλαμβάνουν κυττοκίνες, ογκογονίδια, απάντηση σε βλάβη του γενετικού υλικού, στα πλαίσια της απάντησης σε βλάβη του DNA (DNA Damage Response) (Campisi και συν, 2007) ή και συνθήκες stress που οδηγούν σε **πρώιμη κυτταρική γήρανση που σχετίζεται με το stress** (**stress induced premature senescence-SIPS** ή **stress or aberrant signaling-induced senescence-ASIS**) (Wright & Shay, 2002). Λόγω της σημασίας της αναγνώρισης της κυτταρικής γήρανσης, τόσο στην κατανόηση της εξέλιξής της, όσο και στη διασαφήνιση του ρόλου της στην προστασία κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης, μια αξιόπιστη μέθοδος αναγνώρισης του φαινομένου είναι ιδιαίτερα σημαντική στην κατανόηση του ρόλου της τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

Η RS καθώς και η SIPS δρουν ως ρυθμιστές μιας ομάδας πρωτεϊνών, όπου περιλαμβάνονται η p53 και Rb11. Η μείωση του μήκους των τελομερών, είτε μέσω κύκλων αντιγραφής ή με την απελευθέρωση των άκρων των τελομερών (telomere uncapping), (Blanco και συν, 2007) οδηγεί στην αναγνώριση των άκρων των τελομερών ως σπασμένα τμήματα του γενετικού υλικού DNA, καταλήγοντας σε βλάβες του DNA εξαρτώμενες από τη φωσφορυλίωση και σταθεροποίηση του p53 (von Zglinicki & Martin-Ruiz, 2005) το οποίο ενεργοποιεί μια σειρά αντιδράσεων που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του αναστολέα της κινάσης εξαρτώμενης από την κυκλίνη (cyclin-dependent

kinase inhibitor) p21 CIP1 (Choudhury και συν, 2007). Όμως η SIPS διαμεσολαβείται κυρίως μέσω p16INK4a (p16), και μάλιστα η πρωτεΐνη αυτή δρα ανεξάρτητα από το μήκος των τελομερών (Serrano και συν, 1996). Έτσι, λοιπόν είτε το p21 (μέσω αναστολής της CyclinE/Cdk2) ή το p16 (μέσω αναστολής της CyclinD/Cdk4,6) οδηγούν στην ιδιαίτερα κοινή αντίδραση η οποία περιλαμβάνει την αναστολή του Rb, καταλήγοντας σε απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα E2F (Collado και συν, 2007). Η σημασία του Rb ή του p53 στην κυτταρική γήρανση αναδεικνύεται σε καταστάσεις όπου παρατηρείται διαταραχή των συγκεκριμένων μορίων. Έχει καταδειχθεί τόσο in vitro όσο και in vivo ότι παρεμβαίνοντας στα συγκεκριμένα μονοπάτια αναστέλλεται η κυτταρική γήρανση (Itahana, 2003) αν και η σχετική συνεισφορά του κάθε παράγοντα εξαρτάται από διάφορες μεταβλητές, όπως το είδος του στρες και το είδος του κυττάρου (Iwasa, 2003). Σε αντίθετη περίπτωση, υψηλά επίπεδα έκφρασης προκαλούν κυτταρική γήρανση σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (Sherr & McCormick, 2002).

1β. Γήρανση εξαρτώμενη από τα τελομερή

Τα τελομερή είναι πολύπλοκες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες γενετικού υλικού-DNA που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων και εξασφαλίζουν την γενομική σταθερότητα (Von Zglinicki και συν, 2003). Στα κύτταρα των θηλαστικών τα τελομερή χαρακτηρίζονται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες TTAGGG οι οποίες μπορεί να είναι είτε λίγες ή μερικές δεκάδες ζεύγη κιλοβάσεων ανάλογα με το είδος του οργανισμού (Blasco, 2005). Η προστασία των τελομερών γίνεται μέσω ενός συμπλέγματος 6 πρωτεϊνών με το όνομα shelterin. Η Shelterin περιλαμβάνει τα TRF1, TRF2, Pot1-TPP1 ετεροδιμερή, το Rap1 και το Tin234. Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου αντιγραφής

τα τελομερή μειώνονται σε μήκος λόγω της έλλειψης τελομεράσης, ενζύμου που επιδιορθώνει τα τελομερή και το οποίο δεν εκφράζεται σε φυσιολογικά κύτταρα, κατά το τέλος της διαδικασίας της αντιγραφής, φαινόμενο που παρουσιάζεται σε όλους τους ενήλικους ιστούς. Η τελομεράση αποτελείται από μια καταλυτική μονάδα (Tert) με δράση ανάστροφης μεταγραφάσης, καθώς και από ένα RNA τμήμα (Terc) το οποίο λειτουργεί ως βάση για την επιμήκυνση των τελομερών (Blackburn, 2001). Η δράση της τελομεράσης επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των δύο υπομονάδων της. Η τελομεράση είναι η κύρια κυτταρική πρωτεΐνη υπεύθυνη για τη διατήρηση των τελομερών καθώς και για την επιμήκυνσή τους, κι όπως αναφέρθηκε η δράση της φαίνεται να καταστέλλεται στα κύτταρα των ενηλίκων ιστών, ενώ αντιθέτως είναι παρούσα στα βλαστικά κύτταρα των ενηλίκων ιστών (Flores, 2008). Η παρουσία της τελομεράσης στα αποθέματα των ενηλίκων βλαστικών κυττάρων δε φαίνεται όμως να είναι αρκετή και δεν αντισταθμίζει τη μείωση του μήκους των τελομερών που σχετίζεται με την ηλικία.

Από μελέτες οι οποίες έχουν γίνει *in vitro*, έχει βρεθεί ότι το μήκος μειώνεται κατά 30 έως 120 ζεύγη βάσεων (bp) σε κάθε κύκλο (Harley, 1990). Το μέγεθος της μείωσης επιβεβαιώθηκε και *in vivo* με συγκριτικές μελέτες νέων και ηλικιωμένων ατόμων (Canela και συν, 2007). Το φαινόμενο της μείωσης των τελομερών παρατηρήθηκε επίσης και σε παθολογικές καταστάσεις. Υπάρχουν αρκετά ερευνητικά δεδομένα τα οποία συνδέουν την έναρξη της διαδικασίας της γήρανσης του οργανισμού με την προοδευτική μείωση του μήκους των τελομερών. Επίσπευση της γήρανσης του οργανισμού ή τουλάχιστον κάποιων χαρακτηριστικών σε επίπεδο ιστού μπορεί να οφείλονται και σε μεταλλάξεις στο σύμπλεγμα των πρωτεϊνών της τελομεράσης ή ακόμα σε πρωτεΐνες οι

οποίες συνδέονται με το σύμπλεγμα. Επιπρόσθετα μια σειρά παραγόντων όπως η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης καθώς και το άγχος επηρεάζουν αρνητικά το μήκος των τελομερών (Shay & Wright, 2006).

Έχοντας σημαντική επίπτωση στην κυτταρική διαίρεση, τα τελομερή και η τελομεράση μπορούν να θεωρηθούν ως μόρια κλειδιά για την εξέλιξη του καρκίνου. Πολλοί καρκίνοι στον άνθρωπο είναι θετικοί στην τελομεράση χωρίς όμως να παρουσιάζουν αύξηση του μήκους των τελομερών (Shay & Wright, 2006). Ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα των όγκων παρουσιάζουν μικρότερα μήκη τελομερών σε σχέση με τους υγιείς ιστούς (Meeker και συν, 2004). Η κυτταρική γήρανση ξεκινάει από μικρού μήκους τελομερή τα οποία δρουν κατασταλτικά στον όγκο όταν υπάρχει γενομική σταθερότητα (Martinez και συν, 2009). Ελάχιστες είναι οι περιπτώσεις στις οποίες έχει παρατηρηθεί το αντίθετο δηλαδή τα μικρού μήκους τελομερή να ευοδώνουν την εξέλιξη της νεοπλασίας (Blasco & Hahn, 2003). Πρόσφατη μελέτη σε μοντέλα μυών κατέδειξε ότι η εισαγωγή της τελομεράσης σε μοντέλο γήρανσης μπορεί να αντιστρέψει το φαινόμενο της γήρανσης και η ενεργοποίηση της τελομεράσης στους ενήλικες οργανισμούς μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση του μεταβολισμού χωρίς την πρόκληση καρκίνου (Jaskelioff και συν, 2011). Επειδή η έκφραση της τελομεράσης στους ενήλικες ιστούς διαμορφώνεται βάσει του αποθέματος το οποίο υπάρχει στα ενήλικα βλαστικά κύτταρα η γήρανση θα μπορούσε να οφείλεται σε διαταραχή των συγκεκριμένων αποθεμάτων. Γηραιοί οργανισμοί που παρουσιάζουν μικρά τελομερή στο απόθεμα των βλαστικών κυττάρων μπορεί να παρουσιάζουν αδυναμία αναγέννησης ιστών. Αν και η σημασία της τελομεράσης στο απόθεμα των βλαστικών κυττάρων είναι ήδη γνωστή έχει παρατηρηθεί ότι

ιστοί με μικρό πολλαπλασιαστικό δυναμικό μπορούν επίσης να παρουσιάζουν μείωση στο μήκος των τελομερών τους, γεγονός το οποίο συνδέεται με την κυτταρική διαίρεση και τη συσσώρευση βλαβών στο γονιδίωμα μέσω ενδογενών και εξωγενών μονοπατιών (Sahin και συν, 2011). Η διαταραχή αποθέματος των βλαστικών κυττάρων σε συνδυασμό με την παρουσία γηρασμένων κυττάρων στους ενήλικες ιστούς μπορεί να αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στην εξέλιξη νεοπλασιών σχετιζομένων με τα τελομερή και γενικότερα με τη διαδικασία της γήρανσης του οργανισμού.

1γ. Χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων

Τα γηρασμένα κύτταρα δεν είναι κύτταρα ανενεργά (quiescent) ή τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα (terminally differentiated cells) αν και ο διαχωρισμός δεν είναι πάντοτε σαφής. Έως σήμερα κανένας δείκτης της κυτταρικής γήρανσης δεν είναι απόλυτα ειδικός για την αναγνώριση της φάσης αυτής του κυττάρου. Επιπρόσθετα όλα τα γηρασμένα κύτταρα δεν έχουν οδηγηθεί σε γήρανση με τον ίδιο τρόπο και γι' αυτό έχουν ενεργοποιημένα διαφορετικά μοριακά μονοπάτια και συνεπώς παρουσιάζουν διάφορους μοριακούς φαινότυπους, οι οποίοι στο σύνολό τους χαρακτηρίζουν τη φάση αυτή του κυττάρου. Προσπαθώντας κανείς να ομαδοποιήσει τα χαρακτηριστικά των γηρασμένων κυττάρων μπορεί να περιγράψει τα παρακάτω :

- 1) Η διαδικασία της γήρανσης είναι μόνιμη και δε μπορεί να αντιστραφεί με κάποιο γνωστό φυσιολογικό μόριο. Όμως κάποια κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη CDK1 p16INK4a μπορούν να οδηγηθούν εκ νέου σε ανάπτυξη με γενετικές παρεμβάσεις όπου απενεργοποιούν

το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (Beauséjour και συν, 2003). Μέχρι σήμερα δεν έχει παρατηρηθεί αυτόματη απενεργοποίηση του p53 σε γηρασμένα κύτταρα in vitro ή in vivo.

- 2) Τα γηρασμένα κύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος. Σε κάποιες περιπτώσεις το μέγεθός τους μπορεί και να διπλασιαστεί (Hayflick, 1965).
- 3) Τα γηρασμένα κύτταρα έχουν μεγάλη δραστηριότητα της γαλακτοσιδάσης η οποία περιγράφεται ως senescence-associated-galactosidase/SA-Bgal (Dimri και συν, 1995) και συνδέεται με αύξηση στη μάζα των λυσοσωμάτων (Lee και συν, 2006).
- 4) Τα περισσότερα γηρασμένα κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη p16INK4a, η οποία εκφράζεται και σε ανενεργά κύτταρα ή και σε τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα (Stein και συν, 1999). Σε κάποια κύτταρα η πρωτεΐνη p16INK4a, ενεργοποιώντας το pRB προκαλεί τη δημιουργία μιας δομής χαρακτηριστικής των γηρασμένων κυττάρων η οποία ονομάζεται senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), η οποία με τη σειρά της απενεργοποιεί τη λειτουργία γονιδίων υπεύθυνων για τον πολλαπλασιασμό (Narita και συν, 2003). Η έκφραση της p16INK4a μπορεί να είναι το αποτέλεσμα στρες στην κυτταροκαλλιέργεια, καθώς και το αποτέλεσμα βλάβης στα τελομερή ή στα χρωμοσώματα (Le και συν, 2010). Επιπρόσθετα η έκφραση της p16INK4a αυξάνεται με την ηλικία τόσο στα ποντίκια όσο και στον άνθρωπο (Liu και συν, 2009) και η δράση της έχει σχετιστεί με μείωση στον αριθμό των προγονικών κυττάρων, γεγονός το οποίο συμβαίνει σε πολλούς ιστούς κατά τη γήρανση. (Molofsky και συν, 2006).

