

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:  
«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ  
ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΘΕΜΑ: Τριτοταγείς λεμφικές δομές και ανοσιακό μικροπεριβάλλον  
σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα.**

**ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ**

**ΑΘΗΝΑ  
ΙΟΥΛΙΟΣ, 2018**



Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του  
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

**ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ  
ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

**Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

<b>ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΔΑ</b>	<b>ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
<b>Π. ΦΟΥΚΑΣ (Επιβλέπων)</b>	<b>ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>	.....
<b>Ι. ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΗΣ</b>	<b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>	.....
<b>Κ. ΤΗΝΙΑΚΟΥ</b>	<b>ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ</b>	.....



*Αφιερωμένη στους γονείς μου Άγγελο και Γεωργία  
και στις αδελφές μου Νατάσα και Δήμητρα*



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κο Περικλή Φούκα, ο οποίος βασικά είχε την ιδέα της παρούσας μελέτης. Με την εμπειρία του, τον ενθουσιασμό του, την προτροπή του και την καθοδήγησή του ξεκίνησε αυτό το υπέροχο ταξίδι στον κόσμο της έρευνας και με την συμβολή του, έκανε όλη την πορεία ως εδώ πραγματικά συναρπαστική. Είναι εξαιρετικός επιστήμονας και άνθρωπος και για μένα η συνεργασία μου μαζί του ήταν πραγματικά μία εμπειρία.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω την βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής Παιδιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κο Ιωάννη Παναγιωτίδη. Ήταν ιδιαίτερη τιμή για μένα η συνεργασία μας και πολύτιμη η συμμετοχή του στην διπλωματική μου εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κα Κωνσταντίνα Τηνιακού, με την οποία είχα την τιμή να συνεργαστώ. Είναι μία εξαιρετική επιστήμονας, η συνεργασία μας ήταν απλά άψογη και την ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Ευχαριστώ ολόκληρο το προσωπικό και τους συναδέλφους μου του Β΄ Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α. και της Δ΄ Πανεστημιακής Χειρουργικής Κλινικής Ιατρικής Σχολής στο Πανεστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν» , για την στήριξή τους και την πολύτιμη βοήθειά τους στη συλλογή των δεδομένων της μελέτης.

Αν μπόρεσε να φθάσει στο τέλος της αυτή η ερευνητική πορεία ήταν γιατί είχα την τύχη να περιβάλλομαι από ξεχωριστούς ανθρώπους που με εμπιστεύτηκαν, με στήριξαν και μου έδωσαν τον χώρο να δημιουργήσω και να αναλάβω πρωτοβουλίες. Τους είμαι πραγματικά ευγνώμων και τους ευχαριστώ θερμά, που μου μετέδωσαν κάτι από τη μαγεία της επιστήμης και ελπίζω να συνεχίσω αυτή την πορεία στο μέλλον.

## Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	10
1. Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.....	12
1.1 Ορισμός.....	12
1.2 Επιδημιολογία.....	12
1.2.1 Γεωγραφική κατανομή.....	12
1.2.2 Ηλικιακή και φυλετική κατανομή.....	14
1.3 Παθοφυσιολογία.....	15
1.4 Αιτιολογία.....	17
1.4.1 Κίρρωση ήπατος.....	18
1.4.2 Ιός της ηπατίτιδας Β.....	18
1.4.3 Ιός της ηπατίτιδας C.....	19
1.4.4 Ιός της ηπατίτιδας D.....	21
1.4.5 Αλκοόλ.....	21
1.4.6 Κάπνισμα.....	21
1.4.7 Αφλατοξίνη Β1 (AFB1).....	22
1.5 Επέκταση του όγκου.....	22
1.6 Ιστοπαθολογία.....	23
1.6.1 Προχωρημένο ΗΚΚ.....	24
1.6.2 Βαθμός διαφοροποίησης.....	25
1.6.3 Πρώιμο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.....	27
1.6.4 Πολυεστιακή ανάπτυξη ΗΚΚ.....	27
1.7 Σταδιοποίηση - προγνωστικοί δείκτες.....	28
1.8 Ιστολογικοί τύποι.....	29
2. Τριτοταγείς λεμφικές δομές.....	30
2.1 Ορισμός, θέση και δομή των TLS.....	33
2.2 Θέση των TLS στους καρκινικούς ιστούς.....	35
2.3 Δομή των TLS.....	35
2.4 Κλινικοπαθολογική επίπτωση των TLS στους ανθρώπινους καρκίνους.....	36
2.4.1 Εκτίμηση και συχνότητα των TLS.....	36
2.4.2 Πρόγνωση.....	37
2.4.3 Σχέση με το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον.....	38
2.5 Σχηματισμός των TLS.....	39
2.6 Αρνητικοί ρυθμιστές των TLS.....	40
2.7 Σημαντική βιβλιογραφική αναφορά.....	42



3. Ασθενείς και μέθοδοι .....	43
3.1 Ασθενείς .....	43
3.2 Μέθοδοι .....	43
3.2.1 Διπλή ανοσοϊστοχημεία CD3/CD20.....	44
3.2.2 Μεθοδολογία ανάλυσης .....	46
3.2.3 Στατιστική ανάλυση .....	50
4. Αποτελέσματα .....	52
5. Συζήτηση .....	67
Περίληψη .....	69
Abstract.....	70
Βιβλιογραφικές αναφορές .....	71

## Εισαγωγή

Ο καρκίνος του ήπατος αποτελεί μια νόσο, η επίπτωση της οποίας παρουσιάζει αύξηση τα τελευταία χρόνια. Κύριος εκπρόσωπος των κακοηθειών του ήπατος είναι το λεγόμενο ηπάτωμα ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Πρόκειται για την πέμπτη σε συχνότητα αιτία καρκίνου παγκοσμίως και την τρίτη σε συχνότητα αιτία θανάτου λόγω κακοήθειας. Ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος αποτελεί ένα ετερογενές νόσημα ως προς την αιτιολογία του. Ποικίλοι παράγοντες κινδύνου, τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί έχουν συνδεθεί με τη νόσο, με κυριότερους τις ιογενείς χρόνιες ηπατίτιδες και τα ηπατικά νοσήματα που προκαλούν κίρρωση. Άλλωστε, η πλειονότητα των ασθενών (ποσοστό 60-90%) με ηπατοκυτταρικό καρκίνο εμφανίζουν προϋπάρχουσα κίρρωση και διαταραγμένη ηπατική λειτουργία.

Οι τριτοταγείς λεμφικές δομές (TLS) δημιουργούνται μετά τη γέννηση σε μη λεμφικούς ιστούς, που έχουν προσβληθεί από χρόνιες λοιμώξεις, αυτοάνοσες παθήσεις, σε απόρριψη μοσχεύματος, καθώς και σε καρκινικούς ιστούς. Οι δομές αυτές πιστεύεται ότι παρέχουν επαρκές και λειτουργικό ανοσολογικό περιβάλλον για την κυτταρική και χυμική ανοσία, όπως οι λεμφαδένες και οι πλάκες του Peyer. Η παρουσία των TLS σε καρκινικούς ιστούς έχει αναφερθεί ότι αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό δείκτη σε αρκετούς τύπους καρκίνου.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να γίνει μια ολοκληρωμένη ανασκόπηση και παρουσίαση των πλέον πρόσφατων γνώσεων και εξελίξεων γύρω από τις τριτοταγείς λεμφικές δομές στους καρκινικούς ιστούς και να μελετηθεί λεπτομερώς η παρουσία τους καθώς και η συσχέτιση τους με το ανοσιακό μικροπεριβάλλον στα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα καθώς και η προγνωστική τους αξία. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, πραγματοποιήθηκε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά δεδομένα κυρίως μετά το έτος 2010 και έως σήμερα.

Η εργασία δομείται σε 5 κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται μία συνοπτική περιγραφή της επιδημιολογίας, των παραγόντων κινδύνου, της ιστοπαθολογίας και της σταδιοποίησης του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται μια ανασκόπηση των τριτοταγών λεμφικών δομών στους καρκινικούς ιστούς. Παρουσιάζεται ο σχηματισμός, η δομή, η θέση τους στον όγκο καθώς και η συσχέτιση τους με την πρόγνωση στα διάφορα είδη καρκίνου.

Στη συνέχεια, περιγράφεται εκτενώς η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε προκειμένου να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη μελέτη, καθώς και το δείγμα των ασθενών και η

στατιστική ανάλυση που χρησιμοποιήθηκε (Κεφάλαιο 3ο). Το 4ο κεφάλαιο επικεντρώνεται στα αποτελέσματα που προέκυψαν από την στατιστική ανάλυση των παρατηρήσεων. Τέλος, το 5ο κεφάλαιο εστιάζει στη συζήτηση των αποτελεσμάτων, στα συμπεράσματα που οδηγούμαστε από την συνολική εκτίμηση τους, στη σύγκριση τους με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και στις δυνατότητες που προσφέρονται για περαιτέρω έρευνα και μελέτη των συγκεκριμένων παρατηρήσεων.

# 1. Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

## 1.1 Ορισμός

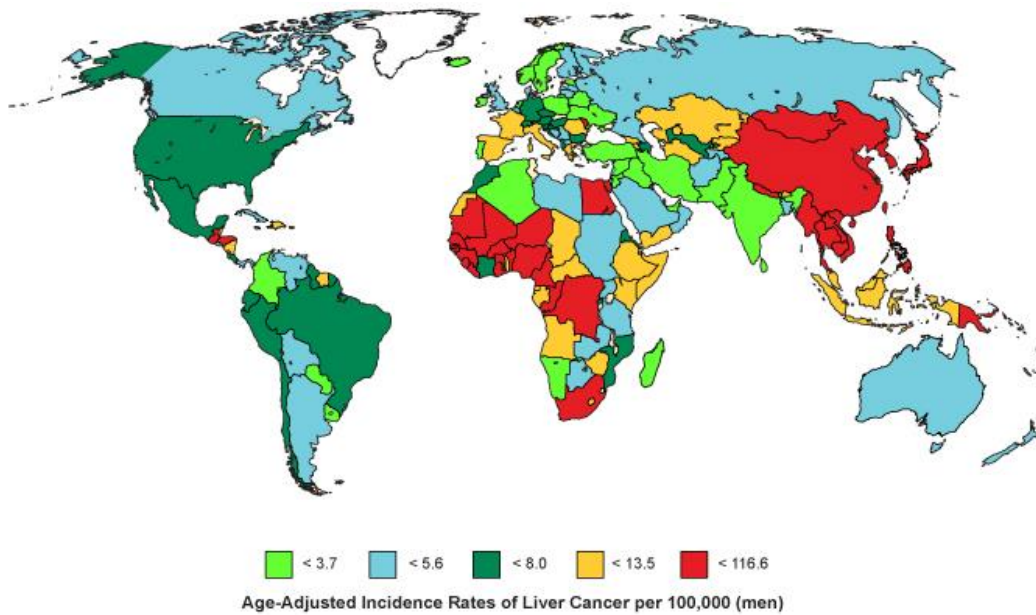
Κακόηθες νεόπλασμα με ηπατοκυτταρική διαφοροποίηση. Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) αποτελεί μία πρωτοπαθή κακοήθεια του ήπατος και εμφανίζεται κυρίως σε ασθενείς με υποκείμενη χρόνια ηπατοπάθεια και κίρρωση. Θεωρούνται ως κύτταρα προέλευσης τα ηπατικά βλαστοκύτταρα (stem cells), αν και παραμένει ένα θέμα έρευνας. Η ανάπτυξη του όγκου γίνεται με τοπική, ενδοηπατική επέκταση καθώς και με απομακρυσμένες μεταστάσεις. Αποτελεί την τρίτη αιτία θανάτου από νεοπλασματική νόσο παγκοσμίως με περισσότερες από 500.000 περιπτώσεις ετησίως. Η επίπτωση του ΗΚΚ είναι υψηλότερη στην Ασία και στην Αφρική, όπου είναι συχνότερη η εμφάνιση της ηπατίτιδας Β και C ,οι οποίες προδιαθέτουν στην ανάπτυξη χρόνιας ηπατικής νόσου και ακολούθως στην ανάπτυξη ΗΚΚ. Η συχνότητα του ΗΚΚ αναμένεται να συνεχίζει να αυξάνεται τα επόμενα χρόνια.

## 1.2 Επιδημιολογία

Ο πρωτοπαθής καρκίνος του ήπατος αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή αιτία καρκίνου στην Ασία και την τέταρτη στην Αφρική. Το ΗΚΚ είναι ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος του πρωτοπαθούς καρκίνου του ήπατος. Τα τελευταία 20 χρόνια η επίπτωση του έχει υπερδιπλασιαστεί από 2.6 σε 5.2 ανά 100.000 πληθυσμού. Μεταξύ των Αφροαμερικανών η αύξηση είναι ακόμα μεγαλύτερη (από 4.7 σε 7.5 ανά 100.000 πληθυσμού κατά μέσο όρο και σε 13.1 ανά 100.000 πληθυσμού ανάμεσα στους άνδρες). Η θνητότητα έχει ομοίως αυξηθεί από 2.8 σε 4.7 ανά 100.000 πληθυσμού μόνο την τελευταία δεκαετία (1).

### 1.2.1 Γεωγραφική κατανομή

Παγκοσμίως, η επίπτωση του ΗΚΚ στις αναπτυσσόμενες χώρες είναι υπερδιπλάσια της επίπτωσης στις αναπτυγμένες (Εικόνα 1). Το 2000, η επίπτωση του ΗΚΚ στους άνδρες ήταν 17.43 ανά 100.000 πληθυσμού στις αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ μόνο 8.7 ανά 100.000 πληθυσμού στις ΗΠΑ. Μεταξύ των γυναικών η διαφορά ήταν επίσης σημαντική (6.77 vs 2.86 ανά 100.000 πληθυσμού αντίστοιχα). Η υψηλότερη επίπτωση του ΗΚΚ αναφέρεται στην Ανατολική Ασία (Κίνα, Ιαπωνία) με συχνότητα στους άνδρες της τάξης των 35 ανά 100.000 πληθυσμού, ακολουθούμενη από την Ασία και τα νησιά του Ειρηνικού ωκεανού (2).



**Εικόνα 1.** Γεωγραφική κατανομή του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος παγκοσμίως (International Agency for Research on Cancer 2013).

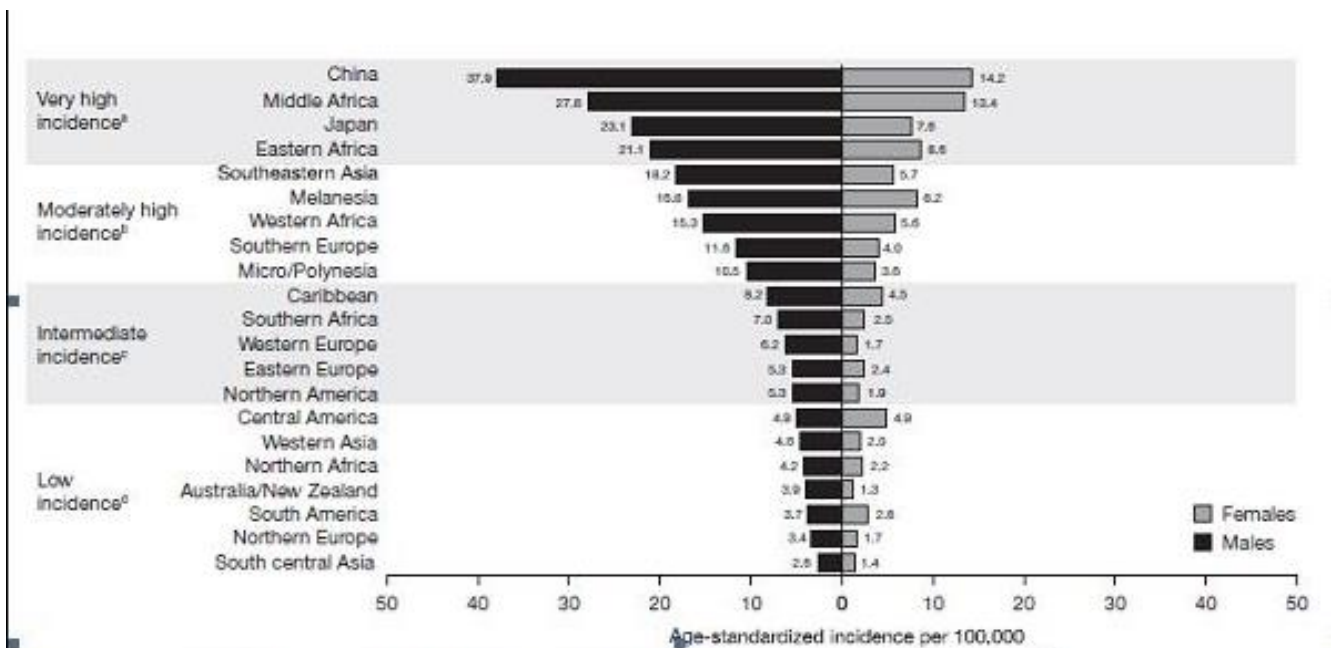
Οι καμπύλες θνητότητας ακολουθούν πιστά τις καμπύλες επίπτωσης στο ΗΚΚ. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η θνητότητα από ΗΚΚ στους άνδρες είναι παραπάνω από διπλάσια συγκριτικά με τις ανεπτυγμένες (16.86 vs 8.07 ανά 100.000 πληθυσμού). Στην Ασία και στην Αφρική, οι καμπύλες θνητότητας είναι 33.5 και 23.73 ανά 100.000 πληθυσμού, αντίστοιχα (2).

Οι γεωγραφικές διαφορές της επίπτωσης και θνητότητας του ΗΚΚ αποδίδονται στα διαφορετικά επίπεδα έκθεσης σε παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τη νόσο, όπως χρόνια ηπατίτιδα Β ή ηπατίτιδα C, έκθεση σε αφλατοξίνη σε αναπτυσσόμενες χώρες, κάπνισμα, κατάχρηση αλκοόλ. Στην Ιαπωνία, οι τοπικές διαφορές στα ποσοστά θνητότητας, αντικατοπτρίζουν τα διαφορετικά επίπεδα αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C μεταξύ των αιμοδοτών (3).

Στις ΗΠΑ, παρατηρείται μία αύξηση περίπου 80% στην ετήσια επίπτωση του ΗΚΚ και αυτό έχει παρατηρηθεί περισσότερο στους Αφροαμερικανούς. Παρόμοια αύξηση έχει σημειωθεί και στο Ηνωμένο Βασίλειο, Καναδά και Αυστραλία. Αυτές οι αλλαγές οφείλονται εν μέρει στην αύξηση της χρόνιας ηπατίτιδας Β (4).

Στις αναπτυσσόμενες χώρες, οι ιοί της ηπατίτιδας (κυρίως της ηπατίτιδας Β) συνεχίζουν να αποτελούν τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη του ΗΚΚ. Η

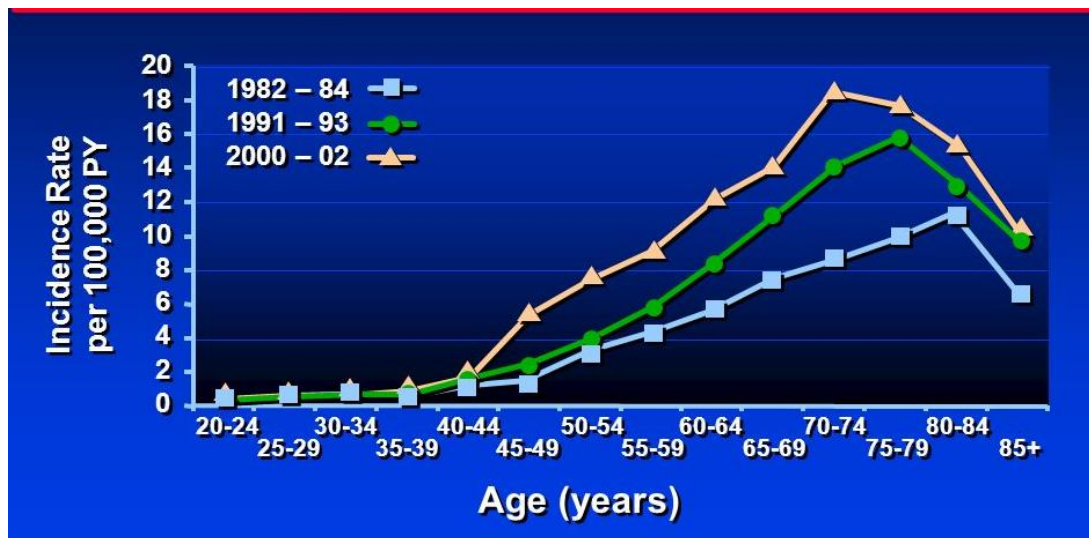
συνεισφορά του εμβολίου για την ηπατίτιδα Β στα ποσοστά εμφάνισης του ΗΚΚ παραμένει αδιευκρίνιστη (5).



**Εικόνα 2.** Επίπτωση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε σχέση με φύλο, ηλικία και φυλή (Parkin DM, et al. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005).

### 1.2.2 Ηλικιακή και φυλετική κατανομή

Στις ΗΠΑ, ο μέσος όρος διάγνωσης είναι τα 65 έτη, ενώ το 74% των περιπτώσεων εμφανίζονται στους άνδρες. Η φυλετική κατανομή έχει ως εξής: 48% λευκοί, 15% Ισπανόφωνοι, 14% Αφροαμερικανοί, και 24% άλλοι (κυρίως Ασιάτες). Η επίπτωση του ΗΚΚ αυξάνεται με την ηλικία, με υψηλότερη τα 70-75 έτη (Εικόνα 3). Ωστόσο, ένας αυξημένος αριθμός νέων ασθενών προσβάλλονται από πρωτοπαθή αλκοολική νόσο του ήπατος, ενώ στην ηλικία 50-60 αρχίζουν να εμφανίζονται οι συνέπειες της λοίμωξης από ιούς της ηπατίτιδας. Ο συνδυασμός ηπατίτιδας και αλκοόλ αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο κίρρωσης και κατ' επέκταση ΗΚΚ (6).



**Εικόνα 3.** Ηλικιακή κατανομή του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (El-Serag HB, N Engl J Med, 1999)

### 1.3 Παθοφυσιολογία

Η παθοφυσιολογία του ΗΚΚ δεν έχει απόλυτα αποσαφηνιστεί και συνίσταται σε ένα πολυπαραγοντικό γεγονός (Εικόνα 4). Το 1981, όταν ο Beasley συνέδεσε τη λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β με την ανάπτυξη του ΗΚΚ, το αίτιο του ΗΚΚ θεωρήθηκε ότι είχε ταυτοποιηθεί (7). Ωστόσο, επόμενες μελέτες απέτυχαν να αποδείξουν ότι η ΗΒV αποτελεί τον κυριότερο ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου και διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες περιπτώσεις ΗΚΚ εμφανίζονται σε έδαφος κίρρωσης οφειλόμενη σε διάφορα αίτια.

Η φλεγμονή, η νέκρωση, η ίνωση και η κυτταρική αναγέννηση χαρακτηρίζουν το κίρρωτικό ήπαρ και συμβάλλουν στην ανάπτυξη του ΗΚΚ. Σε ασθενείς με ηπατίτιδα Β, στους οποίους δεν παρουσιάζεται κίρρωση, η υποκείμενη ίνωση και η αναγέννηση θεωρείται το βασικό αίτιο. Αντίθετα, στους ασθενείς με ηπατίτιδα C, το ΗΚΚ παρουσιάζεται κυρίως στο στάδιο της κίρρωσης. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο ιός της ηπατίτιδας Β ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή και παράγει την ΗΒV πρωτεΐνη Χ που συμβάλλει στην ανάπτυξη του ΗΚΚ, σε αντίθεση με τον ιό της ηπατίτιδας C που αποτελεί έναν RNA ιό που αντιγράφεται στο κυτταρόπλασμα και δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα (8).

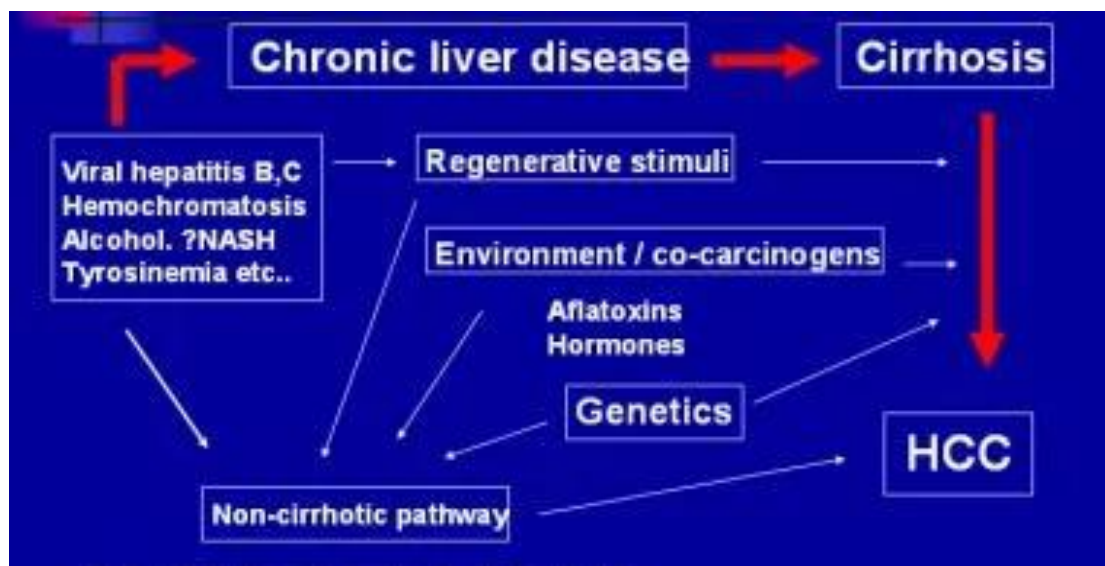
Η διαδικασία που οδηγεί στην κακοήθη εξαλλαγή περιλαμβάνει μια ποικιλία μονοπατιών, πολλά από τα οποία μπορεί να τροποποιηθούν από εξωτερικούς και περιβαλλοντικούς

παράγοντες και τελικά οδηγούν σε γενετικές αλλαγές που αναστέλλουν την απόπτωση και επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να αποσαφηνιστούν τα γενετικά μονοπάτια που τροποποιούνται κατά τη διάρκεια της ηπατοκαρκινογένεσης. Μεταξύ των υποψήφιων γονιδίων, τα γονίδια p53, PIKCA και της β-κατενίνης αποτελούν τα πιο συχνά μεταλλαγμένα στους ασθενείς με ΗΚΚ. Δύο σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση (Wnt-β-catenin, Hedgehog) συχνά τροποποιούνται στο ΗΚΚ. Η υπερενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού φαίνεται να σχετίζεται με προκαρκινικές καταστάσεις που οδηγούν σε υψηλότερα ποσοστά κακοήθους εξαλλαγής (9).

Προοπτικές μελέτες προτείνουν ότι οι δυσπλαστικοί μικροόζοι μέσα στο κίρρωτικό ήπαρ σχετίζονται με αύξηση του κινδύνου για ΗΚΚ, ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο με τους δυσπλαστικούς μεγαλοόζους (10).

Μερικές μελέτες υποθέτουν ότι το ΗΚΚ αναπτύσσεται από τα ηπατικά βλαστοκύτταρα που πολλαπλασιάζονται σε απάντηση στη χρόνια αναγέννηση που προκαλείται από την ιική καταστροφή (11).

