



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΔΙΑΓΝΩΣΗ,
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ»

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***«Μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C
σε διάχυτα από μεγάλα Β κύτταρα λεμφώματα»***

Αναστασίου Μαρία
Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια

Αθήνα 2018

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

**«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΣΥΓΧΡΟΝΗ
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ»**

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

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

| ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ | ΒΑΘΜΙΔΑ | ΥΠΟΓΡΑΦΗ |
|------------------------------|----------------------|-----------------|
| Π. ΦΟΥΚΑΣ (Επιβλέπων) | ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ | |
| Ι. ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΗΣ | ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ | |
| Π. ΚΟΡΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ | ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ | |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---------------|---|
| Εισαγωγή..... | 5 |
|---------------|---|

Γενικό μέρος

| | |
|---|----|
| 1. Διάχυτα από μεγάλα Β κύτταρα λεμφώματα..... | 6 |
| 1.1 Εισαγωγή..... | 6 |
| 1.2 Επιδημιολογία..... | 6 |
| 1.3 Κλινική εικόνα-αιματολογικά και βιοχημικά ευρήματα | 7 |
| 1.4 Ταξινόμηση | 8 |
| 1.5 Ανοσοϊστοχημεία | 11 |
| 1.6 Σταδιοποίηση..... | 15 |
| 1.7 Πρόγνωση | 16 |
| 1.8 Θεραπεία | 21 |
| 2. Μεταγραφικός παράγοντας MEF2C (Myocyte Enhancer Factor-2C) | 22 |
| 2.1 Εισαγωγή..... | 22 |
| 2.2 Δομή | 23 |
| 2.3 Μεταγραφική λειτουργία σε φυσιολογικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος .. | 24 |
| 2.4 Μεταγραφική λειτουργία σε αιματολογικές κακοήθειες..... | 25 |
| 2.5 Μεταγραφική λειτουργία σε συμπαγείς όγκους | 26 |
| 2.6 MEF2C και miR-223 | 27 |

Ειδικό μέρος

| | |
|---|----|
| 3. Πειραματική εργασία | 29 |
| 3.1 Σκοπός | 29 |
| 3.2 Υλικό και Μέθοδοι | 29 |
| 3.2.1 Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα | 29 |
| 3.2.2 Μονιμοποίηση ιστών-ανοσοϊστοχημικές χρώσεις | 30 |
| 3.2.3 Αξιολόγηση δειγμάτων..... | 32 |
| 3.2.4 Στατιστική ανάλυση | 32 |

| | |
|---|----|
| 4. Αποτελέσματα..... | 34 |
| 4.1 Κλινικά δεδομένα | 34 |
| 4.2 Εργαστηριακά δεδομένα..... | 37 |
| 4.3 Διεθνής Προγνωστικός Δείκτης (IPI) και οι παραλλαγές του (R-IRI, aa-IPI, NCCN-IPI) | 39 |
| 4.4 Θεραπεία και ανταπόκριση | 41 |
| 4.5 Μελέτη της σχέσης μεταξύ του χρόνου επιβίωσης και των κλινικοεργαστηριακών δεδομένων | 42 |
| 4.6 Έκφραση μεταγραφικού παράγοντα MEF2C και σχέση με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους | 44 |
| 4.7 Σχέση μεταγραφικού παράγοντα MEF2C με την επιβίωση..... | 49 |
| 5. Συμπεράσματα-Συζήτηση | 53 |
| 6. Περίληψη | 55 |
| 7. Abstract..... | 56 |
| 8. Βιβλιογραφία | 57 |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα διάχυτα από μεγάλα Β κύτταρα λεμφώματα (diffuse large B cell lymphomas DLBCL) αποτελούν το συνηθέστερο τύπο των non-Hodgkin λεμφωμάτων. Παρουσιάζουν μεγάλη κλινική, μορφολογική και ανοσοφαινοτυπική ετερογένεια, με βάση την οποία κατηγοριοποιούνται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.). Λόγω αυτής της ετερογένειας, η ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες υποκατηγορίες με ποσοστό 40-50% των ασθενών να επιτυγχάνουν μακροχρόνια ύφεση. Ο Διεθνής Προγνωστικός Δείκτης (IPI) αποτελεί εργαλείο κλινικών παραμέτρων πρόγνωσης των ασθενών με DLBCL, αντανακλώντας όμως ένα σύνολο μοριακών και βιολογικών μεταβολών. Γι αυτόν τον λόγο, είναι απαραίτητη η περαιτέρω ανοσοφαινοτυπική και μοριακή ταξινόμηση με στόχο να αναγνωριστούν ήδη από τη διάγνωση τα επιθετικά εκείνα λεμφώματα που απαιτούν πιο στοχευμένη και αποτελεσματική θεραπεία.

Η παθογένεια των DLBCL δεν είναι πλήρως κατανοητή. Οι υποομάδες που βασίζονται στο πορτρέτο γονιδιακής έκφρασης δεν μπορούν να αναγνωριστούν με ασφάλεια βάση της μορφολογίας ή του ανοσοφαινοτύπου. Βασίζονται όμως σε διαφορετικές χρωμοσωμικές αλλαγές. Οι διαμεταθέσεις γονιδίων, όπως των *MYC*, *BCL-2*, *BCL-6*, με τη συνοδό υπερέκφρασή τους αποτελούν δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες. Επομένως, είναι σημαντικό, σε περιπτώσεις που δεν παρατηρούνται δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αλλά υπερεκφράσεις ή αποσιωπήσεις γονιδίων, να αναγνωριστούν πιθανοί μεταγραφικοί παράγοντες ή σηματοδοτικά μονοπάτια, που οδηγούν σε μεταβολές πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διαδικασίες, όπως η απόπτωση, η ωρίμανση, ο κυτταρικός κύκλος και ο πολλαπλασιασμός, σημαντικές για την λειτουργία των νεοπλασματικών Β λεμφοκυττάρων. Τέτοιοι παράγοντες και ενδιάμεσες πρωτεΐνες μπορεί να αποτελέσουν μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους, εξατομικευμένους ανάλογα με την έκφρασή τους. Ένας τέτοιος μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος συμμετέχει στην ωρίμανση των Β λεμφοκυττάρων είναι ο MEF2C (Myocyte-specific enhancer factor 2C).

Στην παρούσα μελέτη, ελέγξαμε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας την έκφραση της πρωτεΐνης MEF2C σε τομές παραφίνης από αρχειακό υλικό ασθενών με DLBCL.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Διάχυτα από μεγάλα Β κύτταρα λεμφώματα (DLBCL)

1.1 Εισαγωγή

Τα λεμφώματα ταξινομούνται στα Hodgkin και non-Hodgkin λεμφώματα, με τα δεύτερα να αποτελούν τον 6ο συχνότερο τύπο κακοήθους νεοπλασματος στις Η.Π.Α (1). Τα πιο κοινά non-Hodgkin λεμφώματα σε ποσοστό της τάξης του 30-58% αποτελούν τα DLBCL, τα οποία είναι εξαιρετικά ετερογενή και επιθετικά σε περίπτωση που δε λάβουν οι ασθενείς θεραπεία (2). Κλινικά, συνήθως διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο με εξωλεμφαδενική νόσο. Η συνολική επιβίωση ποικίλει ανάλογα με το στάδιο της νόσου και αγγίζει το ποσοστό του 75%. Η προσθήκη της ανοσοθεραπείας με το μονοκλωνικό αντίσωμα Rituximab στη χημειοθεραπεία αύξησε το ποσοστό της συνολικής επιβίωσης έως 20% (3). Παρόλα αυτά, πάνω από 30% των DLBCL θα υποτροπιάσουν παρά τη χημειοθεραπεία, ανοσοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή το συνδυασμό αυτών και αυτό αποδίδεται στο γεγονός, ότι δεν υπάρχουν αξιόπιστοι κλινικοί, ιστολογικοί ή μοριακοί προβλεπτικοί δείκτες (4).

1.2 Επιδημιολογία

Τα DLBCL αποτελούν το 30-58% των non-Hodgkin λεμφωμάτων και το 79% των υψηλής κακοήθειας λεμφωμάτων (2). Σύμφωνα με τη βάση επιδημιολογικών ιατρικών δεδομένων SEER του Εθνικού Αμερικανικού Ιδρύματος Καρκίνου (National Cancer Institute) παρατηρείται επίπτωση των DLBCL 5,5/100.000/έτος (5, 6). Η επίπτωσή τους στην Ευρώπη και την Αμερική είναι μεγαλύτερη από ό,τι στην Ασία και την Αφρική και αυξάνεται με την ηλικία. Από την άλλη πλευρά, το ποσοστό επιβίωσης είναι υψηλότερο στην λευκή από τη μαύρη φυλή (7). Συνολικά, προσβάλλονται άτομα οποιασδήποτε ηλικίας, αλλά συνηθέστερα ηλικιωμένοι άνω των 60 ετών με μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου τα 63 έτη. Εξαιρέση αποτελεί το πρωτοπαθές DLBCL μεσοθωρακίου, που προσβάλλει συνήθως γυναίκες στο τέλος της 2ης ή στις αρχές της 3ης δεκαετίας της ζωής τους. Η αναλογία ανδρών και γυναικών πλησιάζει το 1,3:1. Τέλος, η θνητότητα κυμαίνεται ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή από 2,3 έως 2,7 ανά 100.000 περιπτώσεις (8).

Στους παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνονται (9):

- Το οικογενειακό ιστορικό λεμφώματος
- η αυτοανοσία
- η ανοσοκαταστολή, κυρίως η HIV λοίμωξη
- η HCV και EBV λοίμωξη
- Ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος σε νεαρή ενήλικη ηλικία

1.3 Κλινική εικόνα- αιματολογικά και βιοχημικά ευρήματα

Η κλινική εικόνα των DLBCL δεν διαφέρει ιδιαίτερα από την αντίστοιχη των υπολοίπων non-Hodgkin λεμφωμάτων. Παρουσιάζει βέβαια ετερογένεια λόγω της διαφορετικής εντόπισής τους. Το συχνότερο εύρημα είναι η λεμφαδενική διόγκωση, συνήθως ταχεία, ενώ τα Β συμπτώματα (πυρετός, νυχτερινή εφίδρωση και απώλεια βάρους) μπορεί να προστεθούν κατά την εξέλιξη της νόσου. Λόγω της ταχείας διόγκωσης των λεμφαδένων και της προσβολής σπλαχνικών οργάνων σε ποσοστό 40% κατά τη διάγνωση, ένα εξίσου συχνό σύμπτωμα αποτελεί ο πόνος. Στα γενικά συμπτώματα ανήκει και η ανορεξία.

Ανάλογα με τα όργανα προσβολής (ήπαρ, σπλήνας, πνεύμονες, νεφροί, ΓΕΣ, ΚΝΣ, μαστοί, όρχεις, δέρμα) και την εντόπιση των λεμφαδένων μπορούν να παρατηρηθούν και τα εξής συμπτώματα:

- δύσπνοια και δυσφορία λόγω διόγκωσης λεμφαδένων του μεσοθωρακίου
- Οίδημα και κνησμός κάτω άκρων σε εσκεπασμένη βουβωνική λεμφαδενοπάθεια
- Συμπτώματα από το ΓΕΣ και το ΚΝΣ, εφόσον προσβάλλονται τα αντίστοιχα συστήματα

Συνήθως, οι διογκωμένοι λεμφαδένες είναι ανώδυνοι και δυσκίνητοι, αλλά λόγω της ταχείας αύξησης μεγέθους μπορεί να παρατηρείται και πόνος κατά την ψηλάφηση. Άλλα κλινικά σημεία αποτελούν η ηπατοσπληνομεγαλία και η ωχρότητα δέρματος λόγω αναιμίας.

Τα αιματολογικά και βιοχημικά ευρήματα είναι μη ειδικά. Στο 25% των ασθενών παρατηρείται αναιμία, ενώ επί προσβολή του μυελού των οστών μπορεί να παρατηρηθεί λευκοπενία ή θρομβοπενία. Διαφορετικά, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια μπορεί να είναι φυσιολογικά ή αυξημένα. Η ταχύτητα καθίζησης ερυθρών (Τ.Κ.Ε.) και η γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH) μπορεί να είναι αυξημένες, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί υπολευκωματιναιμία και αύξηση της β2-μικροσφαιρίνης (10). Άλλα μη ειδικά ευρήματα

ανάλογα με την εντόπιση μπορεί να αποτελούν η διαταραχή της ηπατικής ή νεφρικής βιοχημείας και η υπερασβεστιαμία λόγω συνδρόμου λύσης του όγκου.

1.4 Ταξινόμηση

Τα DLBCL αποτελούν μια ετερογενή ομάδα νοσημάτων, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ακόμα περιπτώσεις που δεν μπορούν να ταξινομηθούν σαφώς με ευρέως αποδεκτά κριτήρια. Έχουν χρησιμοποιηθεί και αναθεωρηθεί διάφορες ταξινομήσεις των non-Hodgkin λεμφωμάτων τα τελευταία 30 χρόνια, από τις οποίες η ταξινόμηση REAL (revised European-American Lymphoma) (11) και η ταξινόμηση κατά Π.Ο.Υ. 2008 (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας- WHO) με αναθεώρηση το 2016 αποτελούν τις πιο χρησιμοποιημένες.