- 5) Τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε φάση γήρανσης παρουσιάζουν χαρακτηριστικές περιοχές βλάβης στο γενετικό υλικό με αλλοιώσεις στη χρωματίνη οι οποίες ενισχύουν τη γήρανση (chromatin alterations reinforcing senescence/DNA-SCARS). Οι περιοχές αυτές περιέχουν ενεργοποιημένες πρωτεΐνες, όπως phospho-ATM και phosphorylated ATM/ataxia telangiectasia και Rad3 related (ATR) υποστρώματα και φέρουν χαρακτηριστικές διαφορές από τις μικρές μεταβατικές βλάβες του γενετικού υλικού κατά τα στάδια ζωής του κυττάρου (Rodier και συν, 2011). Οι βλάβες αυτές -DNA-SCARS- οδηγούν σε δυσλειτουργία των τελομερών (Kim και συν, 2004).
- 6) Τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες, πρωτεάσες, κυτοκίνες και άλλους παράγοντες που δυνητικά έχουν αυτοκρινή και παρακρινή λειτουργία (Corré και συν, 2010). Αυτά τα μόρια τα οποία εκκρίνονται από τα γηρασμένα κύτταρα δημιουργούν ένα συγκεκριμένο φαινότυπο, το λεγόμενο senescence-associated secretory phenotype – SASP ο οποίος βοηθά στην καλύτερη κατανόηση των κυττάρων αυτών.

1δ. Κυτταρική γήρανση και ογκογένεση

Η κυτταρική γήρανση παίζει σημαντικό ρόλο ως αντικαρκινικός μηχανισμός, και ουσιαστικά δρα ως φραγμός στον πολλαπλασιασμό ογκογόνων κυττάρων (Collado & Serrano, 2010). Για το σχηματισμό επιθετικού όγκου πρέπει να υπάρχει δυνατότητα εκτεταμένης αύξησης και ικανότητα έκφρασης ενεργοποιημένων ογκογονιδίων από τα καρκινικά κύτταρα (Hanahan & Weinberg, 2000), χαρακτηριστικά τα οποία καταστέλλονται κατά τη διαδικασία

της γήρανσης. Επίσης, η κυτταρική γήρανση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από δύο πολύ ισχυρά ογκοκατασταλτικά μονοπάτια: το p53 και το pRB/p16INK4a (Rodier και συν, 2007). Και τα δυο μονοπάτια εμπλέκονται στην κυτταρική φυσιολογία με πολλαπλούς τρόπους και ενορχηστρώνουν την τύχη του κάθε κυττάρου. Τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια οι περισσότερες νεοπλασίες χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις σε ένα από τα συγκεκριμένα μονοπάτια. Επίσης αλλοιώσεις σε κάποιο από τα συγκεκριμένα μονοπάτια θέτουν σε κίνδυνο την ικανότητα του κυττάρου να εισέλθει στη διαδικασία της γήρανσης και αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό την επιρρέπεια του οργανισμού στη νεοπλασία. Έρευνες σε ανθρώπινους ιστούς και σε πειραματικά μοντέλα ογκογένεσης σε ποντίκια έχουν δείξει σημαντική καταστολή της κυτταρικής γήρανσης *in vivo*. Προ-καρκινικά αδενώματα του ορθού στον άνθρωπο εκφράζουν δείκτες γήρανσης, όπως το SA-Bgal, ωστόσο τα γηρασμένα κύτταρα εξαλείφονται σημαντικά στα αδενοκαρκινώματα τα οποία αναπτύσσονται από αυτού του τύπου τις αλλοιώσεις (Michaloglou και συν, 2005). Επιπρόσθετα απενεργοποιώντας το p53, που μεταξύ άλλων παρεμποδίζει και την κυτταρική γήρανση, παρατηρείται μεγάλη επιτάχυνση στην ανάπτυξη κακοήθων όγκων (Chen και συν, 2005). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ορισμένοι όγκοι μπορούν να διατηρούν την ικανότητα γήρανσης σε ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (Corré και συν, 2010) ή μετά από ενεργοποίηση του p53 (Ventura και συν, 2007). Στις παραπάνω περιπτώσεις η κυτταρική γήρανση συνδέεται με την καταστολή του όγκου. Αν και είναι πλέον σαφές ότι η κυτταρική γήρανση βοηθά τους όγκους να παραμένουν σε προ-καρκινικό στάδιο, δεν είναι σαφές πώς τελικά οι όγκοι διαφεύγουν του σταδίου αυτού και τελικά μετατρέπονται σε διηθητικές

αλλοιώσεις. Είναι πολλά τα πιθανά σενάρια: 1) πρόσθετες επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν σε μεταλλάξεις τα γηρασμένα κύτταρα, 2) σηματοδοτικά μόρια τα οποία ενεργοποιούμενα αναστρέφουν την αδυναμία αύξησης των γηρασμένων κυττάρων, 3) άλλος μηχανισμός που δεν αφορά τα γηρασμένα κύτταρα, αλλά τα προ-καρκινικά κύτταρα, τα οποία είναι σε μια μορφή καταστολής ή προσωρινά δε μπορούν να πολλαπλασιαστούν και τελικά ούτε αποτίπτουν, ούτε γερνούν.

Είναι πλέον επιστημονικά αποδεκτό ότι τα σήματα διαμεσολάβησης κατά τα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης είναι πολύ αυξημένα μέχρι να φτάσουν σε ένα συγκεκριμένο πλατό όπου ενεργοποιούνται ογκοκατασταλτικά μονοπάτια (p16, p53) (Muñoz-Espín & Serrano M, 2014). Κατά την ενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών μονοπατιών ενεργοποιούνται οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου και τα κύτταρα εισέρχονται σε φάση γήρανσης παρεμποδίζοντας τη διασπορά προ-καρκινικών κυττάρων. Σε παθολογικό επίπεδο, η κυτταρική γήρανση είναι ανιχνεύσιμη στην μη διηθητική φάση της καρκινογένεσης, όπου ανάλογα με τον ιστό είναι γνωστή με διάφορους όρους όπως αδένωμα, νεοπλασία *in situ* ή διεπιθηλιακή νεοπλασία (Muñoz-Espín & Serrano M, 2014). Συνεχώς αυξάνουν τα δεδομένα ότι τα γηρασμένα κύτταρα οδηγούν σε υπερπλαστική παθολογία, ενώ παράλληλα προστατεύουν από την ανάπτυξη διηθητικού φαινότυπου (Campisi, 2013). Οι σημαντικότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με εγχύσεις ανθρώπινων κυττάρων σε πειραματικά μοντέλα μυών. Η έγχυση γηρασμένων ινοβλαστών φαίνεται να ενεργοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα σε πειραματικά μοντέλα ανοσοκατασταλμένων μυών (Campisi, 2013). Η ενεργοποίηση των επιθηλιακών κυττάρων πραγματοποιείται μέσω διαλυτών

παραγόντων οι οποίοι παράγονται και εκκρίνονται από τα γηρασμένα κύτταρα (Campisi, 2013).

1ε. Κυτταρική γήρανση και εξέλιξη νεοπλασιών

Η ιδέα ότι η κυτταρική γήρανση, μια αποδεδειγμένα αντικαρκινική διαδικασία μπορεί να εμπλέκεται στην εξέλιξη των νεοπλασιών φαίνεται παράδοξη. Εντούτοις βασιζόμενοι στη θεωρία του ανταγωνιστικού πλειοτροπισμού μπορούμε να καταλήξουμε ότι μια βιολογική διαδικασία μπορεί να ενέχει θετική ή αρνητική δράση ανάλογα με την ηλικία του οργανισμού (Rauser και συν, 2006). Ένα πολύ βασικό γεγονός το οποίο δεν πρέπει να αγνοούμε είναι ότι οι νεοπλασίες είναι κατά κύριο λόγο σχετιζόμενες με την ηλικία (Balducci & Ershler, 2005). Η ηλικία στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί παράγοντα κινδύνου στην ανάπτυξη νεοπλασιών με εκθετική αύξηση από την ηλικία των 50 ετών, γεγονός παρεμφερές με τις εκφυλιστικές παθήσεις της γήρανσης. Η λογική του ανταγωνιστικού πλειοτροπισμού εντοπίζεται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι οργανισμοί εξελίσσονται σε περιβάλλον με πολλούς εξωγενείς κινδύνους και κάτω από αυτές τις συνθήκες τα γηραιά άτομα είναι σπάνια και η επιλογή έναντι διαδικασιών οι οποίες προάγουν τη νόσο είναι επίσης σπάνια. Οι φαινότυποι που σχετίζονται με την ηλικία και τα νοσήματα που συνδέονται με αυτή έχουν διαφύγει της φυσικής επιλογής. Επομένως μια βιολογική διαδικασία η οποία διατηρεί την καλή υγεία σε νεαρά άτομα (π.χ. ογκοκατασταλτικά γονίδια) μπορεί να παίζει επιβαρυντικό ρόλο στα ηλικιωμένα άτομα (π.χ. εξέλιξη νεοπλασιών).

Σε διηθητικό καρκίνο του μαστού έχει παρατηρηθεί ότι τόσο στον κληρονομούμενο όσο και στο σποραδικό τύπο εμπλέκονται μοριακοί

μηχανισμοί σχετιζόμενοι όχι μόνο με τον κυτταρικό κύκλο αλλά και με την κυτταρική γήρανση (Pare και συν., 2013). Στα πρώτα στάδια του καρκίνου του μαστού η κυτταρική γήρανση φαίνεται να αναστέλλει την ογκογένεση. Όμως σε μεταγενέστερα στάδια της καρκινογένεσης φαίνεται ότι μέσω εκκριτικών παραγόντων που παράγουν τα γηρασμένα κύτταρα, ευοδώνεται η εξέλιξη της νόσου, υποστηρίζοντας τον διπτό ρόλο της (Pare και συν., 2013).

Στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης πρόσφατη έρευνα σε βιοπτικό υλικό κυστεοσκοπίσεων κατέδειξε σημαντικές μεταβολές τόσο στο μήκος όσο και στη δραστηριότητα των τελομερών σε ασθενείς με νεοπλασία καθώς και σε ιστολογικά παρασκευάσματα ασθενών στον προκαρκινικό βλεννογόνο (Mucciardi και συν., 2014).

Επιπρόσθετα ερευνητικές μελέτες έδειξαν ότι η κυτταρική γήρανση, μαζί με τον πολλαπλασιασμό και τη διήθηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Roxburgh και συν., 2013; Narita & Lowe, 2005).

Επιπρόσθετα υπάρχουν δεδομένα για θεραπευτικές προσεγγίσεις όπου ευοδώνουν την κυτταρική γήρανση σε εγκαθιδρυμένους όγκους. Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση της οδού του p53 στα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα και στα σαρκώματα ενισχύει τη γήρανση και την καταστολή του όγκου (Hoare και συν., 2010).

1στ. Η κυτταρική γήρανση ως παθοφυσιολογικό φαινόμενο

Από την ανακάλυψη του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης in vitro οι ερευνητές αναζητούσαν την ανάλογη συμπεριφορά in vivo. Η αρχική εκτίμηση του Hayflick (1965) για πιθανή εμπλοκή της γήρανσης στην καρκινογένεση

επιβεβαιώθηκε. Η μετατροπή ενός κυτάρου γηρασμένου σε «αθάνατο κύτταρο» αντικατοπτρίζει ένα βήμα πριν την καρκινογένεση. Το γεγονός ότι τα μόρια p16INK4A και p53 τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση είναι τα πιο συχνά μεταλλαγμένα μόρια στις νεοπλασίες επιβεβαιώνει τη συσχέτιση της γήρανσης με τον καρκίνο (Cancer Genome Atlas Gene Ranker GBM 6000, <http://cbio.mskcc.org/tcga-generanker/index.jsp>). Πειράματα in vitro κυτταρικής γήρανσης συνήθως χρησιμοποιούσαν υπερέκφραση των επιπέδων της RASV12. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει ότι μεταλλάξεις στις RAF πρωτεΐνες προκαλούν έντονη μιτωτική δραστηριότητα ή αντίθετα οδηγούν τα κύτταρα στη γήρανση αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης τους (Sarkisian και συν.2007; Chen και συν. 2009). Το γεγονός ότι οι συνθήκες στην καλλιέργεια προκαλούν επιπλέον στρες στα κύτταρα και επομένως σε περιβάλλον ιστού οι συνθήκες είναι τελείως διαφορετικές οδήγησε τους ερευνητές σε σχετικό σκεπτικισμό ως προς την πραγματική σημασία του φαινομένου. Τα τελευταία 10 χρόνια έχουν δημιουργηθεί πολλά πειραματικά μοντέλα ζώων, ενώ και ανθρώπινες αλλοιώσεις έχουν προσφέρει δεδομένα τα οποία επιβεβαιώνουν τον ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα του φαινομένου που όμως δεν είναι αποκλειστικός ούτε προβλέψιμος. Για παράδειγμα, επανενεργοποίηση του p53 σε εγκαθιδρυμένους όγκους αρουραίων προκαλεί γήρανση σε σαρκώματα αλλά απόπτωση σε λεμφώματα (Ventura και συν., 2007). Επομένως μια σειρά φυσιολογικών παραγόντων φαίνεται να επηρεάζουν την έναρξη και εξέλιξη του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης.