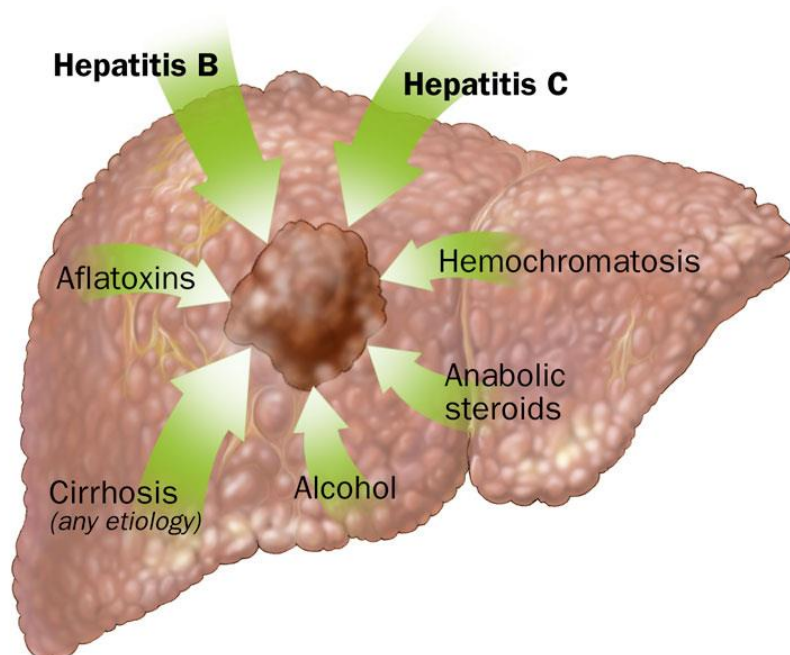


**Εικόνα 4.** Παθοφυσιολογία ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.



## 1.4 Αιτιολογία

Η χρόνια ηπατίτιδα Β και C (και η συλλοίμωξη) είναι οι πιο σημαντικές αιτίες ανάπτυξης ΗΚΚ, και αποτελούν περίπου 85% των περιπτώσεων (12). Η αλκοολική νόσος του ήπατος αποτελεί το δεύτερο πιο σημαντικό αίτιο (13). Το κάπνισμα έχει επίσης πρόσφατα αναγνωριστεί ως ένας παράγοντας ανάπτυξης της νόσου (14). Στη Νότια Κίνα και στην Υπο-Σαχάρια Αφρική οι μεγάλες ποσότητες αφλατοξίνης στα τρόφιμα αποτελούν έναν περιβαλλοντικό κίνδυνο, ιδιαίτερα στα άτομα που έχουν μολυνθεί με ηπατίτιδα Β (14). Η υπερφόρτωση σιδήρου, ιδιαίτερα στα πλαίσια της κληρονομικής αιμοχρωμάτωσης είναι επίσης ένας εξωγενής παράγοντας κινδύνου (15). Η έλλειψη α1-αντιθρυψίνης αυξάνει την επίπτωση του ΗΚΚ. Είναι προφανές ότι η παχυσαρκία, με όλα τα συνυπάρχοντα προβλήματα, δηλαδή σακχαρώδης διαβήτης και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο του ΗΚΚ, ακόμα και χωρίς συνυπάρχουσα ιογενή λοίμωξη (16). Ο κίνδυνος εμφάνισης ΗΚΚ αυξάνεται σε περιπτώσεις συνύπαρξης πολλών παραγόντων κινδύνου (13) (Εικόνα 4).



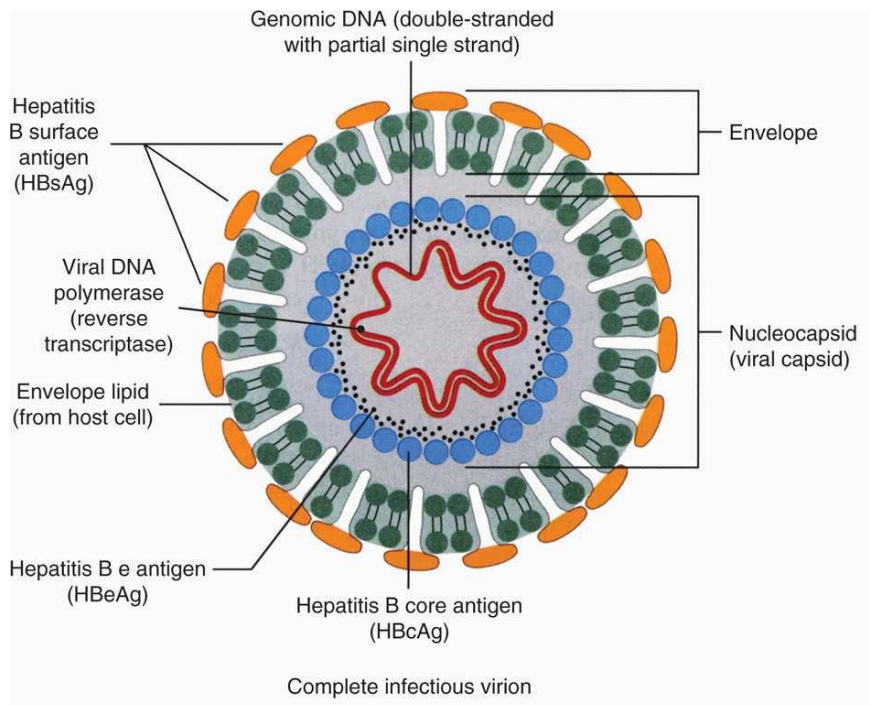
**Εικόνα 4.** Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

### 1.4.1 Κίρρωση ήπατος

Ο κυριότερος κλινικός παράγοντας κινδύνου για ανάπτυξη ΗΚΚ, είναι η κίρρωση του ήπατος, ανεξάρτητα από την αιτιολογία της, αν και η κίρρωση από μόνη της δε θεωρείται προκαρκινική κατάσταση αλλά κυρίως μια παράλληλη διαδικασία που οδηγεί στην κακοήθη εξαλλαγή στα πλαίσια μιας χρόνιας ηπατικής νόσου (17).

### 1.4.2 Ιός της ηπατίτιδας Β

Ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV), είναι ένας DNA ιός που ανήκει στην κατηγορία των ηπατοτρόπων ιών. Το εξωτερικό πρωτεϊνικό περίβλημα του ιού αποτελείται από την πρωτεΐνη επιφανείας με το αντιγονικό επίτοπο HbsAg, ενώ ο νουκλεοκαψιδικός πυρήνας απολείται από το DNA του ιού, την πολυμεράση και την πυρηνική πρωτεΐνη c, με τον επίτοπο HbcAg (Εικόνα 6). Οι πρόοδοι στη Μοριακή Βιολογία έδειξαν ότι υπάρχουν μοριακές ποικιλίες του HBV, οι οποίες αντανακλούν στην ποικιλία των υποτύπων. Έτσι ο HBV μπορεί να ταξινομηθεί σε οχτώ γονοτύπους (A-H) και αρκετούς υποτύπους.



**Εικόνα 6.** Δομή ιού ηπατίτιδας Β.

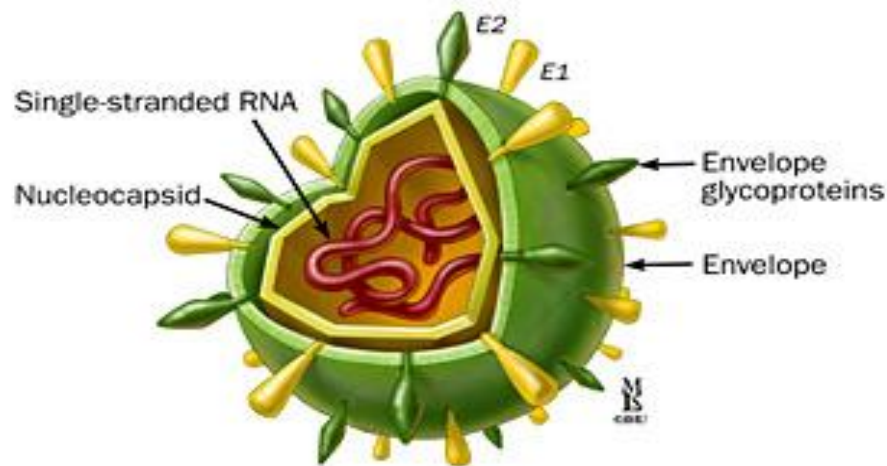
Η κατανομή των διαφορετικών γονοτύπων ποικίλλει σε κάθε γεωγραφική περιοχή, και επηρεάζει την ανταπόκριση στην αντιική θεραπεία με λαμβουδίνη (18). Ο Παγκόσμιος

Οργανισμός Υγείας (WHO) υπολογίζει ότι περίπου 350 εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί με HBV παγκοσμίως. Ο HBV είναι η κύρια αιτία ανάπτυξης ΗΚΚ στις περισσότερες Ασιατικές, Αφρικανικές, και χώρες της Λατινικής Αμερικής (19). Επιδημιολογικές έρευνες δείχνουν μία έντονη σύνδεση μεταξύ χρόνιας HBV λοίμωξης και ανάπτυξης ΗΚΚ. Η επίπτωση του ΗΚΚ σε άτομα που πάσχουν από χρόνια HBV είναι κατά προσέγγιση 100 φορές υψηλότερη από τον μη μολυσμένο πληθυσμό, ενώ ο κίνδυνος ανάπτυξης ΗΚΚ σε άνδρες που έχουν μολυνθεί κατά τη γέννηση αγγίζει το 50 %. Αρκετά δεδομένα υποστηρίζουν τον άμεσο ογκογόνο ρόλο του HBV στην ανάπτυξη του ΗΚΚ, 1) η ενσωμάτωση του HBV DNA στο χρωμοσωμικό DNA των ΗΚΚ, 2) ο ρόλος του HBV Χ γονιδίου στην παθογένεση των HBV σχετιζόμενων-ΗΚΚ, ιδιαίτερα προσδένοντας και απενεργοποιώντας την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 3) η ανάπτυξη του ΗΚΚ σε μοντέλα ποντικών με χρόνια λοίμωξη από ηπατοτρόπους ιούς και 4) η μείωση της επίπτωσης του ΗΚΚ μετά από το μαζικό εμβολιασμό (20).

### 1.4.3 Ιός της Ηπατίτιδας C

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), είναι ένας μικρός (55-65nm) RNA ιός, που ανήκει στην οικογένεια των *Flaviviridae*. Το ιικό γονιδίωμα αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας, μεγέθους 9600 νουκλεοτιδίων και κωδικοποιεί μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη μεγέθους 3.000 αμινοξέων (21) (Εικόνα 7). Το γονιδίωμα του ιού δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του μολυσμένου κυττάρου, καθώς η αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος συμβαίνει εξ ολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα του τελευταίου. Στη συνέχεια, η πολυπρωτεΐνη πρωτεολύεται με τη βοήθεια κυτταρικών και ιικών πρωτεασών στην περιοχή του ενδοπλασματικού δικτύου, σε τουλάχιστον 3 δομικά και 7 μη δομικά πολυπεπτίδια (22). Οι δομικές πρωτεΐνες που αποκόπτονται είναι η καψιδιακή πρωτεΐνη core (191 aa) και οι δυο πρωτεΐνες του ιικού φακέλου E1 (191 aa) και E2 (362 aa). Οι μη-δομικές πρωτεΐνες που αποκόπτονται είναι η NS2 (216 aa), η NS3 (630 aa), η NS4A (53 aa), η NS4B (260 aa), η φωσφοπρωτεΐνη NS5A (446 aa) και η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση NS5B (591 aa). Ο HCV που απομονώνεται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές παρουσιάζει γενετική ετερογένεια με τουλάχιστον 6 διαφορετικούς γονότυπους. Το γονιδίωμα του HCV μεταλλάσσεται μαζί με τις πρωτεΐνες του φακέλου E1 και E2 που παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλομορφία. Η γρήγορη μεταγραφή και η απουσία μηχανισμού διόρθωσης, χαρακτηριστικά των RNA ιών, εξηγούν την τεράστια γενετική ποικιλομορφία του HCV και τις δυσκολίες που αντιμετωπίζουμε για την εκρίζωση του HCV, ακόμα και με πολυφαρμακευτική θεραπεία. Δεν υπάρχει προφυλακτικός εμβολιασμός

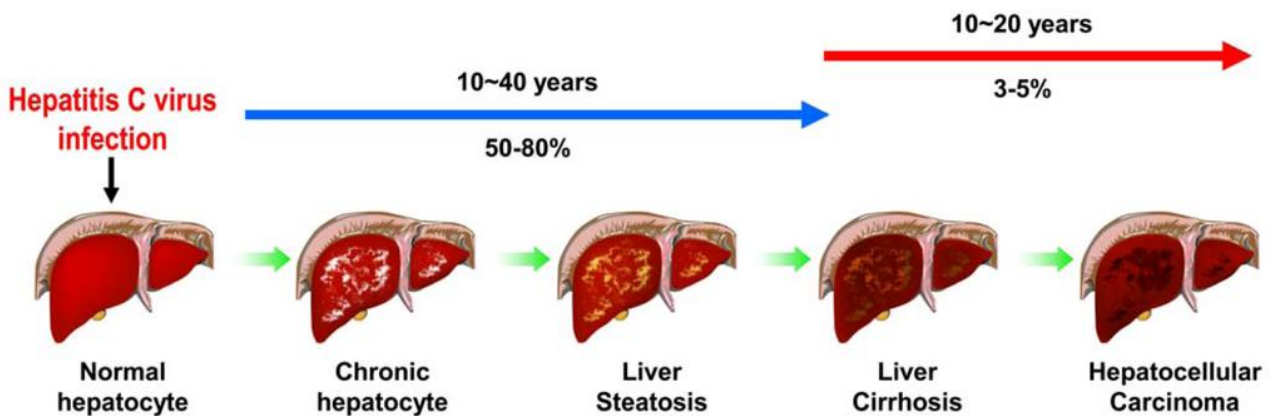
έναντι του ιού. Η WHO υπολογίζει ότι περίπου 180 εκατομμύρια άτομα έχουν μολυνθεί από τον ιό παγκοσμίως, αλλά πιστεύεται ότι ο αριθμός υποεκτιμάται και ότι συνεχίζει να αυξάνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες (19).



**Εικόνα 7.** Δομή ιού ηπατίτιδας C.

Ο HCV ανευρίσκεται πιο συχνά από ότι ο HBV σε ασθενείς με ΗΚΚ στην Ευρώπη, στην Ιαπωνία και στις ΗΠΑ αλλά ακόμα και σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες (Μογγολία, Αίγυπτος και Πακιστάν) λόγω των μη ελεγμένων μεταγγίσεων και των μη αποστειρωμένων βελονών (23).

Τα σχετιζόμενα με HCV-ΗΚΚ τυπικά εμφανίζονται 20-30 χρόνια μετά τη μόλυνση και συχνά αλλά όχι πάντα, προηγούνται της κίρρωσης. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ενδείξεις που να αποδεικνύουν τον άμεσο μοριακό ρόλο του HCV στην παθογένεση του ΗΚΚ. Το ΗΚΚ αναπτύσσεται μέσω της χρόνιας κυτταρικής καταστροφής που προκαλείται από τον HCV που οδηγούν στην ίνωση και στην κίρρωση. Ο μέσος χρόνος από τη λοίμωξη μέχρι την έναρξη της κίρρωσης σε δημοσιευμένες έρευνες ήταν 13-25 χρόνια και ο χρόνος έως τον ηπατικό καρκίνο ήταν 17-31 χρόνια (24). Ο κίνδυνος για καρκίνο του ήπατος στον πληθυσμό με κίρρωση-οφειλόμενη σε HCV υπολογίζεται σε 1% και 7% ανά έτος (25) (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8.** Ηπατίτιδα C και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

#### 1.4.4 Ιός της ηπατίτιδας D

Ο ιός της Ηπατίτιδας D (HDV) είναι ένας RNA ελαττωματικός ιός που απαιτεί λοίμωξη από τον HBV. Είναι αδιευκρίνιστο κατά πόσο η χρόνια επιλοίμωξη από HDV αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ σε σχέση με αυτόν της λοίμωξης μόνο από HBV (26).

#### 1.4.5 Αλκοόλ

Στις ΗΠΑ και στη Βόρεια Ευρώπη, η οφειλόμενη στο αλκοόλ ηπατική καταστροφή είναι μία σημαντική αιτία χρόνιας ηπατικής νόσου και ηπατικής κίρρωσης (19). Η μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ στους άνδρες και η ήπια κατανάλωση (2 με 3 ποτά την ημέρα) στις γυναίκες σχετίζονται με διπλάσιο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ (27). Οι ασθενείς που πίνουν πολύ και έχουν συνυπάρχουσα ηπατική νόσο από άλλες αιτίες έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΗΚΚ (28).

#### 1.4.6 Κάπνισμα

Σύνδεση μεταξύ καπνίσματος και ΗΚΚ έχει διαπιστωθεί πρόσφατα. Ανεξάρτητα από την κατάχρηση αλκοόλ και τη λοίμωξη από ηπατοτρόπους ιούς, ο κίνδυνος ανάπτυξης ΗΚΚ δείχνει να αυξάνεται με τη διάρκεια του καπνίσματος και τον αριθμό των τσιγάρων ανά μέρα (14).

#### **1.4.7 Αφλατοξίνη B1 (AFB1)**

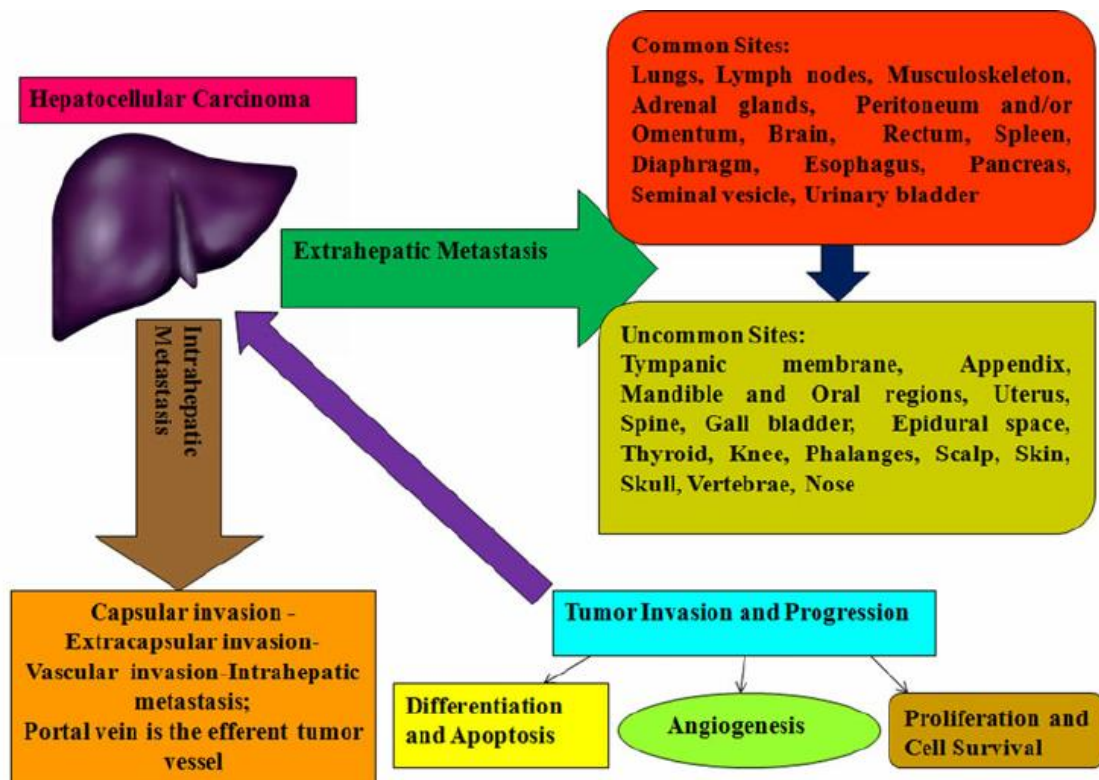
Η αφλατοξίνη B1 είναι ένα πιθανό καρκινογόνο του ήπατος που παράγεται από τους μύκητες *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* και *Aspergillus nomius*, οι οποίοι αναπτύσσονται κυρίως σε ξηρά φρούτα, ξηρούς καρπούς (ιδιαίτερα τα αράπικα φυστίκια, αμύγδαλα), μπαχαρικά, σιτηρά και σε τυριά κάτω από κατάλληλες συνθήκες υγρασίας (πάνω από 7-10%) και θερμοκρασίας. Επίσης, εμφανίζονται στο γάλα ζώων που έχουν τραφεί με ζωοτροφές (καλαμπόκι κ.λπ.) που είχαν μύκητες. Η επικινδυνότητα των αφλατοξινών αυξάνεται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ατόμων που πάσχουν από υποκείμενες ηπατικές νόσους. Έρευνες έδειξαν ότι κατά τη μόλυνση με τον ιό ηπατίτιδας Β, η έκθεση σε αφλατοξίνες αυξάνει τον κίνδυνο για ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Η μόλυνση από HBV καθιστά δύσκολο τον μεταβολισμό των αφλατοξινών από τα ηπατοκύτταρα και έτσι η ένωση αφλατοξίνης M1-DNA παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο ήπαρ αυξάνοντας την πιθανότητα βλάβης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Θεωρείται ότι ο εμβολιασμός των κατοίκων περιοχών της Ασίας και της Αφρικής όπου ενδημεί ο ιός HBV, θα μειώσει σημαντικά τις ηπατικές βλάβες σε πληθυσμούς που συχνά τρέφονται με μουχλιασμένα τρόφιμα (29).

#### **1.5 Επέκταση του όγκου**

Το ΗΚΚ μπορεί να επεκταθεί ενδοηπατικά, είτε λεμφογενώς, είτε αιματογενώς, και η συχνότητα αυτής της επέκτασης αυξάνεται με το μέγεθος του όγκου (Εικόνα 9). Η διείσδυση του όγκου μέσα στα μεγάλα χοληφόρα αγγεία δεν είναι συχνή στην κλινική πράξη, αλλά ανιχνεύεται σε περίπου 5% των αυτοψιών. Οι πνεύμονες είναι ο πιο συχνός στόχος των εξωηπατικών μεταστάσεων (47% των μεταστατικών καρκινωμάτων) ακολουθούμενοι από τους λεμφαδένες (45%), οστά (37%), και τους ενδοκρινείς αδένες (12%). Τα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα διπλασιάζονται σε μέγεθος σε διάστημα 6 μηνών κατά μέσο όρο. Στα πρώιμα στάδια το πρότυπο ανάπτυξης είναι απωθητικό και συνδυάζεται συνήθως με τη δημιουργία κάψας.

Το 60% των ΗΚΚ παρουσιάζει διήθηση μικρών αγγείων με επακόλουθο ενδοηπατικές μεταστάσεις. Επίσης στα προχωρημένα ΗΚΚ παρατηρείται συχνά θρόμβωση της πυλαίας όπως και της ηπατικής φλέβας σε ποσοστό 70% και 20% αντίστοιχα (30).





**Εικόνα 9.** Τρόποι επέκτασης ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

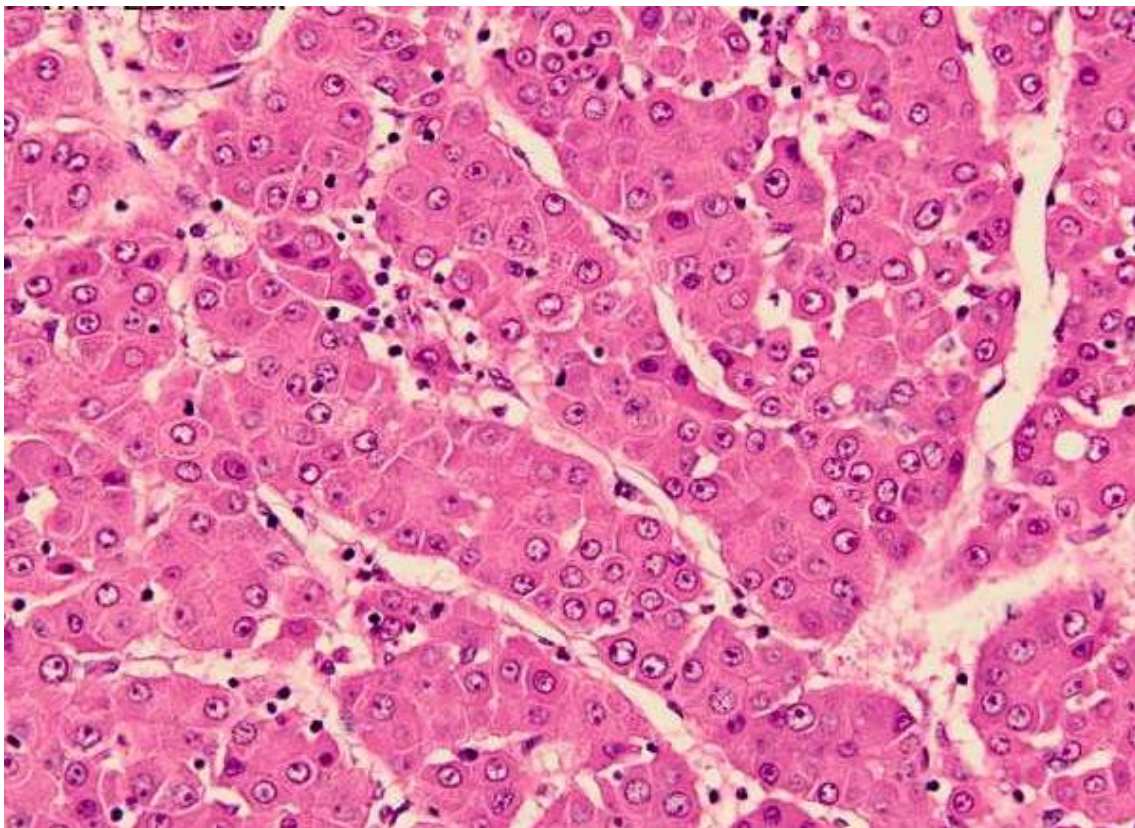
## 1.6 Ιστοπαθολογία

Το ΗΚΚ μιμείται το ηπατικό παρέγχυμα ως προς τη δομή και τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 10). Τα ανωτέρας και μέσης διαφοροποίησης ΗΚΚ έχουν δοκιδώδη αρχιτεκτονική και χαρακτηρίζονται από δοκίδες πάχους > 3 στοιχείων κυττάρων και αραίωση ή εξαφάνιση των δικτυωτών ινών. Οι δοκίδες αφορίζονται από αιμοφόρα κολποειδή, το ενδοθήλιο των οποίων είναι τριχοειδικού τύπου και εκφράζει CD34. Επίσης σχηματίζονται χοληφόροι σωληνίσκοι, οι οποίοι αναδεικνύονται μέσω της διασταυρούμενης αντίδρασης του πολυκλωνικού καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) με τη γλυκοπρωτεΐνη της χολικής μεμβράνης των νεοπλασματικών κυττάρων. Οι χοληφόροι σωληνίσκοι μπορεί να περιέχουν χολή, όταν δε είναι διατεταμένοι προσλαμβάνουν ψευδοαδενική μορφολογία. Στα χαμηλής διαφοροποίησης ΗΚΚ το δοκιδώδες πρότυπο δε διατηρείται και αντικαθίσταται από συμπαγές με παράλληλη απώλεια των κολποειδών.

Σε επίπεδο κυττάρου το ΗΚΚ παρουσιάζει φαινοτυπικές και λειτουργικές ομοιότητες με τα μη νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα, σε βαθμό που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά συμπληρώνονται από την παρουσία και τη συσσώρευση

προϊόντων του μεταβολισμού, παρόμοιων με αυτά που παράγονται από το φυσιολογικό ή παθολογικό μη νεοπλασματικό ηπατοκύτταρο, όπως χολή, λιπασταγονίδια, γλυκογόνο, σφαιρίδια α1-αντιθρυψίνης, πρωτεΐνη που δεσμεύει το χαλκό κ.ά. (31).

Επίσης, όπως και στα μη νεοπλασματικά ηπατοκύτταρα μπορεί να παρατηρηθούν παθολογικές ενδοκυττάρειες δομές και οργανίδια, πχ σωματίδια Mallory (σύμπλεγμα κερατινών και πρωτεϊνών οξείας φάσης λόγω βλάβης του κυτταροσκελετού), μεγαμιτοχόνδρια και μεγαλυσώματα, πυρηνικά έγκλειστα, κυτταροπλασματικά έγκλειστα με εικόνα δίκην εσμουρισμένης υάλου (ground-glass, HBsAg±).



**Εικόνα 10.** Ιστολογική εικόνα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

### 1.6.1 Προχωρημένο ΗΚΚ

**Μακροσκοπικοί τύποι** σύμφωνα με την ταξινόμηση του Eggel (1901):

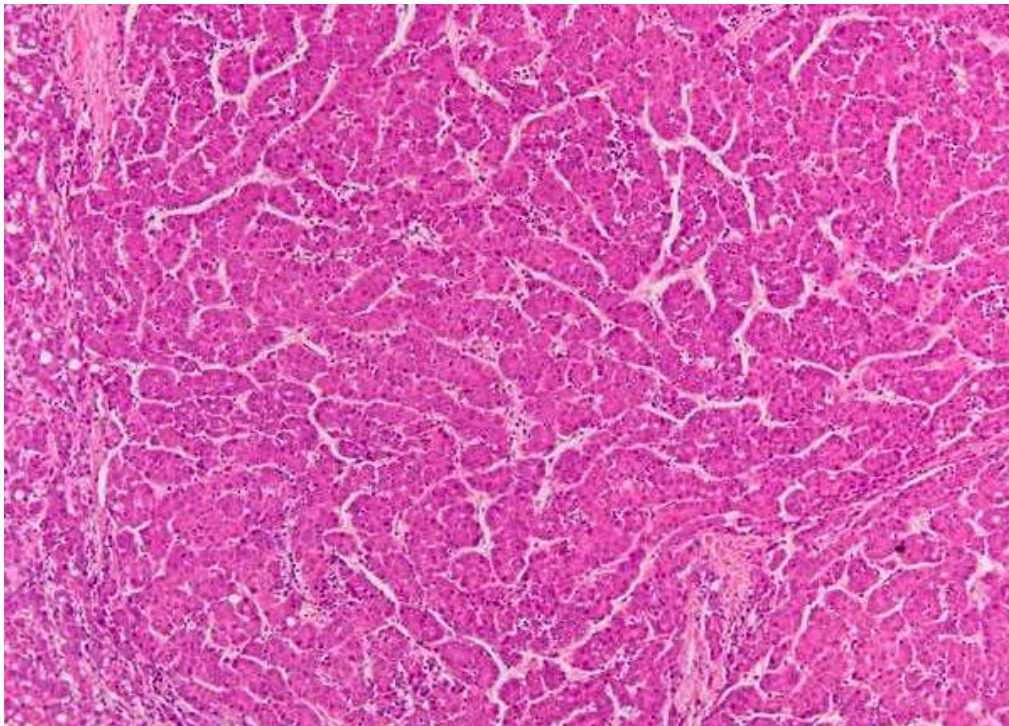
1. Οζώδης τύπος (ένας ή περισσότεροι όζοι με ή χωρίς κάψα).
2. Μαζικός τύπος (ευμεγέθης όγκος με σχετικά ασαφή όρια που μπορεί να καταλαμβάνει όλο τον ηπατικό λοβό).
3. Διάχυτος τύπος (πολλαπλοί διάσπαρτοι μικροσκοπικοί όζοι).