Στον πίνακα 1. αναφέρεται η ταξινόμηση κατά Π.Ο.Υ. του 2008 συγκριτικά με την αναθεωρημένη ταξινόμηση του 2016 για τα DLBCL (12).

| Ταξινόμηση κατά Π.Ο.Υ. 2008 (13) | Αναθεωρήσεις Ταξινόμησης κατά Π.Ο.Υ. 2016 (14) |
|---|--|
| Διάχυτο από μεγάλα Β κύτταρα λέμφωμα μη περαιτέρω προσδιοριζόμενο (DLBCL NOS) <u>μορφολογικές κατηγορίες</u> κεντροβλαστικό ανοσοβλαστικό αναπλαστικό <u>μοριακές υποομάδες</u> Τύπου Β κυττάρου βλαστικού κέντρου (GCB) Τύπου ενεργοποιημένου Β κυττάρου (ABC) | ★ Η διάκριση ανάμεσα σε τύπου Β κυττάρου βλαστικού κέντρου (GCB) και τύπου ενεργοποιημένου Β κυττάρου (ABC) / μη βλαστικού κέντρου (non-GCB) με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας είναι σημαντική, καθώς μπορεί να επηρεάζει τη θεραπεία ★ Η συνέκφραση MYC και BCL2 θεωρείται νέος προγνωστικός παράγοντας |
| | Λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα με IRF4 αναδιάταξη |
| Λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα πλούσιο σε Τ λεμφοκύτταρα/ιστιοκύτταρα | |
| Πρωτοπαθές DLBCL ΚΝΣ | |
| Πρωτοπαθές δερματικό DLBCL τύπου ποδός | |
| EBV+ DLBCL των ηλικιωμένων | EBV+ DLBCL μη περαιτέρω προσδιοριζόμενο, NOS EBV+ Βλεννοδερματικό έλκος |
| Πρωτοπαθές (θυμικό) DLBCL μεσοθωρακίου | |
| Ενδοαγγειακό DLBCL | |
| DLBCL σχετιζόμενο με χρόνια φλεγμονή | |
| Λεμφωματοειδής κοκκιωμάτωση | |
| ALK+ DLBCL | |
| Πλασμαβλαστικό λέμφωμα | |
| HHV8+ DLBCL επί εδάφους - πολυκεντρικής νόσου Castleman | |
| Πρωτοπαθές λέμφωμα ορογόνων κοιλοτήτων | |
| Αταξινόμητα Β λεμφώματα με χαρακτηριστικά ενδιάμεσα μεταξύ DLBCL και κλασικού λεμφώματος Hodgkin | |
| Αταξινόμητα Β λεμφώματα με χαρακτηριστικά ενδιάμεσα μεταξύ DLBCL και Burkitt λεμφώματος | Υψηλόβαθμο από Β κύτταρα λέμφωμα (HGBCL), μη περαιτέρω προσδιοριζόμενο (NOS) |

Πίνακας 1.:Ταξινόμηση των DLBCL⁽¹²⁾

Οι μορφολογικές ποικιλίες των DLBCL NOS περιλαμβάνουν τα κεντροβλαστικά, ανοσοβλαστικά και αναπλαστικά (12).

Τα κεντροβλαστικά λεμφώματα ανήκουν συχνότερα στα τύπου Β κυττάρου βλαστικού κέντρου. Οι κεντροβλάστες έχουν μικρή ποσότητα αμφίφιλου κυτταροπλάσματος και στρογγυλούς ή ωοειδείς κυστικούς πυρήνες με 3-5 πυρήνια. Σε κάποιες περιπτώσεις, ο κυτταρικός πληθυσμός είναι μονόμορφος, αποτελείται δηλαδή σχεδόν αποκλειστικά (>90%) από κεντροβλάστες. Τις περισσότερες φορές όμως ο κυτταρικός πληθυσμός είναι πολύμορφος και αποτελείται από συνδυασμό κεντροβλαστών και ανοσοβλαστών (<90%). Οι ανοσοβλάστες διαθέτουν περισσότερο και βασίφιλο κυτταρόπλασμα, ενώ ο πυρήνας είναι μεγάλος, με προέχον κεντρικό πυρήνιο.

Στα ανοσοβλαστικά λεμφώματα, περισσότερο από το 90% των κυττάρων είναι ανοσοβλάστες. Μπορεί να παρατηρηθούν και ανοσοβλάστες με πλασματοκυτταροειδή διαφοροποίηση. Αυτά τα λεμφώματα εκφράζουν πιο συχνά μοριακό προφίλ παρόμοιο με τα λεμφώματα τύπου ABC, καθώς και *MYC* μεταθέσεις με χειρότερη πρόγνωση.

Τέλος, στο αναπλαστικό DLBCL τα καρκινικά κύτταρα είναι μεγάλα και παρουσιάζουν ετερογένεια ως προς το σχήμα και το περίγραμμα του πυρήνα, χωρίς να απουσιάζουν πολυπύρηνα ή γιγαντιαία καρκινικά κύτταρα. Αυτά μπορεί να ομοιάζουν με νεοπλασματικά κύτταρα αναπλαστικού λεμφώματος ή αδιαφοροποίητου καρκινώματος. Βέβαια, η κατηγοριοποίηση αυτή δεν είναι πάντα εύκολη και ένα ικανό ποσοστό περιπτώσεων παρουσιάζει συνδυασμό κυττάρων και από τις 3 κατηγορίες (13, 15).

Στην ταξινόμηση του Π.Ο.Υ. του 2016 γίνεται αναθεώρηση των EBV+ DLBCL, τα οποία εμφανίζονται συνήθως σε ηλικίες άνω των 50 ετών με χειρότερη πρόγνωση από τα αντίστοιχα EBV- λεμφώματα. Στις περιπτώσεις όμως που παρουσιάζονται σε νεαρές ηλικίες έχουν καλύτερα ποσοστά επιβίωσης. Γι αυτόν τον λόγο, η κατηγορία EBV+ DLBCL των ηλικιωμένων μετονομάστηκε σε EBV+ DLBCL μη περαιτέρω προσδιοριζόμενο (NOS). Επιπλέον, η νοσολογική οντότητα του EBV+ βλεννοδερματικού έλκους ορίστηκε ως ξεχωριστή στην αναθεώρηση του 2016 λόγω της αυτοπεριοριζόμενης ανάπτυξής του και της ανταπόκρισής του σε συντηρητικές θεραπείες (16).

1.5 Ανοσοϊστοχημεία

Τα νεοπλασματικά κύτταρα των DLBCL τυπικά εκφράζουν παν-B-κυτταρικά αντιγόνα, όπως CD19, CD20, CD22, CD79a, και PAX5. Σε ποσοστό 50-75% μπορεί να εκφράζονται ανοσοσφαιρίνες επιφανείας ή κυτταροπλασματικές, κυρίως IgM, ακολουθούμενες από IgG και IgA. Η έκφραση αυτών των ανοσοσφαιρινών δεν σχετίζεται με την έκφραση δεικτών πλασματοκυττάρων, όπως για παράδειγμα CD138. Το CD138 σπάνια συνεκφράζεται με το CD20. Το CD30 μπορεί να εκφράζεται σε ποσοστό 10-20% και μάλιστα πιο συχνά στα αναπλαστικά DLBCL (12).

Τα DLBCL εκφράζουν CD5 σε ποσοστό 5-10% και αποτελούν de novo περιπτώσεις, ενώ σπάνια αποτελούν εξέλιξη (transformation) χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας ή λεμφώματος από μικρά λεμφοκύτταρα. Η απουσία έκφραση κυκλίνης D1 και/ή SOX11 αποτελούν στοιχεία διάκρισης των CD5+ DLBCL από τις βλαστοειδείς ή πλειομορφικές παραλλαγές των λεμφωμάτων από κύτταρο του μανδύα (17, 18). Σε σπάνιες περιπτώσεις έκφρασης κυκλίνης D1 χωρίς διαμετάθεση *CCND1* και *SOX11*, αυτή δεν είναι τόσο ισχυρή και ομοιόμορφη όπως στα λεμφώματα από κύτταρο του μανδύα.

Το γονίδιο *BCL2* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18 και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί είναι ένας αντιαποπτωτικός παράγοντας στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Ενώ αποτελεί σημαντικό παράγοντα ανάπτυξης και διαφοροποίησης των φυσιολογικών B λεμφοκυττάρων, η υπερέκφρασή του έχει ως αποτέλεσμα το πλεονέκτημα επιβίωσης των νεοπλασματικών κυττάρων. Ποσοστό της τάξης 47-84% των DLBCL εκφράζουν *BCL2* και στον τύπο B κυτάρου βλαστικού κέντρου η έκφρασή του σχετίζεται με την παρουσία της διαμετάθεσης $t(14;18)(q32;q21.3)$ (19). Επιπλέον, σημαντικό ογκογονίδιο των B λεμφωμάτων είναι το *MYC*, η πρωτεΐνη του οποίου αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου (20). Στις περισσότερες μελέτες, η θετική έκφραση της πρωτεΐνης *BCL2* (κυτταροπλασματική) και του μεταγραφικού παράγοντα *MYC* (πυρηνική) ορίζεται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% και του 40% των νεοπλασματικών κυττάρων. Η συνέκφραση αυτών είναι πιο συχνή στον τύπο ABC και αποτελεί τα λεμφώματα “διπλής έκφρασης” (“double-expressor lymphomas”) (13-15, 21, 22). Αντίστοιχα, οι δείκτες CD10, *BCL6* και *IRF4/MUM1* είναι θετικοί σε ποσοστό 30—50%, 60—90% και 35-65% των DLBCL. Τέλος, ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού *Ki67* είναι υψηλός και συνήθως κυμαίνεται από 40% έως και μεγαλύτερος από 90% (23-25).

Άλλοι δείκτες που έχουν μελετηθεί στα DLBCL είναι (12):

FOXP1: Η έκφρασή του παρατηρείται στο 20% των DLBCL που δεν ανήκουν στον τύπο B κυττάρου βλαστικού κέντρου και εκφράζουν IRF4/MUM1 και BCL2 επί απουσίας διαμετάθεσης t(14;18) (q32;q21.3).

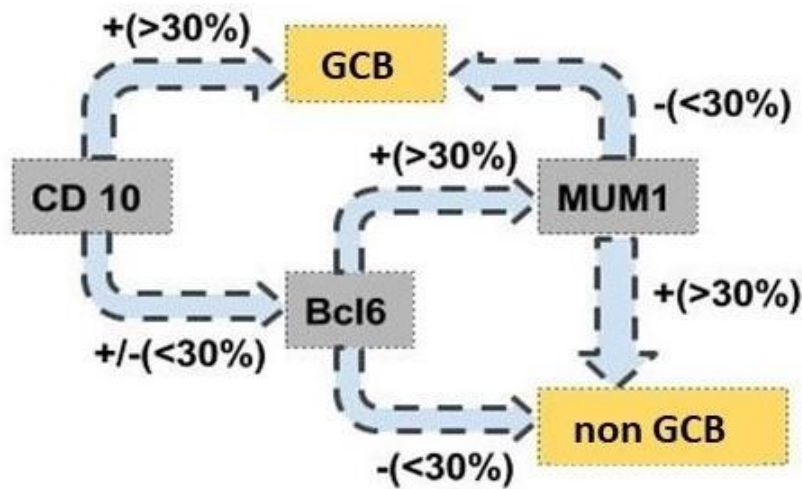
GCET1(CENTERIN): Αποτελεί δείκτης του βλαστικού κέντρου και εκφράζεται στο 40-50% των περιπτώσεων.

GCET2(HGAL): Αποτελεί επίσης κυτταροπλασματικό δείκτη βλαστικού κέντρου και εκφράζεται στα φυσιολογικά B λεμφοκύτταρα βλαστικού κέντρου και σε υποκατηγορίες DLBCL, πρωτοπαθές (θυμικό) λέμφωμα μεσοθωρακίου, οζώδες λέμφωμα και λέμφωμα Burkitt.

LM02: Εκφράζεται περίπου στο 45% των DLBCL και συσχετίζεται στενά με τους δείκτες βλαστικού κέντρου CD10, BCL6 και HGAL.

P53: Η έκφραση που παρατηρείται στο 20-60% των DLBCL σχετίζεται συχνότερα με υπερέκφραση του γονιδίου TP53 παρά με μεταλλάξεις.

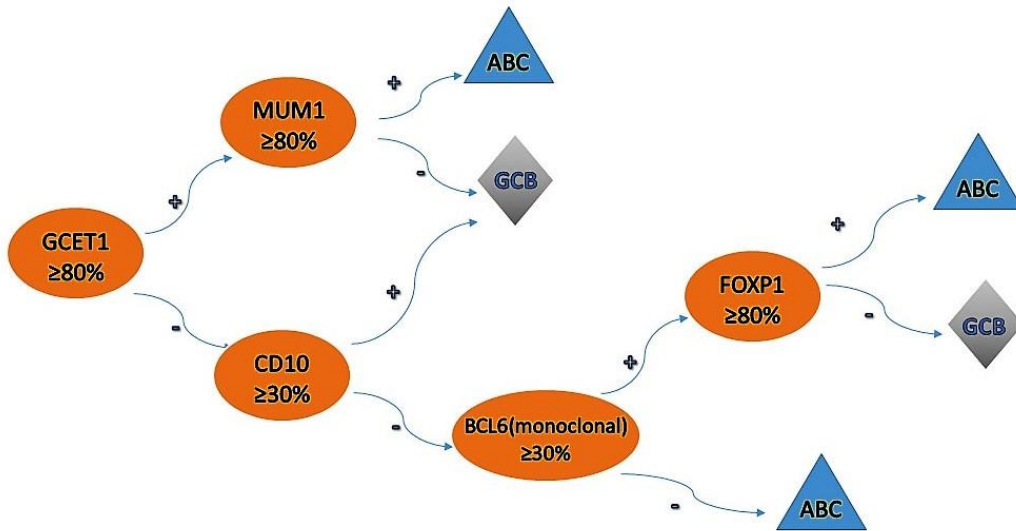
Με τη βοήθεια του πορτρέτου γονιδιακής έκφρασης (gene expression profiling-GEP) αναγνωρίζονται 2 μοριακοί υπότυποι: ο τύπος B κυττάρου βλαστικού κέντρου και ο τύπος ενεργοποιημένου B κυττάρου. Αυτοί διαφοροποιούνται όχι μόνο γενετικά και σε επίπεδο μοριακών μονοπατιών σηματοδότησης, αλλά και σε κλινικό επίπεδο με καλύτερη πρόγνωση του πρώτου. Ταυτόχρονα, μπορούν να αναγνωριστούν και ανοσοϊστοχημικά οι υπότυποι του B κυττάρου βλαστικού κέντρου και του μη βλαστικού κέντρου με τη χρήση του αλγορίθμου Hans (Εικόνα 1.) με βάση τα αντισώματα CD10, BCL6, IRF4/MUM1, χωρίς όμως να υπάρχει πλήρης ταύτιση των μοριακών με των ανοσοϊστοχημικών υποκατηγοριών (26, 27). Όμως, η μη ευρεία χρήση του GEP, η σταδιακή κατανόηση της μοριακής παθογένειας και η επίδραση στις θεραπευτικές στρατηγικές αποτέλεσαν τους λόγους για τους οποίους ο Π.Ο.Υ. έθεσε πιο ξεκάθαρα την αντίστοιχη κατηγοριοποίηση στην αναθεωρημένη ταξινόμηση του 2016. Ο ανοσοϊστοχημικός αλγόριθμος του Hans δεν αποτελεί τον μοναδικό αλγόριθμο, αλλά είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος και αυτός που προσομοιάζει με το GEP (28).