1ζ. Φαινόμενα in vivo

1ζι. Γήρανση τύπου RS in vivo

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι τα γηρασμένα κύτταρα συσσωρεύονται στα άτομα μεγάλης ηλικίας. Αυξημένη έκφραση της SA-b-GAL έχει παρατηρηθεί στο δέρμα ηλικιωμένων ατόμων (Dimigi και συν., 1995). Επιπρόσθετα μικρή αλλά σημαντική μείωση στο μήκος των τελομερών έχει ανιχνευτεί σε ηλικιωμένους ιστούς, αν και το γεγονός αυτό περιορίζεται σε συγκεκριμένους ιστούς (Cristofalo και συν. 2004). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με πειράματα που χρησιμοποίησαν πολλαπλούς δείκτες γήρανσης, όπως οι 53BP1, γ-H2AX, phospho-Ser1981-ATM, HP-1b και HIRA σε ινοβλάστες νέων και ηλικιωμένων μπαμπούνων. Οι δείκτες DNA βλάβης παρουσίαζαν συνέκφραση με τα τελομερή και συσχετίστηκαν με αυξημένη έκφραση p16INK4A (Herbig και συν. 2006), υποδεικνύοντας ότι μη λειτουργικά τελομερή μπορεί να προκαλέσουν την έναρξη της κυτταρικής γήρανσης in vivo. Η δυσλειτουργία των τελομερών φαίνεται να συνδέεται με νοσήματα της μεγάλης ηλικίας και διερευνάται εκτεταμένα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αρτηριοσκλήρυνση η οποία συνοδεύεται από αύξηση της δραστηριότητας της SA-b-GAL και μείωση του μήκους των τελομερών (Minamino και συν. 2002). Γηρασμένα κύτταρα έχουν επίσης παρατηρηθεί στην οστεοαρθρίτιδα (Price και συν. 2002). Όλες οι παραπάνω ερευνητικές εργασίες έχουν εγκυρότητα όμως βασίζονται στη μελέτη ενός δείκτη κυτταρικής γήρανσης και επομένως αναμένεται να επιβεβαιωθούν από τη χρήση πολλαπλών δεικτών. Επίσης η RS φαίνεται να έχει και ευεργετική μορφή η οποία δε σχετίζεται με τον καρκίνο. Σε πειραματικό μοντέλο ηπατικής ίνωσης σε ποντίκια έχουν ανιχνευτεί SA-b-GAL, p16INK4A, p53, p21CIP1 και HMGA1. Τα γηρασμένα αυτά κύτταρα φαίνεται να ενεργοποιούνται από τα

Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

ηπατοκυτταρικά βλαστικά κύτταρα και εμποδίζουν την εξέλιξη της ίνωσης (Krizhanovsky και συν. 2008). Επιπρόσθετα υπάρχουν έρευνες οι οποίες δείχνουν ότι η RS περιορίζει την καρκινογένεση σε λεμφώματα (Feldser & Greider, 2007).

1ζii. Γήρανση προκαλούμενη από ογκογονίδια (oncogene induced senescence- OIS) in vivo

Τα τελευταία 10 χρόνια ένας αριθμός ερευνητών έχουν μελετήσει το φαινόμενο της γήρανσης στα ποντίκια και στον άνθρωπο και πολλοί δείκτες γήρανσης, όπως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν αναγνωρισθεί. Η κυτταρική γήρανση προκαλούμενη από ογκογονίδια σε λεμφώματα παρουσιάστηκε από τους Braig και συν. (Braig, 2005) και έδειξαν τον ογκοκατασταλτικό ρόλο μέσω του ενζύμου που αναδιατάσσει τη χρωματίνη Suv39h1 σε λεμφώματα προερχόμενα από μεταλλάξεις Em-NRAS. Η ερευνητική ομάδα του Serrano (Collado και συν. 2005) έδειξε ότι η ενδογενής έκφραση του KRASV12 καταλήγει σε αδενώματα του πνεύμονα όπως και σε προ-καρκινωματώδεις νεοπλασίες του παγκρέατος, οι οποίες δεν καταλήγουν σε νεοπλασίες. Η αδενωματώδης φάση χαρακτηρίζεται από χαμηλό πολλαπλασιαστικό ρυθμό και από την εμφάνιση πολλών δεικτών γήρανσης όπως SA-b-GAL, p15INK4B, p16INK4A. Η πρώτη παρουσίαση γήρανσης in vivo από απώλεια ογκοκατασταλτικού γονιδίου (PTEN) αναφέρθηκε από την ερευνητική ομάδα του Chen το 2005 (Chen και συν. 2005). Στη συνέχεια και άλλες ομάδες παρατήρησαν το φαινόμενο της αναστολής σχηματισμού όγκου λόγω OIS. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση δεικτών χημειοκινών και κυτταροκινών οι οποίοι δείχνουν την παρουσία γηρασμένων κυττάρων σε ανθρώπινα αδενώματα του ορθού και σε αλλοιώσεις

προστατικών νεοπλασιών (Acosta και συν. 2008; Kuilman και συν. 2008). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι το Myc, γνωστό για την προαποπτωτική του δράση, οδηγεί λεμφώματα σε πειραματικά μοντέλα μυών σε γήρανση μέσω στρωματικής έκκρισης TGFb (Reimann και συν. 2010). Υποστηρίζοντας την ιδέα ότι η OIS δρα ως φραγμός στην ανάπτυξη καρκίνου, ο ρυθμός γήρανσης των καρκινικών κυττάρων φαίνεται να συνδέεται με καλύτερη θεραπευτική έκβαση σε καρκίνου του ορθού υψηλού σταδίου (Haugstetter και συν. 2010). Επιπρόσθετα έχει δειχθεί ότι πολλά γονίδια που συνδέονται με τη γήρανση μειώνονται σημαντικά κατά την πρόοδο του καρκίνου (Chen και συν. 2005).

1ζiii. Γήρανση λόγω απώλειας ογκοκαταστολής in vivo

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η γήρανση in vivo μπορεί να προκληθεί από απώλεια ογκοκατασταλτικού γονιδίου (Chen και συν. 2005). Το φαινόμενο παρατηρήθηκε και σε καλοήγη δερματικά αδενώματα που φέρουν NF1 μεταλλάξεις όπου φάνηκε να υπερεκφράζονται πολλοί δείκτες γήρανσης με χαμηλή έκφραση phospho-ERK και phospho-AKT (Courtois-Cox και συν. 2006). Άλλη ερευνητική ομάδα χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο γήρανσης in vivo το οποίο έφερε απώλεια του αλληλίου Rb κατέληξε στο σχηματισμό αδενώματος του θυροειδούς με ενεργοποίηση του N-Ras και έκφραση διαφόρων δεικτών γήρανσης (Chen και συν. 2005).

1η. Πρώιμη κυτταρική γήρανση In vitro

Η γήρανση μπορεί να προκληθεί ακόμα και χωρίς την απώλεια μήκους των τελομερών, από διάφορες άλλες συνθήκες. Αυτή η γήρανση χαρακτηρίζεται

ως πρόωμη γήρανση καθώς προηγείται της μείωσης του μήκους των τελομερών. Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει την παρουσία πρόωμης γήρανσης in vivo γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό στην ογκοκαταστολή. Οι αιτίες που μπορεί να οδηγούν στη πρόωμη γήρανση in vitro είναι:

1) Στρες in vitro

Το φαινόμενο αυτό οφείλεται κυρίως στις συνθήκες της καλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα εξέρχονται από έναν οργανισμό και εισέρχονται στο περιβάλλον της καλλιέργειας, ένα τεχνητό δηλαδή περιβάλλον, παρατηρούνται διαφορές στις συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων καθώς και πληθώρα O₂ όπως και απουσία κυτταρικών τύπων του περιβάλλοντος και στοιχεία εξωκυττάριας ύλης με τα οποία αλληλεπιδρούσαν. Οι παραπάνω παράγοντες προκαλούν το λεγόμενο στρες στην καλλιέργεια (Sherr & DePinho 2000). Το φαινόμενο αυτό είναι ανεξάρτητο από το μήκος των τελομερών.

2) Γήρανση λόγω ενεργοποίησης ογκογονιδίων (oncogene induced senescence- OIS) in vitro

Πρόδρομες μελέτες ινοβλαστών που έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο HRAS (HRASV12) κατέληξαν στην ανακάλυψη ότι τα κύτταρα μετατρέπονται σε ογκογόνα, αλλά παράλληλα προκαλείται και διακοπή στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (Serrano και συν. 1997). Αυτή η ερευνητική ομάδα παρατήρησε ομοιότητες μεταξύ αυτών των κυττάρων με κυτταρική γήρανση και κατέληξε να χαρακτηρίσει το φαινόμενο αυτό *γήρανση λόγω ενεργοποίησης ογκογονιδίων*, OIS. Σε αντίθεση με τη RS, η OIS δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς την έκφραση του hTERT, ανεξάρτητα από το

μήκος των τελομερών (Wei & Sedivy 1999). Στα κύτταρα τα οποία βρίσκονται τόσο σε RS, όσο και στην OIS παρατηρείται σημαντική εμπλοκή στα μονοπάτια των p53 και p16INK4A–RB. Σε μοντέλα αρουραίων, μπορεί να προσπεραστεί η γήρανση που προκαλείται από το RASV12, μέσω απενεργοποίησης του p53 ή του ρυθμιστή του p53, p19ARF (Serrano και συν. 1997). Σε ανθρώπινα κύτταρα το p16INK4A φαίνεται να παίζει πιο σημαντικό ρόλο σε σχέση με το p53, καθώς κάποια είδη κυττάρων βασίζονται μόνο σε αυτό για την OIS (Ben-Porath & Weinberg 2005). Ειδικές μεταλλάξεις που επηρεάζουν το ανθρώπινο γονίδιο ARF (π.χ. p14ARF), αλλά όχι το p16INK4A, έχουν αναγνωριστεί στο ανθρώπινο μελάνωμα (Freedberg και συν. 2008). Είναι αποδεκτό ότι οι μηχανισμοί OIS δεν είναι ίδιοι για όλους τους κυτταρικούς τύπους και τα γενετικά προφίλ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί για την OIS το φαινόμενο RASV12 έναντι BRAFE600: η γήρανση λόγω RASV12 μπορεί να παρεμποδιστεί από το μονοπάτι p16INK4A–RB (Serrano και συν. 1997), ενώ η γήρανση λόγω BRAFE600 δε μπορεί να παρεμποδιστεί από το p16INK4A μόνο (Haferkamp και συν. 2009).

3) Γήρανση λόγω απώλειας ογκοκαταστολής in vitro

Μετάλλαξη ογκογονιδίου ή υπερέκφρασή του οδηγεί σε ογκοκαταστολή ενεργοποιώντας τη γήρανση σε κύτταρα ποντικών ή ανθρώπων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε για τα γονίδια PTEN και NF1. Η απώλεια του NF1 προκαλεί γήρανση in vitro η οποία συνοδεύεται από απώλεια των δραστηριοτήτων των ERK και AKT (Courtois-Cox και συν. 2006).

10. Τρόποι μελέτης της κυτταρικής γήρανσης

Αν και τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε φάση κυτταρικής γήρανσης υιοθετούν μια χαρακτηριστική μορφολογία *in vitro* (μεγάλα επίπεδα κύτταρα), αυτή η χαρακτηριστική μορφολογία δεν παρατηρείται *in vivo*. Επομένως η ύπαρξη ειδικών δεικτών είναι επιτακτική προκειμένου να μπορούν να αναγνωριστούν τα κύτταρα αυτά. Παρά τις προσπάθειες πολλών εργαστηρίων και το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για την αναγνώριση της κυτταρικής γήρανσης δεν έχουν καταδειχθεί αρκετοί δείκτες για τη μελέτη της.

Σαν δείκτες γήρανσης έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, όπως τα μόρια p21 και p27. Επιπρόσθετα, μόρια τα οποία εμπλέκονται στη βλάβη του γενετικού υλικού, όπως η γΗ2ΑΧ, ή στο σχηματισμό της ετεροχρωματίνης κατά τη γήρανση, όπως η ΗΡ1γ (heterochromatin protein 1γ) έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες (de Jesus και Blasco, 2012). Η ανάλυση μικροσυστοιχιών κατέδειξε μια σειρά νέων δεικτών γήρανσης όπως: p15INK4b, basic helix–loop–helix transcription factor BHLHE40 (DEC1) και decoy receptor 2 (TNFRSF10D) (Collado και συν., 2005). Οι παραπάνω δείκτες δε φαίνεται να είναι ικανοποιητικοί μόνοι τους και πρέπει να συνδυάζονται και με άλλους.