Ο οζώδης τύπος διακρίνεται στον απλό οζώδη, ο οποίος περιβάλλεται συνήθως από κάψα και στον οζώδη με εκτός όζου επέκταση, διάσπαση της κάψας, διήθηση αγγείων, δημιουργία μικρομεταστάσεων. Οι όγκοι που περιβάλλονται από κάψα αναπτύσσονται κατά κανόνα σε κίρρωτικό ήπαρ και προκαλούν πιεστική ατροφία των γειτονικών κίρρωτικών όζων ενσωματώνοντας στην κάψα τα ινώδη διαφράγματα (32).

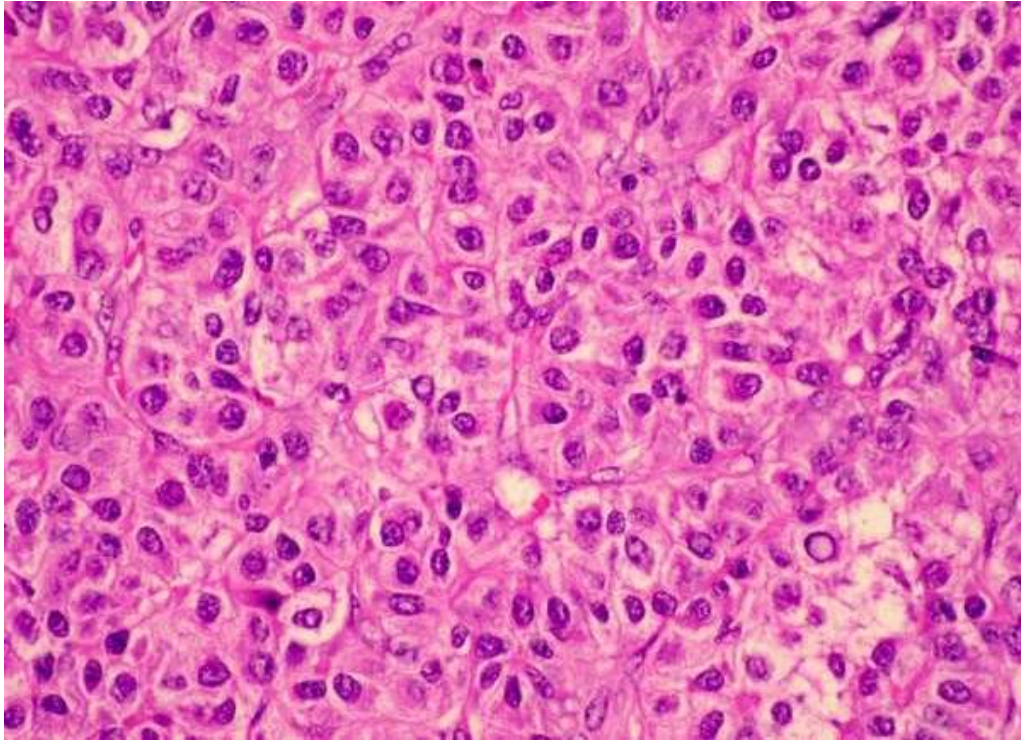
### 1.6.2 Βαθμός διαφοροποίησης

Το πλέον διαδεδομένο σύστημα αξιολόγησης του βαθμού διαφοροποίησης είναι το τετραβάθμιο σύστημα της WHO. Με βάση αυτό το σύστημα το ΗΚΚ ταξινομείται σε ανωτέρας, μέσης και χαμηλής διαφοροποίησης και αδιαφοροποίητο (Εικόνα 11-13).

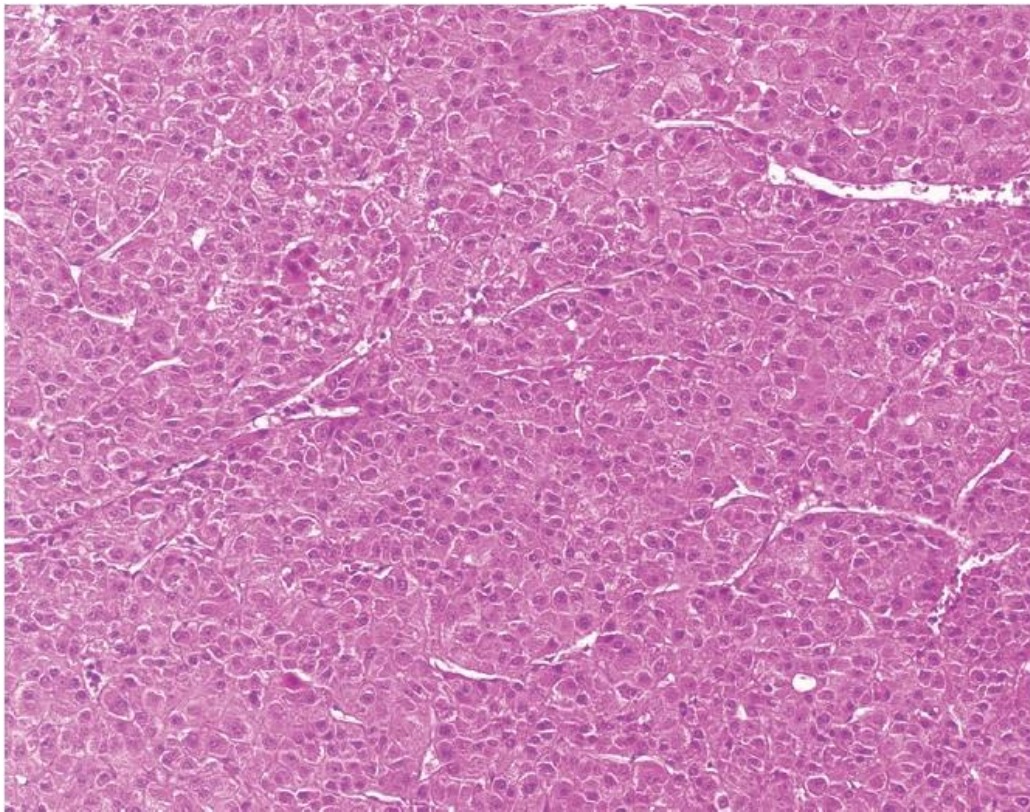


**Εικόνα 11.** Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα καλής διαφοροποίησης.





**Εικόνα 12.** Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα μέτριας διαφοροποίησης.



**Εικόνα 13.** Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης.

Το σύστημα ταξινόμησης των Edmonson – Steiner είναι επίσης τεταρτοβάθμιο και στηρίζεται στην εκτίμηση της κυτταρικής ατυπίας και στο αυξανόμενο κλάσμα πυρήνα – κυτταροπλάσματος.

### **1.6.3 Πρώιμο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα**

Το μικρό πρώιμο ΗΚΚ διαγιγνώσκεται τα τελευταία χρόνια με αυξανόμενη συχνότητα. Μακροσκοπικά είναι οζώδες με καταρχήν ασαφή όρια, η δε διάμετρος είναι <2εκ. Σε ιστολογικό επίπεδο πρόκειται για ένα καλά διαφοροποιημένο ΗΚΚ, το οποίο μπορεί να χαρακτηριστεί σαν καρκίνωμα *in situ* ή μικροδιηθητικό συχνά με διατηρούμενες φυσιολογικές δομές, όπως τα πυλαία διαστήματα, αλλά με αντικατάσταση των φυσιολογικών ηπατοκυττάρων από νεοπλασματικά κύτταρα. Λόγω της κύριας αιμάτωσης μέσω της πυλαίας φλέβας, τα ευρήματα της αγγειογραφίας είναι συχνά μη διαγνωστικά. Τα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά είναι αύξηση της κυτταρικής πυκνότητας (>2 φορές της φυσιολογικής) και του κλάσματος πυρήνα/κυτταροπλάσματος, ακανόνιστη λεπτοδοκιδώδης αρχιτεκτονική και συχνά (40%) διάχυτη ή εστιακή λίπωση των νεοπλασματικών κυττάρων. Μπορεί να παρατηρηθεί διήθηση πυλαίων διαστημάτων ή ινωδών διαφραγμάτων, ενώ διήθηση αγγείων και ενδοηπατικές μεταστάσεις αποτελούν εξαίρεση, ιδιαίτερα στον ασαφή οζώδη τύπο. Το καρκίνωμα προοδευτικά αυξάνει σε μέγεθος με σχηματισμό ψευδοκάψας και αιμάτωση από την ηπατική αρτηρία λόγω εξάλειψης των πυλαίων διαστημάτων και προοδευτικής αρτηριακής νεοαγγείωσης (ασύζευκτες αρτηρίες). Παράλληλα αποδιαφοροποιείται σε μέσης ή χαμηλής διαφοροποίησης ΗΚΚ (33).

### **1.6.4 Πολυεστιακή ανάπτυξη ΗΚΚ**

Πολυεστιακή ανάπτυξη του ΗΚΚ απαντάται συχνά σε κίρρωτικά ήπατα και η συχνότητα του κυμαίνεται από 15% μέχρι 30% σε περιπτώσεις υποκείμενης χρόνιας ηπατίτιδας Β και C. Μπορεί να είναι σύγχρονη ή μετάχρονη, βασίζεται σε ιστολογικά δεδομένα και έχει ενισχυθεί από μοριακές μελέτες.

Τα μορφολογικά διαγνωστικά κριτήρια είναι α) η παρουσία συμβατικού ΗΚΚ σε συνδυασμό με πρώιμο ΗΚΚ ή με ΗΚΚ σε δυσπλαστικό όζο, και β) η παρουσία καλά διαφοροποιημένου ΗΚΚ στην περιφέρεια δύο καρκινικών όζων ή στο μικρότερο όζο (32).

## 1.7 Σταδιοποίηση - προγνωστικοί δείκτες

Το στάδιο του ΗΚΚ θεωρείται ο πλέον αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης και σε αυτό βασίζεται ο σχεδιασμός των θεραπευτικών επιλογών. Προγνωστική σημασία αποδίδεται στις παραμέτρους, που σχετίζονται με τον ίδιο τον όγκο (αριθμός και μέγεθος όγκων, διήθηση αγγείων και εξωηπατικές εντοπίσεις), αλλά και στους κλινικοεργαστηριακούς δείκτες, που σχετίζονται με την κίρρωση και την επάρκεια της ηπατικής λειτουργίας.

Το σύστημα, το οποίο βασίζεται σε αμιγώς παθολογοανατομικά κριτήρια είναι το TNM (πίνακας 1), η απλοποιημένη αναθεώρηση του οποίου διαθέτει ακόμα μεγαλύτερη προγνωστική αξία.

Η πρόγνωση ασθενών με προχωρημένο ΗΚΚ είναι πτωχή. Ιδιαίτερα δυσμενείς προγνωστικοί δείκτες θεωρούνται οι υψηλές τιμές της α-εμβρυϊκής πρωτεΐνης (AFP), η θρόμβωση της πυλαίας και η μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Η συσχέτιση του βαθμού διαφοροποίησης με την επιβίωση έχει δώσει αντιφατικά αποτελέσματα, ενώ η ανοσοέκφραση της κερατίνης19 (δείκτης προγονικών κυττάρων) σε ποσοστό κυττάρων >10% έχει συσχετισθεί με επιθετικότερη συμπεριφορά (32).

<b>Πρωτοπαθής όγκος(T)</b>	
Tx	Πρωτοπαθής όγκος που δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Μη απόδειξη πρωτοπαθούς όγκου
T1	Μονήρης όγκος χωρίς αγγειακή διήθηση
T2	Μονήρης όγκος με αγγειακή διήθηση ή πολλαπλοί όγκοι όχι πάνω από 5 εκ.
T3a	Πολλαπλοί όγκοι μεγαλύτεροι από 5 εκ.
T3b	Μονήρης όγκος ή πολλαπλοί όγκοι οποιοδήποτε μεγέθους που διηθούν κύριο κλάδο της πυλαίας φλέβας ή ηπατικής φλέβας
T4	Όγκοι με διήθηση παρακείμενων οργάνων εκτός της χοληδόχου κύστης ή με διάτρηση του σπλαχνικού περιτοναίου

<b>Περιοχικοί λεμφαδένες (N)</b>	
Nx	Περιοχικοί λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0	Χωρίς μεταστατικούς περιοχικούς λεμφαδένες
N1	Με μεταστατικούς περιοχικούς λεμφαδένες

**Πίνακας 1.** Σύστημα σταδιοποίησης ηπατικών όγκων TNM

<b>Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)</b>			
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις		
M1	Με απομακρυσμένες μεταστάσεις		
<b>Ανατομικά στάδια /προγνωστικές ομάδες</b>			
ΣΤΑΔΙΟ I	T1	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ II	T2	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ IIIa	T3a	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ IIIb	T3b	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ IIIc	T4	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ IVa	οποιοδήποτε T	N1	M0
ΣΤΑΔΙΟ IVb	οποιοδήποτε T	οποιοδήποτε N	M1

Πίνακας 1 (συνέχεια). Σύστημα σταδιοποίησης ηπατικών όγκων TNM.

### 1.8 Ιστολογικοί τύποι

Πέραν του συμβατικού ΗΚΚ υπάρχουν σπάνιοι ιστολογικοί τύποι, οι οποίοι με εξαίρεση το ινοπεταλιώδες ΗΚΚ δεν συνδυάζονται με ειδικά κλινικά χαρακτηριστικά ή παθογενετικές ιδιαιτερότητες.

Οι τύποι αυτοί είναι οι εξής:

- διαυγοκυτταρικός τύπος με υπεροχή διαυγών κυττάρων
- σκιρρώδης τύπος με πυκνό ινώδες στρώμα
- φλεγμονώδης τύπος με ικανές σύνοδες φλεγμονώδεις διηθήσεις κυρίως από λεμφοκύτταρα
- σαρκωματοειδής τύπος με ατρακτόμορφους και αναπλαστικούς κυτταρικούς χαρακτήρες
- ινοπεταλιώδες ΗΚΚ (34).

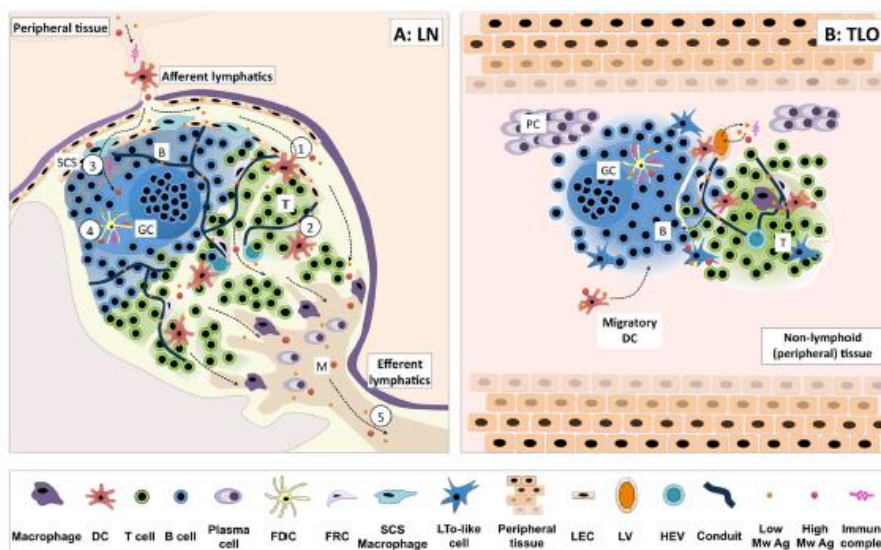


## Ινοπεταλιώδες ΗΚΚ

Το ινοπεταλιώδες ΗΚΚ εμφανίζεται σε νεαρές ηλικίες, αναπτύσσεται χωρίς να προϋπάρχει ηπατική νόσος και σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση. Οι αιτιολογικοί παράγοντες παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Μετά από χειρουργική εκτομή ή μεταμόσχευση η 5ετής επιβίωση φθάνει στο 66%. Μακροσκοπικά εμφανίζεται σαν περιγράπτη πολυοζώδης μάζα με κεντρική ουλή. Σε ιστολογικό επίπεδο τα κύτταρα σχηματίζουν σωρούς ή δοκίδες που διαχωρίζονται από υαλοειδοποιημένες δεσμίδες κολλαγόνου με πεταλιώδη διάταξη. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι ευμεγέθη με ηωσινόφιλο κοκκίωδες κυτταρόπλασμα λόγω του μεγάλου αριθμού μιτοχονδρίων, ενώ συχνά περιέχουν ωχρά σωμάτια και χαλκό (34).

## 2. Τριτοταγείς λεμφικές δομές

Οι τριτοταγείς λεμφικές δομές (Tertiary Lymphoid Structures, TLS) δημιουργούνται μετά τη γέννηση σε μη λεμφικούς ιστούς, σε έδαφος χρόνιων λοιμώξεων ή αυτοάνοσων παθήσεων, σε απόρριψη μοσχεύματος, καθώς και σε καρκινικούς ιστούς. Οι δομές αυτές πιστεύεται ότι παρέχουν επαρκές και λειτουργικό ανοσολογικό περιβάλλον για την ανάπτυξη προσαρμοστικής (adaptive) κυτταρικής και χυμικής ανοσία, όπως αντίστοιχη με τους λεμφαδένες και τις πλάκες του Peyer. Οι TLS έχουν παρόμοια δομή με αυτή των λεμφαδένων και των άλλων δευτερογενών λεμφικών οργάνων, περιλαμβάνοντας T ζώνες, B βλαστικά κέντρα και φλεβίδια με υψηλό ενδοθήλιο (High Endothelial Venules, HEV), χωρίς να περιβάλλονται από κάψα (35) (Εικόνα 14).



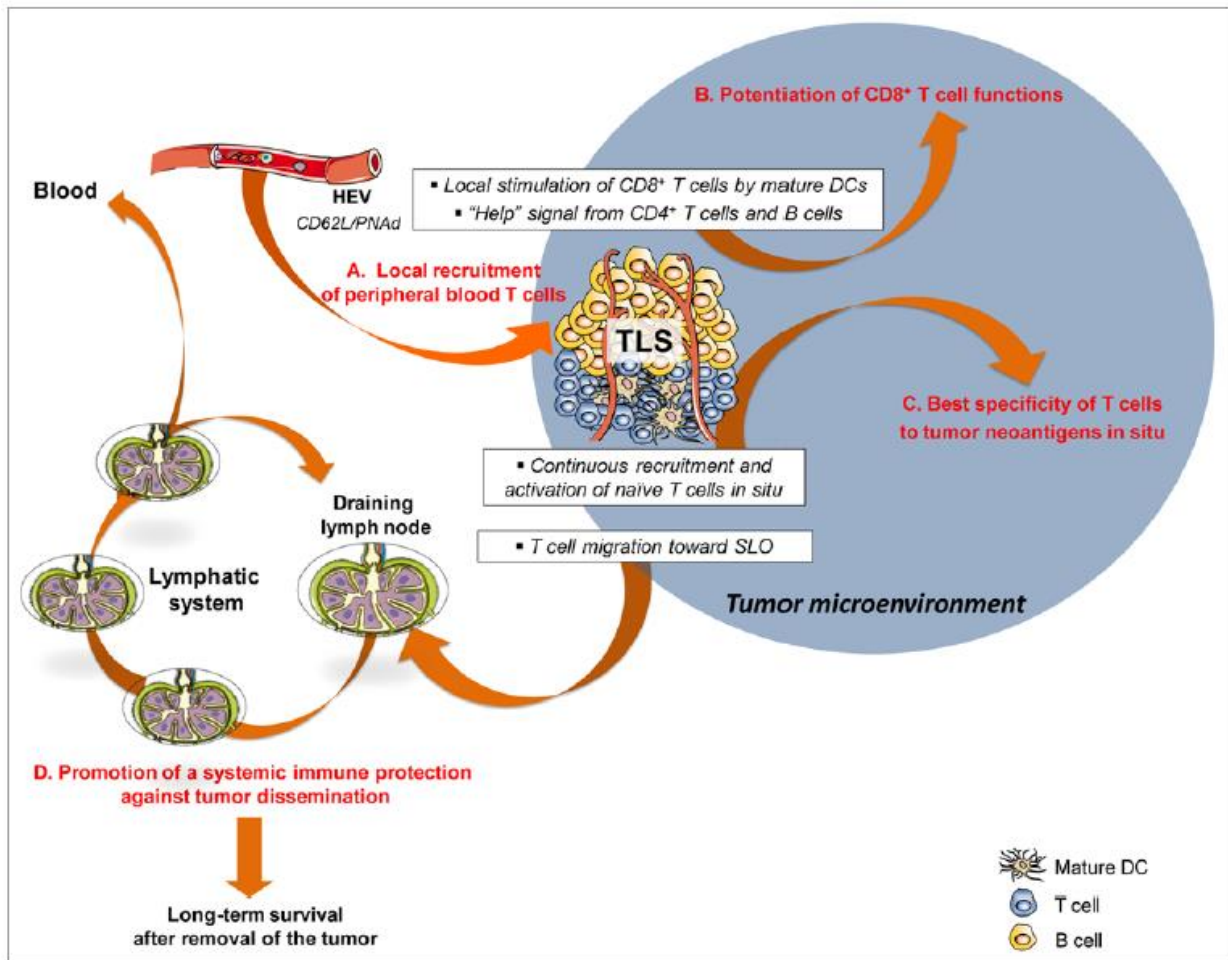
**Εικόνα 14.** Δομή λεμφαδένα vs τριτοταγούς λεμφικής δομής (Hughes CE. et al. *Frontiers in Immunology* 2016).

Ο καρκινικός ιστός αποτελείται από καρκινικά κύτταρα και ένα καρκινικό στρώμα (μικροπεριβάλλον του όγκου) και η αλληλεπίδρασή τους μπορεί να καθορίσει τη βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου (35). Το καρκινικό στρώμα αποτελείται από αγγεία, ινοβλάστες, κύτταρα της έμφυτης (innate) και προσαρμοστικής ανοσίας και ένα εξωκυττάρια ουσία, στοιχεία παρόμοια με αυτά της φυσιολογικής οργάνωσης των οργάνων. Το ανοσολογικό σύστημα έχει κυρίαρχο ρόλο στο μικροπεριβάλλον του όγκου και συμμετέχει στην επιτήρηση του (36). Η αντιογκογόνος ανοσολογική αντίδραση διαφέρει ανάλογα με το είδος του όγκου, το στάδιο ανάπτυξης του όγκου, και τον ιστό από τον οποίο προέρχεται ο όγκος. Για παράδειγμα, τα καρκινώματα του παχέος εντέρου με υψηλό φορτίο γονιδιακών μεταλλάξεων, σε έδαφος μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI), τείνουν να εμφανίζουν μεγαλύτερο αριθμό TLS στο κέντρο του όγκου (37), και πολλοί ανταποκρίνονται στην ανοσοθεραπεία με αναστολείς του ανοσιακού σημείου ελέγχου (immune checkpoint inhibitors), αν και πολλοί ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου δεν επιτυγχάνουν τον ίδιο βαθμό ανταπόκρισης με οποιαδήποτε ανοσοθεραπεία, λόγω της μη ανοσογονικότητας του όγκου (38).

Τα ανοσοκύτταρα που διηθούν τον όγκο συχνά αντιπροσωπεύουν την ανοσολογική αντίδραση. Η παρουσία μεγάλου αριθμού TLS έχει βρεθεί να αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα της κλινικής έκβασης πολλών τύπων συμπαγών όγκων, όπως του γαστρεντερικού, του πνεύμονα, των ωοθηκών, και του παγκρεατικού καρκίνου (39). Κύτταρα μυελικής προέλευσης, όπως τα μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα και μαστοκύτταρα επίσης διηθούν τους καρκινικούς ιστούς, και ειδικά τα μακροφάγα, που είναι συνήθως τα πιο άφθονα μέσα στον όγκο, ασκούν σημαντική επίδραση στην καρκινική ανάπτυξη (40). Αυτά τα μυελικής προελεύσεως κύτταρα που διηθούν τον όγκο φαίνεται να έχουν σημαντική προγνωστική αξία (41). Το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του όγκου παρουσιάζει δραστικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της πολυσταδιακής ανάπτυξής του, από την ανοσολογική αντίδραση έως την ανοσολογική ανοχή στα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης (42). Παράλληλα, αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις επηρεάζουν την ανάπτυξη του όγκου σε διαφορετικά στάδια, περιλαμβάνοντας την έναρξη, την ανάπτυξη, την κακοήγη εξαλλαγή, τη διήθηση και τη μετάσταση (43). Τα ανοσοκύτταρα που διηθούν τον όγκο αλληλεπιδρούν δυναμικά με τα καρκινικά κύτταρα και μερικά από αυτά τα μοριακά γεγονότα έχουν διερευνηθεί (43). Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι ακόμα και ίδιοι τύποι ή υπότυποι ανοσοκυττάρων που διηθούν τον όγκο έχουν διαφορετικές και αντίθετες επιδράσεις στην έκβαση του ασθενούς (44).

Ο κεντρικός μηχανισμός στις κυτταρικές ανοσολογικές απαντήσεις ξεκινάει όταν ανώριμα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic Cells, DCs) έρχονται σε επαφή με ξένα (non-self) αντιγόνα, τα οποία στη συνέχεια μεταναστεύουν σε τοπικούς λεμφαδένες και παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα Τ λεμφοκύτταρα. Αυτά στη συνέχεια ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και αποκτούν υποδοχείς επιφανείας που τα βοηθούν να επιστρέψουν (homing) στον ιστό/όργανο που πάσχει, προκειμένου να απομακρύνουν τα ξένα αντιγόνα. Η Β ανοσολογική αντίδραση είναι κυρίως χυμική και συμβαίνει σε περιφερικά, δευτερογενή λεμφικά όργανα όπως οι λεμφαδένες, οι πλάκες του Peyer και ο σπλήνας. Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα (Secondary Lymphoid Organs, SLOs) αναπτύσσονται σε προκαθορισμένες θέσεις κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και στην πρώιμη ζωή. Αντιθέτως, τα μεταγεννητικά λεμφικά όργανα, τα οποία παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογία με τα δευτερογενή, δεν αναπτύσσονται σε λεμφικούς ιστούς, αλλά σε ιστούς/όργανα τα οποία έχουν προσβληθεί από χρόνιες λοιμώξεις, αυτοάνοσες παθήσεις, σε απόρριψη μοσχεύματος, καθώς και σε καρκινικούς ιστούς και είναι γνωστά ως τριτοταγή λεμφικά όργανα ή δομές (TLS). Οι TLS αναπτύσσονται γενικά σε περιοχές εκταταμένης τοπικής αντίδρασης της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας και θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική αντίδραση παρόμοια με αυτή των SLOs (45). Ένας τύπος TLS είναι ο λεμφικός ιστός του βλεννογόνου του αναπνευστικού συστήματος (BALT) που μπορεί ανεξάρτητα να παράγει τοπικές Β και Τ κυτταρικές απαντήσεις και αποτελεί μία αποθήκη Τ και Β κυττάρων μνήμης (46). Σε αντίθεση με τα SLOs, τα TLS βρίσκονται πολύ κοντά ή εντός των βλαβών και έχουν παρόμοια ανοσολογική λειτουργία. Έτσι, τα TLS είναι στην πρώτη γραμμή της ‘ανοσολογικής μάχης’ (35) (Εικόνα 15).