Εικόνα 1. Αλγόριθμος Hans⁽²⁸⁾

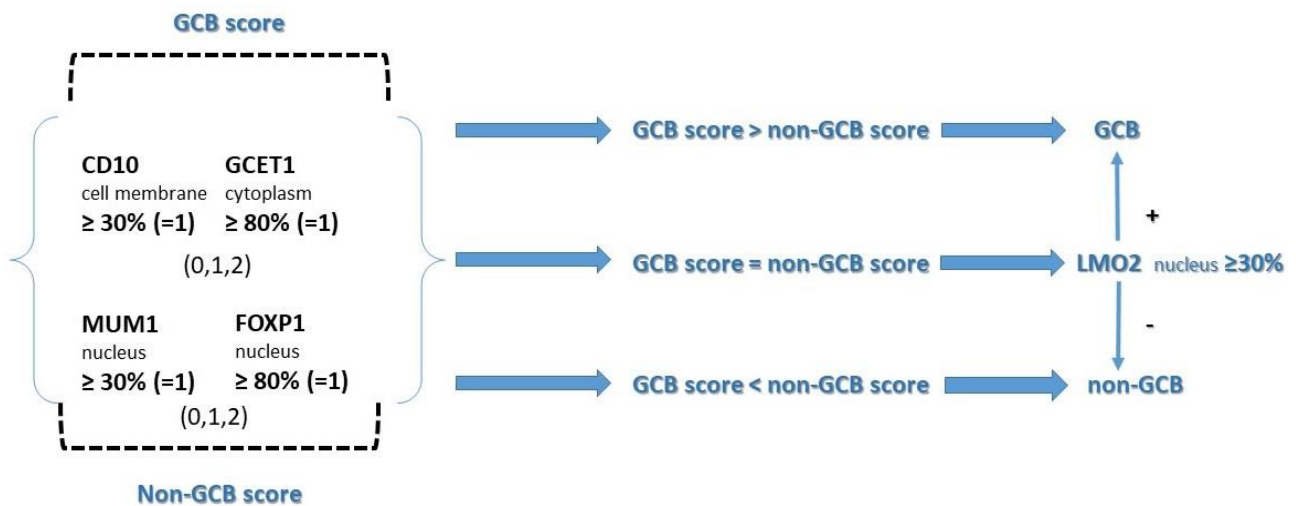
(GCB: βλαστικού κέντρου τύπος, non-GCB: μη βλαστικού κέντρου τύπος)

Κατά τη σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου με το πορτρέτο γονιδιακής έκφρασης, παρατηρείται συμφωνία των 2 μεθόδων σε ποσοστό 86% και θετική προγνωστική αξία του αλγορίθμου Hans σε ποσοστό 71% για την υποκατηγορία των B λεμφωμάτων βλαστικού κέντρου και 88% για τα υπόλοιπα DLBCL (29). Άλλοι επίσης χρησιμοποιούμενοι αλγόριθμοι αποτελούν οι αλγόριθμοι Choi (Εικόνα 2.) και Tally (Εικόνα 3.) (30, 31). Ο πρώτος περιλαμβάνει τους δείκτες GCET1, CD10, MUM1, BCL6 και FOXP1 και η αντιστοίχιση με το πορτρέτο γονιδιακής έκφρασης πλησιάζει το 93%. Όταν ο αλγόριθμος αυτός εφαρμόστηκε σε ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία με Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine και Prednisolone (R-CHOP), η αντιστοίχιση με το προφίλ γονιδιακής έκφρασης παρέμεινε σε υψηλό ποσοστό της τάξεως 88%. Ο δεύτερος χρησιμοποιεί τους δείκτες CD10 και GCET1 ως δείκτες βλαστικού κέντρου και τους δείκτες FOXP1 και MUM1 ως δείκτες ενεργοποιημένων B λεμφοκυττάρων (32).



Εικόνα 2. Αλγόριθμος Choi

Η υπερέκφραση του MYC παρατηρείται σε ποσοστό 30-40% των DLBCL και σε ποσοστό 20% με 35% αυτών των περιπτώσεων συνυπάρχει η έκφραση του BCL2, ενώ δεν παρουσιάζονται χρωμοσωμικές μεταλλάξεις. Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, αυτά τα λεμφώματα ονομάζονται “διπλής έκφρασης” (“double-expressor lymphomas”) και παρουσιάζουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τα υπόλοιπα DLBCL, αλλά είναι λιγότερο επιθετικά από τα υψηλόβαθμα από B κύτταρα λεμφώματα. Στα υψηλόβαθμα από B κύτταρα λεμφώματα ανήκουν τα λεμφώματα με MYC, BCL2 και/ή BCL6 αναδιατάξεις (13-15, 21, 22, 33).



Εικόνα 3. Αλγόριθμος Tally⁽³¹⁾

1.6 Σταδιοποίηση

Τόσο η κλινική όσο και η παθολογοανατομική σταδιοποίηση των DLBCL αποτελούν απαραίτητα στοιχεία για την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης και έχουν προγνωστική σημασία. Η καλύτερη κατανόηση της παθογένειας και της βιολογίας των DLBCL, η βελτίωση των διαγνωστικών μέσων και η εισαγωγή τεχνικών, όπως η μελέτη μοριακής έκφρασης και η ανοσοϊστοχημεία, καθώς και η ανακάλυψη νεώτερων θεραπευτικών παραγόντων αποτελούν σημαντικούς παράγοντες βελτίωσης της επιβίωσης και της ανταπόκρισης στη θεραπεία, που παρατηρούνται τις τελευταίες δεκαετίες.

Γι' αυτούς τους λόγους, είναι σημαντική η χρήση κοινών συστημάτων σταδιοποίησης. Το πιο ευρέως διαδεδομένο σύστημα αποτελεί το σύστημα κατά Ann Arbor, το οποίο αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τα Hodgkin λεμφώματα και περιγράφεται στον Πίνακα 2 (34). Η μεταγενέστερη τροποποίηση κατά Cotswold περιλαμβάνει το στάδιο X ή αλλιώς νόσο bulky, η οποία ορίζεται από την παρουσία λεμφαδενικής μάζας διαμέτρου >10cm ή μάζας μεσοθωρακίου μεγαλύτερη από το $\frac{1}{3}$ του θωρακικού κλωβού. Επίσης, περιλαμβάνει την υποσημείωση - ως δείκτη- του αριθμού των ανατομικών περιοχών που συμμετέχουν στη νόσο.

Γίνεται κατανοητό ότι η λήψη πλήρους ιστορικού και η προσεκτική φυσική εξέταση αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες στην αξιολόγηση των ασθενών. Η εκτίμηση του ασθενούς με βάση την κλίμακα φυσικής κατάστασης ECOG αποτελεί ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο στην κατηγοριοποίησή του, ιδίως όταν πρόκειται να συμμετάσχει σε κλινικές δοκιμές. Εργαστηριακές εξετάσεις, όπως η γενική αίματος, η ηπατική και νεφρική λειτουργία και η γαλακτική δεϋδρογονάση (LDH) είναι ενδεικτικές της ενεργότητας του λεμφώματος. Περαιτέρω εξετάσεις, όπως η οστεομυελική βιοψία, η οσφυονωτιαία παρακέντηση, η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) συμβάλουν στη σταδιοποίηση και αναγνώριση της έκτασης του λεμφώματος, με σκοπό να επιλεγθεί η καλύτερη δυνατή θεραπευτική προσέγγιση.

| | |
|---------------|--|
| Στάδιο I | Προσβολή μιας μόνο περιοχής λεμφαδένων (I) ή μιας εξωλεμφαδενικής περιοχής (Ie) |
| Στάδιο II | Προσβολή δύο ή περισσότερων λεμφαδενικών ομάδων στην ίδια πλευρά του διαφράγματος (II) ή μιας λεμφαδενικής και μιας εξωλεμφαδενικής περιοχής (IIe) |
| Στάδιο III | Προσβολή λεμφαδενικών ομάδων εκατέρωθεν του διαφράγματος (III) με συμμετοχή του σπλήνα (III _s) ή/και παρακείμενων εξωλεμφαδενικών οργάνων/περιοχών (IIIe/III _{es}) |
| Στάδιο IV | Πολυεστιακή προσβολή ενός ή περισσότερων εξωλεμφαδενικών περιοχών/οργάνων με ή χωρίς τη συμμετοχή λεμφαδένων |
| Στάδιο IA-IVA | Απουσία συστηματικών συμπτωμάτων |
| Στάδιο IB-IVB | Παρουσία συστηματικών συμπτωμάτων |

Πίνακας 2.:Ταξινόμηση των DLBCL κατά Ann Arbor⁽³⁴⁾

1.7 Πρόγνωση

Τα DLBCL είναι ιδιαίτερος επιθετικά, αλλά σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να είναι ιάσιμα. Όταν η νόσος είναι περιορισμένη, μπορεί να αγγίξει το 80-85% 5-ετούς επιβίωσης άνευ προόδου, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο πλησιάζει το 50%. Επομένως, είναι σημαντική η σταδιοποίηση τόσο του νοσήματος όσο και των ασθενών. Για παράδειγμα, κάποιες εξωλεμφαδενικές περιοχές προσβολής, όπως το ΚΝΣ και οι όρχεις, απαιτούν ειδικές θεραπευτικές στρατηγικές και έχουν πτωχή πρόγνωση.

Χρήσιμα εργαλεία κατηγοριοποίησης ασθενών αποτελούν ο διεθνής προγνωστικός δείκτης (IPI) και ο αντίστοιχος προσαρμοσμένος σε ηλικία (age-adjusted IPI, aa-IPI), που διαμορφώθηκαν από συλλογή δεδομένων περισσότερων από 2000 ασθενών από τον Καναδά, τις Η.Π.Α. και την Ευρώπη. Ο IPI υπολογίζεται με βάση την παρουσία ή την απουσία 5 μεταβλητών, εύκολα μετρήσιμων στην καθημερινή κλινική πράξη και οι ασθενείς ταξινομούνται σε 4 ομάδες κινδύνου (Πίνακας 3.) (35).

| Μεταβλητές | Βαθμός | Ομάδες κινδύνου | 5ετής συνολική επιβίωση |
|---|---------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Ηλικία άνω των 60 ετών | 1 | 0-1: χαμηλού κινδύνου | 90% |
| Στάδιο νόσου III ή IV | 1 | 2: χαμηλού-ενδιάμεσου κινδύνου | 77% |
| Προσβεβλημένες εξωλεμφαδενικές περιοχές >1 | 1 | 3: υψηλού-ενδιάμεσου κινδύνου | 62% |
| Φυσική κατάσταση του ασθενούς (performance status) ≥2 | 1 | 4-5: υψηλού κινδύνου | 54% |
| LDH >φυσιολογικού | 1 | | |

Πίνακας 3.:Διεθνής Προγνωστικός Δείκτης (IPI)

Ο IPI χρησιμοποιήθηκε σε 1274 ασθενείς ηλικίας ≤60 ετών με εξαίρεση και τον αριθμό των εξωλεμφαδενικών προσβολών από τις μεταβλητές με αποτέλεσμα να σχηματίζεται βαθμολογία 0-3 με αντίστοιχες ομάδες κινδύνου. Τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης σε ηλικίες ≤60 ετών είναι 83%, 69%, 46% και 32% αντίστοιχα στις ομάδες κινδύνου, ενώ για ασθενείς ηλικίας >60 ετών είναι 56%, 44%, 37% και 21% στην ίδια αντιστοιχία ομάδων κινδύνου (35).