Ο πιο διαδεδομένος δείκτης είναι η χρώση με β-γαλακτοσιδάση σε pH 6.0 (senescence-associated β-galactosidase; SABG). Ο δείκτης αυτός φαίνεται να παρουσιάζεται στα κύτταρα σε φάση γήρανσης καθώς και σε κύτταρα πριν εισέλθουν σε φάση γήρανσης (de Jesus και Blasco, 2000). Η β-γαλακτοσιδάση δε φαίνεται να σχετίζεται με κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι στα γηρασμένα κύτταρα. Πιστεύεται ότι η έκφρασή της είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης περιεχομένου εντός των λυσοσωμάτων (Kurz και συν., 2000). Η χρώση της β-γαλακτοσιδάσης (σε κύτταρα ή ιστούς) πραγματοποιείται με Χ-

Gal (5-Bromo-4-chloro-Indoly-D-Galactoside) ή άλλο φθορίζον ανάλογο (όπως FDG) και ένα χρωμογόνο υπόστρωμα -Gal. Το X-Gal διασπάται από το -Gal δημιουργώντας μια αδιάλυτη μπλε χρώση.

Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί καταδεικνύοντας τη χρησιμότητα της χρώσης με β-γαλακτοσιδάση. Συγκεκριμένα το 2013 δημοσιεύτηκε μελέτη στην οποία η χρώση β-γαλακτοσιδάσης σε παθολογικό ιστό ασθενών με νεοπλασία του παχέως εντέρου χρησιμοποιήθηκε ως σημαντική πληροφορία για την εξέλιξη της νόσου (Angell και συν., 2013). Επιπρόσθετα μελέτες σε γλιακά κύτταρα από βιοψίες εγκεφάλου έχουν καταδείξει ότι ασθενείς με νόσο του Parkinson παρουσιάζουν υψηλή θετικότητα στη χρώση με β-γαλακτοσιδάση (Chinta και συν., 2013).

Ένα από τα μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθοδολογίας είναι ότι χρειάζονται φρέσκα παρασκευάσματα για να γίνει η χρώση καθώς η επεξεργασία βασίζεται σε ανοσοενζυμική αντίδραση. Το γεγονός αυτό καθιστά αδύνατη τη χρήση της συγκεκριμένης μεθοδολογίας σε παρασκευάσματα εγκλεισμένα σε παραφίνη και αρχειακούς ιστούς καθώς και μικροσυστοιχίες ιστών (Georgakorouli και συν., 2013). Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί πλέον προς τη χρώση άλλων σωματίων ενδεικτικών της κυτταρικής γήρανσης. Η λιποφουσκίνη είναι ένας χαρακτηριστικός δείκτης κυτταρικής γήρανσης. Τα κύτταρα καθώς γερνούν συσσωρεύουν κοκκία στο κυτταρόπλασμά τους, τα λεγόμενα σωματίδια λιποφουσκίνης. Η λιποφουσκίνη δεν είναι τίποτε άλλο από οξειδωμένες πρωτεΐνες που όσο αυξάνεται η ηλικία του κυττάρου τόσο αυξάνονται και αυτές. Τα κοκκία αυτά είναι ένα πολύ σημαντικό στάδιο της γήρανσης και φαίνεται να εμπλέκονται και στην παθολογία διαφόρων νοσημάτων, όπως στο γλαύκωμα (McElnea και συν.,

2014), στις μυϊκές δυστροφίες (Terrill και συν. 2013) και νευροεκφυλιστικές νόσους (Wu και συν., 2014). Το Sudan Black B αποτελεί μια λιποφιλική ιστοχημική χρώση η οποία ανιχνεύει τη λιποφουσκίνη και μπορεί να εφαρμοστεί και σε κυτταροχημικές και σε ιστοχημικές χρώσεις (Frederiks, 1977). Πρόσφατη ερευνητική μελέτη σε ιστούς παραφίνης κατέδειξε ότι το SBB παρουσίαζε θετικότητα σε όλους τους ιστούς που ήταν θετική στη β-γαλακτοσιδάση (Georgoroulou και συν., 2013). Ο βιοδείκτης αυτός αποτέλεσε έναν πολύ καλό δείκτη της κυτταρικής γήρανσης, ισάξιο με την Β-γαλακτοσιδάση, σε κυτταρικές σειρές καθώς και σε πειραματικά μοντέλα αδενοκαρκινωμάτων και αδενωμάτων του πνεύμονα σε μύες (Georgoroulou και συν., 2013).

2. Λεμφώματα

Τα λεμφώματα αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νεοπλασιών και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- 1) το λέμφωμα Hodgkin και
- 2) τα μη Hodgkin λεμφώματα.

Στη συγκεκριμένη μελέτη θα εστιάσουμε στο λέμφωμα Hodgkin.

2α. Λέμφωμα Hodgkin (HL)-Επίπτωση, συχνότητα

Η ονομασία έχει προέλθει από τον Βρετανό ιατρό Sir Thomas Hodgkin ο οποίος το 1832 περιέγραψε για πρώτη φορά τη νόσο σε περιστατικά ασθενών με υπερμεγέθεις λεμφαδένες και σπληνομεγαλία. Σε αντίθεση με άλλα νεοπλάσματα η συχνότητα κατανομής της νόσου είναι δικόρυφη. Η επίπτωση

της νόσου αυξάνεται στις νεαρές ηλικίες μέχρι την τρίτη δεκαετία και την ηλικία των 45 ετών και η δεύτερη αύξηση παρατηρείται μετά την ηλικία των 60 ετών. Η συχνότητα προσβολής των αντρών είναι μεγαλύτερη των γυναικών (1,3:1) με ενδιάμεση ηλικία προσβολής τα 31 έτη. Παρατηρούνται 2-3 περιστατικά ανά 100.000 κατοίκους στην Ευρώπη και στην Αμερική μάλιστα έχει παρατηρηθεί συσχέτιση με αυξημένο κοινωνικοοικονομικό επίπεδο, ευφυΐα, ολιγομελείς οικογένειες και το μορφωτικό επίπεδο των ασθενών (King, 2014).

Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστή η αιτιοπαθογένεια της νόσου. Ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνεται τουλάχιστον 3 φορές σε άτομα με ιστορικό λοιμώδους μονοπυρήνωσης και θετικότητα στον ιό EBV. Επιπρόσθετα αυξημένη συχνότητα παρουσιάζεται σε ασθενείς με συγγενή και επίκτητη ανοσολογική ανεπάρκεια.

2β. Διάγνωση

Η διάγνωση της νόσου γίνεται ιστολογικά με την αναγνώριση στο βιοπτικό υλικό των χαρακτηριστικών κυττάρων Reed-Sternberg (RS), τα οποία είναι ευμεγέθη κύτταρα με δίλοβο πυρήνα, διακριτά υπερχρωματικά πυρήνια και άφθονο κυτταρόπλασμα στο κατάλληλο αντιδραστικό υπόστρωμα. Το κύτταρο Hodgkin είναι μορφολογική παραλλαγή του κυττάρου RS διαθέτοντας ένα μόνο πυρήνα (King, 2014; Salati, 2014). Τα νεοπλασματικά κύτταρα ονομάζονται συλλογικά HRS (Hodgkin-Reed-Stemberg), και αποτελούν λιγότερο από 1% των κυττάρων του νεοπλάσματος δυσκολεύοντας την αναγνώρισή τους ανάμεσα στα υπόλοιπα κύτταρα (λεμφοκύτταρα, ηωσινόφιλα, ιστιοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και ουδετερόφιλα).

Η οντογενετική προέλευση του κυττάρου HRS μελετάται περισσότερο από ένα αιώνα. Η ανοσοϊστοχημεία, η PCR και οι τεχνικές μοριακής γενετικής κατέδειξαν ότι πρόκειται για κύτταρο της Β λεμφικής σειράς. Τα Β-λεμφοκύτταρα φυσιολογικά φέρουν ανοσοσφαιρίνη επιφανείας και κατά την επιλογή τους από το αντιγόνο μέσα στα βλαστικά κέντρα συχνά οδηγούνται σε απόπτωση. Στα HRS δεν ανιχνεύεται ανοσοσφαιρίνη επιφανείας. Η παρεμπόδιση της απόπτωσης έχει ερμηνευτεί με την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl2 στο 60% των περιπτώσεων του λεμφώματος (Cuccaro, 2014). Το ίδιο ισχύει και για την ιντερλευκίνη-10, η οποία προκαλεί την έκφραση του bcl2. Στο 20-30% των περιπτώσεων του λεμφώματος Hodgkin όπου είναι θετικές στον ιό EBV έχει βρεθεί έκφραση των πρωτεϊνών LMP-1,-2 (Latent Membrane Protein) οι οποίες μπορεί να συμμετέχουν στην αναστολή της απόπτωσης και την επιβίωση των κυττάρων HRS. Έρευνες έχουν δείξει ότι η απώλεια της ταυτότητας των Β-κυττάρων σχετίζεται με την απουσία έκφρασης μορίων ανοσοσφαιρίνης και είναι πολύ πιθανόν να είναι η αιτία της διαφυγής τους από την αποπτωτική διαδικασία (Cuccaro, 2014). Στα λεμφώματα Hodgkin αναγνωρίζεται άφθονο αντιδραστικό υπόστρωμα, με παρουσία πολυάριθμων μη νεοπλασματικών κυττάρων τα οποία παράγουν συγκεκριμένες κυτταροκίνες και χημειοκίνες, οι οποίες επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό τόσο των νεοπλασματικών κυττάρων, όσο και των κυττάρων του μικροπεριβάλλοντος. Έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένες κυτταροκίνες δρουν ως αυξητικοί παράγοντες για τα κύτταρα HRS (IL-6, -7, -9, -13, -17), ενώ άλλες επηρεάζουν το μικροπεριβάλλον (IL-5) ή ακόμα έχουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (IL-10, TGF). Επίσης αρκετές χημειοκίνες (TARC, MDC, IP-10, RANTES) φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο

στο σχηματισμό του μικροπεριβάλλοντος (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology , Cuccaro, 2014).

2γ. Ταξινόμηση

Η ταξινόμηση του λεμφώματος Hodgkin (HL) από το 1966 μέχρι σήμερα έχει διαφοροποιηθεί πολλές φορές. Το 1994 η ταξινόμηση REAL βασίστηκε για πρώτη φορά σε συνδυασμό κλινικών, μορφολογικών, ανοσοφαινοτυπικών και μοριακών χαρακτηριστικών των νεοπλασματικών κυττάρων (Cuccaro, 2014) και τελικά τροποποιήθηκε από την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO). Σήμερα γνωρίζουμε ότι το λέμφωμα Hodgkin προέρχεται από Β λεμφοκύτταρα (Jaffe, 2009). Σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμηση (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/hodgkins.pdf) διακρίνονται δύο κύριοι τύποι λεμφώματος Hodgkin (HL): το **κλασικό λέμφωμα Hodgkin (cHL)**, που αντιστοιχεί στο 95% των περιπτώσεων και ο κατά πολύ σπανιότερος (5% των περιπτώσεων) **οζώδης λεμφοεπικρατών τύπος (NLPHL)**, με διαφορές σε κλινικό/προγνωστικό επίπεδο, στη σύνθεση του κυτταρικού πληθυσμού, στον ανοσοφαινότυπο και στη διατήρηση ή μη του προγράμματος έκφρασης Β γονιδίων. Η ιστολογική εικόνα του cHL χαρακτηρίζεται από σπάνια νεοπλασματικά HRS κύτταρα σε άφθονο αντιδραστικό υπόστρωμα. Μια παραλλαγή νεοπλασματικών κυττάρων είναι τα μουμιοποιημένα κύτταρα, με συρρικνωμένο κυτταρόπλασμα και πυκνωτικό πυρήνα. Το cHL περιλαμβάνει του υπότυπους οζώδους σκλήρυνσης (70%), μικτής κυτταροβρίθειας (20%), τον πλούσιο σε λεμφοκύτταρα (5%) και τον πολύ σπάνιο υπότυπο της λεμφοκυτταρικής απογύμνωσης ή λεμφοπενικό (<1%) οι οποίοι διαφέρουν κλινικά, ιστολογικά και στην συχνότητα λοίμωξης

Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

από τον ιό Epstein-Barr (EBV), αλλά ανοσοφαινοτυπικά είναι ταυτόσημοι. Στο cHL χαρακτηριστική είναι η έκφραση του δείκτη CD30, με ή χωρίς έκφραση του CD15. Ο δείκτης CD20 εκφράζεται στο 20-30% των περιπτώσεων, ενώ ο ιός EBV ανευρίσκεται στο 20-30% των ασθενών.

Ο τύπος της οζώδους σκλήρυνσης είναι ο συχνότερος, εμφανίζεται κυρίως σε γυναίκες νεαρής ηλικίας και έχει καλή πρόγνωση. Χαρακτηριστική είναι η οζώδης διαμόρφωση, με διαφραγμάτια από ινώδη συνδετικό ιστό τα οποία χωρίζουν τον λεμφαδένα σε όζους και συνοδεύονται με πάχυνση της κάψας. Ο αριθμός των νεοπλασματικών κυττάρων ποικίλλει, ενώ λόγω της ίνωσης αναγνωρίζονται και τα χαρακτηριστικά βοθριοειδή κύτταρα (lacunar cells). Το αντιδραστικό κυτταρικό διήθημα περιλαμβάνει ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, μικρά λεμφοκύτταρα, ιστοκύτταρα κ.α.