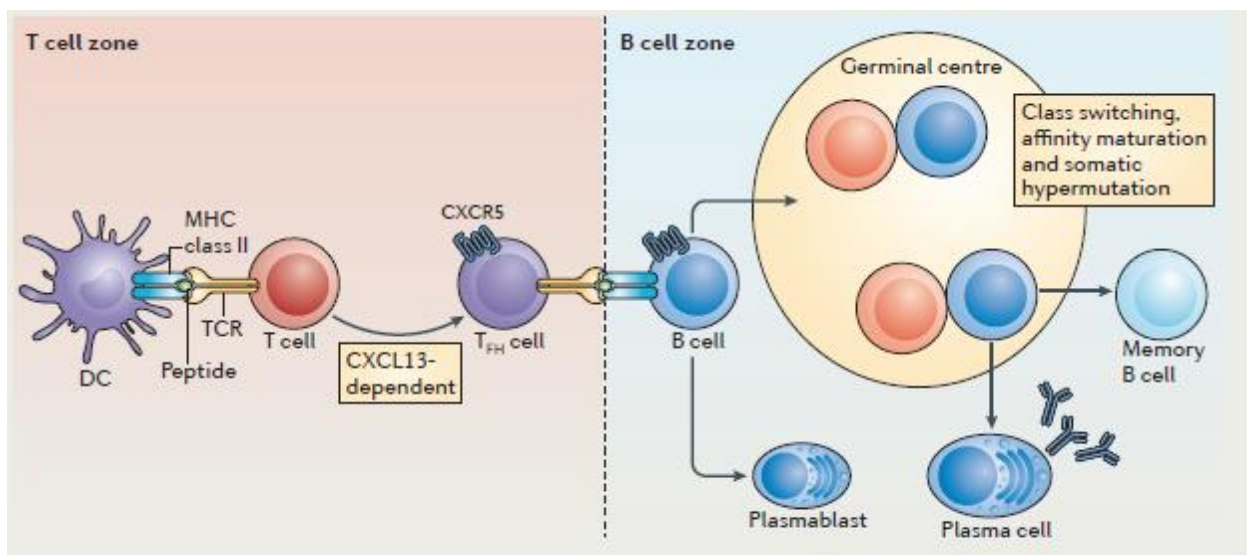




**Εικόνα 15.** Ο ρόλος των τριτοταγών λεμφικών δομών στις ανοσολογικές απαντήσεις που λαμβάνουν χώρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Goc J et al. *OncolImmunology* 2013).

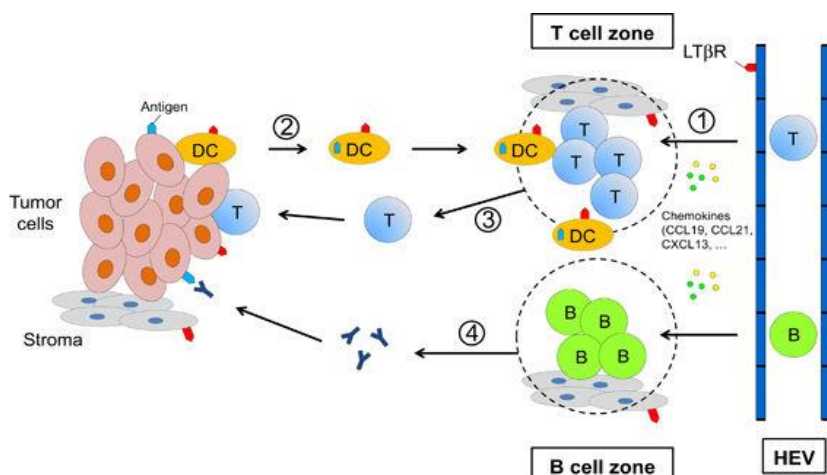
## 2.1 Ορισμός, θέση και δομή των TLS

.Οι TLS οργανώνονται σε λεμφικές δομές που μοιάζουν με τα SLOs και χαρακτηρίζονται από την παρουσία B περιοχών (πρωτογενή ή δευτερογενή λεμφοζίδια με βλαστικά κέντρα), T κυτταρικές ζώνες και εξειδικευμένα αγγεία γνωστά ως φλεβίδια με υψηλό ενδοθήλιο (HEVs), αν και οι TLS δεν έχουν κάψα, ενώ φαίνεται να τροφοδοτούνται από προσαγωγά λεμφαγγεία (35),(47) (Εικόνα 16).



**Εικόνα 16.** T και B κυτταρικές ζώνες στις τριτοταγείς λεμφικές δομές ( Pitzalis C et al, Nature Reviews Immunology, 2014)

Η λεμφοκυτταρική διήθηση και εγκατάσταση ρυθμίζονται με ακρίβεια από αρκετά είδη χημειοτακτικών παραγόντων και μορίων προσκόλλησης που εκφράζονται ή παρουσιάζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα ή κατά μήκος των οδών που ακολουθούν τα λεμφοκύτταρα (48). Τα κυτταροτοξικά και μνήμης λεμφοκύτταρα διεισδύουν στους φλεγμονώδεις ιστούς αν και μεγάλος αριθμός λεμφοκυττάρων συγκεντρώνονται στις TLS μέσω των HEVs με ένα πολύπλοκο μηχανισμό που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των λεμφοκυττάρων, των ενδοθηλιακών κυττάρων, της L-σελεκτίνης και ιντεγκρινών (49). Συγκεκριμένα, τα HEVs εκφράζουν προσδέτες της L-σελεκτίνης, συμπεριλαμβανομένου του Pnad (peripheral node addressin) ο οποίος αποτελεί και ειδικό δείκτη ανίχνευσής τους στους λεμφαδένες ή άλλους ιστούς (50). Οι χημειοκίνες CCL19 και CCL21 είναι απαραίτητες για την προσέλκυση των T και των δενδριτικών κυττάρων στους λεμφικούς ιστούς και η χημειοκίνη CXCL13 για την προσέλκυση των B κυττάρων (51) (Εικόνα 17).



**Εικόνα 17.** Δημιουργία τριτοταγών λεμφικών δομών (Pimenta EM et al, Cancers, 2014)

## 2.2 Θέση των TLS στους καρκινικούς ιστούς

Οι TLS που σχετίζονται με τον όγκο , μπορεί να βρίσκονται είτε στο κέντρο αυτού ,είτε συχνότερα στην περιφέρειά του δημιουργώντας ένα <τοίχος> γύρω από τον καρκινικό ιστό. Οι TLS που βρίσκονται στο κέντρο του όγκου είναι πολύ πιο σπάνιες από αυτές της περιφέρειας σε ίδιους τύπους καρκίνου, αλλά η συχνότητα των TLS στο κέντρο ποικίλλει ανάλογα με τον ιστό προέλευσης του καρκίνου και το είδος του καρκίνου (35).

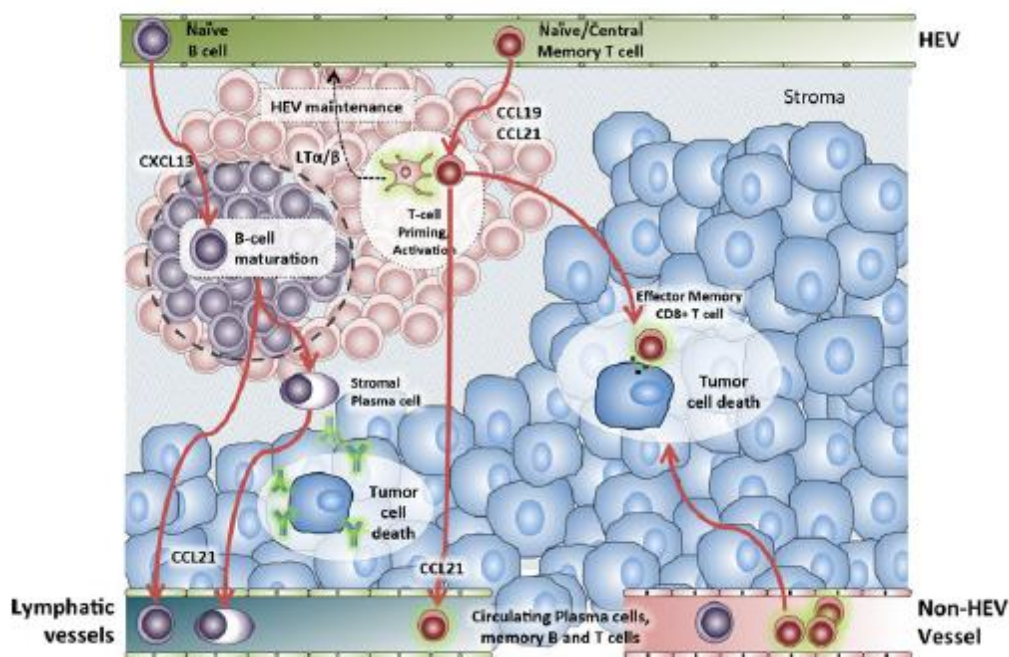
Προφανώς, ο σχηματισμός των TLS αναμένεται σε ιστούς με συνεχή και ενεργό φλεγμονή όπου λαμβάνουν χώρα ανοσολογικές αντιδράσεις (52). Αυτές οι συνθήκες επικρατούν στους ιστούς που περιβάλλουν τον καρκίνο, καθώς τα ξένα αντιγόνα του όγκου παρουσιάζονται διαρκώς και η ιστική καταστροφή που προκαλείται από τη διήθηση του καρκίνου πυροδοτεί τη φλεγμονή, ενώ διατηρούνται οι υγιείς μη καρκινικές δομές (35).

Πιθανολογείται, ότι οι TLS στην περιφέρεια του όγκου καταστρέφονται από την καρκινική διήθηση και δημιουργούνται νέες ακριβώς το διηθητικό μέτωπο, οι οποίες με τη σειρά τους περιβάλλονται από νέο καρκινικό ιστό. Αυτές οι διαδικασίες επαναλαμβάνονται, έχοντας ως αποτέλεσμα ο όγκος να περιβάλλεται από TLS στην περιφέρεια , ενώ στο εσωτερικό του όγκου να είναι σπάνιες ή απύσες (35).

## 2.3 Δομή των TLS

Οι TLS έχουν δομή παρόμοια με αυτή των λεμφαδένων και των πλακών του Peyer. Εκτός από την αρχιτεκτονική, τα δομικά κύτταρα των TLS και τα μόρια που αυτές εκφράζουν είναι όμοια με αυτές των SLOs (54). Οι T κυτταρικές ζώνες είναι CD62L+ και αποτελούνται κυρίως από CD4 κύτταρα μνήμης και ώριμα T λεμφοκυττάρων που συσσωρεύονται μέσω των HEVs από την κυκλοφορία του αίματος. Η T ζώνη επίσης περιέχει ανώριμα καθώς και CD208 + ώριμα δενδριτικά κύτταρα (55). Η ποσότητα των HEVs σχετίζεται στενά με τον αριθμό των CD3+ , CD8+ T κύτταρα, των CD20+ B κυττάρων και των CD208 + ώριμων δενδριτικών κυττάρων. Το δευτερογενές λεμφοζίδιο αποτελείται από ένα μανδύα ώριμων B κυττάρων και ένα βλαστικό κέντρο (GC) το οποίο με τη σειρά του αποτελείται από ενεργά πολλαπλασιαζόμενα B κύτταρα και ένα δίκτυο CD21+ δενδριτικών κυττάρων των λεμφοζιδίων (Follicular Dendritic Cells, FDCs). Η ανάπτυξη του βλαστικού κέντρου αντιπροσωπεύει μια ενεργή ανοσολογική αντίδραση και ο αριθμός των βλαστικών κέντρων σε διάφορα είδη καρκίνου έχει συσχετιστεί σημαντικά με την κλινική έκβαση των ασθενών (56). Εκτός από τις χημειοκίνες (CCL19, CCL21, CXCL13) και μόρια προσκόλλησης (ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, MadCAM-1), ανιχνεύονται επίσης CCL17, CCL22 και IL16

στις TLS (Εικόνα 18). Τα κύτταρα φυσικοί φονείς επίσης έχουν βρεθεί σε TLS σε όγκους του πνεύμονα (54).



**Εικόνα 18.** Οι τριτοταγείς λεμφικές δομές ρυθμιστές των ανοσολογικών διεργασιών στην περιοχή του όγκου ( Dieu Nosjean MC et al, Immunological Reviews, 2016)

## 2.4 Κλινικοπαθολογική επίπτωση των TLS στους ανθρώπινους καρκίνους

Η παρουσία των TLS σε καρκινικούς ιστούς έχει αναφερθεί ότι αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό δείκτη , αν και από κάποιες μελέτες συμπεραίνεται ότι δεν ισχύει πάντοτε αυτό όπως π.χ στον καρκίνο του νεφρού (57).

### 2.4.1 Εκτίμηση και συχνότητα των TLS

Είναι σημαντικό να διερευνήσουμε την παρουσία των TLS και στον όγκο αλλά και τους ιστούς που τον περιβάλλουν. Η συχνότητα των TLS ποικίλλει και τείνει να εξαρτάται από τη θέση τους και τον τύπο του καρκίνου. Τουλάχιστον μία TLS έχει βρεθεί στην περιφέρεια του όγκου σε περισσότερες από το 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του παχέος εντέρου, του παγκρέατος και του καρκίνου του μαστού, ενώ στο εσωτερικό του έχουν παρατηρηθεί μόνο στο 15%. Περίπου 20-40% των καρκίνων του δέρματος και του στοματικού βλεννογόνου είχαν TLS, των οποίων οι περιβάλλοντες ιστοί καλύπτονταν από

πλακώδες επιθήλιο (58). Οι TLS στο πλακώδες καρκίνωμα του στοματικού βλεννογόνου βρίσκονται κυρίως στο περιβάλλον στρώμα του όγκου περίπου 0.5mm από την παρυφή του. Η ποσότητα των TLS στον καρκίνο του μαστού δείχνει μια αξιοσημείωτη μείωση από το DCIS στο διηθητικό καρκίνωμα , αν και άλλες μελέτες υποστηρίζουν διαφορετικά δεδομένα (59).

#### 2.4.2 Πρόγνωση

Η παρουσία των TLS είναι συνήθως ενδεικτική ευνοϊκής πρόγνωσης , αν και κάποιες αναφορές προτείνουν ότι η παρουσία τους μπορεί να έχει αρνητική προγνωστική αξία. Οι Bento et al. διαπίστωσαν ότι η παρουσία TLS στον καρκίνο του παχέος εντέρου σχετίζεται σημαντικά με πιο προχωρημένη νόσο (60). Οι Figenschau et al θεώρησαν ότι οι περιπτώσεις του καρκίνου του μαστού που σχετίζονταν με TLS παρουσίαζαν υψηλότερο βαθμό κακοήθειας και μια πιο μεγάλη συχνότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων (61). Αυτά τα αντίθετα αποτελέσματα πιθανά σχετίζονται με την χρήση διαφορετικών μεθοδολογιών εκτίμησης της παρουσίας TLS.

Αναδρομικά, η πρώτη μέθοδος μέτρησης του αριθμού των TLS ήταν η ποσότητα των ώριμων DCs (DC-Lamp+) μέσα στις αθροίσεις των CD3 + T λεμφοκυττάρων (58). Οχτώ δημοσιεύσεις έχουν βρει μία θετική συσχέτιση μεταξύ του μεγάλου αριθμού DC-Lamp+ DCs και της πρόγνωσης σε αρκετούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (56), του μελανώματος (52) , του καρκίνου του μαστού (63), του νεφρού (57) και του παχέος εντέρου (64).

Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τις TLS (Gene expression signature) προσφέρει τη δυνατότητα να διερευνήσουμε την προγνωστική τους αξία σε μεγάλες αναδρομικές μελέτες. Μέχρι στιγμής, έξι μελέτες έχουν εκτιμήσει την προγνωστική αξία της αυξημένης έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τις TLS στον καρκίνο. Παρά την ετερογένεια στις TLS- γονιδιακές υπογραφές ,σε έξι τουλάχιστον μελέτες, μια σημαντική συσχέτιση με καλή πρόγνωση έχει βρεθεί στο μελάνωμα και στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Με την ίδια μεθοδολογία, TLS έχουν επίσης ανιχνευτεί και σε ΗΚΚ που όμως η παρουσία τους σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καθυστερημένη υποτροπή και μία τάση μείωσης της συνολικής επιβίωσης μετά την εκτομή του ΗΚΚ. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αντανakλά ένα μη αναμενόμενο ρόλο των TLS , ίσως λόγω της τοπικής παραγωγής λεμφοτοξίνης (LT) -β από τα προγονικά κύτταρα του ΗΚΚ (65) .

Μια διαφορετική προσέγγιση που έχει χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του αριθμού των TLS στα διάφορα είδη καρκίνων είναι η μέτρηση των B λεμφοκυττάρων με ανοσοιστοχημεία (IHC). Η πλειονότητα των δημοσιεύσεων μετράει τις συγκεντρώσεις των CD20 + B-λεμφοκυττάρων αποδεικνύοντας ότι μεγάλος αριθμός από αυτούς του πληθυσμούς συνδέεται με καλή πρόγνωση σε αρκετούς καρκίνους. Πολλές μελέτες υπολογίζουν τον αριθμό των συγκεντρώσεων των CD3+ T λεμφοκυττάρων και επίσης βρέθηκε μία θετική προγνωστική αξία (66).

Συνολικά, παρά την ετερογένεια των μεθόδων, στις περισσότερες μελέτες, βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του μεγάλου αριθμού TLS και της επιβίωσης των ασθενών σε περισσότερα από 10 είδη καρκίνου (66).

### **2.4.3 Σχέση με το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον**

Η παρουσία και η ποσότητα των TLS σχετίζονται σημαντικά με την ανοσολογική αντίδραση σε πολλούς καρκίνους, αν και υπάρχουν διαφορές μεταξύ των μελετών και των διάφορων τύπων καρκίνου. Οι TLS φαίνεται να είναι καλοί δείκτες του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος, καθώς βρίσκονται μέσα στον όγκο και ανιχνεύονται με την ιστολογική εξέταση (34).

Η παρουσία και ο αριθμός των TLS σχετίζεται κυρίως με την παρουσία Th1 λεμφοκυττάρων και με κυτταροτοξικές ανοσολογικές αντιδράσεις σε διάφορα είδη καρκίνων. Η ποσότητα των TLS επίσης σχετίζεται με την παρουσία FOXP3+ T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Regulatory T cells, Tregs), αλλά υπάρχει αρνητική συσχέτιση με το λόγο FOXP3+/CD3 + T κύτταρα καθώς επίσης και με τα M2 μακροφάγα, στον καρκίνο του μαστού και του παγκρέατος (53). Τα Th2 λεμφοκύτταρα και γονίδια που αναστέλλουν την ανοσολογική αντίδραση δε σχετίζονται σημαντικά με τις TLS. Η παρουσία και ο αριθμός των TLS σχετίζεται επίσης με CD20+ B λεμφοκύτταρα. Στους καρκίνους του πνεύμονα και μαστού, το μέγεθος, η ποσότητα και ο αριθμός των B λεμφοζιδίων ή βλαστικών κέντρων σχετίζεται σημαντικά με ευνοϊκότερη πρόγνωση. Έχει υποτεθεί ότι τα B κύτταρα παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην αντιογκογόνο ανοσολογική αντίδραση, ίσως δεσμεύοντας και παρουσιάζοντας τα αντιγόνα του όγκου στα T λεμφοκύτταρα, λειτουργώντας δηλαδή σαν επαγγελματίες αντιγονοπαρουσιαστές ή παράγοντας αντισώματα ειδικά έναντι αντιγόνων του όγκου (67). Οι Germain et al. έχουν επισημάνει ότι η παρουσία ώριμων CD208+ δένδριτικών κυττάρων με αυξημένο αριθμό B λεμφοζιδίων είναι ένας ισχυρός δείκτης της κλινικής έκβασης των ασθενών (56). Έτσι,

φαίνεται ότι ο μεγάλος αριθμός TLS είναι ένας καλός βιοδείκτης της ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος του όγκου όπου λαμβάνουν χώρα κυτταρικές και χυμικές αντιδράσεις.

Μια πρόσφατη έρευνα έχει επίσης δείξει ότι τα T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) καταστέλλουν τα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα μέσα στις TLS του όγκου και κατ' επέκταση την ανοσολογική αντίδραση κατά του όγκου (68). Για αυτό το λόγο, προκειμένου να αυξήσουμε την θεραπευτική επίδραση της ανοσοθεραπείας, προτείνεται να ελαττωθούν τα T ρυθμιστικά κύτταρα (35).

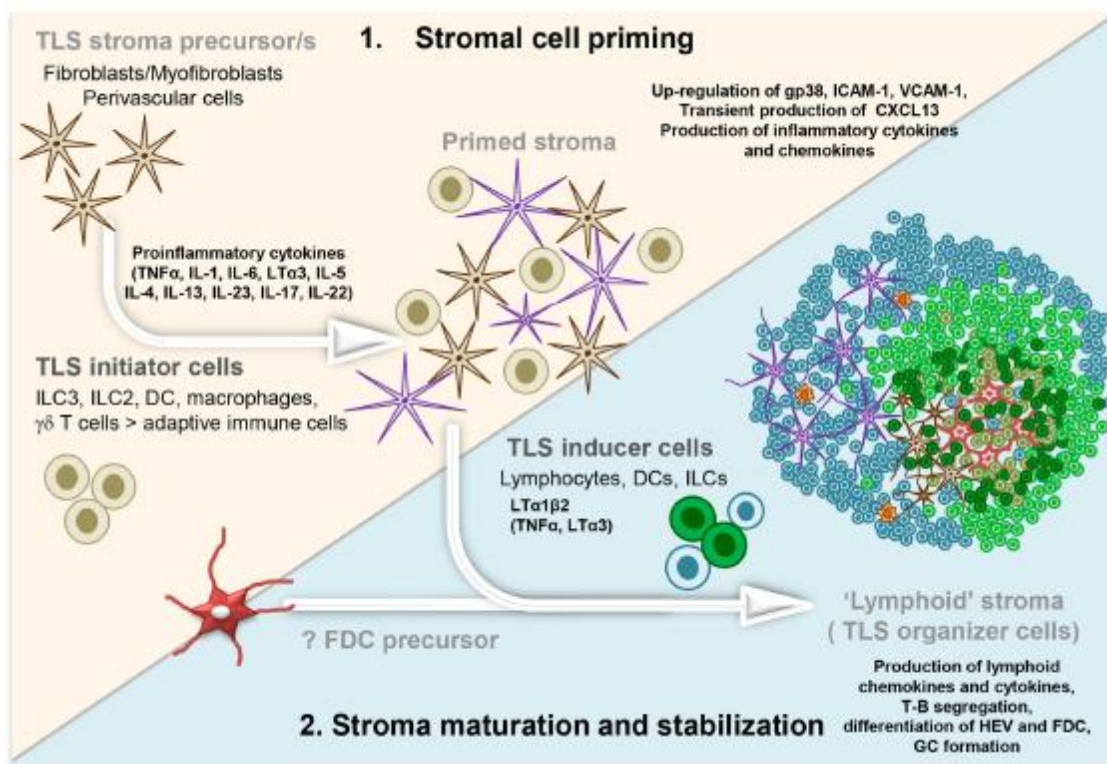
## 2.5 Σχηματισμός των TLS

Μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί συμμετέχουν στο σχηματισμό TLS (69) (Εικόνα 19) . Το ρετινοϊκό οξύ επάγει την έκφραση της CXCL13 στα στρωματικά κύτταρα. Τα κύτταρα επαγωγείς του λεμφικού ιστού (Lymphoid Tissue inducers, LTi) συσσωρεύονται ως απάντηση στην τοπική παραγωγή CXCL13 και σχηματίζουν τις πρώτες αθροίσεις κυττάρων. Ως απάντηση στην IL-7 και στον TNFSF11, τα LTi εκκρίνουν λεμφοτοξίνη (LT)  $\alpha 1\beta 2$ . Η αλληλεπίδραση της LT $\alpha 1\beta 2$  που εκφράζεται από τα LTi με το LT $\beta$  υποδοχέα που εκφράζεται σε στρωματικά κύτταρα, επιτρέπει στα τελευταία να διαφοροποιηθούν σε LTo (Lymphoid Tissue organizers cells) κύτταρα, οδηγώντας στην έκκριση λεμφικών χημειοκινών CCL19, CCL21 και CXCL13 , οι οποίες προσελκύουν αιμοποιητικά κύτταρα και στην αύξηση της έκκρισης VCAM-1, ICAM-1 και MadCAM-1 που εξασφαλίζουν την ιστική εγκατάσταση (homing) των λεμφοκυττάρων. Οι χημειοκίνες CCL19 και CCL21 αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα τους CCR7 για να προσελκύσουν T λεμφοκύτταρα και δένδριτικά κύτταρα και η χημειοκίνη CXCL13 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα CXCR5 για να προσελκύσει B λεμφοκύτταρα. Τα LTo κύτταρα επίσης εκκρίνουν VEGF-C, FGF-2 και HGF που προάγουν την ανάπτυξη λεμφοκυτταρικής αγγείωσης και κυρίως HEVs. Τα LTo, παράλληλα διαφοροποιούνται σε δένδριτικά κύτταρα και ινοβλάστες (70).

Τα Th 17,  $\gamma\delta T$  κύτταρα που εκφράζουν IL17A ή άλλα ανώριμα λεμφικά κύτταρα μπορεί να αντικαταστήσουν τα LTi cells στην ανάπτυξη των TLS (71). Αυτά τα κύτταρα μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά με τα LTi , όπως η παραγωγή IL17A, IL22, Ltb, TNF, και GM-CSF. Τα T βοηθητικά κύτταρα επίσης εκφράζουν CXCL13 και επίσης εμπλέκονται στη ρύθμιση των TLS διαδραματίζοντας ρόλο-κλειδί στη λεμφική οργανογένεση , στο σηματοδοτικό μονοπάτι Lt $\beta R$  , στην δραστηριότητα των B λεμφοκυττάρων και στην παραγωγή αντισωμάτων στα βλαστικά κέντρα (72) .



Η δημιουργία των TLS στηρίζεται σε σημαντικό βαθμό και στα HEVs. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των HEVs εκφράζουν LtβR, και η συνεχής δέσμευση του LtβR των HEVs από τα LT+ CD11c+ Dcs είναι ουσιώδης για τη δημιουργία και διατήρηση των ώριμων HEV που απαιτούνται για την εξαγγείωση των λεμφοκυττάρων του αίματος μέσα στις TLS (73). Επιπλέον, τα CD11+ DCs μπορεί να είναι πηγή προαγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF , που ευνοούν την ανάπτυξη των HEVs (74).



**Εικόνα 19.** Σχηματισμός τριτοταγών λεμφικών δομών ( Barone F. et al, *Frontiers in Immunology*, 2016).

## 2.6 Αρνητικοί ρυθμιστές των TLS

Από την άλλη πλευρά, η IL-27, μια κυτοκίνη που αναστέλλει την επίδραση των Th17 κυττάρων, πρόσφατα, φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά την ανάπτυξη των TLS στους ιστούς των αρθρώσεων σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Ενώ σε ασθενείς που έχουν μεγάλο αριθμό TLS, οι τριτοταγείς λεμφικές δομές είναι εκτεθειμένες σε υψηλά επίπεδα IL-17 και IL-21, σε ασθενείς που δεν έχουν TLS παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα IL-27 και άρα πιθανότατα η έκφραση της IL-27 σχετίζεται αντιστρόφως με τη διήθηση από CD3+ T-

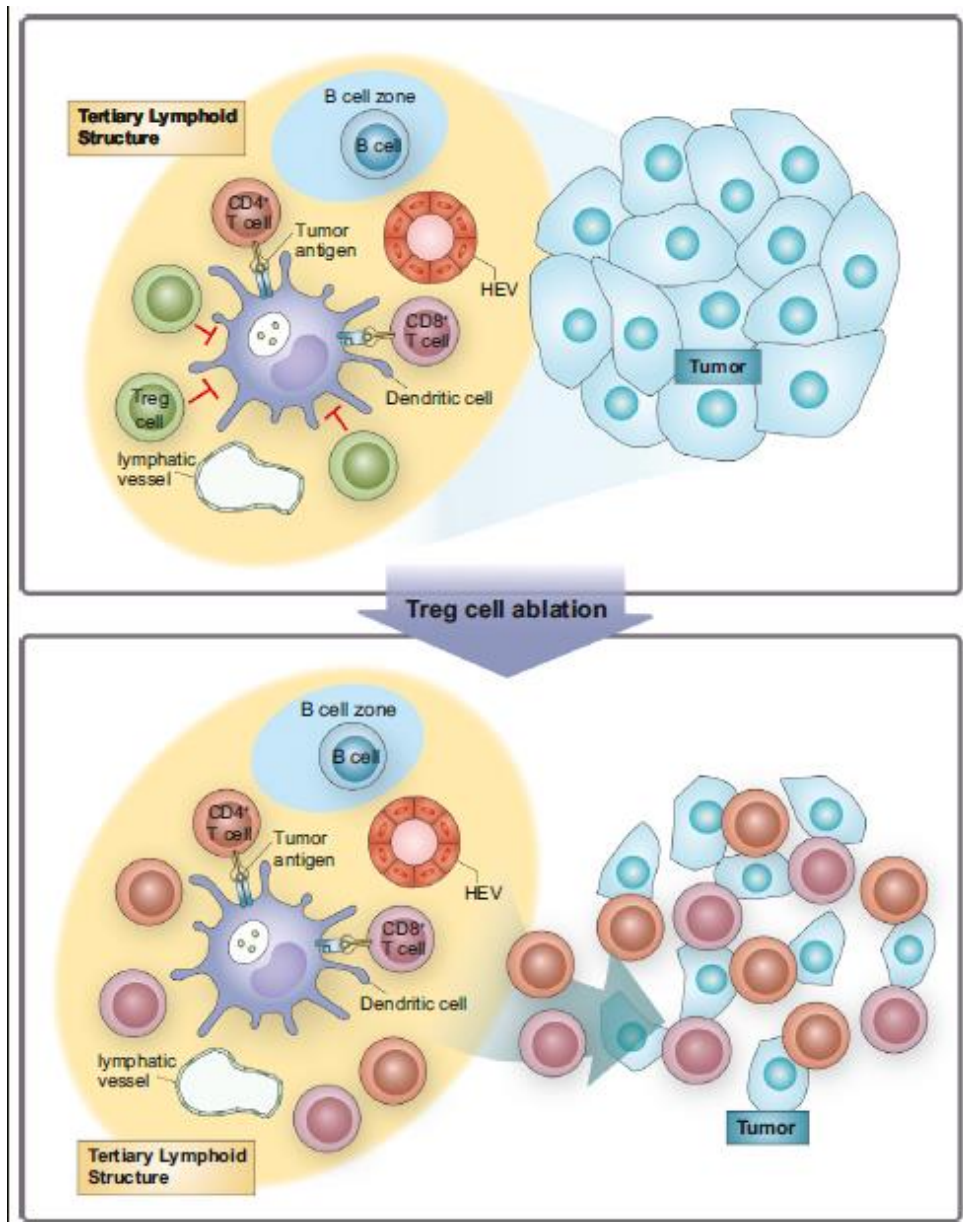


και CD20+ B-λεμφοκύτταρα και με την αρθρίτιδα. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε σε μοντέλο ποντικού με ρευματοειδή αρθρίτιδα (75).