Η προσθήκη στη χημειοθεραπεία του αντι-CD20 μονοκλωνικού αντισώματος Rituximab είχε σημαντικά αποτελέσματα βελτίωσης των ποσοστών επιβίωσης ασθενών με DLBCL. Επομένως, μελετήθηκαν ως προς τον IPI περίπου 1000 ασθενείς που έλαβαν rituximab και CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine και prednisone) ή αντίστοιχη χημειοθεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα και τα αντίστοιχα ποσοστά ελεύθερα επεισοδίου (EFS), ελεύθερα προόδου νόσου (PFS) και συνολικής επιβίωσης (OS) παρουσιάζονται στον πίνακα 4 (36, 37).

| Αναθεωρημένος Διεθνής Προγνωστικός Δείκτης (R-IPI) | Ελεύθερη 4 ετής Προόδου Νόσου Επιβίωση (PFS) | Συνολική 4 ετής Επιβίωση (OS) |
|---|---|--------------------------------------|
| 0: χαμηλού κινδύνου-πολύ καλή πρόγνωση | 94% | 94% |
| 1-2: ενδιάμεσου κινδύνου-καλή πρόγνωση | 80% | 79% |
| 3-5: υψηλού κινδύνου-πτωχή πρόγνωση | 53% | 55% |

Πίνακας 4.:IPI σε ασθενής που έλαβαν Rituximab (revised IPI, R-IPI)⁽³⁶⁾

Χρησιμοποιώντας κλινικά δεδομένα από τη βάση δεδομένων του Εθνικού Κέντρου Συντονισμού για την αντιμετώπιση του Καρκίνου των ΗΠΑ (National Comprehensive Cancer Network NCCN) κατά την περίοδο θεραπείας με Rituximab, διαμορφώθηκε ένα ενισχυμένο μοντέλο IPI (NCCN-IPI) με στόχο τη βελτίωση διαστρωμάτωσης κινδύνου. Όπως παρατηρείται στους Πίνακες 5. και 6., αξιολογήθηκαν 5 προγνωστικοί παράγοντες σε 1650 ασθενείς που διεγνώστηκαν τη χρονική περίοδο 2000-2010 με de novo DLBCL σε 7 Κέντρα του NCCN. Με βάση αυτούς τους παράγοντες, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε 4 ομάδες κινδύνου και παρατηρήθηκε ότι σε σύγκριση με το IPI, ο NCCN-IPI διακρίνει καλύτερα τις υποομάδες χαμηλού και υψηλού κινδύνου (συνολική επιβίωση 5 ετών: OS: 96% έναντι 33%) από το IPI (5ετές OS: 90% έναντι 54%) (38).

| Μεταβλητές | Τιμή P | Βαθμός |
|---|---------------|---------------|
| Ηλικία | | 0 |
| ≤40 ετών | | |
| 41-60 ετών | 0.0002 | 1 |
| 61-75 ετών | <0.0001 | 2 |
| >75 ετών | <0.0001 | 3 |
| Στάδιο νόσου III ή IV κατά Ann Arbor | 0.0062 | 1 |
| Προσβεβλημένες εξωλεμφαδενικές περιοχές >1 | 0.0008 | 1 |
| Φυσική κατάσταση του ασθενούς (performance status) ≥2 | 0.0001 | 1 |
| LDH ratio | | 0 |
| ≤1 | | |
| >1-3 | <0.0001 | 1 |
| >3 | <0.0001 | 2 |

Πίνακας 5.: Προγνωστικοί Παράγοντες του NCCN-IPI⁽³⁸⁾

Μια προσαρμοσμένη σε μεγαλύτερες ηλικίες εκδοχή του IPI παρουσιάστηκε από την Αμερική το 2010 με την συντομογραφία E-IPI και περιλαμβάνει ασθενείς ηλικίας >70 ετών (39). Σε αυτή την κατηγοριοποίηση, αυξήθηκε το ποσοστό των ασθενών χαμηλού κινδύνου και μειώθηκε το ποσοστό υψηλού κινδύνου συγκριτικά με τον κλασικό IPI. Η 3-ετής επιβίωση ελεύθερης υποτροπής για τις ομάδες χαμηλού, χαμηλού-ενδιάμεσου, υψηλού-ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου ήταν 77%, 62%, 47% και 28% αντίστοιχα, ενώ η αντίστοιχη συνολική επιβίωση ανήλθε σε ποσοστά 86%, 74%, 58% και 36%.

Μια ακόμα παραλλαγή του IPI που στηρίζεται σε χρονικό διάστημα ελεύθερης επεισοδίου επιβίωσης μικρότερο από 5 έτη ορίστηκε από τον Maurer και τους συνεργάτες του. Αυτοί, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι οι ασθενείς που παρουσίασαν υποτροπή νόσου σε λιγότερο από 24 μήνες είχαν πτωχή συνολική επιβίωση, ανέπτυξαν ένα πολυπαραγονικό μοντέλο (ηλικία, σταδιοποίηση κατά Ann Arbor, LDH ορού, απόλυτος αριθμός λεμφοκυττάρων, φυσική κατάσταση ασθενούς, ευμεγέθης όγκος και φύλο) που εφαρμόστηκε σε 1.348 ασθενείς με DLBCL, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε θεραπεία με

ανοσοχημειοθεραπεία με βάση την ανθρακυκλίνη. Η παραλλαγή αυτή ονομάστηκε IPI24 και προέβλεψε πιθανότητα χρονικού διαστήματος 24 μηνών ελεύθερου προόδου νόσου ή θανάτου σε ποσοστό 36% με εύρος 12-88% αναλόγως του σταδίου, ενώ περισσότερο από το 20% των ασθενών παρουσίασαν 50% κίνδυνο να μην επιτύχουν το χρονικό αυτό διάστημα (40, 41). Εν κατακλείδι, οι τροποποιήσεις του IPI προς το παρόν περιλαμβάνουν σχετικά μικρό αριθμό ασθενών, με αποτέλεσμα ο κλασικός IPI να αποτελεί το πιο σημαντικό προγνωστικό εργαλείο.

| Διεθνής Προγνωστικός Δείκτης (NCCN-IPI) | Ποσοστό Ασθενών | Ελεύθερη Προόδου Νόσου 5 ετής Επιβίωση (PFS) | Συνολική 5ετής Επιβίωση (OS) |
|--|------------------------|---|-------------------------------------|
| 0-1: χαμηλού κινδύνου | 19% | 91% | 96% |
| 2-3: χαμηλού-ενδιάμεσου κινδύνου | 42% | 74% | 82% |
| 4-5: υψηλού-ενδιάμεσου κινδύνου | 31% | 51% | 64% |
| ≥6: υψηλού κινδύνου | 8% | 30% | 33% |

Πίνακας 6.: NCCN-IPI⁽³⁸⁾

Επιπλέον μεταβλητές, όπως το γυναικείο φύλο και η λευκή φυλή αποτελούν καλούς προγνωστικούς παράγοντες. Αντιθέτως, κάποιοι ανοσοϊστοχημικοί και μοριακοί δείκτες έχουν συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση. Τέτοιοι δείκτες αποτελούν η διπλή ή τριπλή έκφραση των γονιδίων *MYC*, *BCL2* και/ή *BCL6* καθώς και ο CD5+. Μάλιστα, σε αυτή την τελευταία υποκατηγορία των DLBCL έχει αμφισβητηθεί η αποτελεσματικότητα της μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, είτε η αυτόλογη είτε η αλλογενή. Τα τελευταία στοιχεία αναδεικνύουν την ανάγκη ανάπτυξης νέων στοχευμένων θεραπειών γι' αυτές τις κατηγορίες ασθενών.

1.8 Θεραπεία

Η θεραπευτική προσέγγιση των DLBCL βασίζεται κυρίως στην ανοσοχημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία βασίζεται στον συνδυασμό κυκλοφωσφαμίδης, δοξορουβικίνης, βινκριστίνης και πρεδνιζολόνης (CHOP) μαζί με ανοσοθεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα Rituximab (R-CHOP, 6-8 κύκλοι). Σε μεγάλες ηλικίες (>80 ετών), εφόσον η συνολική κλινική κατάσταση και οι συννοσηρότητες του ασθενούς το επιτρέπουν, ο συνδυασμός μειωμένης δοσολογίας Rituximab με CHOP αποτελούν την θεραπεία εκλογής (R-mini-CHOP) (42, 43). Σε περίπτωση καρδιακής ανεπάρκειας, δύναται να αντικατασταθεί η δοξορουβικίνη με γεμισιταβίνη (R-GCVP) ή λιποσωμική δοξορουβικίνη (R-CDOP) ή ακόμα και να παραληφθεί (44). Εναλλακτική επιλογή αποτελεί ο ο συνδυασμός Rituximab με κυκλοφωσφαμίδα, μιτοξανδρόνη, βινκριστίνη και πρεδνιζολόνη (R-CNOP).

Σε περιπτώσεις υπολειπόμενης ογκώδους νόσου μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ακτινοθεραπεία ως συμπληρωματική αντιμετώπιση. Τέλος, σε περιπτώσεις υποτροπής ή προόδου νόσου θεραπεία εκλογής αποτελεί η μεγαθεραπεία με το σχήμα BEAM (καρμουστίνη, ετοποσίδη, κυταραβίνη, μελφαλάνη) και η επακόλουθη αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Σε περιπτώσεις ανθεκτικής νόσου, πρώιμης υποτροπής ή γενικά υποτροπής ύστερα από αυτόλογη μεταμόσχευση λαμβάνεται υπόψιν το ενδεχόμενο αλλογενούς μεταμόσχευσης.

2.Μεταγραφικός παράγοντας MEF2C (Myocyte Enhancer Factor-2C)

2.1 Εισαγωγή

Ο μεταγραφικός παράγοντας MEF2C ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων MEF2 (Myocyte Enhancer Factor-2), η οποία αποτελείται από 4 πρωτεΐνες και συγκεκριμένα από τις MEF2A, MEF2B, MEF2C και MEF2D. Αυτές παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και της προσαρμογής των κυττάρων, μέσω ελέγχου επιγενετικών τροποποιήσεων και έκφρασης γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, συμβάλλουν στην γονιδιακή μεταγραφή μέσω αλληλεπιδράσεων με συνενεργοποιητές ή συν-καταστολείς. Για παράδειγμα, όταν σχηματίζεται σύμπλοκο κάποιου παράγοντα MEF2 με μία από 4 αποακετυλάσες ιστονών κατηγορίας IIa (HDACs): HDAC4, HDAC5, HDAC7 και HDAC9, ο MEF2 μετατρέπεται σε μεταγραφικός καταστολέας, ενώ όταν συνδέεται με κάποιον συνενεργοποιητή, όπως p300, P-TEFβ, GRIP-1, CARM1, MAML1, ACTN4, Ash2L, EBF-1 και CRX, αυξάνει τη μεταγραφή περιοχών ρυθμιζόμενων από τον MEF2.

Όπως ακριβώς μπορούν οι 4 αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας MEF2 να συμμετάσχουν σε σύμπλοκα πολλαπλών πρωτεϊνών με δράση είτε ενεργοποιητή είτε καταστολέα, έτσι ακριβώς μπορούν να συμμετάσχουν και στη νεοπλασματική ανάπτυξη είτε ως ογκογόνοι είτε ως ογκοκατασταλτικοί παράγοντες. Διάφορες γενετικές αλλαγές και μεταβολές έκφρασης έχουν παρατηρηθεί σε διαφορετικούς τύπους νεοπλασμάτων και για όλα τα μέλη της οικογένειας MEF2, τα οποία συμμετέχουν σε διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη του κυττάρου και του καρκίνου, όπως η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός, η αγγειογένεση και η μεσεγχυματική μετάπτωση του επιθηλίου (epithelial mesenchymal transition). Πιο συγκεκριμένα, ο παράγοντας MEF2C είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση κυρίως μεσεγχυματογενών ιστών, όπως του οστίτη ιστού, των μυικών, καρδιακών και νευρικών κυττάρων και του ανοσοποιητικού συστήματος, επομένως συμμετέχει και στην ανάπτυξη και εξέλιξη των αντίστοιχων νεοπλασμάτων. Στο παρόν κεφάλαιο, θα μας απασχολήσει η συμμετοχή του MEF2C σε συμπαγή νεοπλάσματα και σε νεοπλάσματα του ανοσοποιητικού συστήματος.

2.2 Δομή

Όλες οι πρωτεΐνες MEF2 περιέχουν υψηλά διατηρημένες περιοχές MADS και MEF2 που βρίσκονται στο N-τελικό άκρο τους και είναι απαραίτητες για τον διμερισμό, τη δέσμευση του DNA και την αλληλεπίδραση με άλλους παράγοντες. Αντίθετα, το C-τελικό άκρο των πρωτεϊνών, στο οποίο εδρεύουν οι πληροφορίες μεταγραφικής ενεργοποίησης, δεν είναι εξίσου διατηρημένο ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας MEF2. Εξαίρεση αποτελούν τα τελικά 35 αμινοξέα, στα οποία εδρεύει η πυρηνική αλληλουχία εντοπισμού και είναι αρκετά διατηρημένη περιοχή.

Οι πρωτεΐνες MEF2 συνδέονται στο DNA ως διμερή και με διάταξη κεφαλής-κεφαλής. Η σωστή αναδίπλωση της περιοχής MEF2 απαιτεί σωστή αναδίπλωση της περιοχής MADS, επομένως, μεταλλάξεις της που εμποδίζουν τη δέσμευση του DNA ή μεταβάλλουν τη δομή αυτής της περιοχής επηρεάζουν τη δομή της MEF2 περιοχής. Συνεπώς, μια μετάλλαξη του MEF2 μπορεί να οδηγήσει σε αστάθεια στη σύνδεση με το DNA και στο διμερισμό (45, 46).

Η περιοχή MEF2 βέβαια συμμετέχει και στην αλληλεπίδραση με τους συμπαραγόντες και τους συν-καταστολείς. Μία υδρόφοβη αυλάκωση στην περιοχή MADS-box / MEF2 που σχηματίζεται από τα αμινοξέα Leu66, Tyr69 και Thr70 και οριοθετείται από την έλικα H2 και τον εύκαμπτο συνδέτη μεταξύ H2 και β3 μπορεί να αναδιαταχθεί για να φιλοξενήσει μεταγραφικούς συνενεργοποιητές ή συν-καταστολείς, όπως τους Cabin1, HDAC κατηγορίας IIa, MyoD, p300 και MASTR (46, 47). Ένα υδρόφοβο αμινοξύ των παραγόντων αυτών τους εισάγει στην αυλάκωση και οδηγεί στην αλληλεπίδραση με κάποιον παράγοντα MEF2. Η αλληλεπίδραση αυτή και κυρίως για τους συγκεκριμένους παράγοντες Cabin1, HDAC κατηγορίας IIa και p300 είναι αμοιβαία αποκλειστική. Συνεπώς, οι καλύτερα μελετημένοι συνεργάτες των παραγόντων MEF2C δεσμεύουν την υδρόφοβη αυτή «τσέπη» ανάμεσα στις περιοχές MADS και MEF2, όπου η έλικα H2 έχει θεμελιώδη ρόλο στην αλληλεπίδραση (46). Καθώς, λοιπόν, οι συνεργάτες της οικογένειας των MEF2 ανταγωνίζονται την ίδια θέση σύνδεσης, κάθε μετάλλαξη μπορεί να έχει διαφορετική δράση και διαφορετικό αποτέλεσμα στις δραστηριότητες των μεταγραφικών παραγόντων MEF2, ανάλογα και με τη σταθερότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου. Στην παρούσα εργασία, θα μας απασχολήσει συγκεκριμένα η λειτουργικότητα του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C και κυρίως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

2.3 Μεταγραφική λειτουργία σε φυσιολογικά κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος

Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί αρκετά η συμμετοχή του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C στην ανάπτυξη, εξέλιξη και διαφοροποίηση αρκετών ιστών συμπεριλαμβανομένων του οστίτη και νευρικού ιστού, καρδιακού και σκελετικού μυός, καθώς και στην ωρίμανση και εξέλιξη των B λεμφοκυττάρων.

Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα ποντικών προκειμένου να μελετήσουν τη συμβολή του μεταγραφικού αυτού παράγοντα στην εξέλιξη και ωρίμανση των B λεμφοκυττάρων. Σε επίπεδο μυελού των οστών έχει παρατηρηθεί υψηλότερη έκφραση του MEF2C σε κοινά λεμφοειδή προγονικά κύτταρα (CLPs) και στα ώριμα B κύτταρα του βλαστικού κέντρου από αυτά της οριακής ζώνης, ενώ η έκφρασή του σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και κοινά μυελοειδή προγονικά κύτταρα είναι σημαντικά χαμηλότερη (48). Αυτά τα στοιχεία, καθώς και η μειωμένη έκφρασή του σε φυσιολογικά T λεμφοκύτταρα, ουδετερόφιλα και ερυθροκύτταρα υποδηλώνουν τη συμμετοχή του μεταγραφικού αυτού παράγοντα στην ωρίμανση της λεμφοειδούς σειράς και την καταπίεση της μυελοειδούς καθώς και στη διαμόρφωση των βλαστικών κέντρων. Συμπληρωματικά, έχει μελετηθεί ο κεντρικός ρόλος του MEF2C στην επιλογή διαφοροποίησης μονοκυττάρου έναντι ουδετεροφίλου κοκκιοκυττάρου ως απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως κυτοκίνες και ενδοτοξίνες που συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση (49).

Πιο αναλυτικά, έχουν μελετηθεί δύο μηχανισμοί ενεργοποίησης της λεμφοειδούς έναντι της μυελοειδούς σειράς: Στον πρώτο ενεργοποιεί τη λεμφοποίηση δρώντας συνεργικά με τον μεταγραφικό παράγοντα Pu.1, προάγοντας έτσι την επιβίωση των προγονικών B κυττάρων και στον δεύτερο καταπιέζει τη μυελοποίηση δεσμεύοντας το ένζυμο Hdac7 σε περιοχές μυελοειδούς γονιδιακής ρύθμισης (50). Αντίθετα, ο MEF2C δρα κατασταλτικά ως προς τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων συνδεδόμενος με τον μεταγραφικό παράγοντα Malm1 και ανταγωνίζοντας τη σηματοδότηση Notch1, η οποία προάγει τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων (48).

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί η αναγκαιότητά του στην ομοίωση των B λεμφοκυττάρων, μέσω μετάδοσης σημάτων πολλαπλασιασμού και επιβίωσης είτε σε απάντηση της ενεργοποίησης του υποδοχέα των B κυττάρων (B cell receptor-BCR) είτε σε συνεργασία με παράγοντες, όπως οι EBF1 (early B cell factor-1), NF-kB and NFAT (51-53). Η τελευταία πραγματοποιείται σε μεταγραφή γονιδίων ειδικών των B-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των αντιαποπτωτικών γονιδίων της οικογένειας Bcl-2.

2.4 Μεταγραφική λειτουργία σε αιματολογικές κακοήθειες

Παρόλο που στο πλαίσιο της αιμοποίησης, ο MEF2C μπορεί να θεωρηθεί μεταγραφικός παράγοντας ειδικός για τα Β λεμφοκύτταρα, η παθολογική έκφρασή του έχει παρατηρηθεί σε κακοήθειες των Τ λεμφοκυττάρων και των μυελοειδών κυττάρων (54). Πιο συγκεκριμένα, στην οξεία Τ-λεμφοβλαστική λευχαιμία (Τ-ΟΛΛ), παρατηρούνται χρωμοσωμικές αλλοιώσεις που προκαλούν την ενεργοποίηση διαφόρων ογκογονιδίων. Το αποτέλεσμα είναι η καταστολή της διαφοροποίησης των Τ λεμφοκυττάρων και η ανάπτυξη λευχαιμογένεσης. Δύο υποομάδες των Τ-ΟΛΛ, που αντιπροσωπεύουν το 20% του συνόλου τους, χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση των NKX2-1/NKX2-2 ή του παράγοντα MEF2C. Οι περιπτώσεις υπερέκφρασης του MEF2C χαρακτηρίζονται από έναν πολύ ανώριμο ανοσοφαινότυπο, που ονομάζεται πρώιμος και ο αντίστοιχος υπότυπος ονομάζεται ΟΛΛ πρόδρομων Τ λεμφοκυττάρων (55, 56). Η ενεργοποίηση του MEF2C μπορεί να είναι αποτέλεσμα έκφρασης του γονιδίου NKX2-5 ή χρωμοσωμικής διαγραφής στο χρωμόσωμα 5q14 με αποτέλεσμα μετάλλαξη στον υποκινητή του MEF2C. Αυτή η μετάλλαξη πιθανώς καταργεί μια θέση σύνδεσης για την πρωτεΐνη STAT5, η οποία δρα κατασταλτικά ως προς την έκφραση του MEF2C (57, 58). Άλλοι μηχανισμοί απορρύθμισης έκφρασης αυτού του μεταγραφικού παράγοντα μπορεί να είναι α) η καταστολή της έκφρασης του συμπλόκου NR4A1/NUR77, πιθανώς μέσω σύνδεσης με ένζυμα HDAC κατηγορίας IIa, η οποία οδηγεί σε ανεξέλεγκτη σηματοδότηση επιβίωσης και β) η καταστολή απόπτωσης μέσω έκφρασης μελών της οικογένειας των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών BCL2 (57).

Όσον αφορά την οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ), έχει παρατηρηθεί παρόμοια ογκογόνος δράση του MEF2C με αντίστοιχη ογκοκατασταλτική δράση του πυρηνικού υποδοχέα NR4A. Έμμεση ένδειξη της μιτογόνου δράσης του MEF2C αποτελεί η αξιοσημείωτη ουδετεροφιλία που παρατηρείται σε ποντίκια που δεν εκφράζουν miR-223. Αυτή έχει αποδειχθεί ότι οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα του MEF2C. Το φαινόμενο αυτό είναι σύμφωνο με την υπερέκφραση του MEF2C κατά την εκτροπή των μονοκυτταρικών-κοκκιοκυτταρικών προγονικών κυττάρων προς λευχαιμικά αρχέγονα κύτταρα, αναγκαία αλλά όχι ικανή συνθήκη για τη διατήρηση της ογκογονικότητας των λευχαιμικών αρχέγονων κυττάρων. Ένας άλλος μηχανισμός ογκογόνου δράσης του MEF2C σχετίζεται με την φωσφορυλίωσή του στη σερίνη 222, η οποία έχει συσχετιστεί με χημειοαντοχή σε ασθενείς με ΟΜΛ. Ποντίκια με S222A/S222A παρουσίασαν αντίσταση στη λευχαιμογένεση, γεγονός που καταδεικνύει τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του MEF2C, όταν αυτός δεν είναι φωσφορυλιωμένος στην σερίνη 222 (59).

2.5 Μεταγραφική λειτουργία σε συμπαγείς όγκους

Η λειτουργία του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C στην ογκογένεση έχει εξεταστεί και σε διάφορους συμπαγείς όγκους. Αρχικά, στον καρκίνο του μαστού, η έκφρασή του φαίνεται να συνδέεται με την δυνατότητα διήθησης του όγκου. Η εξαρτώμενη από τον παράγοντα MEF2C πυρηνική συσσώρευση της β-κατενίνης και η ρύθμισή του από το miR-223 εξηγούν τον προ-αγγειογενετικό ρόλο του παράγοντα αυτού. Πιο συγκεκριμένα, έχουν παρατηρηθεί μακροφάγα σχετιζόμενα με τον καρκίνο που απελευθερώνουν εξωσώματα πλούσια σε miR-223. Αυτό το μόριο προάγει τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων του μαστού πιθανότατα μέσω ρύθμισης του παράγοντα MEF2C και της σύνδεσης με την β-κατενίνη (60).

Δεύτερον, αξίζει να αναφερθεί η μελέτη του MEF2C στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, όπου παρατηρείται να υπερεκφράζεται δρώντας τόσο ογκογόνα όσο και ογκοκατασταλτικά. Από τη μία συμμετέχει στη διήθηση και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων με τη συμμετοχή των σηματοδοτικών μονοπατιών p38/MAPK και πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και στην εξαρτώμενη από τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) αγγειογένεση, ενώ από την άλλη δρα αρνητικά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αναστέλλοντας την πυρηνική μεταφορά της β-κατενίνης και το αντίστοιχο σηματοδοτικό μονοπάτι (61). Σε πρόσφατη μελέτη, η έγχυση σε ποντικούς ηπατοκυτταρικών καρκινικών κυττάρων, που υπερεκφράζουν τον παράγοντα MEF2C είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη βραδέως πολλαπλασιαζόμενων, αλλά υψηλής κακοήθειας καρκινωμάτων.

Η διπλή δράση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C έχει παρατηρηθεί και στο ραβδομυοσάρκωμα. Τα ραβδομυοσάρκωμα αποτελούν τον πιο συχνό τύπο σαρκώματος μαλακών μορίων στα παιδιά και χωρίζονται σε 2 κύριες ιστολογικές υποκατηγορίες: το *εμβρυϊκό* που εμφανίζεται σε μικρότερη ηλικία συνήθως και έχει καλύτερη πρόγνωση και το *κυψελιδικό* που εμφανίζεται κυρίως σε εφήβους και έχει χειρότερη πρόγνωση (62). Έχουν παρατηρηθεί δύο παραλλαγές του MEF2C, οι οποίες διαμορφώνονται από τα εξώνια α1 και α2 ως MEF2Ca1 και MEF2Ca2, με τη δεύτερη να εκφράζεται κυρίως στα μυϊκά κύτταρα. Στα ραβδομυοσάρκωμα ο λόγος α1/α2 είναι σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τους φυσιολογικούς μυοβλάστες. Η ισομορφή MEF2Ca1 αλληλεπιδρά πιο ισχυρά με την αποακετυλάση των ιστονών HDAC5 και τη στρατολογεί στους προαγωγούς μυογόνων γονιδίων καταστέλλοντας έτσι την έκφραση γονιδίων των μυϊκών κυττάρων. Από την άλλη, η υπερέκφραση της ισομορφής MEF2Ca2 σε κύτταρα ραβδομυοσάρκωμα αυξάνει τη μυογονική δραστηριότητα και προάγει τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων (63).

Στα ραβδομυοσαρκώματα έχει μελετηθεί, επίσης, η συσχέτιση της έκφρασης του MEF2C με το σηματοδοτικό μονοπάτι NOTCH1. Πιο συγκεκριμένα, σε εμβρυικά ραβδομυοσαρκώματα, η ενεργοποίηση του NOTCH1 μονοπατιού προκαλεί την αυξορρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων SNAIL, γεγονός που εμποδίζει τη μυϊκή διαφοροποίηση (64). Σε αυτή την αποδιαφοροποίηση συμβάλλει η καταστολή του MEF2C τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο ενεργοποίησης. Ένας άλλος μηχανισμός ελαττωματικής έκφρασης MEF2C μπορεί να προκαλείται από την απώλεια της σύνδεσης του ρυθμιστικού παράγοντα MYOD στον υποκινητή του και σε ρυθμιστικές περιοχές (65). Βέβαια, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους συνδέονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια και η ρύθμιση του MEF2C χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Επιπλέον στοιχεία της επίδρασης του MEF2C σε άλλους συμπαγείς όγκους έχουν μελετηθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στα λεμφώματα. Στον πρώτο έχει παρατηρηθεί αυξορρύθμιση του MEF2C κατά την πρόοδο νόσου. Αντίθετα, στα δεύτερα παρατηρείται μειορρύθμιση με αποτέλεσμα η ανασταλτική του δράση στο γονίδιο SIX1 να μειώνεται. Στο πλαίσιο αυτού του μηχανισμού, έχει παρατηρηθεί ασυνήθιστη ενεργοποίηση του γονιδίου αυτού στο 12% των ασθενών με επακόλουθη απενεργοποίηση αναπτυξιακών γονιδίων (66). Συμπερασματικά, ο μεταγραφικός παράγοντας MEF2C παρουσιάζει ταυτόχρονα προ-ογκογόνες και ογκοκατασταλτικές επιδράσεις, ανάλογα με το καρκινικό υπόβαθρο και τον μηχανισμό απορρύθμισης της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου.

2.6 MEF2C και miR-223

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η συσχέτιση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C και του miR-223 έχει μελετηθεί σε διάφορους ιστούς (67). Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι η υπερέκφραση του miR-223 σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευσή τους μέσω -τουλάχιστον εν μέρει- της άμεσης καταστολής του mRNA Mef2c και της πρωτεΐνης RHOB. Αντίθετα, η ογκοκατασταλτική δράση του miR-223 έχει μελετηθεί στη σπογγοειδή μυκητίαση (δερματικό T λέμφωμα) μέσω μειορρύθμισης των E2F1, MEF2C and TOX εμποδίζοντας έτσι την εξέλιξη της νόσου. Επίσης, στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, ο μεταγραφικός παράγοντας miR-223 καταστέλλεται μέσω ενός μηχανισμού σχετιζόμενου με το χιμαιρικό γονίδιο BCR/ABL (12, 68, 69). Ακολουθεί αυξορρύθμιση του MEF2C συμβάλλοντας στην εξέλιξη της νόσου. Παρόμοιος μηχανισμός δράσης παρατηρείται στα μυελοειδή προγονικά κύτταρα, όπου ο Mef2c αποτελεί στόχο του miR-223 προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των μυελοειδών

προγονικών κυττάρων. Αντιστρόφως, η γενετική απόσπαση του Mef2c καταστέλλει την προγονική επέκταση και διορθώνει τον ουδετερόφιλο φαινότυπο στους miR-223 μεταλλαγμένους ποντικούς (70). Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, και στον καρκίνο του μαστού έχει παρατηρηθεί μηχανισμός σύνδεσης του παράγοντα miR-223 με τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων πιθανότατα μέσω ρύθμισης του παράγοντα MEF2C και της σύνδεσης με την β-κατενίνη (60). Συνοπτικά, αυτή η αρνητική συσχέτιση των παραγόντων MEF2C και miR-223 μπορεί να αποτελέσει μηχανισμός στοχευμένης θεραπείας σε διάφορους καρκινικούς ιστούς, ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης του MEF2C σε κάθε παθολογικό ιστό.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. Πειραματική Εργασία

3.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C σε τομές παραφίνης ασθενών που πάσχουν DLBCL χρησιμοποιώντας διαγνωστικό υλικό εγκλεισμένο σε κύβους παραφίνης από το αρχείο του Β'Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Π.Γ.Ν. Αττικών. Ταυτόχρονα, θα μελετηθεί η συσχέτιση της έκφρασης αυτής με τα κλινικά, εργαστηριακά και άλλα παθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών αυτών.