Ο τύπος της μικτής κυτταροβρίθειας αντιπροσωπεύει το 20% των περιπτώσεων με εμφάνιση κυρίως σε παιδιά και σε μεγαλύτερους ενήλικες και σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Ιστολογικά αναγνωρίζονται τα κύτταρα HRS ανάμεσα σε αντιδραστικά ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, πλασματοκύτταρα και ιστοκύτταρα, που μπορεί να δημιουργήσουν κοκκιώματα. Συνήθως εμφανίζεται σε προχωρημένο στάδιο και σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση (King, 2014; Salati, 2014).

Ο πλούσιος σε λεμφοκύτταρα υπότυπος εμφανίζεται συχνότερα σε άνδρες κάτω των 35 ετών, σε αρχικό στάδιο (I, II), με πολύ καλή πρόγνωση. Η ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από οζώδες πρότυπο και σπάνια διάχυτο. Στους όζους παρατηρούνται κυρίως μικρά B-λεμφοκύτταρα, ενώ τα HRS κύτταρα είναι σπάνια. Στην πρώτη περίπτωση πρέπει να γίνει διαφοροδιάγνωση από

Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

τον οζώδη λεμφοεπικρατητικό τύπο, βάσει ανοσοφαινοτύπου. Τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα είναι ελάχιστα ή απουσιάζουν,

Ο τύπος της λεμφοκυτταρικής απογύμνωσης εμφανίζεται σε λιγότερο από το 1% των περιστατικών, σε ηλικιωμένους με γενικευμένη νόσο και συστηματικές εκδηλώσεις, με κακή πρόγνωση. Στα περιστατικά αυτά παρατηρείται εμπύρετο αγνώστου αιτιολογίας, ίκτερος, ηπατοσπληνομεγαλία και πανκυτταροπενία.

Ο οζώδης λεμφοεπικρατών τύπος λεμφώματος Hodgkin (NLPHL) είναι ένα μονοκλωνικό B-λέμφωμα, που χαρακτηρίζεται από ολική ή μερική κατάλυση του λεμφαδένα και την ανάπτυξη οζώδους, ή οζωδους και διάχυτου διηθήματος αποτελούμενου από μικρά λεμφοκύτταρα, ιστιοκύτταρα και νεοπλασματικά κύτταρα. Τα νεοπλασματικά έχουν τη χαρακτηριστική ονομασία L&H ή 'roscorn' κύτταρα. Χαρακτηρίζονται από μεγάλο μέγεθος με ένα πυρήνα, πολυλοβωτό ή με αναδιπλώσεις και πολλαπλά πυρήνια. Συνυπάρχουν ιστιοκύτταρα και πλασματοκύτταρα. Η διαφορο-διάγνωση περιλαμβάνει τον πλούσιο σε λεμφοκύτταρα υπότυπο του κλασσικού λεμφώματος Hodgkin και το πλούσιο σε B- και T- κύτταρα λέμφωμα. Ανοσοφαινοτυπικά τα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν CD20, CD45 και δεν εκφράζουν CD30, CD15. Ο ιός EBV σπάνια ανιχνεύεται (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/hodgkins.pdf).

2δ. Κλινική εικόνα

Η αρχική κλινική εικόνα των ασθενών αυτών χαρακτηρίζεται από ασυμπτωματική διόγκωση των λεμφαδένων (τραχηλικοί ή υπερκλείδιοι), με ή

χωρίς συμπτώματα (εμπύρετο χωρίς λοίμωξη, νυχτερινές εκδηλώσεις, απώλεια βάρους >10% εντός 6-μήνου: Β συμπτώματα). Τα Β συμπτώματα παρατηρούνται στο 35% των περιστατικών κατά τη διάγνωση. Στο 25% των περιστατικών παρατηρείται κνησμός. Σε ελάχιστες περιπτώσεις παρατηρείται πόνος στους προσβεβλημένους λεμφαδένες (ενδοθωρακικούς ή ενδοκοιλιακούς) μετά την κατανάλωση αλκοόλ. Όταν η νόσος έχει προχωρήσει στο μεσοθωράκιο παρατηρείται δύσπνοια/ορθόπνοια, φλεβική στάση στην κόπωση, βήχας ή θωρακικό άλγος, ενδοκοιλιακή οσφυαλγία (σύνδρομο μεσοθωρακίου). Σπάνια προσβάλλονται και εξωλεμφικά όργανα, όπως ο πνεύμονας, ο μυελός των οστών και το ήπαρ, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί προσβολή του γαστρεντερικού σωλήνα, του δέρματος και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Πέραν των τραχηλικών και υπερκλειδίων λεμφαδένων προσβάλλονται οι λεμφαδένες του μεσοθωρακίου, οι παραορτικοί και οι μασχαλιαίοι με φθίνουσα συχνότητα. Στο 10% των περιστατικών ο σπλήνας είναι ψηλαφητός ενώ στο 30% των περιστατικών είναι διηθημένος. Σπάνια παρατηρείται υποδιαφραγματική εντόπιση της νόσου (δακτύλιος του Waldeyer, μεσεντέριοι λεμφαδένες) (King, 2014).

Τρόποι εκδηλώσεως

| | |
|--|---------------|
| ασυμπτωματική διόγκωση επιπολής λεμφαδένων | 60% |
| διόγκωση επιπολής λεμφαδένων | 35% |
| παρατεινόμενο εμπύρετο ή άλλα Β-συμπτώματα (:απώλεια βάρους, άφθονοι -νυκτερινοί, ιδίως- ιδρώτες βήχας, κόπωση, δύσπνοια κοπώσεως ή σύνδρομο άνω κοίλης | 3% |
| βήχας, κόπωση, δύσπνοια κοπώσεως ή σύνδρομο άνω κοίλης | <2% |

διεύρυνση μεσοθωρακίου σε τυχαία ακτινογραφία θώρακος <2%

| | |
|--|---------------|
| κνησμός | 15-25% |
| προκλητό άλγος με τη λήψη αλοκοόλ, οσφυαλγία ή άλγος νεφρικών χωρών, εντοπισμένο οστικό άλγος, συμπτωματολογία πίεσης νευρικών ριζών, παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις | <3% |

Ανατομική εντόπιση

| |
|---|
| τραχηλικοί –υπερκλείδιοι λεμφαδένες: 80-85% |
| μεσοθωράκιο: 50-60% |
| μασχαλιαίοι λεμφαδένες: 25% |
| βουβωνικοί λεμφαδένες: 12% |
| επιτροχίλιοι, υποκλείδιοι λεμφαδένες: <1% |
| σπλήνας: (9%, (30-35%, μετά από χειρουργική σταδιοποίηση)) |
| πνεύμονας (7%) |
| μυελός των οστών (6%) |
| ήπαρ (5%) |
| οστά (2%) |
| δακτύλιος Waldeyer (1-2%) |
| θωρακικό τοίχωμα (<1%) |

Από τον αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο συγκεντρώνονται αξιοποιήσιμες πληροφορίες καθώς μερικά από τα ευρήματα αυτά έχουν προγνωστική σημασία. Από τη γενική αίματος αναγνωρίζεται αναιμία, λευκοπενία, ουδετεροφιλία ή ηωσινοφιλία. Η συνδεόμενη με το HL αναιμία έχει τα χαρακτηριστικά της αναιμίας επί χρόνιας νόσου, αν και μπορεί να είναι

απότοκη της επινεμήσεως του μυελού των οστών, ή να οφείλεται στην παρουσία ενός αυτοαντισώματος, όπως αναγνωρίζεται από τη δοκιμασία Coombs. Η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων μπορεί να ελέγχεται αυξημένη ή μειωμένη. Η ΤΚΕ, γενικός δείκτης φλεγμονής, μπορεί να ευρεθεί αυξημένη, εύρημα που έχει συνδυασθεί με δυσμενή πρόγνωση. Εν τούτοις, η ΤΚΕ είναι μια μη ειδική δοκιμασία και δεν πρέπει να θεωρείται ως δείκτης προσυμπτωματικού ελέγχου. Η LDH μπορεί να είναι αυξημένη και να σχετίζεται με την έκταση της παθήσεως. Η κρεατινίνη ορού μπορεί να αυξηθεί στις σπάνιες περιπτώσεις του συνδεδόμενου με HL νεφρωτικού συνδρόμου. Η αλκαλική φωσφατάση, ALP, μπορεί να είναι αυξημένη, ανάλογα με τις οστικές ή ηπατικές επινεμήσεις. Μεταξύ άλλων, ασυνήθων, παθολογικών ευρημάτων συγκαταλέγονται η υπερασβεστιαμία, η υπερνατριαιμία και η υπογλυκαιμία, λόγω της παρουσία αυτοαντισωμάτων έναντι της ινσουλίνης. Η εξέταση για HIV θεωρείται αναγκαία για το λέμφωμα, επειδή η αντίική θεραπεία μπορεί να ευνοήσει την έκβαση του λεμφώματος.

Αιματολογικά ευρήματα

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| αναιμία | 35% |
| λευκοκυττάρωση | 45% ($\geq 15 \times 10^9$ σε 15%) |
| λεμφοπενία | 35% |
| ηωσινοφιλία | 8% |
| θρομβοκυττάρωση | 25% |
| ΤΚΕ≥ 50 | 45% (≥ 100 σε 15%) |

2ε. Σταδιοποίηση κατά Ann-Arbor/Cotswolds

Η αυξανόμενη χρήση χημειοθεραπευτικών σχημάτων ακόμα και στα αρχικά στάδια του λεμφώματος Hodgkin οδήγησε στην καθιέρωση της κλινικής σταδιοποίησης η οποία βασίζεται στο σύστημα Ann Arbor και την τροποποίηση του κατά Cotswolds (King, 2014). Η βασική κατάταξη χωρίζεται σε αρχικά και προχωρημένα στάδια. Ο διαχωρισμός στις δύο αυτές κατηγορίες ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ερευνητικών ομάδων. Ως αρχικά θεωρούνται τα στάδια I και IIA και προχωρημένα τα στάδια III/IV. Η κατάταξη του σταδίου IIB ποικίλλει και θεωρείται προχωρημένο τουλάχιστον όταν συνοδεύεται από εξωλεμφαδενική επέκταση της νόσου ή ογκώδεις μάζες (>7εκ) (King, 2014).

Σταδιοποίηση - κατά περιοχή επινεμήσεων (Ann Arbor)

| στάδιο | περιοχή επινεμήσεων |
|--------|--|
| I | μονήρης ομάδα λεμφαδένων |
| II | πολλαπλές ομάδες από την ίδια πλευρά του διαφράγματος |
| III | πολλαπλές ομάδες λεμφαδένων από τις δύο πλευρές του διαφράγματος |
| IV | πολλαπλές εξωλεμφαδενικές επινεμήσεις |
| V | μαζικοί >10 cm |
| E | εξωλεμφαδενικές επινεμήσεις |
| A/B | B συμπτώματα απώλεια βάρους >10%, πυρετός, αθρόοι νυκτερινοί ιδρώτες |

Η διάγνωση αρχικά γίνεται μέσω βιοψίας διογκωμένου λεμφαδένα ή με βιοψία εξωλεμφικού οργάνου ή/και μυελού των οστών. Στη συνέχεια θα ακολουθήσει η κλινική σταδιοποίηση. Ως απαραίτητες εξετάσεις κρίνονται η γενική αίματος, βιοχημικός έλεγχος, anti-HIV και ο απεικονιστικός έλεγχος ο οποίος περιλαμβάνει την ακτινογραφία θώρακος, την αξονική τομογραφία τραχήλου, θώρακος, άνω και κάτω κοιλίας, την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET scan) (NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology), το σπινθηρογράφημα με Γάλλιο-67 και τον υπέρηχο καρδιάς. Επιπρόσθετα μπορούν να πραγματοποιηθούν μαγνητική τομογραφία θώρακα-κοιλίας, σπινθηρογράφημα οστών, απλή ακτινογραφία οστών.

2ζ. Πρόγνωση-Θεραπεία

Το λέμφωμα Hodgkin είναι ιάσιμο στο 85% των περιπτώσεων των ενηλίκων (Salati, 2014). Η θεραπευτική προσέγγιση εξαρτάται από το στάδιο της νόσου και τους παράγοντες κινδύνου (King, 2014). Ο ιστολογικός τύπος του λεμφώματος δεν επηρεάζει τη θεραπευτική παρέμβαση παρά μόνο στην περίπτωση που πρόκειται για τον οζώδη λεμφοεπικρατητικό τύπο. Έχει παρατηρηθεί μεγάλη ετερογένεια ως προς την έκβαση των ασθενών. Η εύρεση προγνωστικών παραγόντων απαιτείται προκειμένου η θεραπεία να είναι επιθετικότερη στους ασθενείς υψηλού κινδύνου. Μέχρι σήμερα ως προγνωστικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται η παρουσία B-συμπτωμάτων και η ύπαρξη ογκώδους νόσου (διάμετρος μάζας >5-10 εκ), ενώ χρησιμοποιείται και ο Διεθνής Προγνωστικός Δείκτης (International Prognostic Score, IPS). Το IPS αποτελείται από επτά παράγοντες που σχετίζονται με δυσμενέστερη εξέλιξη της νόσου: αλβουμίνη ορού < 40γ/Λ, αιμοσφαιρίνη <105 γ/Λ, φύλο (άρρεν), ηλικία>45 ετών, στάδιο IV, λευκοκυττάρωση >15x10⁹, λεμφοπενία

Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

$<0,6 \times 10^9$ και/ή 8% των λευκοκυττάρων. Κάθε ένας από τους παράγοντες μειώνει την επιβίωση κατά 8% (King, 2014; Cuccaro, 2014). Επιπρόσθετα τα επίπεδα ιντερλευκίνης 10 και του διαλυτού CD30 στον ορό, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 και της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 ενώ χρησιμοποιούνται ενδεικτικά ως προγνωστικοί δείκτες δεν έχει διευκρινιστεί η ακριβής βαρύτητά τους (Batlevi, 2013). Η θεραπεία των ασθενών αυτών έχει αλλάξει σημαντικά τα τελευταία χρόνια, εξαρτάται από το στάδιο και είναι ιδιαίτερα επιτυχής.