Μεταξύ των ανοσολογικών κυττάρων που διηθούν τους όγκους, τα T-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs), θεωρούνται σε πολλές αναφορές ως δείκτης φτωχής πρόγνωσης στον καρκίνο. Τα Tregs έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζουν αρνητικά την ανάπτυξη του BALB (76). Στον καρκίνο του μαστού, Tregs, εντοπίστηκαν στις λεμφικές αθροίσεις που περιβάλλουν τους όγκους, και η παρουσία τους συνδέεται με κακή κλινική έκβαση των ασθενών (77). Σε ποντίκια με καρκίνο του μαστού, η έλλειψη Tregs οδήγησε σε αύξηση των HEVs μέσα στον όγκο, διευκολύνοντας την προσέλευση των T λεμφοκυττάρων από το αίμα και τελικά την καταστροφή του όγκου.(78). Αυτή η παρατήρηση βρίσκεται σε συμφωνία με μία μελέτη σε ανθρώπους που δείχνει ότι όγκοι του μαστού με μεγάλη ποσότητα HEVs σχετίζεται, με αυξημένη έκφραση LT-β, αυξημένη ποσότητα ώριμων δενδριτικών κυττάρων στον όγκο και ένα μειωμένο λόγο FOXP3+/CD3+ Tλεμφοκυττάρων (63) (Εικόνα 20).

Πιο πρόσφατα, αποκαλύφθηκε ένας νέος μηχανισμός αρνητικής ρύθμισης σχηματισμού των TLS από τα Tregs, μέσω μετριασμού των ουδετεροφίλων στην περιοχή της φλεγμονής. Η παρουσία ουδετεροφίλων φαίνεται να είναι σημαντική για τη δημιουργία και λειτουργικότητα της χυμικής ανοσίας, αυξάνοντας τη δραστηριότητα των B-κυττάρων (79).

Συμπερασματικά, οι μηχανισμοί γένεσης των TLS και των λεμφικών οργάνων μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Από τη μία πλευρά, η παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών (LT,IL-17,IL-22,IL23) και λεμφικών χημειοκινών (CCL21, CXCL12, CXCL13), η ανάπτυξη HEVs, όπως και η ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων των B λεμφοκυττάρων και των κυττάρων τελεστών (effector) φαίνεται να αποτελούν κρίσιμα γεγονότα στο σχηματισμό των TLS, σε συνθήκες φλεγμονής όπως ο καρκίνος. Από την άλλη πλευρά, η παρουσία Tregs μοιάζει να έχει αρνητική επίπτωση στη δημιουργία TLS και στις T ανοσολογικές απαντήσεις.



**Εικόνα 20.** Τα ρυθμιστικά κύτταρα αρνητικοί ρυθμιστές των τριτοταγών λεμφικών δομών (Lee V. et al, Immunity, 2015).

## 2.7 Σημαντική βιβλιογραφική αναφορά

Μία πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε μία πιθανή διαδικασία ογκογένεσης στο ήπαρ, όπου η παρουσία TLS στο μη-νεοπλασματικό ηπατικό παρέγχυμα φαίνεται να προάγει την ανάπτυξη ΗΚΚ και όχι να την αναστέλλει, όπως έχει δείχτεί σε αρκετούς τύπους καρκίνου και αποτελεί τη μοναδική δημοσίευση στην οποία περιγράφεται αρνητική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας τριτοταγών λεμφικών δομών και της πρόγνωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι Finklin et al., χρησιμοποιώντας μία γνωστή 12-γονιδιακή έκφραση (υπογραφή) [CCL21, CCL19, CXCL13, CXCL11, CCL8, CXCL10, CXCL9, CCL2, CCL3, CCL18, CCL5] η οποία σχετίζεται με την παρουσία TLS, έδειξαν ότι η παρουσία αυτής της υπογραφής στο ηπατικό παρέγχυμα σχετίζεται με πρώιμη υποτροπή (< 2 έτη μετά την εκτομή του ΗΚΚ), και χειρότερη πρόγνωση (80).

Στη συνέχεια προσπάθησαν να εξηγήσουν το εύρημα με τη χρήση προκλινικού (ποντικίσιου) μοντέλου, στο οποίο έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού IKK\_NF-κB σχετίζεται με τον σχηματισμό TLS, οι οποίες φαίνεται να δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον το οποίο ευοδώνει την εμφάνιση και ανάπτυξη προγονικών κυττάρων του καρκίνου (cancer stem cells), με επακόλουθο τη σταδιακή εμφάνιση άτυπων ηπατοκυττάρων στο ηπατικό παρέγχυμα και στη συνέχεια τη δημιουργία ΗΚΚ. Συμπερασματικά, με βάση αυτό το άρθρο φαίνεται πως οι TLS μπορεί να αποτελούν μια μικροφωλιά για τα προγονικά κύτταρα που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Καθώς η δημοσίευση αυτή είναι η μοναδική που δείχνει μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των TLS στο μικροπεριβάλλον ενός καρκίνου και της πρόγνωσης, θελήσαμε να αναπαράγουμε το αποτέλεσμα σε μία σειρά ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και να δούμε ιστολογικά αν οι εν λόγω δομές βρίσκονται στο άμεσο μικροπεριβάλλον του νεοπλασματος ή στο παρακείμενο ηπατικό παρέγχυμα, στο πλαίσιο προϋπάρχουσας ηπατοπάθειας π.χ. αυτοάνοση ηπατίτιδα, χρόνια ΗCV ηπατίτιδα, η οποία σχετίζεται με ηπατοκαρκινογένεση.

### **3. Ασθενείς και μέθοδοι**

#### **3.1 Ασθενείς**

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 22 ασθενείς (18 άνδρες-4 γυναίκες), ηλικίας 17-82 ετών με ιστολογική διάγνωση ΗΚΚ σταδίου I-IV που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εκτομή της νόσου στην Δ Πανεπιστημιακή Χειρουργική Κλινική Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν» από το έτος 2010-2015. Οι ασθενείς βρίσκονταν σε στενή παρακολούθηση από τους θεράποντες ιατρούς μετά την επέμβαση και καταγράφηκαν η μετεγχειρητική θεραπευτική αντιμετώπιση (χημειοθεραπεία, χημειοεμβολισμός) και οι τυχόν υποτροπές. Οι ιστολογικές διαγνώσεις όλων των περιστατικών έγιναν στο Β΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., από τα αρχεία του οποίου ανακτήθηκαν τα πλακίδια και οι κύβοι παραφίνης.

#### **3.2 Μέθοδοι**

Για την επιλογή των κύβων παραφίνης προς διενέργεια ανοσοϊστοχημικών χρώσεων εκτιμήθηκαν όλα τα πλακίδια με χρώση Αιματοξυλίνης- Ηωσίνης και έγινε επιλογή εκείνων των θέσεων όπου εκπλήρωναν τις εξής προϋποθέσεις : α) Περιλαμβάνεται όγκος και

γειτονικό παρέγχυμα, και β) Περιλαμβάνονται τριτοταγείς λεμφικές δομές στα όρια του όγκου ή/ και στο γειτονικό παρέγχυμα.

### 3.2.1 Διπλή ανοσοϊστοχημεία CD3/CD20

Στη συνέχεια διενεργήθηκε διπλή διαδοχική ανοσοϊστοχημική χρώση στο μηχάνημα αυτόματης ανοσοϊστοχημείας Leica Bond με το εξής πρωτόκολλο:

#### 1<sup>η</sup> φάση.

- Επώαση σε ξηρό κλίβανο στους 65°C για 2 ώρες.
- Αποπαραφίνωση/επώαση με Dewax Solution για 30 λεπτά.
- Αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων με το διάλυμα Heat Induced Epitope Retrieval II για 20 λεπτά.
- Επώαση των δειγμάτων σε υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Peroxide Block 3-4%v/v).
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 3x (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Επώαση με το πρώτο πρωτογενές αντίσωμα (αντί-CD3) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 3x (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. (Post primary Rabbit anti mouse IgG (<10μg/mL) in 10%v/v) (Πίνακας 2).
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 3x (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Επώαση με πολυμερές για 15 λεπτά (Polymer Anti-Rabbit Poly-HRP-IgG (<25μg/mL) containing 10% v/v animal serum in Tris-buffered saline/0,09% ProClin 950).
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 3x (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
- Επώαση με διάλυμα DAB για 9 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Mixed DAB Refine).
- Έκπλυση με απεσταγμένο νερό 4x.

## 2<sup>η</sup> φάση

- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 3x (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Επώαση με το δεύτερο πρωτογενές αντίσωμα (αντί-CD20) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 3x (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα AP (αλκαλική φωσφατάση) 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 2 λεπτά 3x (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Επώαση με πολυμερές AP για 30 λεπτά (Polymer Anti-Rabbit Poly-HRP-IgG (<25μg/mL) containing 10% v/v animal serum in Tris-buffered saline/0,09% ProClin 950).
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 2 λεπτά 2x (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 5 λεπτά (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash 2 λεπτά (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Έκπλυση με υδατικό διάλυμα Bond Wash (Tris buffered saline, surfactant and 35% Proclin).
- Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
- Επώαση με διάλυμα Mixed Red για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Mixed Red Refine) .
- Επώαση με διάλυμα Mixed Red για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Mixed Red Refine).
- Έκπλυση με απεσταγμένο νερό 3x.
- Αντίχρωση (counterstaining) των τομών, με εμφάπτιση σε αιματοξυλίνη για 1 λεπτό.
- Δεκαπέντε εμφαπτίσεις σε διαλύματα αλκοόλης με ανιούσα συγκέντρωση (50°, 70°, 80°, 96°, 100°), για προοδευτική αφυδάτωση.
- Εμφάπτιση σε ξυλόλη, επικάλυψη με καλυπτρίδα.

Αντίσωμα	Κλώνος	Εταιρία	Αραίωση
CD3	πολυκλωνικό	Thermo Scientific	1:40
CD20	L26	Dako	1:100

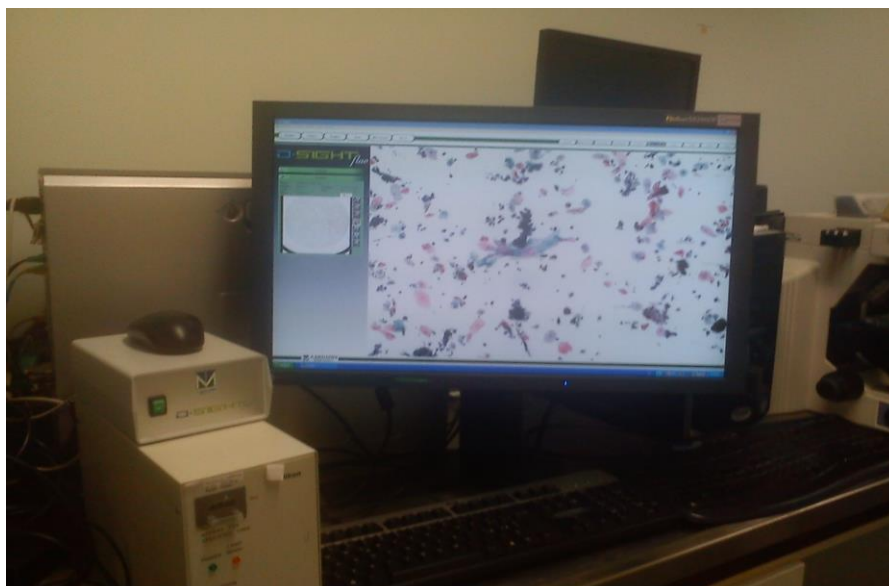
## Πίνακας 2

### 3.2.2 Μεθοδολογία ανάλυσης

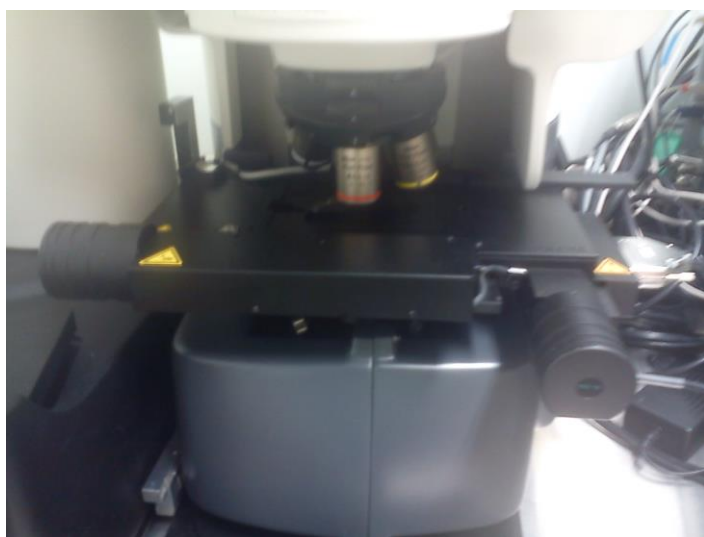
Μετά τη χρώση, τα δείγματα αναλύθηκαν με το αυτοματοποιημένο σύστημα D-Sight-F 200 το οποίο έχει σχεδιαστεί για την παραγωγή ψηφιακών εικόνων με φωτισμό λάμπας και φθορίου (Εικόνα 21-22). Για παθολοανατομική χρήση, τα δείγματα που τοποθετούνται στο σύστημα ψηφιοποιούνται πλήρως και προβάλλονται στην οθόνη για διαγνωστικούς σκοπούς και περαιτέρω αξιολόγηση. Το σύστημα είναι εξοπλισμένο με ένα σετ φακών (Εικόνα 24), και τα δείγματά μας σαρώθηκαν με μεγέθυνση 20x. Κάθε πλακίδιο αναγνωρίζεται αυτόματα από έναν ενσωματωμένο μηχανισμό ανάγνωσης ραβδοκωδικών που επιτρέπει την ψηφιακή φωτογράφιση των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε υπολογιστής για την ψηφιοποίηση, τον έλεγχο και την ανάλυση των δειγμάτων που σαρώθηκαν. Οι εικόνες αναπαράγονται σε μια ευρεία οθόνη LCD 24", υψηλής ευκρίνειας που προσφέρει τη δυνατότητα δυναμικής διαχείρισης της αντίθεσης για καθαρή και λεπτομερή προβολή και μετατροπή με υψηλή πιστότητα χρώματος, ομοιόμορφη αντίθεση και τέλεια αναπαραγωγή (Εικόνα 23).



**Εικόνα 21-22.** Αυτοματοποιημένο σύστημα D-Sight-F 200



**Εικόνα 23.** Υπολογιστής με οθόνη LCD 24", υψηλής ευκρίνειας για την ψηφιοποίηση, τον έλεγχο και την ανάλυση των δειγμάτων.



**Εικόνα 24.** Ενσωματωμένο σετ φακών συστήματος

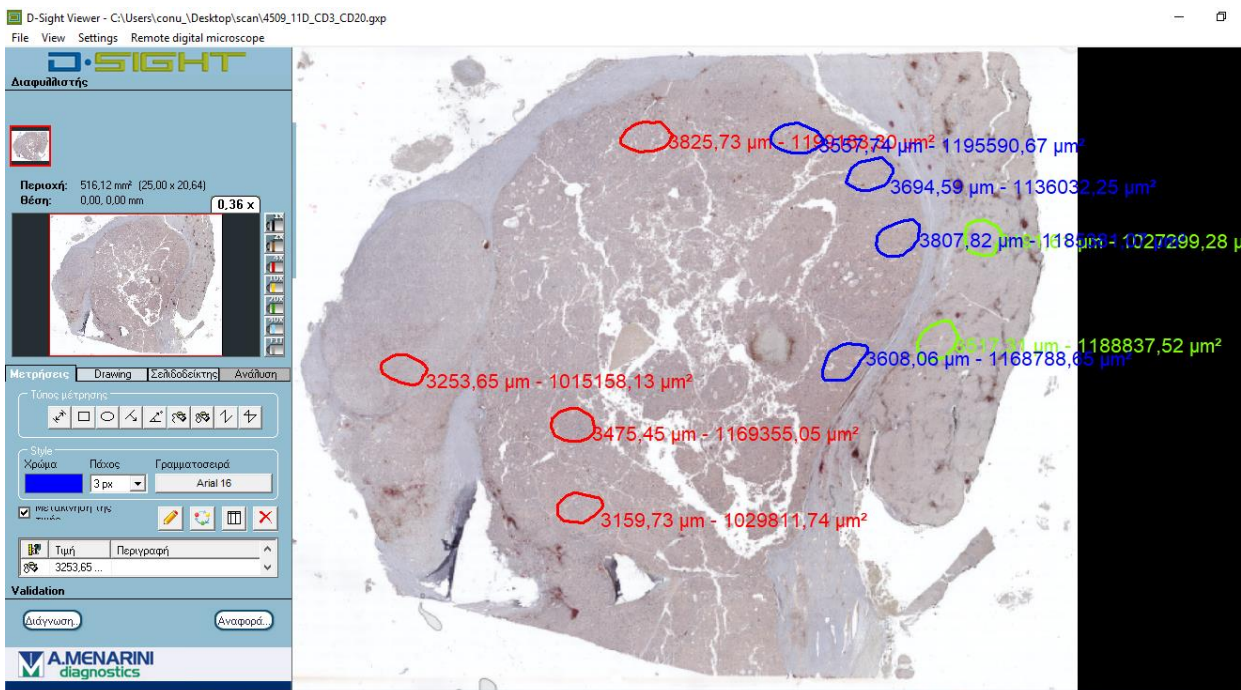


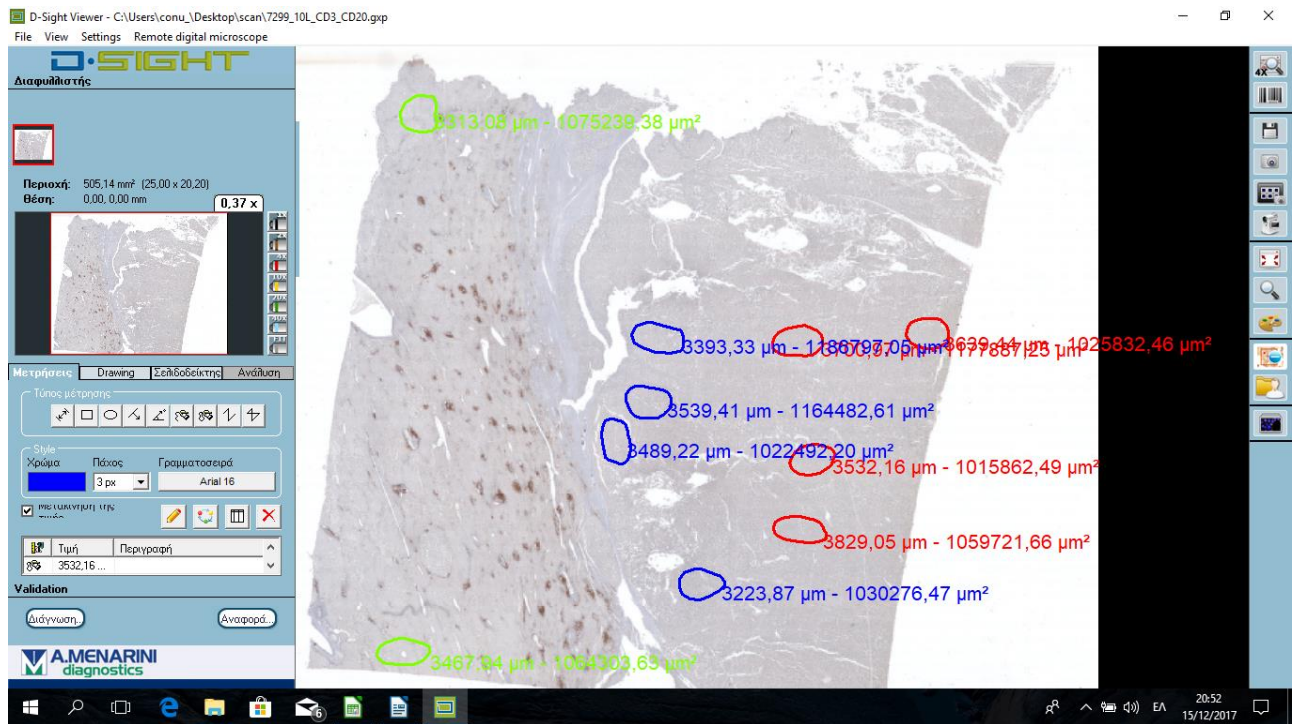
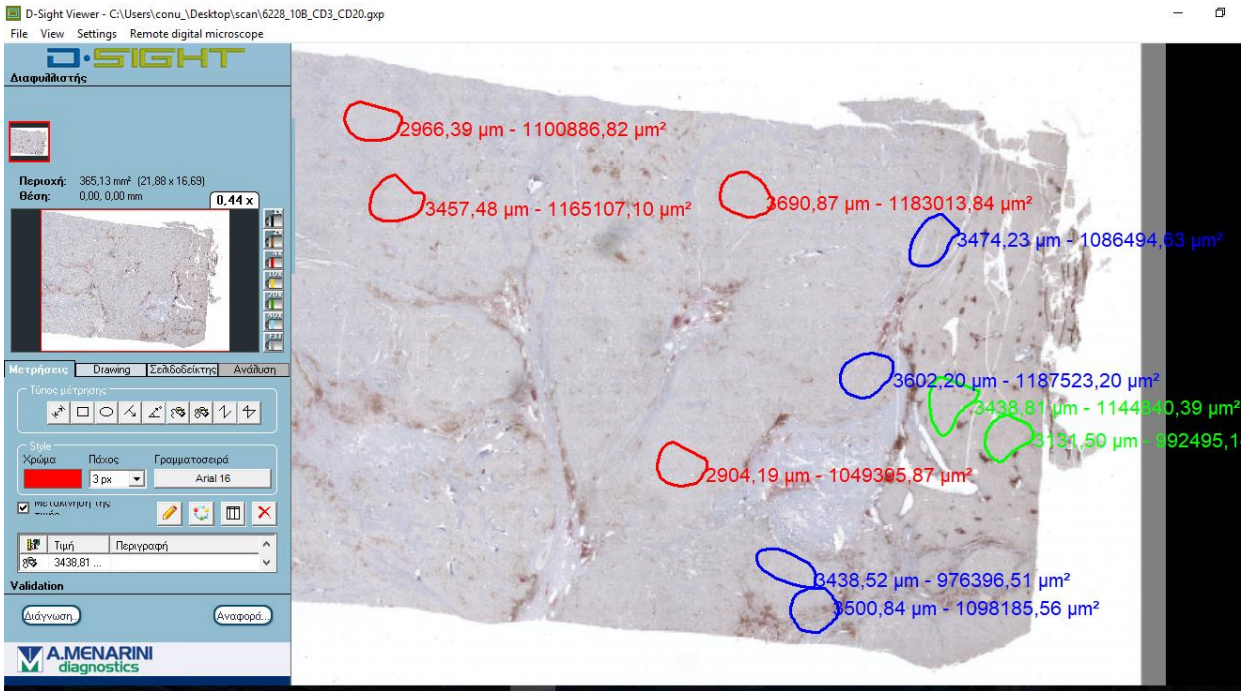
**Εικόνα 25:** Μονάδα φόρτωσης πλακιδίων

Μετά τη σάρωση με το ψηφιακό μικροσκόπιο, οι εικόνες επεξεργάστηκαν και παρατηρήθηκαν με το πρόγραμμα D-Sight Viewer με τη συμβολή ειδικού



παθολογοανατόμου. Το πρόγραμμα παρέχει τη δυνατότητα επισκόπησης των δειγμάτων, εντοπισμού περιοχών ενδιαφέροντος και διαδραστικών εργαλείων σήμανσης και μέτρησης των επιλεγμένων περιοχών. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν περιοχές εμβαδού περίπου 1mm<sup>2</sup> από το κέντρο του όγκου ( 4 περιοχές οι οποίες σημάνθηκαν με κόκκινο περίγραμμα), από την περιφέρεια του όγκου (4 περιοχές οι οποίες σημάνθηκαν με μπλε περίγραμμα) και από το φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα (2 περιοχές οι οποίες σημάνθηκαν με πράσινο περίγραμμα). Να τονιστεί ότι στις παραπάνω περιοχές δεν συμπεριλήφθηκαν εκείνες που περιείχαν TLS . Στη συνέχεια, στην κάθε περιοχή μετρήθηκαν τα κύτταρα CD3 (καφέ χρώση, DAB), και τα CD20 (κόκκινη χρώση, Fast Red) και καταγράφηκαν τα αποτελέσματα σε μορφή αριθμός κυττάρων/mm<sup>2</sup> (Εικόνα 26-28).





**Εικόνα 26-28.** Παραδείγματα δειγμάτων που σαρώθηκαν και σημάνθηκαν οι περιοχές ενδιαφέροντος για καταμέτρηση.

### 3.2.3 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα εισήχθηκαν και αναλύθηκαν στο SPSS 24.0. Όλες οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάστηκαν ως απόλυτος αριθμός (n) και σχετική συχνότητα (%), ενώ για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών υπολογίστηκε η διάμεση τιμή (Δ.Τ) και το τυπικό σφάλμα (Τ.Σ.). Το SSI rate παρουσιάστηκε ως ποσοστό με διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Για τον έλεγχο της ανεξαρτησίας των τιμών των ποσοτικών μεταβλητών που δεν κατανέμονται κανονικά, εφαρμόστηκε το στατιστικό κριτήριο Mann-Whitney test ή Kruskal-Wallis, ενώ για τη μελέτη της επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό κριτήριο Kaplan Meier. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε  $p=0,05$  που χρησιμοποιείται, ευρέως, στην ιατροβιολογική έρευνα για τους διάφορους ελέγχους υποθέσεων.

## 4. Αποτελέσματα

Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν 22 ασθενείς (18 άνδρες) ηλικίας 17-82 ετών (μέση ηλικία: 73,5 έτη), με μέγιστη διάμετρο όγκου 1,5-21 εκ. (μέση διάμετρος: 9,35εκ). Σε τέσσερις ασθενείς (18%) αναφέρεται προηγούμενη ηπατοπάθεια (Πίνακας 3). Κατά τη μικροσκόπηση των πλακιδίων με χρώση H&E, καταγράφηκε η παρουσία TLS στο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα (TLO normal), στην περιφέρεια (TLO tumor periphery), στο κέντρο του όγκου (TLO tumor center) και στο σύνολο του όγκου (TLO tumor total) και ανάλογα με την πυκνότητα τους στις αντίστοιχες περιοχές χωρίστηκαν στις εξής κατηγορίες: απουσία (no) TLS όταν δεν παρατηρούνται τριτοταγείς λεμφικές δομές, λίγες (few) όταν παρατηρούνται σπάνιες δομές και άφθονες (abundant) TLS όταν παρατηρείται μεγάλος αριθμός δομών. Παράλληλα, μετρήθηκαν στην οθόνη του υπολογιστή και αντίστοιχα με τις περιοχές που επιλέχθηκαν (Εικόνες 26-28) ο αριθμός των CD3+ T και CD20+ B λεμφοκυττάρων τόσο στο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα (CD3 ή CD20 normal), όσο και στην περιφέρεια (CD3 ή CD20 tumor periphery), στο κέντρο (CD3 ή CD20 tumor center) και στο σύνολο του όγκου (CD3 ή CD20 total tumor) και καταγράφηκαν σε μορφή αριθμός CD3+ ή CD20+ λεμφοκυττάρων/mm<sup>2</sup>.