3.2 Υλικό και μέθοδοι

3.2.1. Κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα

Στην παρούσα εργασία, εντάχθηκαν 87 ασθενείς που έπασχαν από DLBCL και διεγνώστηκαν στο Β'Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Π.Γ.Ν. Αττικών. Οι ασθενείς αυτοί παρακολούθηθηκαν και αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά στην Αιματολογική Μονάδα της Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Π.Γ.Ν. Αττικών κατά τη χρονική περίοδο 2003-2017. Συμπεριλήφθηκαν ασθενείς όλων των σταδίων και των εντοπίσεων της νόσου, ανεξαρτήτως συννοσηροτήτων, ηλικίας και κλινικής κατάστασής τους. Σε όλους τους ασθενείς είχε προηγηθεί της θεραπείας ιστολογική επιβεβαίωση την νόσου είτε από συμπαγή όργανα είτε από λεμφαδενικό ιστό. Εν συνεχεία, οι ασθενείς έλαβαν συνδυασμό χημειοθεραπείας και ανοσοθεραπείας (R-CHOP ή R-CNOP). Ένας ασθενής υπεβλήθη σε ολική γαστρεκτομή και δύο ασθενείς σε ακτινοθεραπεία. Όλοι οι ασθενείς παρακολούθηθηκαν εν συνεχεία με απεικονιστικό, εργαστηριακό και κλινικό επανέλεγχο μετά το τέλος της θεραπείας και εν συνεχεία ανά 3-6 μήνες μέχρι την πρόοδο/υποτροπή της νόσου ή τον θάνατο.

Οι ασθενείς αξιολογήθηκαν ως προς την ανταπόκριση στη θεραπεία, την παρουσία υποτροπής ή προόδου νόσου, την ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση και τη συνολική επιβίωση. Η ελεύθερη νόσου επιβίωση (Disease Free Survival-DFS) ορίζεται ως το χρονικό διάστημα από την ημερομηνία πρώτης ύφεσης έως την ημερομηνία προόδου/υποτροπής νόσου, ενώ η συνολική επιβίωση (Overall Survival-OS) ορίζεται το χρονικό διάστημα από

την ημερομηνία πρώτης ύφεσης έως το θάνατο ή την τελευταία παρακολούθηση του ασθενούς.

Όσον αφορά τα κλινικά χαρακτηριστικά τους, αυτά περιλάμβαναν την ηλικία, το φύλο, τη φυσική κατάσταση του ασθενούς (ECOG Performance Status), το στάδιο της νόσου κατά Ann Arbor, τον αριθμό και το σύστημα των εξωλεμφαδενικών εντοπίσεων και την παρουσία Β συμπτωμάτων. Τα εργαστηριακά χαρακτηριστικά αποτελούνταν από την LDH, την αιμοσφαιρίνη (Hb), τα λευκά αιμοσφαίρια (WBC), τα ουδετερόφιλα, τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα αιμοπετάλια (PLT) και τη β2-Μικροσφαιρίνη (β2Μ). Τέλος, ιστολογικά και ανοσοϊστοχημικά εκτιμήθηκαν οι ιστοί ως προς την προέλευση του λεμφώματος (origin: GCB, non-GCB), τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki 67 και το μεταγραφικό παράγοντα MEF2C.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών αξιολογήθηκαν ως προς την πρόγνωση βάσει του Διεθνούς Προγνωστικού Δείκτης (IPI), του αντίστοιχου προσαρμοσμένου σε ηλικία (aa-IPI), του αναθεωρημένου Διεθνούς Προγνωστικού Δείκτης (R-IPI) και του Διεθνούς Προγνωστικού Δείκτη του Εθνικού Κέντρου Συντονισμού για την αντιμετώπιση του Καρκίνου των ΗΠΑ (NCCN-IPI).

3.2.2. Μονιμοποίηση ιστών-ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Τα ιστοικά δείγματα μετά την εξαίρεσή τους μονιμοποιήθηκαν σε τιτλοποιημένο (buffered) διάλυμα 10% φορμόλης του εμπορίου. Εξαίρεση αποτελούν τα δείγματα οστεομυελικής βιοψίας τα οποία μονιμοποιήθηκαν και αφαλατώθηκαν σε μονιμοποιητικό οξέος-ψευδάργυρου-φορμόλης (Acid-Zinc-Formalin, AZF) για τουλάχιστον τρεις ώρες και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με άφθονο νερό. Επιπροσθέτως, τα δείγματα που εμπεριείχαν οστίτη ιστό μετά την 48ωρη μονιμοποίησή τους σε διάλυμα 10% φορμόλης, αφαλατώθηκαν σε DECAL για τουλάχιστον τρεις ώρες και εν συνεχεία ξεπλύθηκαν με άφθονο νερό. Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε επανεκτίμηση της διάγνωσης και επιλογή χαρακτηριστικών θέσεων σε τομές με χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης, με την βοήθεια πεπειραμένου παθολογοανατόμου. Από τους αντίστοιχους κύβους παραφίνης πάρθηκαν τομές πάχους 4μm, στις οποίες ακολούθησε ανοσοϊστοχημική χρώση με το αντίσωμα MEF2C (phospho S396) antibody (ab78888) Rabbit polyclonal, εταιρία Abcam, σε αραιώση 1:100.

Η ακριβής διαδικασία ανοσοϊστοχημικής χρώσης είναι η εξής:

1) Αρχικά έγινε αποπαραφίνωση των πλακιδίων σε κλίβανο (θερμοκρασία 65°C) επί 2 ώρες και στη συνέχεια με εμβάπτιση σε Ξυλόλη (3x5min), ενώ ακολούθησε ενυδάτωση με

διαδοχική εμβάπτιση των τομών σε κατιούσα σειρά διαλυμάτων αιθυλικής αλκοόλης (100°, 96°, 80°, 70°, 50°) και σε απιονισμένο ύδωρ.

2) Εν συνεχεία, ακολούθησε ανάκτηση αντιγονικών επιτόπων στο μηχάνημα PTLINK της Dako, στο οποίο τοποθετήθηκαν οι τομές εμβάπτισμένες στο ειδικό διάλυμα Target Retrieval Solution Low pH (pH=6) (K8004, Dako) με αραιώση 30ml του διαλύματος σε 1500ml απεσταγμένου ύδατος και επακολούθησε βρασμός στους 97°C για 20 λεπτά. Οι τομές αφέθηκαν μέχρις ότου η θερμοκρασία πλησιάσει στους 60°C και τοποθετήθηκαν επί 10 λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) TBS (αποτελούμενο από 20mM Tris-Cl pH=7,6 και 138mM NaCl.)

3) Η αυτοματοποιημένη διαδικασία χρώσης στο μηχάνημα AutostainerLink 48 της DAKO που ακολούθησε, περιλαμβάνει την εξής διαδικασία:

- Επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα (30 λεπτά)
- Έκπλυση με buffer (2 x 5 λεπτά)
- Διάλυση σε διάλυμα δέσμευσης ενδογενούς υπεροξειδάσης (Peroxidase blocking reagent) (10 λεπτά)
- Έκπλυση με buffer (2 x 5 λεπτά)
- Επώαση με το ειδικό διάλυμα Envision flex/HRP (K5007, DAKO), συζευγμένο με υπεροξειδάση πολυμερές, το οποίο περιέχει επίσης μόρια δευτεροταγούς αντισώματος στρεφόμενου έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού ή κονίκλου (30 λεπτά)
- Έκπλυση με buffer (2 x 5 λεπτά)
- Επώαση με το χρωμογόνο διαμινοβενζιδίνη (DAB) με υπεροξειδίο του υδρογόνου ως υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (Envision TM kit, Dako) (5 λεπτά)
- Έκπλυση με απιονισμένο ύδωρ (5 λεπτά)
- Έκπλυση με buffer (5 λεπτά)

4) Τα τελικά στάδια της χρώσης είναι:

- Αντίχρωση με εμβάπτιση σε διάλυμα Αιματοξυλίνης (1 λεπτό)
- Έκπλυση με απιονισμένο ύδωρ (5 λεπτά)
- Αφυδάτωση με εμβάπτισεις σε ανιούσα σειρά διαλυμάτων αιθυλικής αλκοόλης (50°, 70°, 80°, 96° και 100°)
- Εμβάπτιση σε διάλυμα ξυλόλης και κάλυψη της τομής με καλυπτρίδα, στην οποία έχει τοποθετηθεί τεχνητό υποκατάστατο βαλσάμου Καναδά (Entellan).

Για όλες τις ανωτέρω παθολογοανατομικές διαδικασίες και τεχνικές τηρήθηκαν οι εκάστοτε προβλεπόμενες αρχές και διαδικασίες διασφάλισης ποιότητας (Quality assurance), όπως

αυτές περιγράφονται σε σχετικά εγχειρίδια του Β`Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Π.Γ.Ν. Αττικών.

3.2.3. Αξιολόγηση δειγμάτων

Η μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων έγινε με οπτικό μικροσκόπιο Carl Zeiss AxioStar plus σε μεγεθύνσεις έως 40x. Σε κάθε δείγμα αξιολογήθηκε η ανοσοθετικότητα για τον μεταγραφικό παράγοντα MEF2C και συγκεκριμένα η ένταση της χρώσης σε σύγκριση με ιστολογικές τομές - μάρτυρες από φυσιολογικό λεμφαδενικό ιστό. Η εκτίμηση της πυρηνικής ανοσοθετικότητας κατηγοριοποιήθηκε ως εξής:

- αρνητική (κατηγορία έντασης =0),
- ασθενώς θετική (κατηγορία έντασης =1),
- μετρίως θετική (κατηγορία έντασης =2) και
- ισχυρά θετική (κατηγορία έντασης =3).

Σε κάθε κατηγορία έγινε καταγραφή του ποσοστού των ανοσοθετικών κυττάρων της αντίστοιχης έντασης χρώσης σε σχέση με το σύνολο των κυττάρων του νεοπλάσματος. Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκε η ημιποσοτική μέθοδος του H score ως εξής:

$$\mathbf{H\ score = (\% \text{ των κυττάρων της κατηγορίας έντασης } 1 \times 1) + (\% \text{ των κυττάρων της κατηγορίας έντασης } 2 \times 2) + (\% \text{ των κυττάρων της κατηγορίας έντασης } 3 \times 3)}$$

Το τελικό αποτέλεσμα ποσοτικοποίησης την έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα κυμαίνεται από 1 έως 300 και αναδεικνύει εν συνόλω αξιόπιστα την ένταση της ανοσοθετικότητας του νεοπλάσματος.

3.2.4. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των κλινικών, εργαστηριακών, ιστολογικών και ανοσοϊστοχημικών δεδομένων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η πολυπαραγοντική συσχέτισή τους καθώς και η ανάλυση επιβίωσης πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού στατιστικής ανάλυσης δεδομένων *IBM SPSS Statistics (Statistical Package for the Social Sciences) version 23.0*.

Πιο συγκεκριμένα, για τον έλεγχο των κατανομών επιβίωσης ανάμεσα στις κατηγορίες των ασθενών της παρούσας εργασίας σε σχέση με το θάνατο και την πρώτη υποτροπή της νόσου δημιουργήσαμε καμπύλες επιβίωσης *Kaplan-Meier*. Οι ειδικές καμπύλες επιβίωσης

συγκρίθηκαν με τη δοκιμασία *log Rank (Mantel-Cox)*. Για την επίδραση ποιοτικών μεταβλητών σε μια άλλη χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό κριτήριο χ^2 (*Chi square test*). Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε τους συντελεστή συσχέτισης *Pearson* και *Spearman* για την ανάλυση συσχέτισης ποσοτικών μεταβλητών. Η κανονικότητα κατανομής της έκφρασης του παράγοντα MEF2C ελέγχθηκε με τα κριτήρια *Kolmogorov-Smirnov* και *Shapiro-Wilk*. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της έκφρασης του παράγοντα MEF2C ως προς τον θάνατο εκτιμήθηκε με την *καμπύλη χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (ROC curve)*.