2η. Απόπτωση και λέμφωμα Hodgkin

Η παρεμπόδιση της απόπτωσης είναι ένα σημαντικό γεγονός στην παθογένεση του καρκίνου. Η διαφυγή από τα αποπτωτικά μονοπάτια αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα στη δημιουργία των HRS κυττάρων του λεμφώματος Hodgkin (Bai και συν., 2005). Δύο διαφορετικά αποπτωτικά μονοπάτια έχουν αναγνωρισθεί. Το πρώτο είναι μέσω της υπεροικογένειας του υποδοχέα TNF. Κατά την ενεργοποίηση του TNF δημιουργείται ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών και ενεργοποίησης των κασπασών-8, -3, -7 και ακολουθεί η καταστροφή δομών απαραίτητων για την επιβίωση του κυττάρου (Bai και συν., 2005). Το δεύτερο-ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι ενεργοποιεί την απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών του αποπτωτικού σωματίου και του διμερισμού της κασπάσης-9 (Bai και συν., 2005). Και τα δύο αποπτωτικά μονοπάτια οδηγούν σε πρωτεολυτικές διαδικασίες. Τα κύτταρα HRS εκφράζουν το CD95 (Fas) και άλλα μέλη της οικογένειας TNFR (tumor necrosis factor) και οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση μέσω ενεργοποίησης των κασπασών (Maggio και συν., 2003). Τα κύτταρα HRS φαίνεται να φέρουν

Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

μεταλλάξεις στο γονίδιο CD95 οδηγώντας σε διαταραχές του αποπτωτικού μηχανισμού (Maggio και συν., 2003). Μια άλλη πρωτεΐνη η οποία φαίνεται να διαταράσσεται είναι η FLICE-inhibitory protein-c-FLIP η οποία εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα HRS. Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση του c-FLIP έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μέσω CD95 της απόπτωσης στα κύτταρα HRS (Dutton και συν, 2004).

II. Ειδικό μέρος

1. Σκοπός

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικά βήματα στη διασαφήνιση των παθοφυσιολογικών και μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια του λεμφώματος Hodgkin, παρ'όλα αυτά όμως αρκετά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Ένα από τα ερωτηματικά και συγχρόνως αίτιο δυσκολίας στην προσέγγιση ήταν και ο περιορισμένος αριθμός νεοπλασματικών HRS κυτάρων με εντόπιση εν μέσω άφθονου αντιδραστικού πληθυσμού. Στα πλαίσια κάλυψης αυτού του «βιβλιογραφικού κενού» εντάσσεται και η μελέτη της σχέσης της κυτταρικής γήρανσης με την εμφάνιση του λεμφώματος Hodgkin και του ρόλου της στα κύτταρα HRS. Ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρονται στην κυτταρική γήρανση στα Β- και Τ-λεμφώματα, ενώ η μελέτη της συγκεκριμένης διαδικασίας στο λέμφωμα Hodgkin αποτελεί νέο ερευνητικό πεδίο.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει σκοπό τη διερεύνηση της διαδικασίας της κυτταρικής γήρανσης σε περιστατικά ασθενών με πρωτοπαθές λέμφωμα Hodgkin, χρησιμοποιώντας την ιστοχημική χρώση SBB, που έχει δειχθεί σε προηγούμενη ερευνητική μελέτη ότι αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της κυτταρικής γήρανσης σε ιστικό επίπεδο και μάλιστα σε αρχειακό υλικό (Georgakopoulou και συν., 2013). Έτσι θα διερευνηθεί το συγκεκριμένο μόριο ως ένας αξιόπιστος βιοδείκτης για τα παραπάνω περιστατικά.

2. Υλικό

Στη συγκεκριμένη μελέτη συμπεριελήφθησαν 11 ασθενείς με κλασσικό λέμφωμα Hodgkin (cHL) οι οποίοι επελέγησαν από τα αρχεία του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Γενικού Νοσοκομείου «Άγιος Σάββας» κατά το χρονικό διάστημα 2001-2014. Τα κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών ελήφθησαν από τα αρχεία του Αιματολογικού Τμήματος του ίδιου Νοσοκομείου και περιελάμβαναν την ηλικία και το φύλο των ασθενών. Ένα περιστατικό ασθενούς με λεμφαδένες οι οποίοι παρουσίαζαν αλλοιώσεις αντιδραστικού τύπου χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς-μάρτυρας για την παρούσα μελέτη.

Η διάγνωση των λεμφωμάτων στηρίχθηκε στα ιστολογικά και ανοσοϊστοχημικά ευρήματα σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO για τα λεμφικά νεοπλάσματα βασιζόμενη σε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και ανοσοχρώσεων για τους ενδεδειγμένους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες (CD30, CD15, CD20, CD3, EMA, LCA, PAX5, Ki-67; Dako Glostrup, Denmark). Όλες οι περιπτώσεις επανελέγχθηκαν και ταξινομήθηκαν από δύο μελετητές (ΑΒ και ΥΔΑ). Συνολικά συμπεριελήφθησαν στη μελέτη 11 περιπτώσεις από τις οποίες οκτώ (8) αντιστοιχούσαν σε οζώδη σκλήρυνση και τρεις (3) σε μεικτή κυτταροβρίθεια. Η ταξινόμησή τους παρουσιάζεται στον πίνακα Ι.

| A/A | Ηλικία | Φύλο | Ιστολογική εξέταση |
|-----|--------|------|------------------------------------|
| 1 | 73 | A | cHL, τύπου οζώδους σκλήρυνσης |
| 2 | 59 | A | cHL, τύπου μεικτής κυτταροβρίθειας |
| 3 | - | Θ | cHL, τύπου οζώδους σκλήρυνσης |

| A/A | Ηλικία | Φύλο | Ιστολογική εξέταση |
|-----|--------|------|-------------------------------------|
| 4 | 47 | A | cHL, τύπου οζώδους σκλήρυνσης |
| 5 | 48 | A | cHL, τύπου οζώδους σκλήρυνσης |
| 6 | 61 | A | cHL, τύπου μεικτής κυτταροβρίθειας |
| 7 | 51 | A | cHL, τύπου οζώδους σκλήρυνσης |
| 8 | - | Θ | cHL, τύπου οζώδους σκλήρυνσης |
| 9 | 40 | Θ | cHL τύπου οζώδους σκλήρυνσης |
| 10 | 53 | Θ | cHL, τύπου οζώδους σκλήρυνσης |
| 11 | 75 | Aθ | cHL, τύπου μεικτής κυτταροβρίθειας. |

3. Μέθοδος

Η μελέτη της κυτταρικής γήρανσης στην παρούσα εργασία έγινε με τη χρήση της ιστοχημικής χρώσης Sudan-Black-B (SBB), όπως έχει περιγραφεί (Georgakoroulou και συν., 2013). Συγκεκριμένα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η χρώση με SBB, έγινε προετοιμασία του διαλύματος της χρωστικής (0,7 gr SBB διαλυμένα σε 70% αιθανόλη) και κατόπιν ακολούθησε η διαδικασία της χρώσης των δειγμάτων. Αφού προηγήθηκε η μονιμοποίηση των δειγμάτων σε διάλυμα φορμαλδεΐδης, ακολούθησαν σταδιακές επωάσεις σε διαλύματα αιθανόλης και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για χρώση, σε διάλυμα SBB για 2-8 λεπτά. Στο τέλος ακολούθησαν πλύσεις με 50% διάλυμα αιθανόλης, με αποστειρωμένο νερό και 0,1% Nuclear Fast Red διάλυμα και τέλος ακολούθησε επικάλυψη της χρώσης με διάλυμα γλυκερόλης 40%.

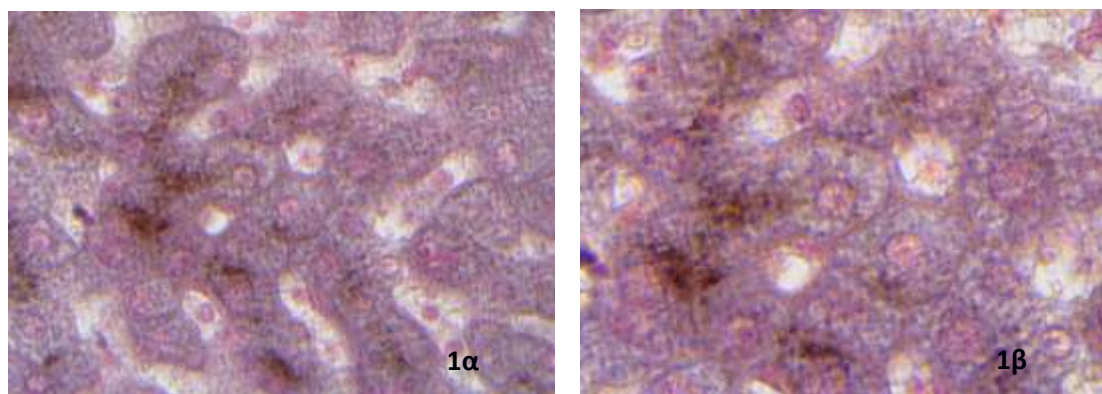
Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ιστός από φυσιολογικό ήπαρ.

Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

Όλες οι περιπτώσεις σαρώθηκαν και τα νεοπλασματικά HRS κύτταρα μελετήθηκαν για ύπαρξη θετικής αντίδρασης, Τουλάχιστον 30 νεοπλασματικά κύτταρα αξιολογήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

4. Αποτελέσματα

Αρχικά έγινε χρώση σε βιοπτικό υλικό από ήπαρ που χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας. Η ιστοχημική χρώση από το ήπαρ ήταν θετική, με παρουσία σκουρόχρωμων καφέ κοκκίων σε συσσωματώματα στο κυτταρόπλασμα, γύρω από τον πυρήνα, σε περίπου 25% των ηπατοκυττάρων (Εικ. 1).

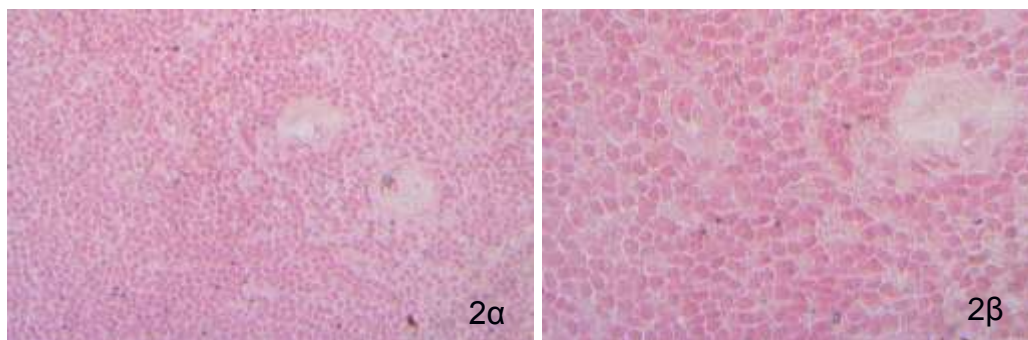


Εικόνα 1: Ιστοχημική χρώση στο θετικό μάρτυρα (ήπαρ), 1α (μεγέθυνση 40X), και 1β (μεγέθυνση 63X).

Παράλληλα μελετήθηκε μία περίπτωση αντιδραστικού λεμφαδένα με τη χρώση SBB. Αυτή δεν παρουσίασε θετικότητα, ούτε στα κύτταρα του ανοσοποιητικού (λεμφοκύτταρα και μακροφάγα) στις διαφορετικές περιοχές του παρεγχύματος (εξωτερικός φλοιός, εσωτερικός φλοιός, μυελός), ούτε και

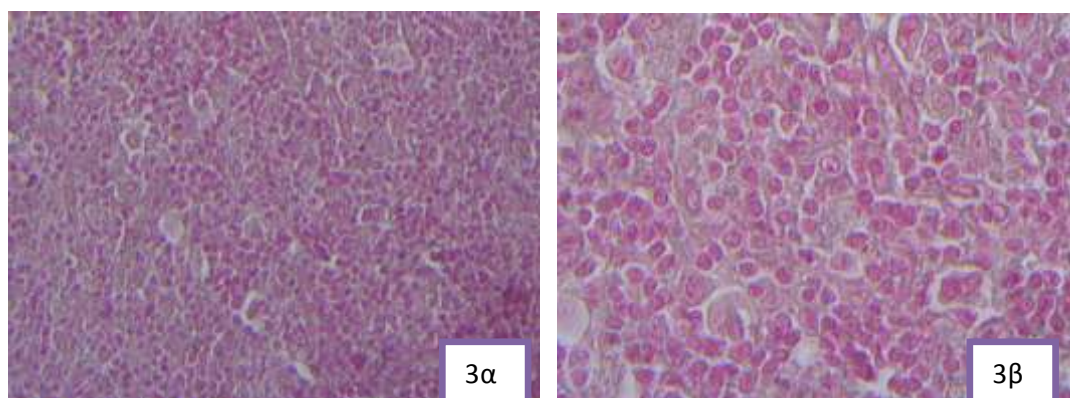
Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

στα στηρικτικά κύτταρα του στρώματος, τους ινοβλάστες ή στα κύτταρα των αγγείων (Εικ. 2).