*4.1 Η παρουσία TLS στην περιφέρεια του όγκου σχετίζεται σημαντικά με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD3 + T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια όγκου.*

Συγκεκριμένα, όπως διαπιστώνεται και στο γράφημα 1, μετά την ενδελεχή παρατήρηση των δειγμάτων, στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται άφθονες TLS στην περιφέρεια του όγκου, ο αριθμός των CD3+ λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια του όγκου [διάμεση (median) τιμή 271,977 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±251,122] διαφέρει **στατιστικά σημαντικά** με τον αντίστοιχο αριθμό των CD3+ λεμφοκυττάρων [διάμεση (median) τιμή 62,424 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±44,902] στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται σπάνιες ή καθόλου TLS στην ίδια περιοχή ( $p=0,027$ , Mann-Whitney).

*4.2 Η παρουσία άφθονων TLS στην περιφέρεια του όγκου σχετίζεται με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD3 T λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου.*

Όπως παρατηρείται στον γράφημα 2, στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται άφθονες TLS στην περιφέρεια του όγκου, ο αριθμός των CD3+ λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου [διάμεση (median) τιμή 132,477 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±402,33] διαφέρει με τον αντίστοιχο αριθμό των CD3 λεμφοκυττάρων στην ίδια περιοχή [διάμεση (median) τιμή 75,561 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±30,363] στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται σπάνιες ή καθόλου TLS στην περιφέρεια του όγκου ( $p\ value=0,053$ , Mann-Whitney).

4.3 Η παρουσία άφθονων TLS στην περιφέρεια του όγκου σχετίζεται με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου (κέντρο και περιφέρεια).

Όπως παρατηρείται στο γράφημα 3, στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται άφθονες TLS στην περιφέρεια του όγκου, ο αριθμός των CD3+ λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου [διάμεση (median) τιμή 196,900 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±324,095] διαφέρει με τον αντίστοιχο αριθμό των CD3 λεμφοκυττάρων στην ίδια περιοχή [διάμεση (median) τιμή 71,244 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±32,997] στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται σπάνιες ή καθόλου TLS στην περιφέρεια του όγκου ( $p=0,053$ , *Mann-Whitney*).

4.4 Η παρουσία άφθονων TLS στο κέντρο του όγκου σχετίζεται με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στην ίδια περιοχή.

Όπως παρατηρείται στο γράφημα 4, στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται άφθονες TLS στο κέντρο του όγκου, ο αριθμός των CD3+ λεμφοκυττάρων στην ίδια περιοχή [διάμεση (median) τιμή 734,419 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±601,943] διαφέρει με τον αντίστοιχο αριθμό των CD3+ λεμφοκυττάρων του κέντρο του όγκου [διάμεση (median) τιμή 75,712 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±28,815] στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται σπάνιες ή καθόλου TLS στην ίδια περιοχή με ( $p=0,078$ , *Mann-Whitney*).

4.5 Η παρουσία TLS στο σύνολο του όγκου (κέντρο και περιφέρεια) σχετίζεται σημαντικά με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια όγκου.

Επιπλέον, όπως παρατηρείται στον γράφημα 5, στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται άφθονες TLS στο σύνολο του όγκου, ο αριθμός των CD3+ T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια του όγκου [διάμεση (median) τιμή 271,977 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±251,122] διαφέρει **στατιστικά σημαντικά** με τον αντίστοιχο αριθμό των CD3+ T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια [διάμεση (median) τιμή 62,424 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±44,902] στις περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS στο σύνολο του όγκου με ( $p=0,027$ , *Mann-Whitney*).

4.6 Η παρουσία άφθονων TLS στο σύνολο του όγκου (κέντρο και περιφέρεια) σχετίζεται με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου.

Όπως παρατηρείται στο γράφημα 6, στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται άφθονες TLS στο σύνολο του όγκου, ο αριθμός των CD3+ λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου [διάμεση (median) τιμή 132,477 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±402,33] διαφέρει με τον αντίστοιχο αριθμό των CD3+ T λεμφοκυττάρων στην ίδια περιοχή [διάμεση (median) τιμή 75,561

κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±30,363] στις περιπτώσεις με λίγες ή καθόλου TLS στο κέντρο του όγκου με ( $p=0,053$ , *Mann-Whitney*).

4.7 Η παρουσία άφθονων TLS στο σύνολο του όγκου (κέντρο και περιφέρεια) σχετίζεται με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου.

Όπως παρατηρείται στο γράφημα 7, στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται άφθονες TLS στο σύνολο του όγκου, ο αριθμός των CD3 T λεμφοκυττάρων στον όγκο [διάμεση (median) τιμή 196,900 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±324,095] διαφέρει με τον αντίστοιχο αριθμό των CD3+ T λεμφοκυττάρων στην ίδια περιοχή [διάμεση (median) τιμή 71,244 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±32,997] στις περιπτώσεις με σπάνιες λίγες ή καθόλου TLS στο σύνολο του όγκου με ( $p=0,053$ , *Mann-Whitney*).

4.8 Η παρουσία άφθονων TLS στην περιφέρεια του όγκου σχετίζεται με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD20+ B λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου.

Όπως παρατηρείται στο γράφημα 8, στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται άφθονες TLS στην περιφέρεια του όγκου, ο αριθμός των CD20+ B λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου [διάμεση (median) τιμή 4,526 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±40,8,51] διαφέρει με τον αντίστοιχο αριθμό των CD20+ B λεμφοκυττάρων στην ίδια περιοχή [διάμεση (median) τιμή 0,668 κύτταρα/mm<sup>2</sup> ±0,229] στις περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS στην περιφέρεια του όγκου, με ( $p=0,095$ , *Kruskal-Wallis*).

Επιπλέον, συγκρίθηκαν και άλλες παράμετροι που όμως δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, τα αποτελέσματα των οποίων απεικονίζονται συνολικά στα γραφήματα 9-16.

Στη συνέχεια, με βάση τις πληροφορίες που συλλέχθηκαν ,από την παρακολούθηση των ασθενών (follow up), μελετήθηκε ο ρόλος των CD3+ T και CD20+ B λεμφοκυτταρικών διηθήσεων, καθώς και αυτός των TLS, στην επιβίωση των ασθενών. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες (low or high) με βάση τη μέση τιμή του αριθμού των κυττάρων που μετρήθηκαν στις αντίστοιχες περιοχές. Να τονισθεί ότι σε έναν αριθμό περιπτώσεων δεν κατέστη δυνατό να ελεγχθεί ο χρόνος επιβίωσης τους μετά το χειρουργείο λόγω αδυναμίας εύρεσης πληροφοριών. Λόγω των λίγων περιστατικών δεν καταγράφηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση, όμως σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζεται μία τάση η οποία θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί στο μέλλον με τη συγκέντρωση και μελέτη περισσότερων ασθενών

4.9. Οι ασθενείς με αυξημένο αριθμό CD20+ B λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση.

Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με μικρό αριθμό CD20+ B λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου, παρουσιάζουν μέση τιμή επιβίωσης 39,694 μήνες  $\pm 12,884$  σε σύγκριση με τους ασθενείς με υψηλό αριθμό CD20 + B λεμφοκυττάρων στην ίδια περιοχή, οι οποίοι παρουσιάζουν μέση τιμή επιβίωσης 62,375 μήνες  $\pm 11,395$  με ( $p=0,171$ , *Kaplan-Meier*) (γράφημα 17).

4.10 Οι ασθενείς με αυξημένο αριθμό TLS στο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση.

Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με αυξημένο αριθμό TLS στο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα παρουσιάζουν μέση τιμή επιβίωσης 79 μήνες  $\pm 22,597$  σε σύγκριση με τους ασθενείς με σπάνιες ή καθόλου TLS στην ίδια περιοχή, οι οποίοι παρουσιάζουν μέση τιμή επιβίωσης 12 μήνες  $\pm 5,963$  ( $p=0,138$ , *Kaplan-Meier*) (γράφημα 18).

4.11 Οι ασθενείς με αυξημένο αριθμό CD3+ T λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση.

Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με αυξημένο αριθμό CD3+ T λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου παρουσιάζουν μέση τιμή επιβίωσης 79 μήνες  $\pm 0$  σε σύγκριση με τους ασθενείς με σπάνιες ή καθόλου TLS στην ίδια περιοχή, οι οποίοι παρουσιάζουν μέση τιμή επιβίωσης 32 μήνες  $\pm 23,238$  ( $p=0,79$ , *Kaplan-Meier*) (γράφημα 19).

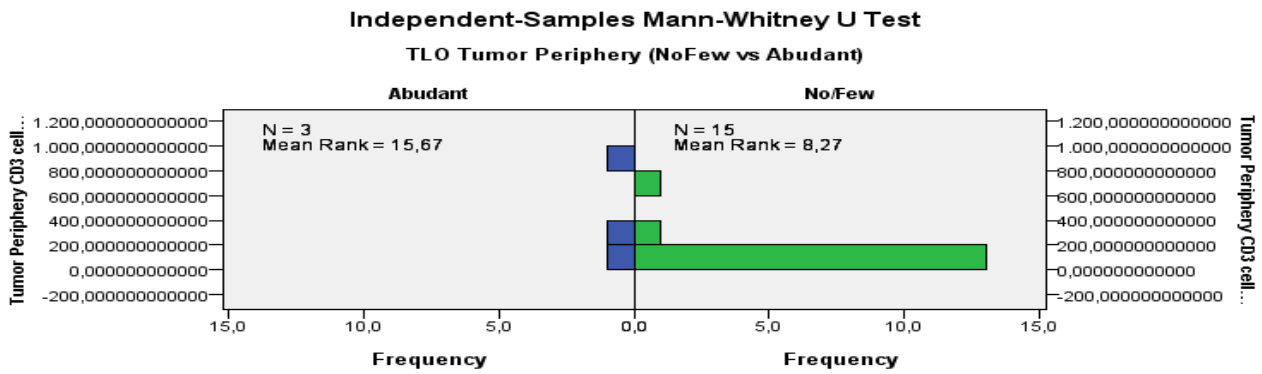
4.12 Οι ασθενείς με αυξημένο αριθμό CD20+ B λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου (κέντρο και περιφέρεια) παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση.

Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με αυξημένο αριθμό CD20+ B λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου παρουσιάζουν μέση τιμή επιβίωσης 79 μήνες  $\pm 21,968$  σε σύγκριση με τους ασθενείς με σπάνιες ή καθόλου TLS στην ίδια περιοχή, οι οποίοι παρουσιάζουν μέση τιμή επιβίωσης 12 μήνες  $\pm 15,758$  ( $p=0,099$ , *Kaplan-Meier*) (γράφημα 20).



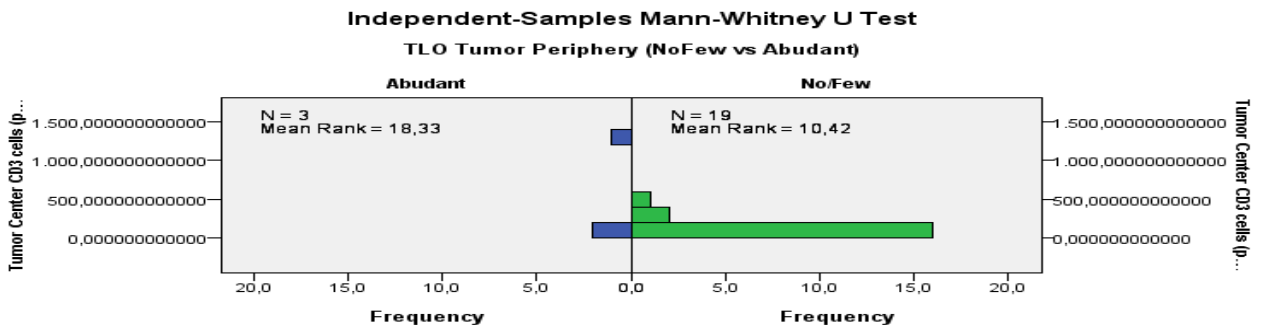
Ασθενείς	Φύλο	Ηλικία (έτη)	Μέγιστη διάμετρος όγκου (εκ)	Προηγούμενη ηπατοπάθεια
1	άρρεν	81	9,2	όχι
2	άρρεν	72	11,1	όχι
3	άρρεν	44	3,3	ναι
4	άρρεν	61	6,5	όχι
5	θήλυ	23	21	όχι
6	θήλυ	81	2,5	ναι
7	άρρεν	82	11	όχι
8	άρρεν	17	11	όχι
9	άρρεν	66	11	όχι
10	άρρεν	59	5,5	όχι
11	άρρεν	75	10	όχι
12	άρρεν	80	9,1	όχι
13	άρρεν	72	1,5	όχι
14	θήλυ	77	1,7	όχι
15	άρρεν	83	5,6	όχι
16	άρρεν	60	2,5	ναι
17	άρρεν	80	12,5	όχι
18	άρρεν	64	13	ναι
19	θήλυ	61	13,5	όχι
20	άρρεν	39	9,5	όχι
21	άρρεν	75	17-3,7	όχι
22	άρρεν	75	5	όχι

**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που συμπερηλήφθησαν στη μελέτη.



<b>Total N</b>	18
<b>Mann-Whitney U</b>	41,000
<b>Wilcoxon W</b>	47,000
<b>Test Statistic</b>	41,000
<b>Standard Error</b>	8,441
<b>Standardized Test Statistic</b>	2,192
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,028
<b>Exact Sig. (2-sided test)</b>	,027

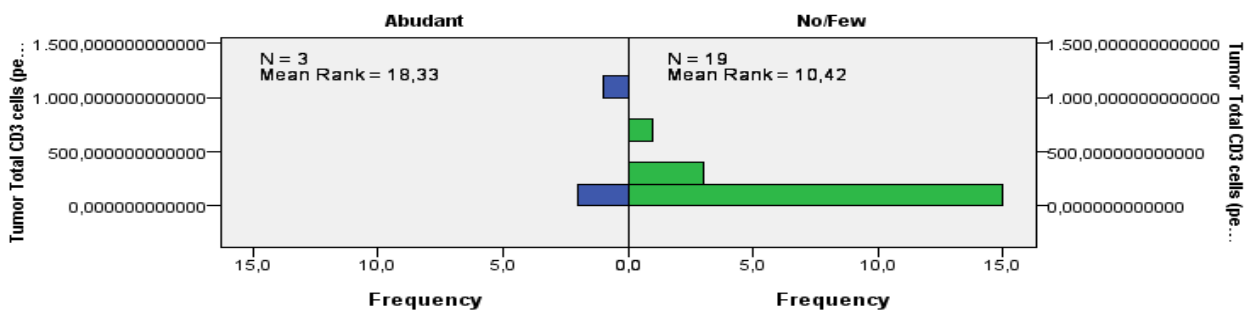
**Γράφημα 1:** Σύγκριση αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια του όγκου σε περιπτώσεις με άφθονες TLS στην ίδια περιοχή με περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS.



<b>Total N</b>	22
<b>Mann-Whitney U</b>	49,000
<b>Wilcoxon W</b>	55,000
<b>Test Statistic</b>	49,000
<b>Standard Error</b>	10,452
<b>Standardized Test Statistic</b>	1,961
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,050
<b>Exact Sig. (2-sided test)</b>	,053

**Γράφημα 2:** Σύγκριση αριθμού CD3 + T λεμφοκυττάρων στην κέντρο του όγκου σε περιπτώσεις με άφθονες TLS στην περιφέρεια του όγκου με περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS.

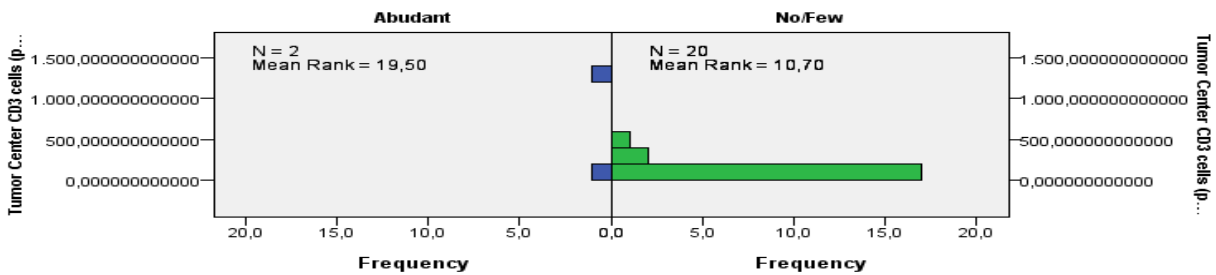
**Independent-Samples Mann-Whitney U Test**  
**TLO Tumor Periphery (NoFew vs Abudant)**



<b>Total N</b>	22
<b>Mann-Whitney U</b>	49,000
<b>Wilcoxon W</b>	55,000
<b>Test Statistic</b>	49,000
<b>Standard Error</b>	10,452
<b>Standardized Test Statistic</b>	1,961
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,050
<b>Exact Sig. (2-sided test)</b>	,053

**Γράφημα 3:** Σύγκριση αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου σε περιπτώσεις με άφθονες TLS στην περιφέρεια του όγκου με περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS.

**Independent-Samples Mann-Whitney U Test**  
**TLO Tumor Center (NoFew vs Abudant)**

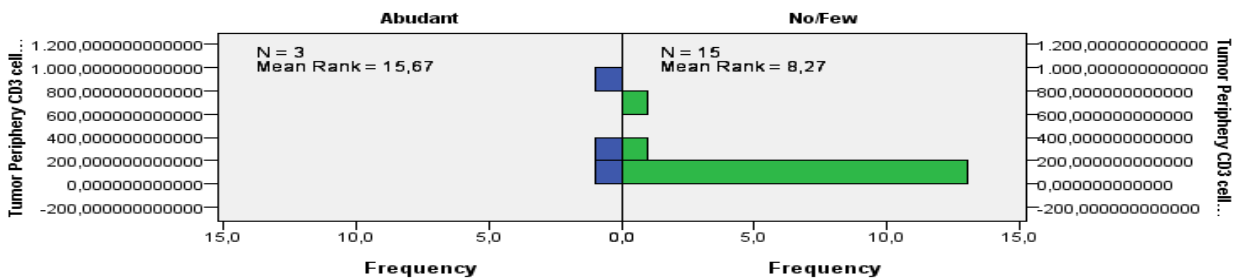


<b>Total N</b>	22
<b>Mann-Whitney U</b>	36,000
<b>Wilcoxon W</b>	39,000
<b>Test Statistic</b>	36,000
<b>Standard Error</b>	8,756
<b>Standardized Test Statistic</b>	1,827
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,068
<b>Exact Sig. (2-sided test)</b>	,078

**Γράφημα 4:** Σύγκριση αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου σε περιπτώσεις με άφθονες TLS στην ίδια περιοχή του όγκου με περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS.

### Independent-Samples Mann-Whitney U Test

TLO Tumor Total (NoFew vs Abudant)

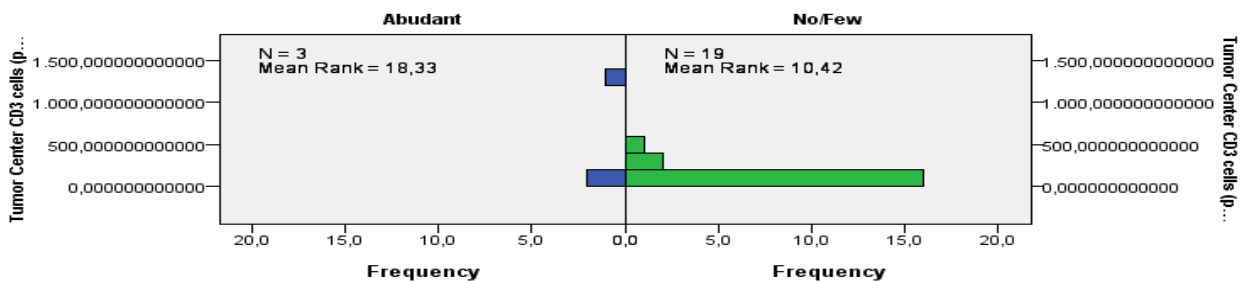


<b>Total N</b>	18
<b>Mann-Whitney U</b>	41,000
<b>Wilcoxon W</b>	47,000
<b>Test Statistic</b>	41,000
<b>Standard Error</b>	8,441
<b>Standardized Test Statistic</b>	2,192
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,028
<b>Exact Sig. (2-sided test)</b>	,027

**Γράφημα 5:** Σύγκριση αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια του όγκου σε περιπτώσεις με άφθονες TLS στο σύνολο του όγκου με περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS.

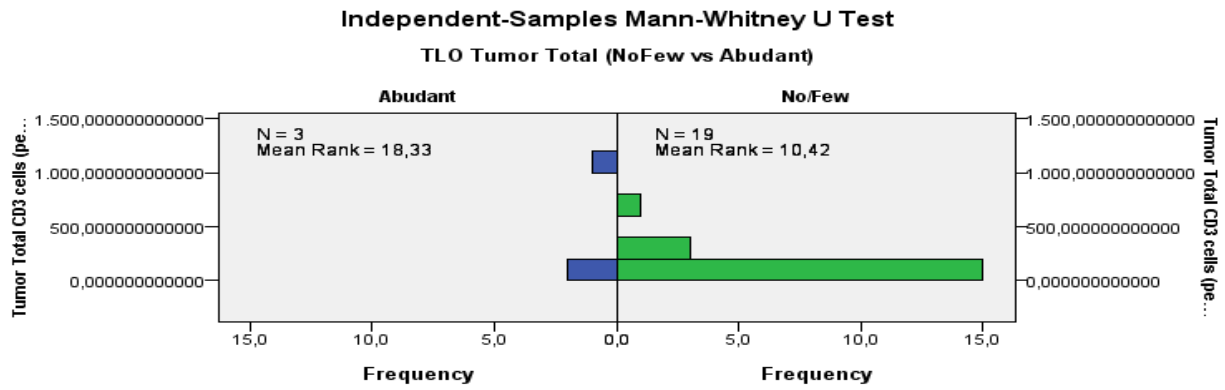
### Independent-Samples Mann-Whitney U Test

TLO Tumor Total (NoFew vs Abudant)



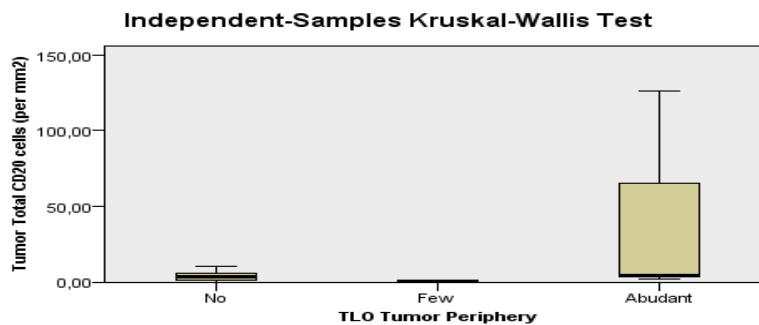
<b>Total N</b>	22
<b>Mann-Whitney U</b>	49,000
<b>Wilcoxon W</b>	55,000
<b>Test Statistic</b>	49,000
<b>Standard Error</b>	10,452
<b>Standardized Test Statistic</b>	1,961
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,050
<b>Exact Sig. (2-sided test)</b>	,053

**Γράφημα 6:** Σύγκριση αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου σε περιπτώσεις με άφθονες TLS στο σύνολο του όγκου με περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS.



<b>Total N</b>	22
<b>Mann-Whitney U</b>	49,000
<b>Wilcoxon W</b>	55,000
<b>Test Statistic</b>	49,000
<b>Standard Error</b>	10,452
<b>Standardized Test Statistic</b>	1,961
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,050
<b>Exact Sig. (2-sided test)</b>	,053

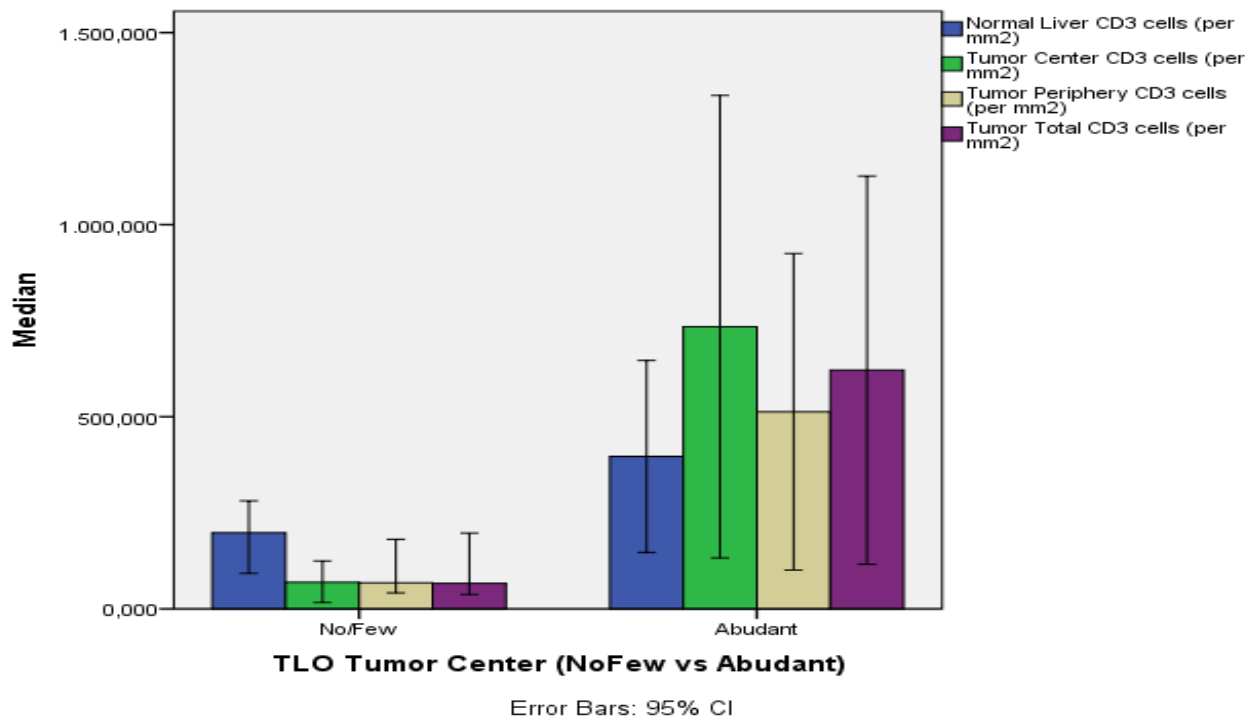
**Γράφημα 7:** Σύγκριση αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου σε περιπτώσεις με άφθονες TLS στην ίδια περιοχή με περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS.