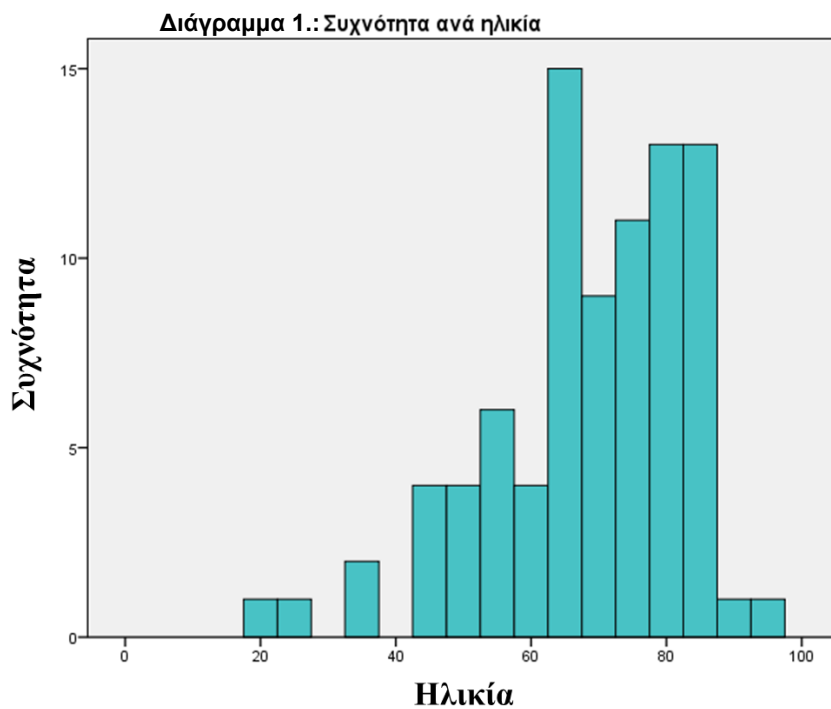
Για τη σύγκριση μιας διχοτομικής μεταβλητής με συνεχή μεταβλητή με κανονική κατανομή και για σύγκριση μέσων τιμών μεταβλητών από ανεξάρτητα δείγματα που ακολουθούν κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *independent samples t-test*, ενώ για το μη παραμετρικό έλεγχο της ισότητας δύο μέσων τιμών μεταβλητών ανεξάρτητων δειγμάτων, τα οποία όμως δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, η μέθοδος *independent samples Mann-Whitney U Test*. Τέλος, για τον έλεγχο σχέσης μεταξύ μιας συνεχούς μεταβλητής με μια κατηγορική, η οποία έχει περισσότερες από δύο κατηγορίες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *One way ANOVA* για ανεξάρτητα δείγματα, ενώ ο αντίστοιχος μη παραμετρικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο *independent samples Kruskal-Wallis Test*.

Για την κρίση των μηδενικών υποθέσεων επιλέξαμε 95% διάστημα εμπιστοσύνης, ενώ το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (*p-value*) τέθηκε στο $p < 0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις.

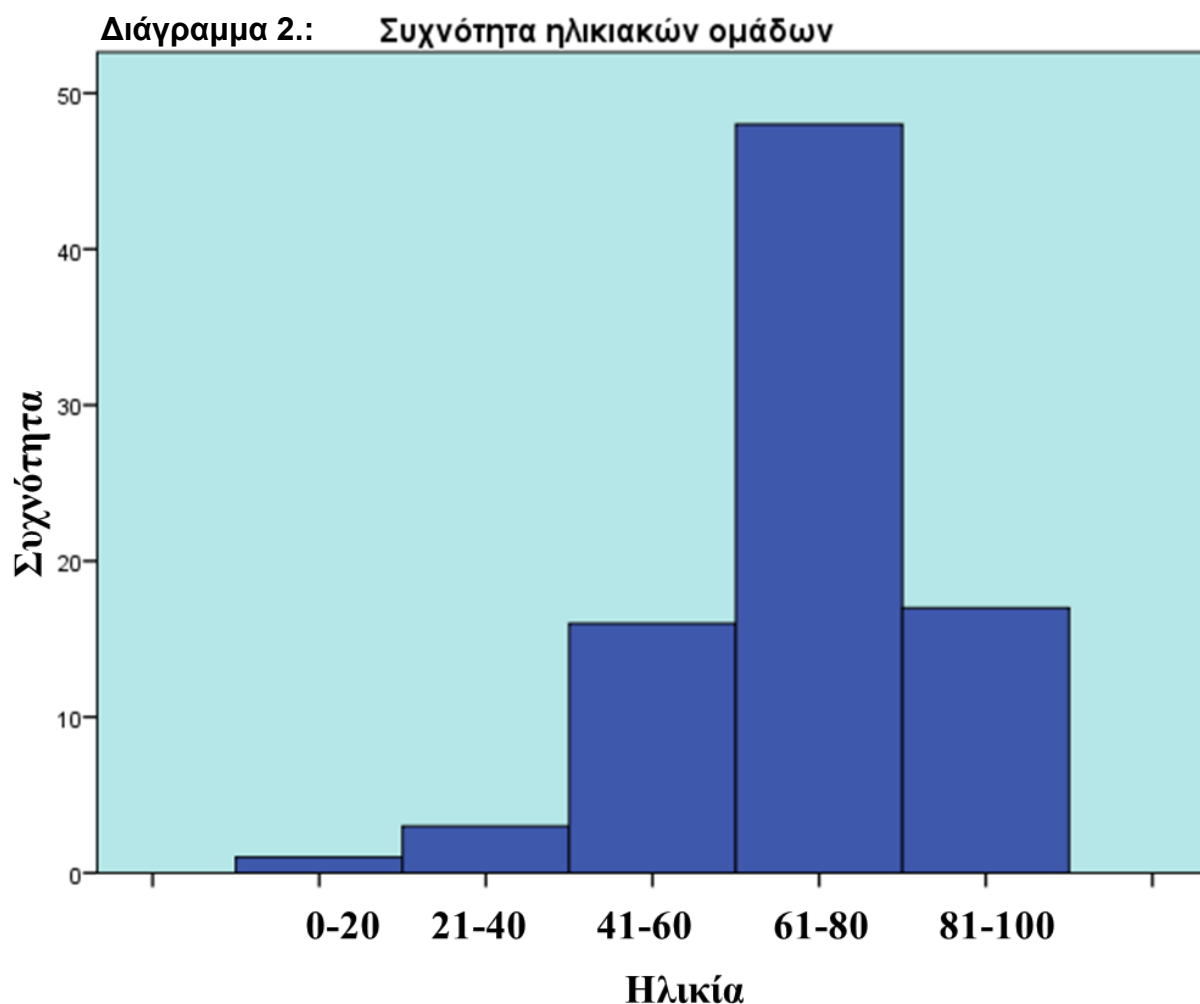
4. Αποτελέσματα

4.1 Κλινικά δεδομένα

Ο αριθμός των ασθενών που εντάχθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία είναι 87. Από αυτούς οι 35 (40.2%) ήταν γυναίκες και οι 52 (59.8%) άνδρες. Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης της νόσου ήταν τα 68 έτη, με μικρότερη ηλικία τα 20 έτη και μεγαλύτερη τα 93 έτη και με κατανομή των ασθενών σε ηλικιακές ομάδες όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1. που ακολουθεί.



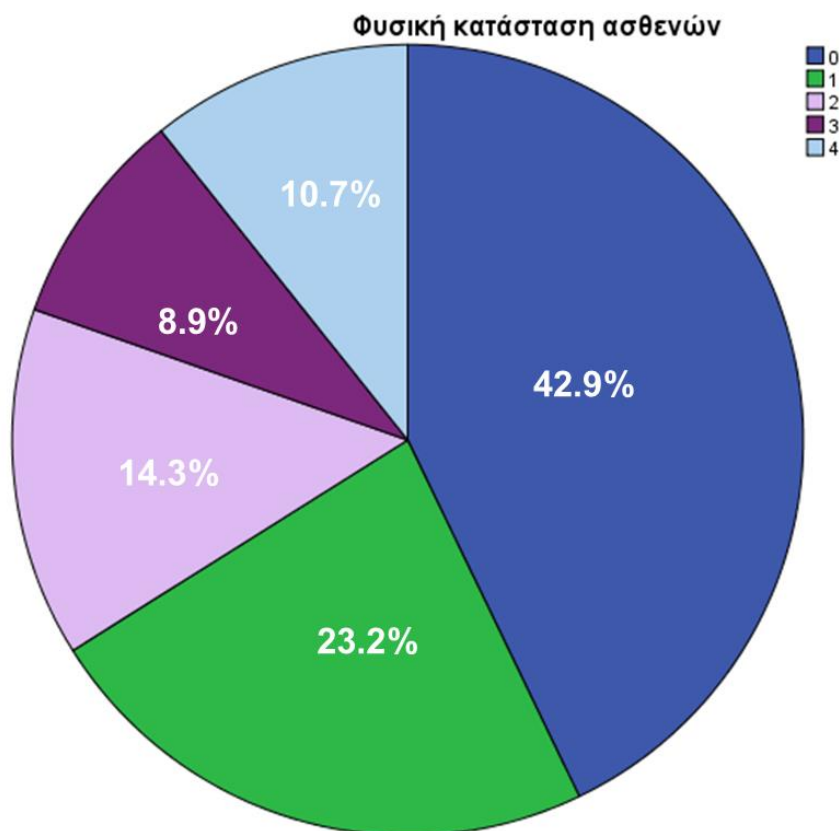
Στο σύνολο των ασθενών, η μεγαλύτερη επίπτωση εμφανίστηκε στην ηλικιακή ομάδα των 61-80 ετών με ποσοστό 56.5% και ακολούθησε η ηλικιακή ομάδα 81-100 ετών με ποσοστό 20%. Σε ποσοστό 18.8% οι ασθενείς ήταν ηλικίας 41-60 ετών, ενώ μόνο το 4.7% ήταν ηλικίας μικρότερης των 40 ετών (διάγραμμα 2.).



Το στάδιο της νόσου ήταν γνωστό σε 55 ασθενείς, από τους οποίους οι 28 είχαν νόσο σταδίου I-II και οι 27 σταδίου III-IV με αντίστοιχα ποσοστά 50.9% και 49.1%. Η φυσική κατάσταση (ECOG performance status) των ασθενών αυτών φαίνεται στον πίνακα 7. και στο διάγραμμα 3.

| ECOG Performance Status | Συχνότητα | Ποσοστό % |
|-------------------------|-----------|-----------|
| 0 | 24 | 42.9 |
| 1 | 13 | 23.2 |
| 2 | 8 | 14.3 |
| 3 | 5 | 8.9 |
| 4 | 6 | 10.7 |

Πίνακας 7.: Συχνότητα και ποσοστά φυσικής κατάστασης ασθενών



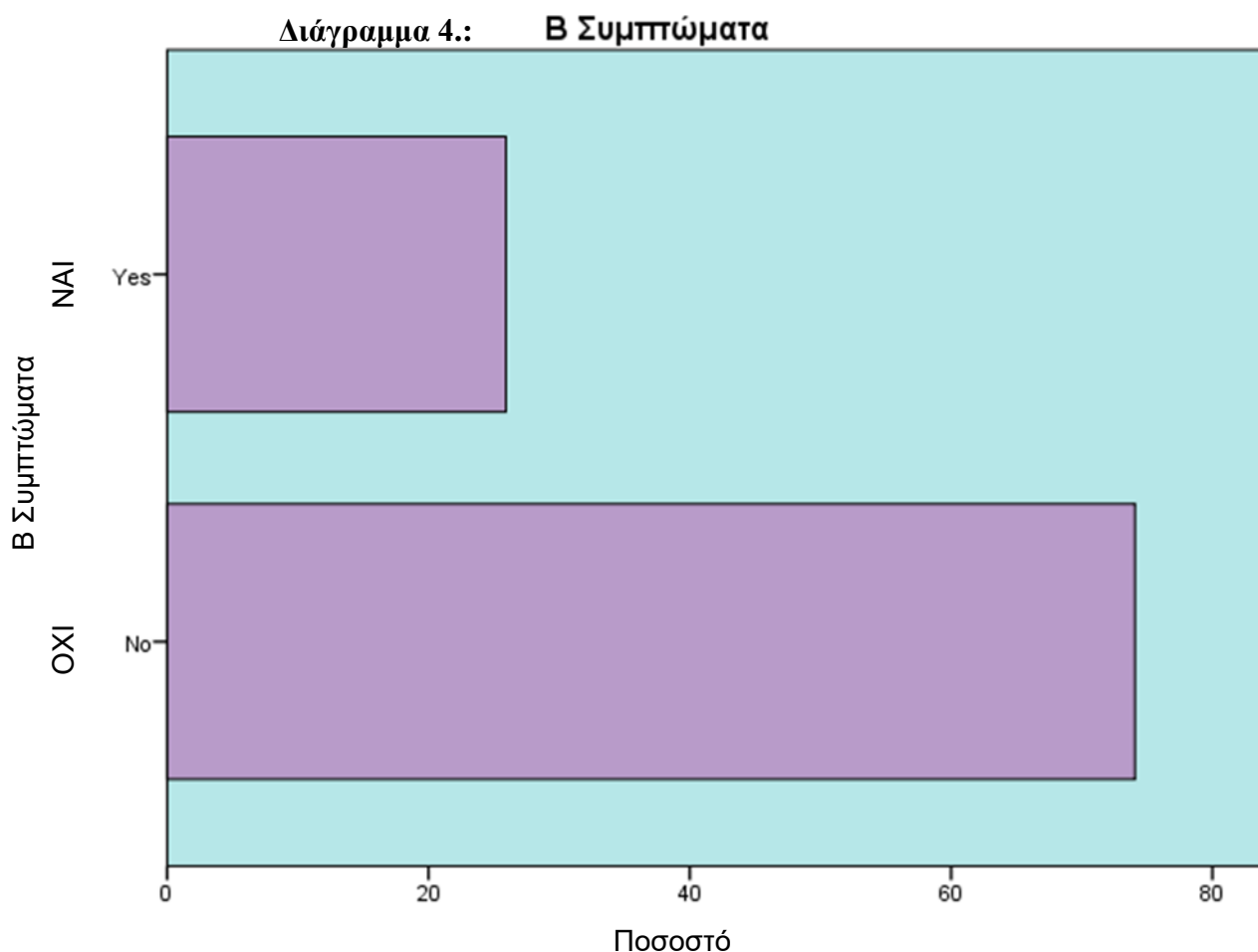
Διάγραμμα 3.: Διάγραμμα ποσοστών φυσικής κατάστασης ασθενών

Αναφορικά με τις εξωλεμφαδενικές εντοπίσεις των ασθενών αυτές ως προς τον αριθμό τους, κυμάνθηκαν από 0 έως 3 με αντίστοιχη συχνότητα ως εξής: καμία εξωλεμφαδενική εντόπιση σε ποσοστό 39.6% των ασθενών, μια εντόπιση σε ποσοστό 41.5%, δύο σε ποσοστό 7.5% και 3 εντοπίσεις στο 11.3% των ασθενών. Οι σημαντικότερες εξωλεμφαδενικές εντοπίσεις φαίνονται στον πίνακα 8.

| Εξωλεμφαδενικές εντοπίσεις | Αριθμός ασθενών (n=55) |
|--|------------------------|
| Στόμαχος | 10 |
| Αμυγδαλή | 4 |
| Στοματική κοιλότητα και λοιπός στοματοφάρυγγας | 5 |
| Παραρρίνιοι κόλποι και ρινοφάρυγγας | 4 |
| Ήπαρ | 4 |
| Οστά | 4 |
| Σπλήνας | 2 |
| Όρχεις | 2 |
| Κεντρικό Νευρικό Σύστημα | 1 |

Πίνακας 8.: Εξωλεμφαδενικές εντοπίσεις

Τέλος, τα αντίστοιχα ποσοστά των ασθενών που παρουσίασαν Β συμπτωματολογία παρατηρούνται στο διάγραμμα 4. Πιο συγκεκριμένα, το 74,1% των ασθενών παρουσιάζουν Β συμπτώματα, ενώ το υπόλοιπο 25.9% όχι.