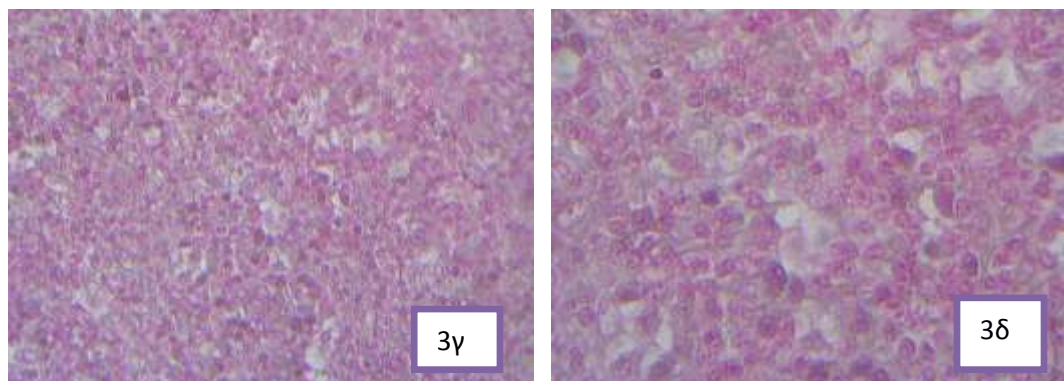


Εικόνα 2: Χρώση SBB σε αντιδραστικό λεμφαδένα, 2α (μεγέθυνση 20X), 2β (μεγέθυνση 40X).

Η μελέτη των 11 περιπτώσεων κλασσικού λεμφώματος Hodgkin έδειξε ότι σε όλες τις περιπτώσεις τα νεοπλασματικά HRS κύτταρα ήταν αρνητικά (Εικ. 3, 4). Η παράλληλη παρουσία αντίδρασης στους θετικούς μάρτυρες κατέδειξε την επιτυχή εφαρμογή της τεχνικής. Εκτός από τα νεοπλασματικά κύτταρα, δεν παρατηρήθηκε χρώση με το SBB ούτε στα αντιδραστικά λεμφοκύτταρα ή στα κύτταρα του στρώματος σε κανένα από τα περιστατικά.

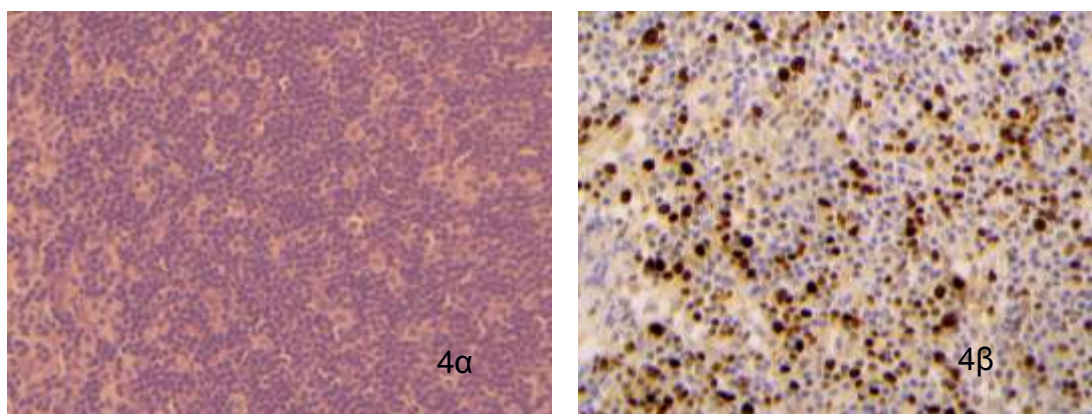


Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin



Εικόνα 3: Έλλειψη ιστοχημικής χρώσης SBB στα νεοπλασματικά HRS κύτταρα 3α (μεγέθυνση 20X), 3β (μεγέθυνση 40X), 3γ (μεγέθυνση 20X), 3δ (μεγέθυνση 40X).

Παράλληλη ανοσοϊστοχημική χρώση με τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67, η οποία ήταν διαθέσιμη σε όλες τις περιπτώσεις στα πλαίσια της διαγνωστικής προσέγγισης έδειξε υψηλή θετικότητα, που ξεπερνούσε το 50% των νεοπλασματικών HRS κυττάρων (Εικ. 4).



Εικόνα 4: Χρώση κλασσικού λεμφώματος Hodgkin 4α. με αιματοξυλίνη ηωσίνη (μεγέθυνση 20X) και 4β. με τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67, όπου παρατηρείται έντονη αντίδραση σε αυξημένο αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων (μεγέθυνση 20X).

5. Συζήτηση

Σχεδόν 50 χρόνια πριν καταδείχθηκε ότι τα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα υπόκεινται σε περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων στην καλλιέργεια προτού να σταματήσει η ανάπτυξή τους μέσω μιας διαδικασίας η οποία ονομάζεται κυτταρική γήρανση (Ben-Porath & Weinber, 2005). Πολλές μελέτες έδειξαν παράλληλα με τη μόνιμη διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης και σοβαρές μεταβολές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της αντοχής στην αποπτωτική διαδικασία (Blasco, 2005) και μεταβολές στο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης (Campisi και συν., 2007). Σε άλλες μελέτες έχει καταδειχθεί ότι ο φαινότυπος των γηρασμένων κυττάρων μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες, όπως στρες ή λόγω έκφρασης ογκογονιδίων (Collado και συν., 2007). Είναι πλέον σαφές ότι η μόνιμη διατήρηση των κυττάρων σε φάση «αναμονής» αποτελεί το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης και δεν παρατηρείται μόνο στο ανθρώπινο είδος αλλά και σε άλλα σπονδυλωτά. Επιπρόσθετα υπάρχουν δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι γηρασμένα κύτταρα μπορούν να συσσωρεύονται στους ιστούς που ανανεώνονται με την ηλικία και σε τμήματα του οργανισμού στα πλαίσια παθολογικών καταστάσεων συνδεδεμένων με την ηλικία, όπως στην οστεοαρθρίτιδα και στην αρτηριοσκλήρυνση (Collado & Serrano, 2010).

Το λέμφωμα Hodgkin είναι συχνό λέμφωμα στο Δυτικό κόσμο και συνήθως προσβάλλει νεαρούς ενήλικες. Με βάση τη μορφολογία, την ανοσοφαινοτυπική ανάλυση και την κλινική εικόνα το λέμφωμα Hodgkin διακρίνεται στις δύο κύριες κατηγορίες, η συχνότερη των οποίων είναι το κλασσικό λέμφωμα Hodgkin (cHL). Χαρακτηριστικό του cHL είναι η παρουσία σπάνιων

νεοπλασματικών HRS κυττάρων, τα οποία αντιπροσωπεύουν μόλις το 1% του κυτταρικού διηθήματος, τα οποία περιβάλλονται από άφθονο αντιδραστικό πληθυσμό.

Αν και η ενεργοποίηση των φυσιολογικών κυττάρων από όλα τα σηματοδοτικά μονοπάτια ελέγχεται αυστηρά, στα κύτταρα HRS αρκετά σήματα και οδοί παρουσιάζουν διαταραχές. Συγκεκριμένα τα μόρια Notch1, multiple receptor tyrosine kinases (RTKs), τα μονοπάτια PI3K και MEK/ERK, και οι μεταγραφικοί παράγοντες NFκB, STAT και AP-1 ενεργοποιούνται πέραν του φυσιολογικού (Cristofalo και συν., 2004). Πειραματική αναστολή αρκετών από τα σηματοδοτικά μόρια αποκαλύπτει τη σημασία της συνεχούς ενεργοποίησης στην επιβίωση και στον πολλαπλασιασμό των HRS κυττάρων.

Η διαφυγή από την αποπτωτική διαδικασία είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό γεγονός στην ανάπτυξη των νεοπλασμάτων και παρατηρείται ιδιαίτερα στα HRS κύτταρα. Καθώς τα HRS κύτταρα προέρχονται από προ-αποπτωτικά B κύτταρα, η διαφυγή της αποπτωτικής διαδικασίας είναι σημαντικό βήμα στο μετασχηματισμό των κυττάρων σε νεοπλασματικά.

Η κυτταρική γήρανση είναι ένα ερευνητικό πεδίο το οποίο προσεγγίζεται με διαφορετικούς τρόπους σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Τον τελευταίο καιρό μια σειρά νοσημάτων και διεργασιών, όπως η ίνωση, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι νευρολογικές καταστάσεις, οι μυϊκές διαταραχές και πολλά άλλα διερευνούνται ως προς την κυτταρική γήρανση των παθολογικών κυττάρων. Στα πλαίσια αυτά εντάσσεται και η συγκεκριμένη μελέτη η οποία αποσκοπεί στη διερεύνηση του φαινομένου της γήρανσης σε περιστατικά με cHL. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 11 ασθενείς με πρωτοπαθές cHL. Η διάγνωση έγινε με βάση την ιστολογική εικόνα και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η

χρώση για την κυτταρική γήρανση έγινε με την ιστοχημική χρώση SSB, μια τεχνική η οποία πρόσφατα επιβεβαιώθηκε ότι αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για την μελέτη του φαινομένου σε αρχιακό υλικό (Georgakoroulou και συν., 2013). Όλα τα περιστατικά τα οποία μελετήθηκαν ήταν αρνητικά στη χρώση με το SBB. Δεν πραγματοποιήθηκαν αλλαγές επί του πρωτοκόλλου της χρώσης διότι ο θετικός μάρτυρας παρουσίαζε θετικότητα.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης περιλαμβάνει μια σειρά από αλλαγές στο πρόγραμμα της γήρανσης των κυττάρων. Επίσης, κατά τη διάρκεια της αντινεοπλασματικής θεραπείας μπορεί στα νεοπλασματικά κύτταρα είτε να ενεργοποιηθεί η αποπτωτική διαδικασία είτε να ευοδωθεί η κυτταρική γήρανση (Shay & Roninson, 2004). Η υπερέκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή η αναστολή των ογκογονιδίων μπορεί να οδηγήσει σε γήρανση τα νεοπλασματικά κύτταρα (Shay & Roninson, 2004). Παρόλο που τα γηρασμένα κύτταρα δεν διαιρούνται, είναι μεταβολικά ενεργά και ικανά να εκκρίνουν παράγοντες, οι οποίοι μπορούν είτε να διεγείρουν ή να αναστείλουν την ανάπτυξη του όγκου (Jones και συν., 2012). Στο κλασσικό λέμφωμα Hodgkin έχει παρατηρηθεί αναστολή της αποπτωτικής διαδικασίας (Felberbaum, 2005) χωρίς να υπάρχουν δεδομένα για την κυτταρική γήρανση. Το γεγονός ότι στη μελέτη της μικρής σειράς περιστατικών που πραγματοποιήσαμε δεν παρατηρήθηκαν νεοπλασματικά ή άλλα κύτταρα θετικά με την ιστοχημική χρώση SSB, που αποτελεί δείκτη της κυτταρικής γήρανσης, μπορεί να ερμηνευτεί με πολλούς τρόπους.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα στο λέμφωμα Hodgkin είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν αναστολή της απόπτωσης, η οποία είναι πιθανό να μην ακολουθείται από το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης. Αξίζει να αναφερθεί

ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα στο λέμφωμα Hodgkin παρουσιάζουν υψηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό, όπως παρατηρείται από την αυξημένη έκφραση δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως το Ki67 και το KiS1 (Doussis-Anagnostopoulou 2008), γεγονός που δεν συνάδει με την κυτταρική γήρανση. Είναι επομένως πιθανόν στα κύτταρα αυτά το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης να μην είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Τέλος πρόσφατη μελέτη στην κυτταρική γήρανση κατέδειξε ότι τα ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος διαθέτουν μηχανισμό απομάκρυνσης των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση κυτταρικής γήρανσης (Sagin & Krizhanovsky, 2013). Έτσι θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ακόμη και όσα κύτταρα μπαίνουν σε αυτή τη φάση, απομακρύνονται άμεσα από το πλούσιο αντιδραστικό περιβάλλον του λεμφώματος Hodgkin. Παράλληλα, η έλλειψη θετικότητας στα αντιδραστικά λεμφοκύτταρα του υποστρώματος μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά παραμένουν για μικρό χρονικό διάστημα στο λεμφαδένα και επομένως μας διαφεύγει το στάδιο αυτό (Janeway, 2011).