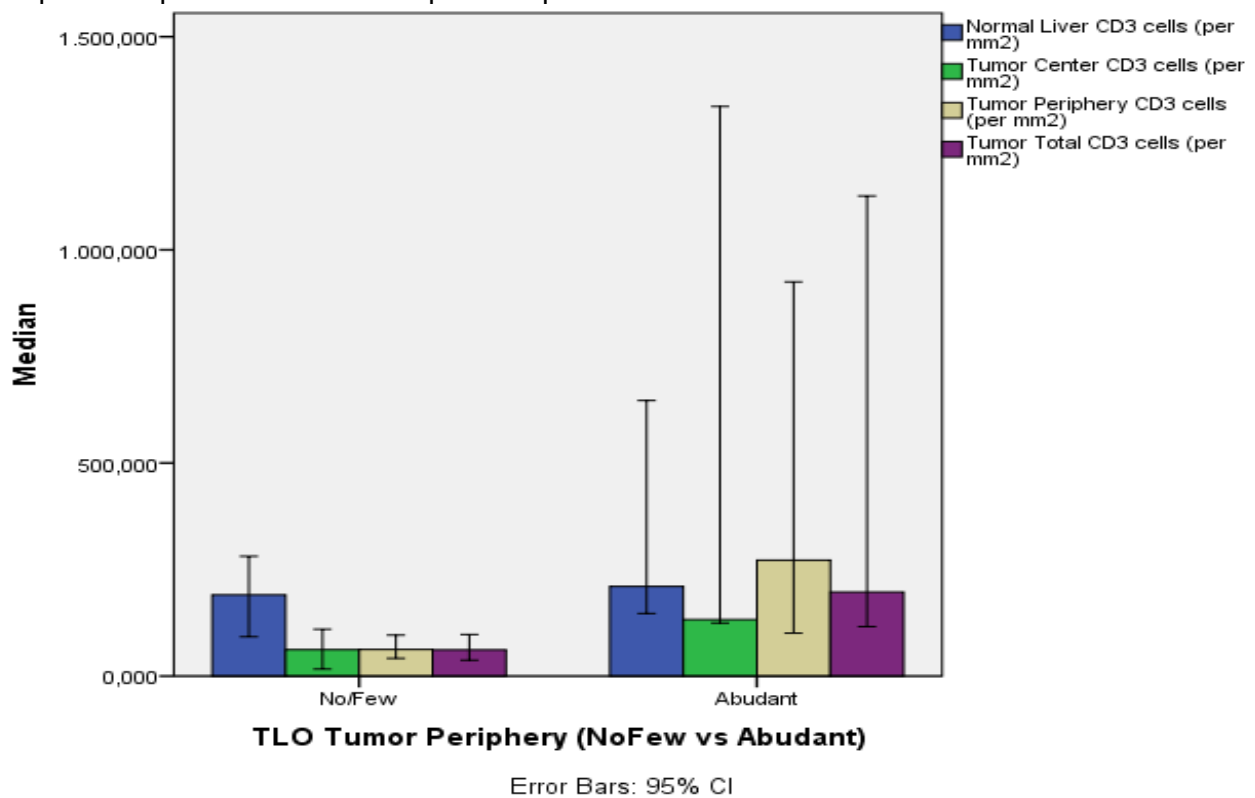
<b>Total N</b>	22
<b>Test Statistic</b>	4,705
<b>Degrees of Freedom</b>	2
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	,095

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

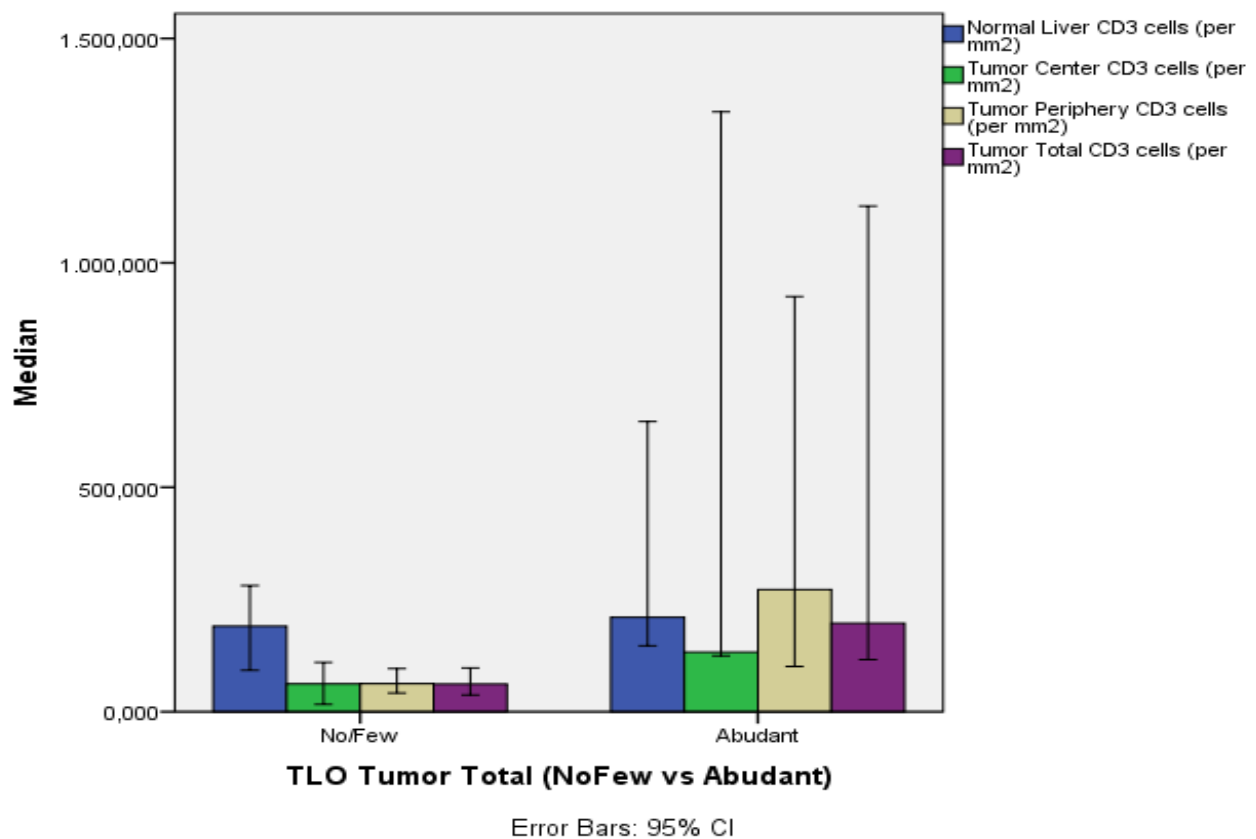
**Γράφημα 8:** Σύγκριση αριθμού CD20+ B λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου σε περιπτώσεις με άφθονες TLS στην ίδια περιοχή με περιπτώσεις με σπάνιες ή καθόλου TLS.



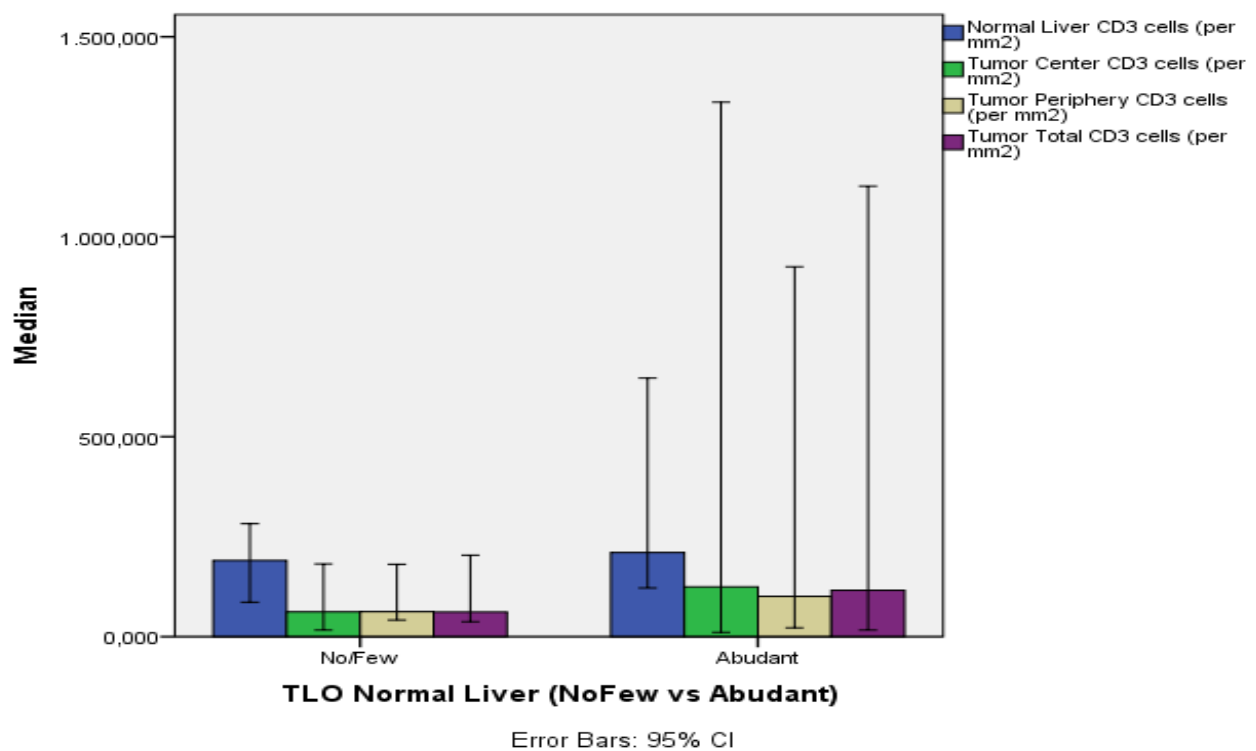
**Γράφημα 9:** Σύγκριση CD3+ T λεμφοκυττάρων στις σε όλες τις παρατηρηθείσες περιοχές ανάλογα με την ποσότητα των TLS στο κέντρο του όγκου.



**Γράφημα 10:** Σύγκριση CD3+ T λεμφοκυττάρων στις σε όλες τις παρατηρηθείσες περιοχές ανάλογα με την ποσότητα των TLS στην περιφέρεια του όγκου

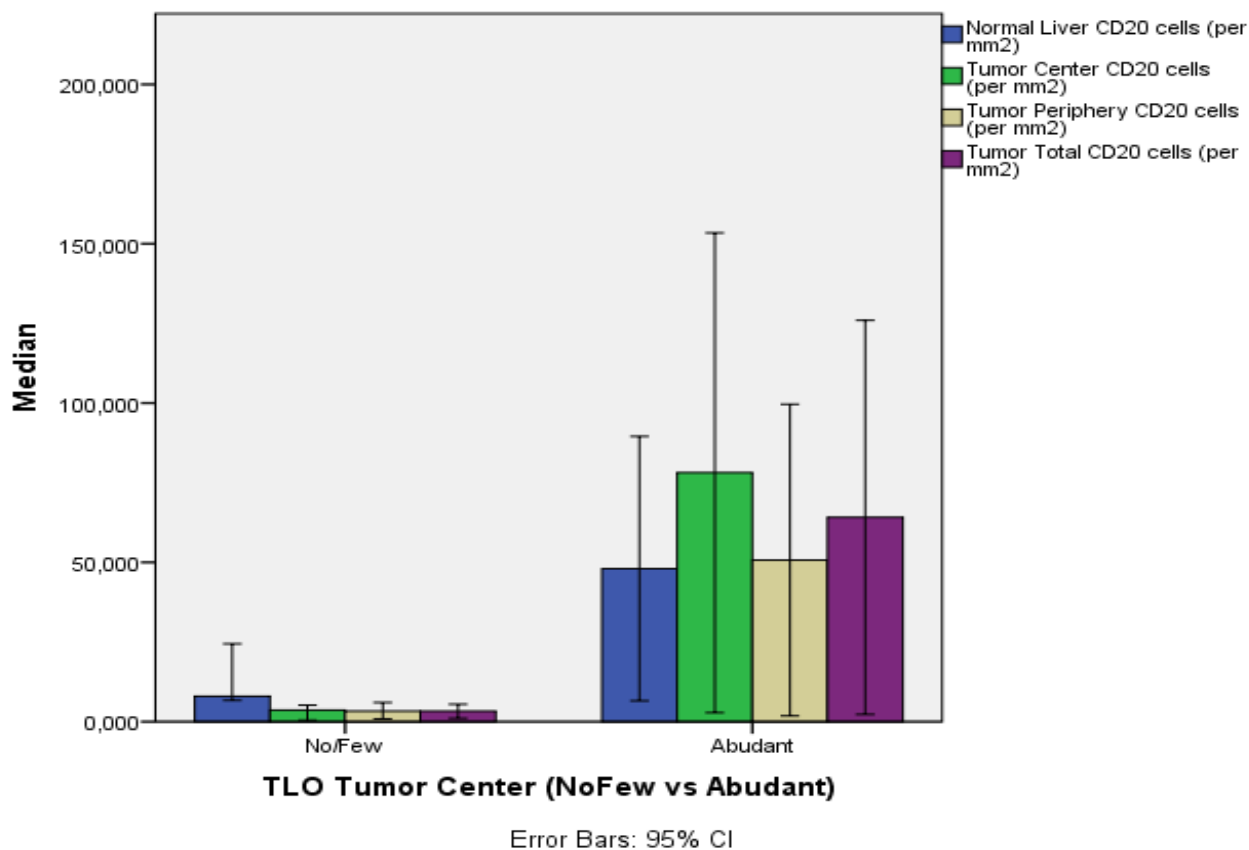


**Γράφημα 11:** Σύγκριση CD3+ T λεμφοκυττάρων στις σε όλες τις παρατηρηθείσες περιοχές ανάλογα με την ποσότητα των TLS στο σύνολο του όγκου.

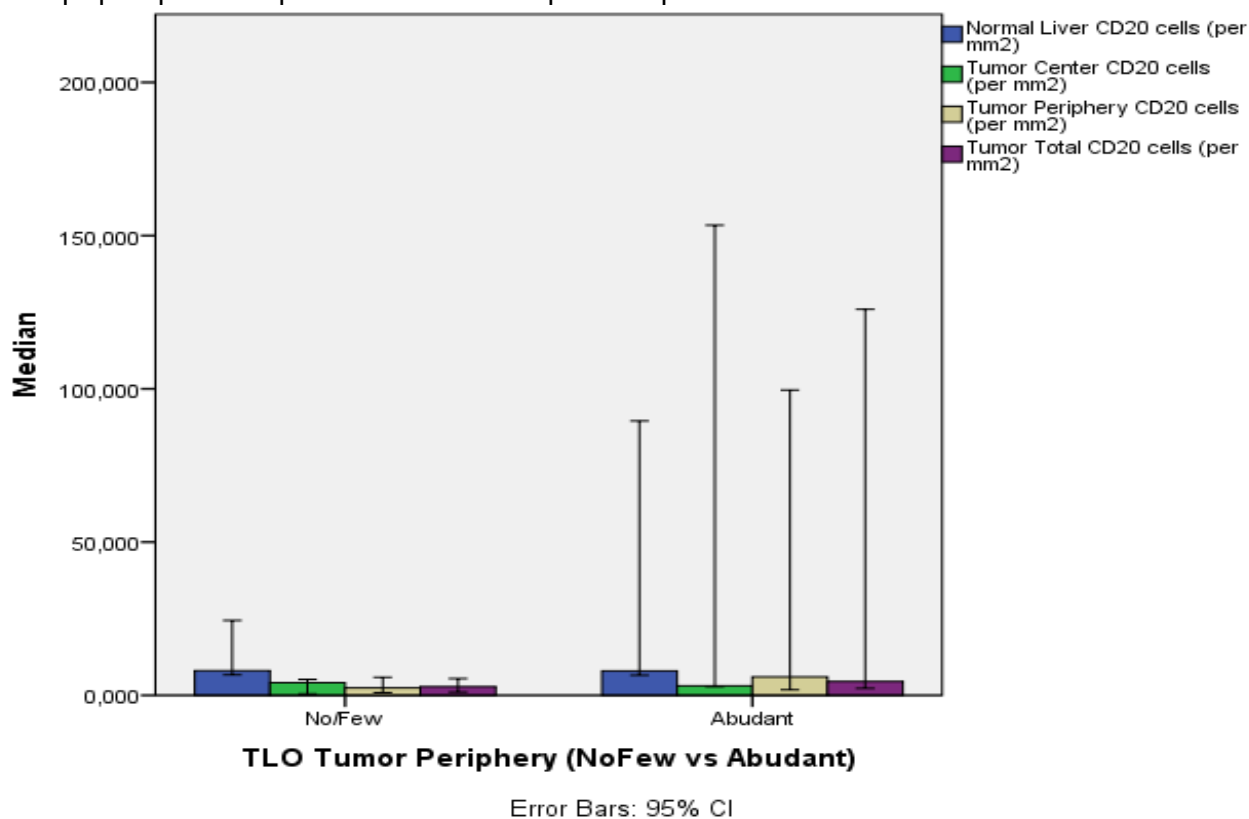


**Γράφημα 12:** Σύγκριση CD3+ T λεμφοκυττάρων στις σε όλες τις παρατηρηθείσες περιοχές ανάλογα με την ποσότητα των TLS στο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα.

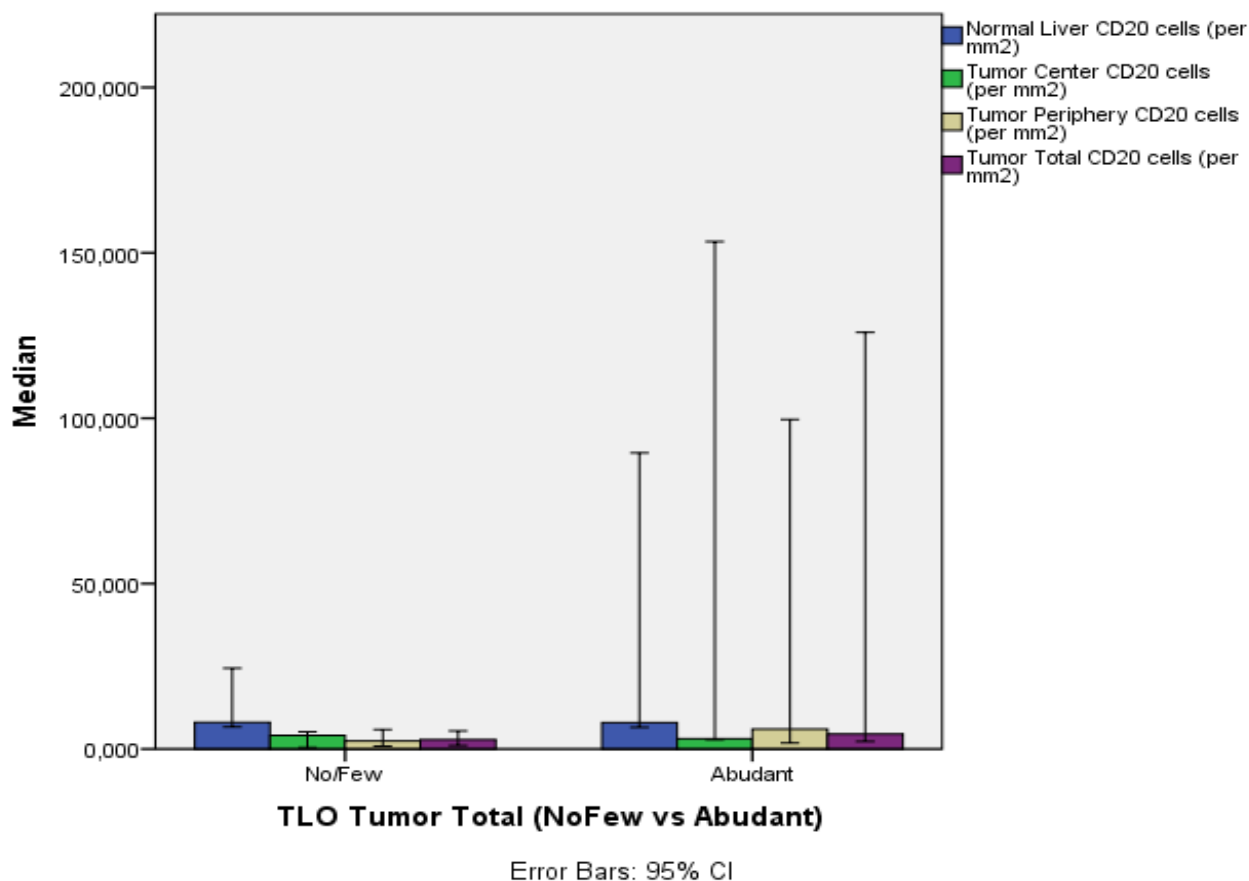




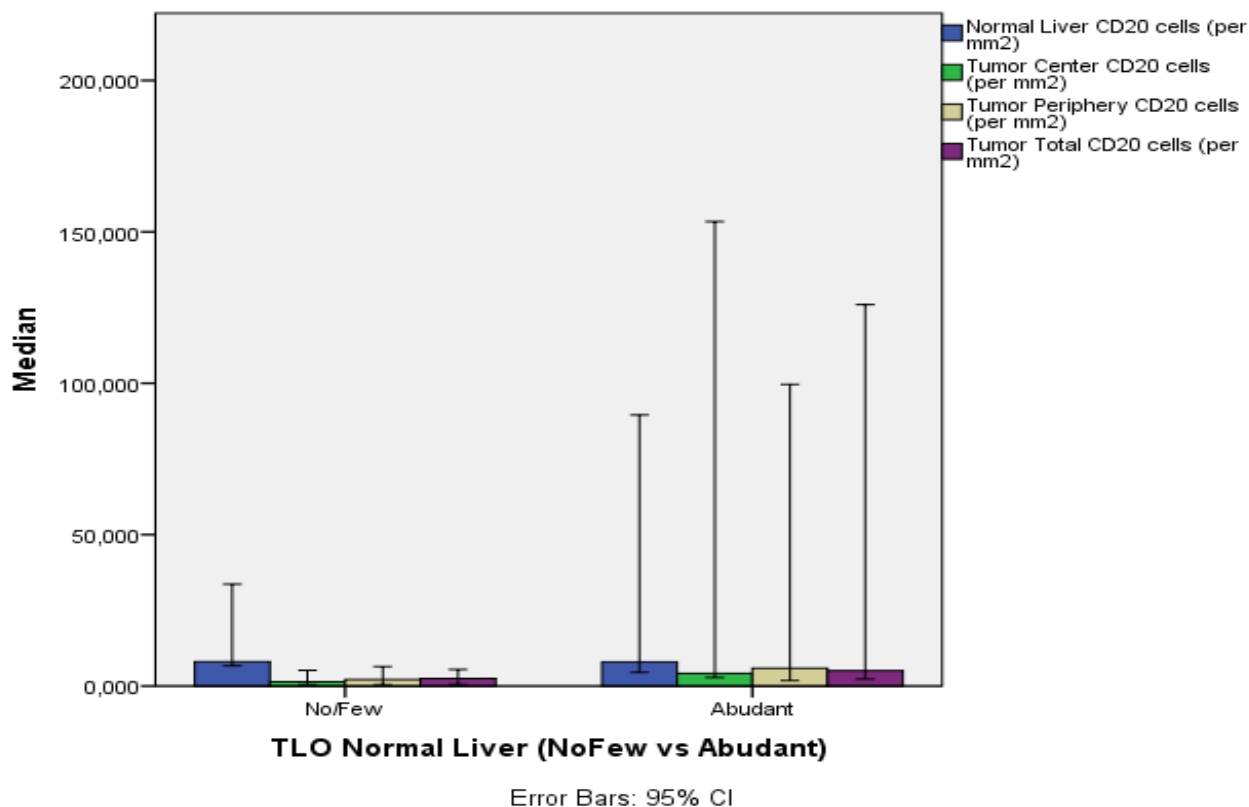
**Γράφημα 13:** Σύγκριση CD20+ B λεμφοκυττάρων στις σε όλες τις παρατηρηθείσες περιοχές ανάλογα με την ποσότητα των TLS στο κέντρο του όγκου.



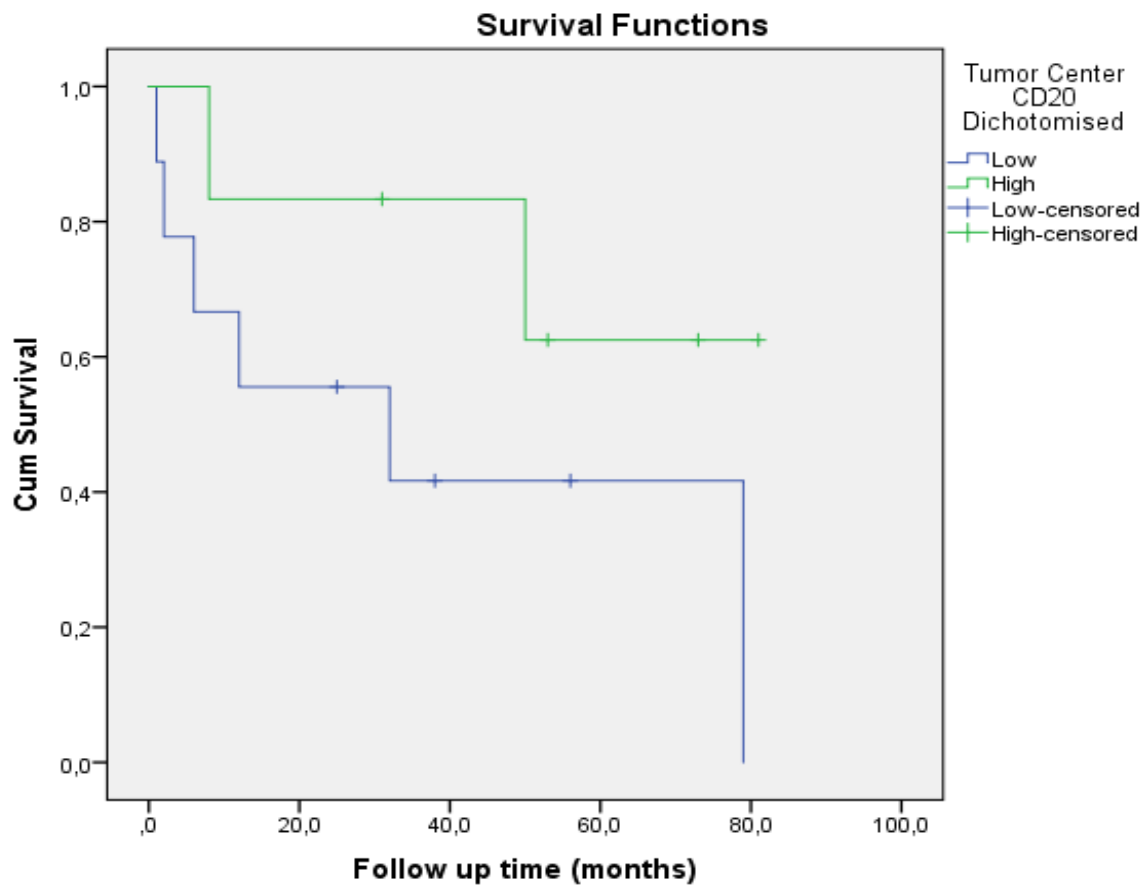
**Γράφημα 14:** Σύγκριση CD20+ B λεμφοκυττάρων στις σε όλες τις παρατηρηθείσες περιοχές ανάλογα με την ποσότητα των TLS στην περιφέρεια του όγκου.



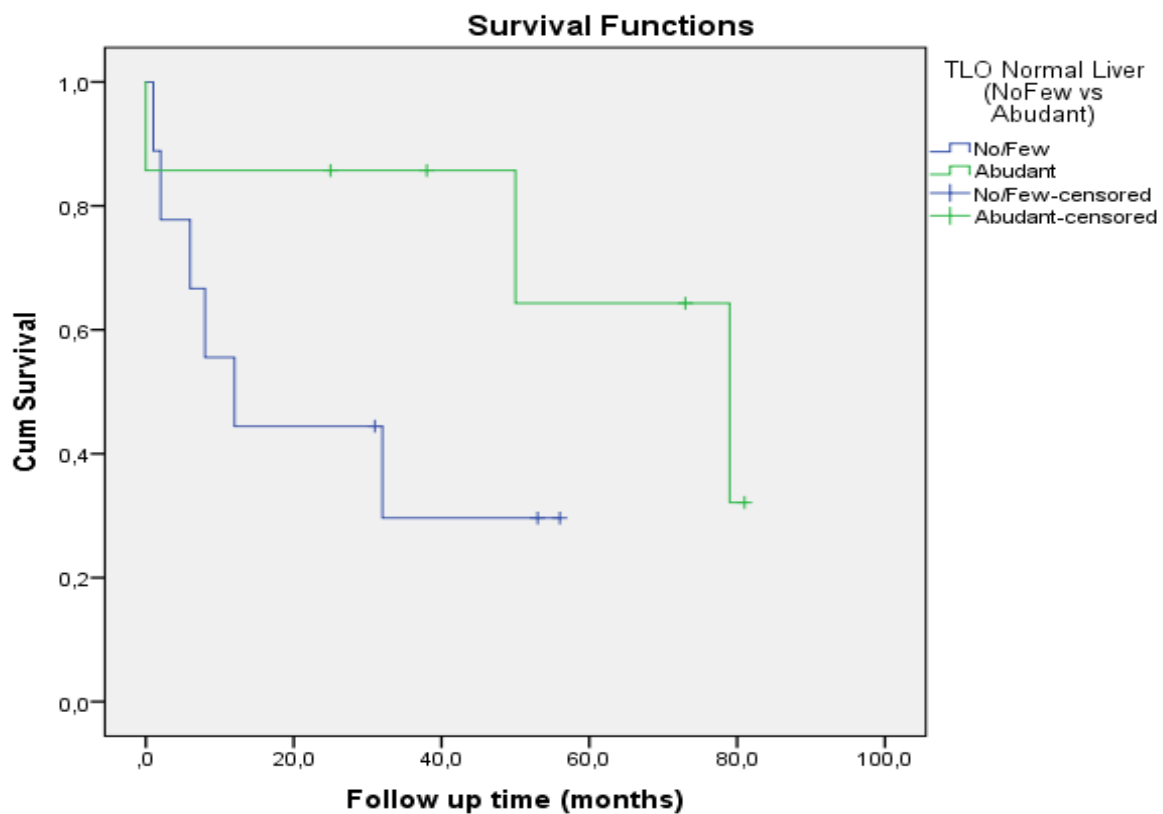
**Γράφημα 15:** Σύγκριση CD20+ B λεμφοκυττάρων στις σε όλες τις παρατηρηθείσες περιοχές ανάλογα με την ποσότητα των TLS στο σύνολο του όγκου.



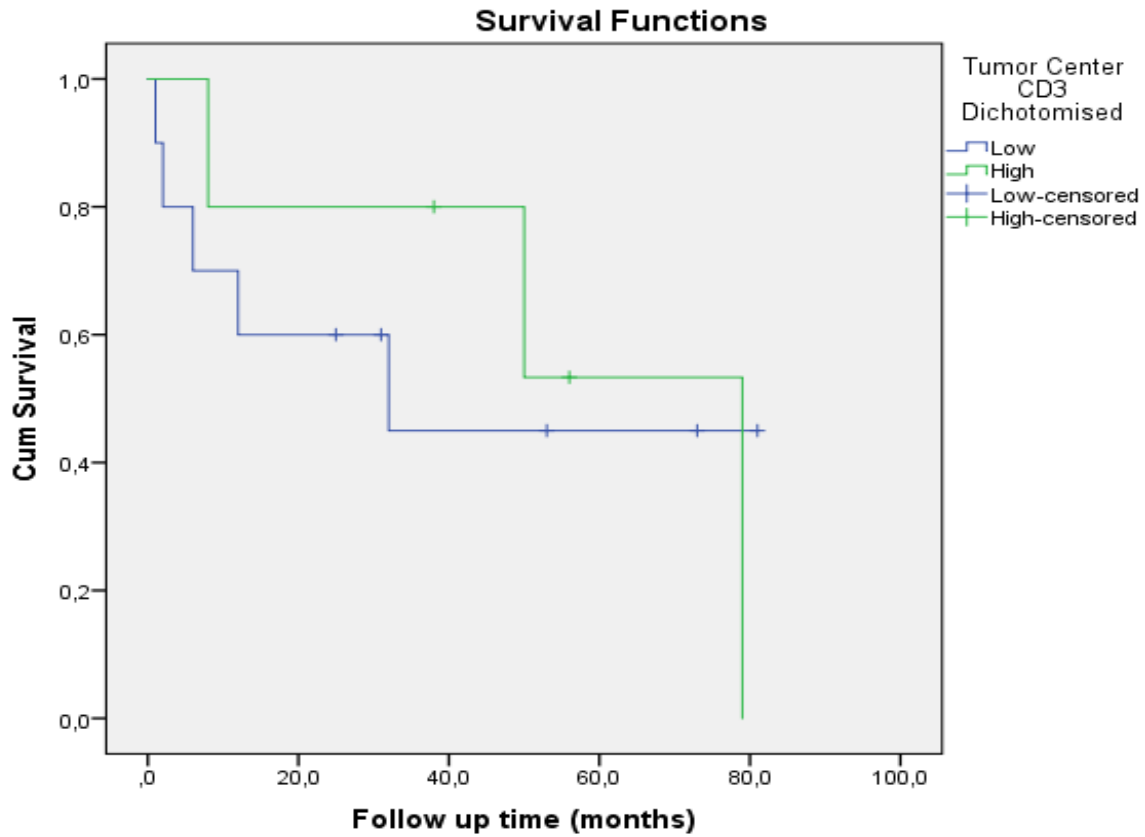
**Γράφημα 16:** Σύγκριση CD20+ B λεμφοκυττάρων στις σε όλες τις παρατηρηθείσες περιοχές ανάλογα με την ποσότητα των TLS στο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα.



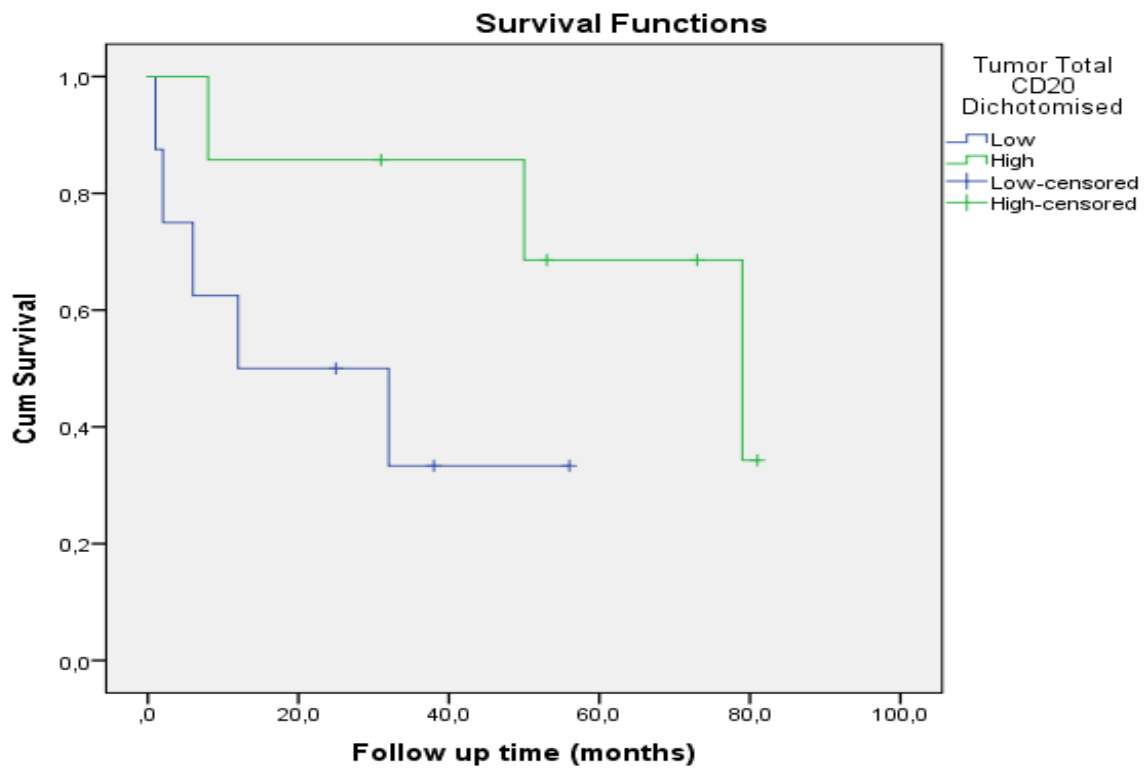
**Γράφημα 17:** Σύσχεση αριθμού CD20+ Β λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου με την επιβίωση.



**Γράφημα 18:** Σύσχεση ποσότητας TLS στο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα με την επιβίωση.



**Γράφημα 19:** Σύσχετιση αριθμού CD3+ Β λεμφοκυττάρων στο κέντρο του όγκου με την επιβίωση.



**Γράφημα 20:** Σύσχετιση αριθμού CD20+ Β λεμφοκυττάρων στο σύνολο του όγκου με την επιβίωση.

		Normal Liver CD3 cells (per mm2)		Tumor Center CD3 cells (per mm2)		Tumor Periphery CD3 cells (per mm2)		Tumor Total CD3 cells (per mm2)	
		Median	SEM	Median	SEM	Median	SEM	Median	SEM
TLO Tumor Center	No	156,122	26,522	68,858	34,290	60,406	48,044	66,320	37,828
	Few	246,380	35,837	104,410	52,110	167,200	104,777	140,615	51,247
	Abudant	396,766	249,912	734,419	601,943	512,873	412,121	621,243	505,065
TLO Tumor Periphery	No	156,122	26,522	75,712	35,324	60,406	48,044	73,402	38,688
	Few	282,218		42,503	19,863	62,424		42,503	14,500
	Abudant	210,543	157,073	132,477	402,633	271,977	251,122	196,900	324,095
TLO Tumor Total	No	156,122	26,522	75,561	36,369	60,406	48,044	71,244	40,151
	Few	282,218		63,416	55,696	62,424		63,416	52,962
	Abudant	210,543	157,073	132,477	402,633	271,977	251,122	196,900	324,095
TLO Normal Liver	No	205,240	72,584	146,077	114,317	226,720	191,960	147,968	131,389
	Few	152,432	31,871	52,823	23,677	48,059	15,082	48,713	21,956
	Abudant	210,543	95,408	104,410	209,155	100,752	165,613	101,538	172,674

		Normal Liver CD20 cells (per mm2)		Tumor Center CD20 cells (per mm2)		Tumor Periphery CD20 cells (per mm2)		Tumor Total CD20 cells (per mm2)	
		Median	SEM	Median	SEM	Median	SEM	Median	SEM
TLO Tumor Center	No	7,894	13,859	3,516	0,733	3,328	0,886	2,859	0,660
	Few	39,852	31,898	1,786	2,268	3,797	2,196	2,779	2,212
	Abudant	48,033	41,507	78,136	75,298	50,703	48,912	64,127	61,826
TLO Tumor Periphery	No	7,894	13,859	4,170	0,818	3,328	0,886	3,348	0,751
	Few	71,750		0,460	0,123	1,601		0,668	0,229
	Abudant	7,954	27,436	3,112	50,153	5,993	31,931	4,526	40,851
TLO Tumor Total	No	7,894	13,859	4,144	0,760	3,328	0,886	2,889	0,679
	Few	71,750		0,564	2,378	1,601		0,850	2,334
	Abudant	7,954	27,436	3,112	50,153	5,993	31,931	4,526	40,851
TLO Normal Liver	No	7,778	2,400	3,853	1,417	1,814	2,696	2,859	1,578
	Few	10,429	19,481	0,985	0,895	2,257	1,040	1,874	0,891
	Abudant	7,954	16,132	3,655	24,931	5,904	19,040	4,794	20,377

**Πίνακας 3-4:** Αποτελέσματα μετά τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

## 5. Συζήτηση

Ο καρκινικός ιστός αποτελείται από καρκινικά κύτταρα και το καρκινικό στρώμα (μικροπεριβάλλον του όγκου) και η αλληλεπίδρασή τους μπορεί να καθορίσει τη βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου (36). Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελείται από αγγεία, ινοβλάστες και ανοσιακά κύτταρα, όπως Β λεμφοκύτταρα, Τ λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα και μαστοκύτταρα που τον διηθούν, ασκούν σημαντική επίδραση στον καρκίνο και φαίνεται να έχουν αξιοσημείωτη προγνωστική αξία. Το ανοσολογικό σύστημα έχει κυρίαρχο ρόλο στο μικροπεριβάλλον του όγκου και παρουσιάζει δραστικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της πολυσταδιακής ανάπτυξης του καρκίνου (37).

Οι τριτοταγείς λεμφικές δομές (TLS), δημιουργούνται μετά τη γέννηση σε μη λεμφικούς ιστούς, που έχουν προσβληθεί από χρόνιες λοιμώξεις, αυτοάνοσες παθήσεις, σε απόρριψη μοσχεύματος, καθώς και σε καρκινικούς ιστούς. Οι δομές αυτές εμφανίζουν παρόμοια φαινοτυπικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά με τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, παρόλο που απαιτούνται ειδικές κυτταρικές και μοριακές διαδικασίες για την ανάπτυξη και οργάνωσή τους, κατέχοντας έναν ιδιαίτερο ρόλο στην ανοσολογική επιτήρηση του όγκου (35).

Η παρουσία μεγάλου αριθμού TLS έχει βρεθεί ότι αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα της κλινικής έκβασης πολλών τύπων συμπαγών όγκων, όπως του γαστρεντερικού, του πνεύμονα, των ωοθηκών, και του παγκρεατικού καρκίνου (40). Παράλληλα, η διήθηση του όγκου από αυξημένο αριθμό CD3+ Τ και CD8+ Τ κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων φαίνεται να σχετίζεται με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου (PFS), μεγαλύτερη συνολική επιβίωση και χαμηλότερο μεταστατικό δυναμικό όπως έχει ερευνηθεί σε διάφορα είδη καρκίνου (81, 82, 83, 84). Ωστόσο, μια αρνητική συσχέτιση έχει καταγραφεί μεταξύ του αριθμού των Τ λεμφοκυττάρων και της επιβίωσης σε κάποια καρκινώματα όπως το διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα του νεφρού, το αδενοκαρκίνωμα του προστάτη και το λέμφωμα Hodgkin που πιθανότατα οφείλεται στην αυξημένη νεοαγγείωση των συγκεκριμένων όγκων που έχει ως αποτέλεσμα τη διήθηση του όγκου από Τ ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα που καταστέλλουν την ανοσολογική αντίδραση, καθώς και ανώριμων δένδριτικών κυττάρων με μειωμένη δυνατότητα αναγνώρισης των νεοαντιγόνων του όγκου και κατ' επέκταση περιορισμένες ανοσολογικές απαντήσεις (85,86).

Η μελέτη μας είχε ως στόχο να διερευνήσει το μικροπεριβάλλον του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και να μελετήσει την επίδραση που ασκεί στη νεοπλασματική εξέλιξη και την προγνωστική σημασία του. Έγινε μικροσκόπηση και παθολογοανατομική εξέταση των

πλακιδίων από ένα δείγμα 22 ασθενών με ιστολογική διάγνωση ΗΚΚ σταδίου I-IV που υποβλήθηκαν σε χειρουργική εκτομή της νόσου προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία TLS στο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα, καθώς και στην περιφέρεια και στο κέντρο του όγκου. Στη συνέχεια, μετά από ανοσοϊστοχημικές χρώσεις μετρήθηκαν τα CD3+ T λεμφοκύτταρα και CD20+ B λεμφοκύτταρα στις ίδιες περιοχές. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η παρουσία TLS σε περιφερικές θέσεις του όγκου σχετίζεται σημαντικά με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια, ενώ και η παρουσία TLS στο σύνολο (περιφέρεια και κέντρο) του όγκου σχετίζεται σημαντικά με την παρουσία αυξημένου αριθμού CD3+ T λεμφοκυττάρων στην περιφέρεια του. Ταυτόχρονα, προέκυψαν και παραπάνω δεδομένα που λόγω του μικρού αριθμού των περιστατικών δεν καλύπτουν τις προϋποθέσεις της στατιστικής σημαντικότητας όμως εμφανίζουν μια αξιοπρόσεκτη τάση που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Από αυτά φαίνεται ότι η διήθηση του όγκου από αυξημένο αριθμό λεμφοκυττάρων B και T λεμφοκυττάρων σχετίζεται με την παρουσία τριτοταγών λεμφικών δομών και άρα παρατηρείται μια έντονη ανοσολογική αντίδραση στο μικροπεριβάλλον του όγκου, που όπως φαίνεται από τις καμπύλες επιβίωσης σχετίζεται με μεγαλύτερο διάστημα επιβίωσης.

Η συγκεκριμένη παρατήρηση, παρά το μικρό δείγμα ασθενών, φαίνεται να έρχεται σε αντίθεση με την πρόσφατη μελέτη που αναπτύχθηκε στην τελευταία παράγραφο του γενικού μέρους, στην οποία διαπιστώθηκε ότι ο αυξημένος αριθμός TLS σχετίζεται με κακή πρόγνωση στα ηπατοκυτταρικά καρκινώματα (80). Είναι πιθανό, λόγω και του μη ιστολογικού τρόπου εκτίμησης της παρουσίας των TLS στη μελέτη αυτή, οι εν λόγω δομές να αναπτύσσονται στο γειτονικό μη νεοπλασματικό ηπατικό παρέγχυμα, δημιουργώντας ένα φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον με μεταλλαξιογόνο δράση στα ηπατοκύτταρα.

Με βάση τα αποτελέσματα μας, θεωρούμε ότι είναι σημαντικό να επεκτείνουμε τη μελέτη σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών, προκειμένου να διερευνηθεί τόσο ο μηχανισμός γένεσης των TLS στο μικροπεριβάλλον των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων, όσο και πως αυτές τροποποιούν το τοπικό ανοσιακό σύστημα και την επιβίωση των ασθενών οι οποίοι πάσχουν από αυτόν τον επιθετικό τύπο καρκίνου.



## Περίληψη

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ) αποτελεί ένα τεράστιο πρόβλημα της δημόσιας υγείας και είναι η τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανάπτυξη του σχετίζεται με προϋπάρχουσα χρόνια ηπατοπάθεια, συχνότερα χρόνια ιογενής ηπατίτιδα και μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα. Οι τριτοταγείς λεμφικές δομές (TLS) είναι έκτοποι λεμφικοί σχηματισμοί, οι οποίοι αναπτύσσονται σε έδαφος χρόνιων φλεγμονωδών (αυτοανόσων ή λοιμωδών) καταστάσεων, σε απόρριψη μοσχευμάτων και στο μικροπεριβάλλον κακοήθων νεοπλασμάτων. Έχουν παρόμοια δομή με αυτή των λεμφαδένων και γενικότερα των δευτερογενών λεμφικών οργάνων, περιλαμβάνοντας T ζώνες, B λεμφοζυδιακούς σχηματισμούς και φλεβίδια με υψηλό ενδοθήλιο (HEV), χωρίς να περιβάλλονται από κάψα. Λειτουργικά, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της τοπικής ανοσιακής απάντησης. Σε σχέση με τα κακοήθη νεοπλασμάτα, έχει περιγραφεί μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης συγκέντρωσης TLS στον όγκο και της μεγαλύτερης επιβίωσης των ασθενών σε περισσότερα από 10 είδη καρκίνου. Στην παρούσα μελέτη 22 περιπτώσεων με ΗΚΚ ανιχνεύσαμε την παρουσία TLS στο μικροπεριβάλλον του όγκου, χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό ιστολογικών και ανοσοϊστοχημικών μεθόδων. Συγκεκριμένα, υπολογίσαμε με ημιποσοτικό τρόπο τις TLS και συσχετίσαμε την παρουσία τους με τον αριθμό των CD3+ T και CD20+ B λεμφοκυττάρων σε δείγματα καρκινικών ιστών από ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε εκτομή του ΗΚΚ και διερευνήσαμε επιπλέον τη συσχέτιση μεταξύ αυτών των παραμέτρων και της επιβίωσης των ασθενών. Παρατηρήσαμε ότι η παρουσία αυξημένου αριθμού TLS στο κέντρο και στην περιφέρεια του όγκου σχετίζεται με μεγαλύτερο αριθμό CD3+ T και CD20+ B λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο στις αντίστοιχες περιοχές και τάση για μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης.

## **Abstract**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a major health problem, being the third leading cause of cancer-related deaths worldwide. In most cases, human HCC is driven by chronic liver inflammation due to chronic viral hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. Tertiary lymphoid structures (TLS) are ectopic lymphoid formations found in inflamed, infected, or tumoral tissues. They exhibit features in common with corresponding structures in the lymph nodes associated with the generation of an adaptive immune response, including a T cell zone with mature dendritic cells, a germinal center with follicular dendritic cells and proliferating B cells, and high endothelial venules. In tumors, they orchestrate local and systemic anti-tumor responses. A correlation has been found between high densities of TLS and prolonged patient's survival in more than 10 different types of cancer. Here, we studied 22 HCC cases and we examined TLS and the immune microenvironment of the tumor using a combination of histological and immunohistochemical methods. Specifically, we evaluated the density of TLS and the number of CD3+ T and B CD20+ lymphocytes in cancer tissue specimens from patients who underwent resective surgery for HCC, and we investigated the correlation between them and the patient's survival. We found that the presence of abundant TLS in the center and the margin of the tumor is associated with a greater number of CD3+ and CD20+ cells in the same regions and with a trend for better prognosis.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

1. Curado MP, Edwards B, Shin H. R., et al. Cancer Incidence in Five Continents Vol. IX IARC Scientific Publication No. 160,2007
2. Seeff LB. Introduction: The burden of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1): S1-4
3. Parkin DM, Whelan S.L, Ferlay J., et al. Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII IARC Scientific Publication No. 155,1997
4. Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108
5. Wong JB, McQuillan GM, McHutchison JG, et al. Estimating future hepatitis C morbidity, mortality, and costs in the United States. *Am J Public Health*. 2000 Oct;90(10):1562-9.
6. Bosch FX, Ribes J, Díaz M et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S5-S16.
7. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, et al. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*. 1981 Nov 21;2(8256):1129-33.
8. Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* 2006 Feb;147(2):58-66.
9. McKillop IH, Moran DM, Jin X, et al. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res*. 2006 Nov;136(1):125-35.
10. Cameron RG, Greig PD, Farber E, et al. Small encapsulated hepatocellular carcinoma of the liver. Provisional analysis of pathogenetic mechanisms. *Cancer*. 1993 Nov 1;72(9):2550-9.
11. Alison MR. Liver stem cells: implications for hepatocarcinogenesis. *Stem Cell Rev*. 2005;1(3):253-60.
12. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006 Jun 15;118(12):3030-44.
13. Franceschi S, Montella M, Polesel J, et al. Hepatitis viruses, alcohol, and tobacco in the etiology of hepatocellular carcinoma in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Apr;15(4):683-9.
14. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans volume 83.

15. Kew MC, Asare GA. Dietary iron overload in the African and hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2007 Aug;27(6):735-41.
16. El-Serag HB, Hampel H, Javadi F. The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006 Mar;4(3):369-80.
17. Theise ND. Cirrhosis and hepatocellular neoplasia: more like cousins than like parent and child. *Gastroenterology.* 1996 Aug;111(2):526-8.
18. Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* 2004;47(6):289-309.
19. Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Br J Cancer.* 2007 Apr 10;96(7):1127-34.
20. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med.* 1997 Jun 26;336(26):1855-9.
21. Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res.* 2004;63:71-180.
22. Combet C, Penin F, Geourjon C, Deléage G. HCVDB: hepatitis C virus sequences database. *Appl Bioinformatics.* 2004;3(4):237-40.
23. Raza SA, Clifford GM, Franceschi S. Worldwide variation in the relative importance of hepatitis B and hepatitis C viruses in hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Br J Cancer.* 2007 Apr 10;96(7):1127-34.
24. Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *J Hepatol.* 2006 Oct;45(4):607-16.
25. Liang TJ, Heller T. Pathogenesis of hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S62-71.
26. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, et al. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology.* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S35-50.
27. Allen NE, Beral V, Casabonne D, et al. Moderate alcohol intake and cancer incidence in women. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Mar 4;101(5):296-305.

28. Zaridze D, Brennan P, Boreham J, et al. Alcohol and cause-specific mortality in Russia: a retrospective case-control study of 48,557 adult deaths. *Lancet*. 2009 Jun 27;373(9682):2201-14.
29. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, et al. Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions, *Am J Clin Nutr* 80:1106-1122
30. Uka K, Aikata H, Takaki S, Shirakawa H, et al. Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 21;13(3):414-20.
31. Enzan H, Himeno H, Iwamura S, et al. Alpha-smooth muscle actin-positive perisinusoidal stromal cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1994 Apr;19(4):895-903.
32. Kojiro M. Pathology of hepatocellular carcinoma. Blackwell Publishing, 2007
33. Kondo F. Histological features of early hepatocellular carcinomas and their developmental process: for daily practice clinical application. *Hepatol Int* 2008; 9107-9
34. Roncalli M, et al. Histopathological classification of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2010 S228-S234.
35. Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R. Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Tissues. *Front Immunol*. 2016 Jun 22;7:244.
36. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
37. Teng MW, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest*. 2015 Sep;125(9):3338-46.
38. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*. 2015 Jan;5(1):43-51.
39. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2455-65.

40. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2013 Mar 5;108(4):914-23.
41. Jinushi M, Komohara Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Apr;1855(2):123-30.
42. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci*. 2014 Jan;105(1):1-8.
43. Hiraoka N, Yamazaki-Itoh R, Ino Y, Mizuguchi Y, Yamada T, Hirohashi S, Kanai Y. CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2011 Jan;140(1):310-21.
44. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):883-99.
45. Remark R, Alifano M, Cremer I, et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res*. 2013 Aug 1;19(15):4079-91.
46. Wiley JA, Richert LE, Swain SD, et al. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue elicited by a protein cage nanoparticle enhances protection in mice against diverse respiratory viruses. *PLoS One*. 2009 Sep 23;4(9):e7142.
47. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Hartson L et al. Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs. *Immunity*. 2006 Oct;25(4):643-54.
48. Huang HY, Luther SA. Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs. *Semin Immunol*. 2012 Jun;24(3):175-89.
49. Girard JP, Moussion C, Förster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*. 2012 Nov;12(11):762-73.
50. Miyasaka M, Tanaka T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol*. 2004 May;4(5):360-70.
51. Mitoma J, Bao X, Petryanik B, et al. Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nat Immunol*. 2007 Apr;8(4):409-18.

52. van de Pavert SA, Mebius RE. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol.* 2010 Sep;10(9):664-74.
53. Lee HJ, Park IA, Song IH, et al. Tertiary lymphoid structures: prognostic significance and relationship with tumour-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer. *J Clin Pathol.* 2016 May;69(5):422-30.
54. Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R, et al. Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favourable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2015 May 26;112(11):1782-90.
55. Germain C, Gnjatic S, Dieu-Nosjean MC. Tertiary Lymphoid Structure-Associated B Cells are Key Players in Anti-Tumor Immunity. *Front Immunol.* 2015 Feb 23;6:67.
56. Martinet L, Garrido I, Girard JP. Tumor high endothelial venules (HEVs) predict lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Oncoimmunology.* 2012 Aug 1;1(5):789-790.
57. Germain C, Gnjatic S, Tamzalit F, et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014 Apr 1;189(7):832-44.
58. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol.* 2008 Sep 20;26(27):4410-7.
59. Wirsing AM, Rikardsen OG, Steigen SE, et al. Characterisation and prognostic value of tertiary lymphoid structures in oral squamous cell carcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2014 Aug 23;14:38.
60. Bento DC, Jones E, Junaid S, et al. High endothelial venules are rare in colorectal cancers but accumulate in extra-tumoral areas with disease progression. *Oncoimmunology.* 2015 Apr 2;4(3):e974374.
61. Figenschau SL, Fismen S, Fenton KA, et al. Tertiary lymphoid structures are associated with higher tumor grade in primary operable breast cancer patients. *BMC Cancer.* 2015 Mar 6;15:101.
62. Ladányi A, Kiss J, Somlai B, et al. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma



- is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Sep;56(9):1459-69.
63. Martinet L, Filleron T, Le Guellec S, et al. High endothelial venule blood vessels for tumor-infiltrating lymphocytes are associated with lymphotoxin  $\beta$ -producing dendritic cells in human breast cancer. *J Immunol.* 2013 Aug 15;191(4):2001-8.
64. Remark R, Alifano M, Cremer I, et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. *Clin Cancer Res.* 2013 Aug 1;19(15):4079-91.
65. Sautès-Fridman C, Fridman WH. TLS in Tumors: What Lies Within. *Trends Immunol.* 2016 Jan;37(1):1-2.
66. Sautès-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, et al. Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention. *Front Immunol.* 2016 Oct 3;7:407.
67. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S et al. CD4<sup>+</sup> follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest.* 2013 Jul;123(7):2873-92.
68. Joshi NS, Akama-Garren EH, Lu Y, et al. Regulatory T Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Suppress Anti-tumor T Cell Responses. *Immunity.* 2015 Sep 15;43(3):579-90.
69. Huang HY, Luther SA. Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs. *Semin Immunol.* 2012 Jun;24(3):175-89.
70. Jones GW, Jones SA. Ectopic lymphoid follicles: inducible centres for generating antigen-specific immune responses within tissues. *Immunology.* 2016 Feb;147(2):141-51.
71. Carrega P, Loiacono F, Di Carlo E, et al. NCR(+)ILC3 concentrate in human lung cancer and associate with intratumoral lymphoid structures. *Nat Commun.* 2015 Sep 23;6:8280.
72. Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, et al. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med.* 2000 Dec 4;192(11):1545-52.

73. Browning JL, Allaire N, Ngam-Ek A, et al. Lymphotoxin-beta receptor signaling is required for the homeostatic control of HEV differentiation and function. *Immunity*. 2005 Nov;23(5):539-50.
74. Moussion C, Girard JP. Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature*. 2011 Nov 13;479(7374):542-6.
75. Jones GW, Bombardieri M, Greenhill CJ, et al. Interleukin-27 inhibits ectopic lymphoid-like structure development in early inflammatory arthritis. *J Exp Med*. 2015 Oct 19;212(11):1793-802.
76. Becht E, Giraldo NA, Germain C, et al. Immune Contexture, Immunoscore, and molecular subtypes and immune classifications in renal cell cancer (RCC) and colorectal cancer (CRC). *Oncoimmunology*. 2015 Aug 7;4(12):e1049804. Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Adv Immunol*. 2016;130:95-190.
77. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*. 2009 Mar 1;69(5):2000-9.
78. Hindley JP, Jones E, Smart K, et al. T-cell trafficking facilitated by high endothelial venules is required for tumor control after regulatory T-cell depletion. *Cancer Res*. 2012 Nov 1;72(21):5473-82.
79. Foo SY, Zhang V, Lalwani A, et al. Regulatory T cells prevent inducible BALT formation by dampening neutrophilic inflammation. *J Immunol*. 2015 May 1;194(9):4567-76.
80. Finkin S, Yuan D, Stein I, et al. Ectopic lymphoid structures function as microniches for tumor progenitor cells in hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol*. 2015 Dec;16(12):1235-44.
81. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960-4
82. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jan 16;348(3):203-13.

83. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*. 2013 Oct 17;39(4):782-95.
84. Kirilovsky A, Marliot F, El Sissy C, et al. Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *Int Immunol*. 2016 Aug;28(8):373-82.
85. Giraldo NA, Becht E, Vano Y, et al. Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017 Aug 1;23(15):4416-4428.
86. Becht E, Giraldo NA, Beuselinck B, et al. Prognostic and theranostic impact of molecular subtypes and immune classifications in renal cell cancer (RCC) and colorectal cancer (CRC). *Oncoimmunology*. 2015 Aug 7;4(12):e1049804.