Το αποτέλεσμα της πρόδρομης μελέτης μας χρίζει περαιτέρω διερεύνησης σε μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών για να επιβεβαιωθεί και να εκτιμηθεί. Επιπρόσθετα θα παρουσίαζε ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί συγκριτική μελέτη και με άλλους δείκτες κυτταρικής γήρανσης ώστε να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η σημασία ή μη του φαινομένου της γήρανσης στα νεοπλασματικά HRS κύτταρα στα πλαίσια της μελέτης της παθογένειας του λεμφώματος Hodgkin.

Βιβλιογραφία

Acosta JC, O’Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008; 133: 1006–1018.

Angell HK, Tosolini M, Mlecnik B, Bindea G, Fredriksen T, Lafontaine L, Waldner M, Pagès F, Valge-Archer V and Galon J. The impact of cellular senescence and DNA damage on colorectal tumour progression. *J Immunother Cancer*. 2013; 1(Suppl 1): P144.

Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011;479: 232–236.

Balducci L, & Ershler W.B. Cancer and ageing: a nexus at several levels. *Nat. Rev. Cancer*. 2005; 5:655–662.

Batlevi CL, Younes A. Novel therapy for Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013; 2013:394-399.

Beauséjour, C.M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S.W. Lowe, P. Yaswen, J. Campisi. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*. 2003; 22:4212–4222.

Benguria A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M.

Ben-Porath I & Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37:961–976.

Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001; 106:661–673.

Blanco R, Munoz P, Flores JM, Klatt P, Blasco MA. Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*. 2007; 21:206 –220.

Blasco MA & Hahn WC. Evolving views of telomerase and cancer. *Trends Cell Biol*. 2003;13:289 –294.

Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005; 6:611– 622.

Böll B, Fuchs M, Reiners KS, Engert A, Borchmann P. Lenalidomide In Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2010 116: Abstract 2828.

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AHFM, Schlegelberger B, Stein H, Dorken B, Jenuwein T, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 2005; 436: 660–665.

Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:729 –740.

Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685-705.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):513-22.

Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:5300–5305.

Chen X, Mitsutake N, LaPerle K, Akeno N, Zanzonico P, Longo VA, Mitsutake S, Kimura ET, Geiger H, Santos E, et al. Endogenous expression of Hras(G12V) induces developmental defects and neoplasms with copy number imbalances of the oncogene. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106: 7979–7984.

Chen, Z., L.C. Trotman, D. Shaffer, H.K. Lin, Z.A. Dotan, M. Niki, J.A. Koutcher, H.I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005; 436:725–730.

Chinta SJ, Lieu CA, Demaria M, Laberge RM, Campisi J, Andersen JK. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? *J Intern Med*. 2013 May;273(5):429-36.

Choudhury AR, Ju Z, Djojotubroto MW, et al. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet*. 2007; 39:99–105.

Collado M, & Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer*. 2010;10:51–57.

Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007; 130:223–233.

Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas Coppé, J.P., C.K. Patil, F. Rodier, A. Krtolica, C.M. Beauséjour, S. Parrinello, J.G.

Hodgson, K. Chin, P.Y. Desprez, and J. Campisi. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One*. 2010; 5:e9188.

Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Coppé, J.P., K. Kauser, J. Campisi, and C.M. Beauséjour. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem*. 2006; 281:29568–29574.

Coppé, J.P., K. Kauser, J. Campisi, and C.M. Beauséjour. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem*. 2006;281:29568–29574.

Courtois-Cox S, Genter Williams SM, Reczek EE, Johnson BW, McGillicuddy LT, Johannessen CM, Hollstein PE, MacCollin M, Cichowski K. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*. 2006; 10: 459–472.

Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. Replicative senescence: A critical review. *Mech Ageing Dev*. 2004; 125: 827–848.

Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, Galli E, Giachelia M, Hohaus S. Prognostic factors in hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014; 6:e2014053.

d’Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, de Jesus BB, Blasco MA. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ Res*. 2012;111:97-109.

d’Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano,

Feldser DM & Greider CW. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell*. 2007;11:461–469.

Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, Dutton A, O'Neil JD, Milner AE, Reynolds GM, Starczynski J, Crocker J, Young LS, Murray PG. Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6611–6.

Dutton A, O'Neil JD, Milner AE, Reynolds GM, Starczynski J, Crocker J, Young LS, Murray PG. Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6611–6.

Doussis-Anagnostopoulou IA, Vassilakopoulos TP, Thymara I, Korkolopoulou P, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Kokoris SI, Dimitriadou EM, Kalpadakis C, Matzouranis M, Kaklamanis L, Panayiotidis P, Kyrtsolis MC, Androulaki A, Patsouris E, Kittas C, Pangalis GA. Topoisomerase IIalpha expression as an independent prognostic factor in Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 15;14(6):1759-66.

Falandry C, Gilson E, Rudolph KL. Are aging biomarkers clinically relevant in oncogeriatrics? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;85:257-65.

Felberbaum RS. The molecular mechanisms of classic Hodgkin's lymphoma. *Yale J Biol Med*. 2005;78(4):203-10.

Feldser DM & Greider CW. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell*. 2007; 11:461–469.

Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, Blasco MA. The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* 2008; 22:654–667.

Frederiks WM. Some aspects of the value of Sudan Black B in lipid histochemistry. *Histochemistry.* 1977;54(1):27-37.

Georgakopoulou EA, Tsimaratou K, Evangelou K, Fernandez Marcos PJ, Zoumpourlis V, Trougakos IP, Kletsas D, Bartek J, Serrano M, Gorgoulis VG. *Aging (Albany NY).* Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues 2013; 5:37-50.

Haferkamp S, Scurr LL, Becker TM, Frausto M, Kefford RF, Rizos H. Oncogene-induced senescence does not require the p16(INK4a) or p14ARF melanoma tumor suppressors. *J Invest Dermatol,* 2009;129: 1983–1991.

Hanahan D, & Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57–63.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345:458–460.

Haugstetter AM, Loddenkemper C, Lenze D, Grone J, Standfuss C, Petersen I, Dorken B, Schmitt CA. Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2010;103: 505–509.

Hayflick L & Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585– 621.

Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997;62:1180–1190.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. 1965; 37:614–636.

Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science*. 2006;311: 1257.

Hoare M, Das T, Alexander G. Ageing, telomeres, senescence, and liver injury. *J Hepatol*. 2010 Nov;53(5):950-61.

Itahana K, Zou Y, Itahana Y, Martinez JL, Beausejour C, Jacobs JJ, Van Lohuizen M, Band V, Campisi J, Dimri GP. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol*. 2003;23:389–401.

Iwasa H, Han J, Ishikawa F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells*. 2003; 8:131–144.

Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:523-31.

Janeway's Immunobiology 7th Edition (Murphy, Travers, Walport) 2011.

Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, Sahin E, Kost-Alimova M, Protopopov A, Cadinanos J, Horner JW, Maratos-Flier E, Depinho RA. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*. 2011;469: 102–106.

Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

Jones CH, Pepper C, Baird DM. Telomere dysfunction and its role in haematological cancer. *Br J Haematol.* 2012;156:573-87.

Ju Z, Jiang H, Jaworski M, Rathinam C, Gompf A, Klein C, Trumpp A, Rudolph KL. Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. *Nat Med.* 2007 Jun;13(6):742-7.

Kim, S.H., C. Beausejour, A.R. Davalos, P. Kaminker, S.J. Heo, and J. Campisi. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J. Biol. Chem.* 2004;279:43799–43804.

King RL, Howard MT, Bagg A. Hodgkin lymphoma: pathology, pathogenesis, and a plethora of potential prognostic predictors. *Adv Anat Pathol.* 2014;21:12-25.

Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell.* 2008;134: 657–667.

Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell.* 2008;133: 1019.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt20):3613–3622.

Le, O.N., F. Rodier, F. Fontaine, J.P. Coppe, J. Campisi, J. DeGregori, C. Laverdière, V. Kokta, E. Haddad, and C.M. Beauséjour. Ionizing radiation-

induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell*. 2010;9:398–409.

Lee, B.Y., J.A. Han, J.S. Im, A. Morrone, K. Johung, E.C. Goodwin, W.J.Kleijer, D. DiMaio, and E.S. Hwang. Senescence-associated betagalactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006;5:187–195.

Liu, Y., H.K. Sanoff, H. Cho, C.E. Burd, C. Torrice, J.G. Ibrahim, N.E. Thomas, and N.E. Sharpless. Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell*. 2009;8:439–448.

M, Benguria A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, et al. Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;436: 642.

M. Linskens, I. Rubelj, O.M. Pereira-Smith, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92:9363–9367.

Maggio EM, van den Berg A, de Jong D, Diepstra A, Poppema S. Low frequency of FAS mutations in Reed–Sternberg cells of Hodgkin’s lymphoma. *Am J Pathol* 2003;162:29–35.

Martinez P, Siegl-Cachedenier I, Flores JM, Blasco MA. MSH2 deficiency abolishes the anticancer and pro-aging activity of short telomeres. *Aging Cell*. 2009;8:2–17.

McElnea EM, Hughes E, McGoldrick A, McCann A, Quill B, Docherty N, Irraten M, Farrell M, Clark AF, O Brien CJ, Wallace DM. Lipofuscin

accumulation and autophagy in glaucomatous human lamina cribrosa cells. *BMC Ophthalmol.* 2014;14(1):153.

Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, Ronnett BM, De Marzo AM. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004;10:3317–3326.

Michaloglou, C., L.C.W. Vredeveld, M.S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C.M.A.M. van der Horst, D.M. Majoor, J.W. Shay, W.J. Mooi, and D.S. Peeper. BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005;436:720–724.

Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002; 105: 1541–1544.

Mizuno T, Zhong X, Rothstein TL. Fas-induced apoptosis in B cells. *Apoptosis* 2003;8:451–60.

Molofsky, A.V., S.G. Slutsky, N.M. Joseph, S. He, R. Pardal, J. Krishnamurthy, N.E. Sharpless, and S.J. Morrison. Increasing p16^{INK4a} expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature.* 2006;443:448–452.

Mucciardi G, Gali' A, Barresi V, Mucciardi M, Aguenouz M, Inferrera A, Magno C. Telomere instability in papillary bladder urothelial carcinomas: Comparison with grading and risk of recurrence. *Indian J Urol.* 2014;30(3):245-51.

Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jul;15(7):482-96.

Narita M, Lowe SW. Senescence comes of age. *Nat Med* 2005;11: 920–922.

Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon, and S.W. Lowe. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003;113:703–716.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Hodgkin Lymphoma. Version 2.2010.

Pare R, Yang T, Shin JS, Lee CS. The significance of the senescence pathway in breast cancer progression. *J Clin Pathol.* 2013;66(6):491-5.

Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, Clark IM. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell.* 2002;1: 57–65.

Reimann M, Lee S, Loddenkemper C, Dorr JR, Tabor V, Aichele P, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA. Tumor stroma-derived TGF- β limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell.* 2010;17: 262–272.

Rodier, F., D.P. Muñoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik, J.P. Coppé, E. Campeau, C.M. Beauséjour, S.H. Kim, et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* 2011;124:68–81.

Rodier, F., J.P. Coppé, C.K. Patil, W.A.M. Hoeijmakers, D.P. Muñoz, S.R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A.R. Davalos, and J. Campisi. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 2009;11:973–979.

Rodriguez-Puebla ML, LaCava M, Bolontrade MF, Russell J, Conti CJ. Increased expression of mutated H-ras during premalignant progression in SENCAR mouse skin. *Mol Carcinog.* 1999;26: 150–156.

Roxburgh CS, Richards CH, Macdonald AI, Powell AG, McGlynn LM, McMillan DC, Horgan PG, Edwards J, Shiels PG. The in situ local immune response, tumour senescence and proliferation in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2013;109(8):2207-16.

Sagiv A, Krizhanovsky V. Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology.* 2013;14(6):617-28.

Sahin E, Colla S, Liesa M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature.* 2011;470:359 –365.

Salati M, Cesaretti M, Macchia M, Mistiri ME, Federico M. Epidemiological Overview of Hodgkin Lymphoma across the Mediterranean Basin. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014;6:e2014048.

Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the Ink4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell.* 1996;85:27–37.

Shay JW & Wright WE. Telomerase therapeutics for cancer: Challenges and new directions. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:577–584.

Κυτταρική γήρανση στο λέμφωμα Hodgkin

Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2919-33.

Sherr CJ & McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002;2:103–112.

Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: Mitotic clock or culture shock? *Cell*. 2000;102: 407–410.

Stein, G.H., L.F. Drullinger, A. Soulard, and V. Dulić. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol*. 1999;19:2109–2117.

Terrill JR, Radley-Crabb HG, Iwasaki T, Lemckert FA, Arthur PG, Grounds MD. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J*. 2013;280:4149-64.

Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature*. 2005;

Ventura A, Kirsch DG, Mclaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*. 2007;445: 661–665.

Vijg J & Campisi J. Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*. 2008;454:1065–1071.

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9:138-41.

von Zglinicki T & Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med*. 2005;5:197–203.

Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003;426: 194–198.

Wei W, Hemmer RM, Sedivy JM. Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 6748–6757.

Wright WE & Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol*. 2002;20:682– 688.

Wu D, Liu J, Wu B, Tu B, Zhu W, Luo J. The Batten disease gene CLN3 confers resistance to endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;447:115-20.

Young NP, & Jacks T. Tissue-specific p19Arf regulation dictates the response to oncogenic K-ras. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107: 10184–10189.