4.2 Εργαστηριακά δεδομένα

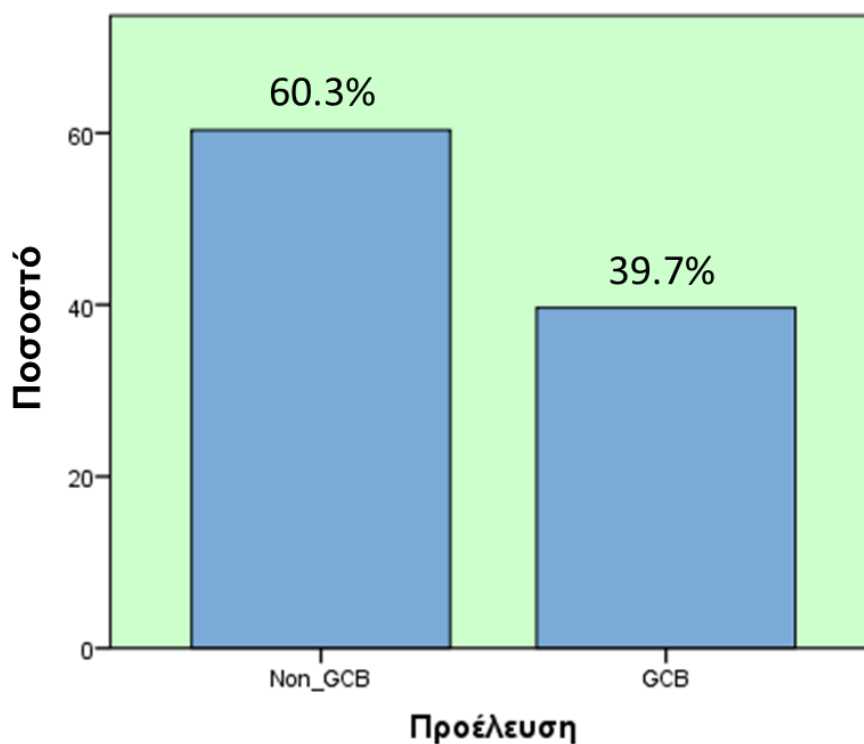
Ως προς τα εργαστηριακά δεδομένα, τα οποία αξιολογήθηκαν σε 50 ασθενείς, αξίζει να σημειωθούν τα δεδομένα των τιμών της LDH, καθώς αποτελεί μεταβλητή της αξιολόγησης του διεθνούς προγνωστικού δείκτη και των παραλλαγών του. Αυτή παρατηρήθηκε εντός φυσιολογικών τιμών κατά τη διάγνωση της νόσου σε ποσοστό 25% των ασθενών, ενώ στο υπόλοιπο 75% η τιμή ξεπερνούσε το τριπλάσιό της σε ποσοστό 19.23%. Οι υπόλοιπες εργαστηριακές εξετάσεις και οι τιμές τους συνοψίζονται στον πίνακα 9.

Ιστολογικά και ανοσοϊστοχημικά, οι ασθενείς εκτιμήθηκαν ως προς την προέλευση του λεμφώματος (origin), δηλαδή ως προς τον τύπο Β κυτάρου βλαστικού κέντρου και μη

βλαστικού κέντρου, με τη χρήση του αλγορίθμου Hans. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο διάγραμμα 5.

| Εργαστηριακές εξετάσεις | Παθολογικές τιμές | Αριθμός ασθενών (n=50) | Ποσοστό ασθενών |
|-------------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------|
| Αιμοσφαιρίνη | < 10 g/dL | 6 | 12% |
| Αιμοπετάλια | < 100.000/mm ³ | 0 | 0% |
| Λευκά Αιμοσφαίρια | <4.000/mm ³ | 1 | 2% |
| Ουδετερόφιλα | < 2.000/mm ³ | 1 | 2% |
| Λεμφοκύτταρα | < 1.000/mm ³ | 12 | 24% |
| Μονοκύτταρα | <8% των λευκών αιμοσφαιρίων | 33 | 66% |
| B2-μικροσφαιρίνη | >3,5mg/dL | 18 (n=34) | 53% |

Πίνακας 9.: Παθολογικές τιμές εργαστηριακών εξετάσεων ασθενών με DLBCL

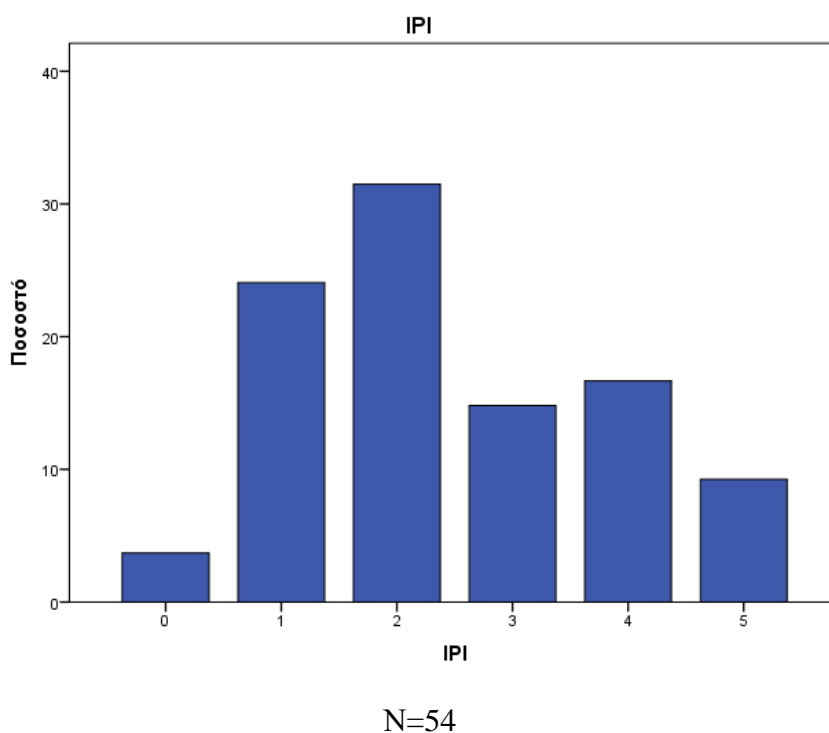


Διάγραμμα 5.: Διάγραμμα προέλευσης DLBCL

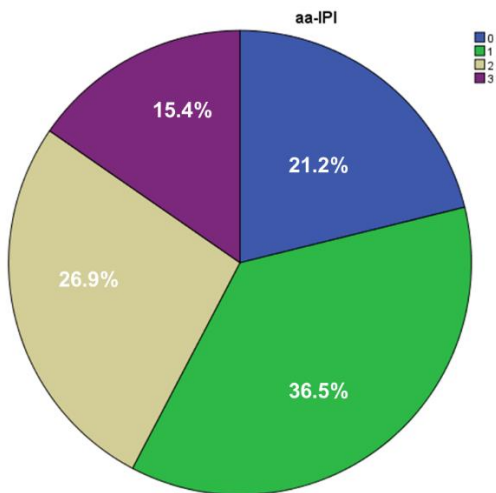
Όσον αφορά τις συσχετίσεις των κλινικοεργαστηριακών δεδομένων, φαίνεται να σχετίζεται η ηλικία με τη φυσική κατάσταση του ασθενούς, το συνολικό χρόνο επιβίωσης και την ανταπόκριση στην θεραπεία ($p=0.012$, $p=0.021$ και $p=0.009$ αντίστοιχα). Επίσης, ο αριθμός των αιμοπεταλίων κατά τη διάγνωση σχετίζεται με τον αντίστοιχο αριθμό των ουδετεροφίλων και των μονοκυττάρων, καθώς και με τη φυσική κατάσταση και την ανταπόκριση των ασθενών ($p=0.000$, $p=0.000$, $p=.024$ και $p=0.023$ αντίστοιχα).

4.3 Διεθνής Προγνωστικός Δείκτης (IPI) και οι παραλλαγές του (R-IPI, aa-IPI, NCCN-IPI)

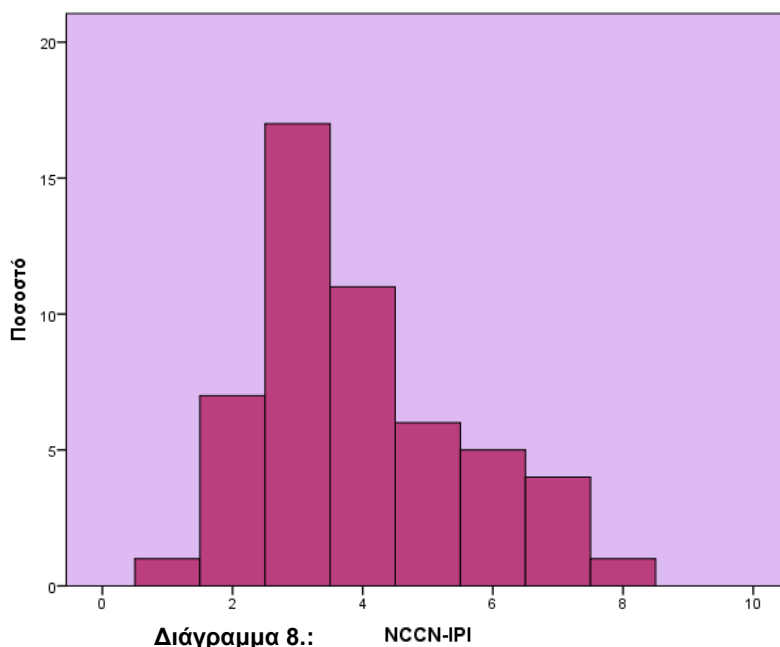
Από τους ασθενείς που εντάχθηκαν στην παρούσα εργασία, οι 52 εκτιμήθηκαν με βάση τους προγνωστικούς παράγοντες του Διεθνούς Προγνωστικού Δείκτη (IPI) και των παραλλαγών του, όπως περιγράφηκε στο αρχικό κεφάλαιο της εργασίας. Η εκτίμηση αυτή παρατηρείται στα παρακάτω διαγράμματα:



Διάγραμμα 6.:Κατανομή ασθενών με βάση τον Διεθνή Προγνωστικό Δείκτη



Διάγραμμα 7.: age-adjusted IPI



Διάγραμμα 8.: NCCN-IPI

Εν συνεχεία, οι ασθενείς αυτοί κατηγοριοποιήθηκαν στις ομάδες χαμηλού κινδύνου, ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου και των συνδυασμών τους, σύμφωνα με τον συγκεντρωτικό πίνακα 10.

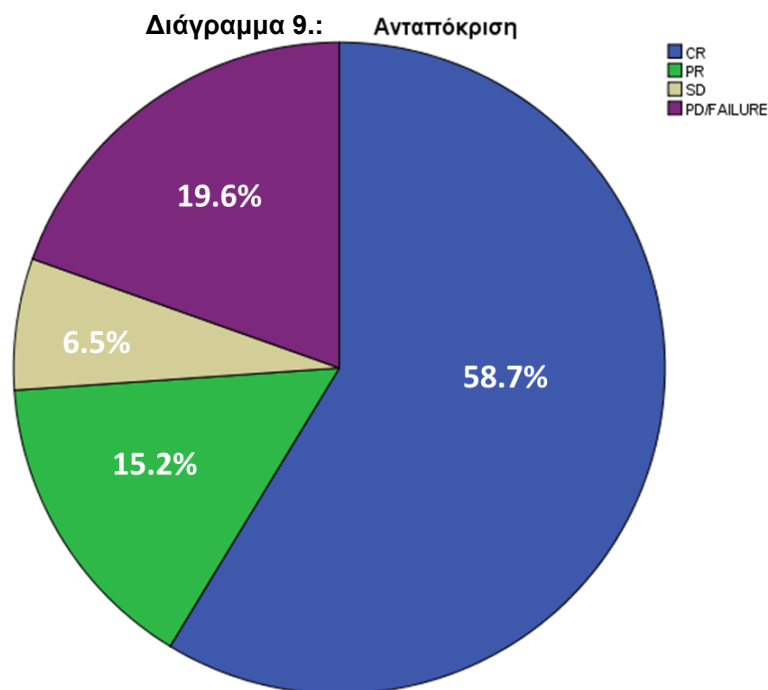
| Κατηγορίες | IPI | aa-IPI | R-IPI | NCCN-IPI |
|-----------------------------|-------|--------|-------|----------|
| Χαμηλού κινδύνου | 26.9% | 19.2% | 9.6% | 1.9% |
| Χαμηλού-ενδιάμεσου κινδύνου | 32.7% | 38.5% | 50% | 46.2% |
| Ενδιάμεσου-υψηλού κινδύνου | 13.5% | 26.9% | | 32.7% |
| Υψηλού κινδύνου | 26.9% | 15.4% | 40.4% | 19.2% |

Πίνακας 10.: Κατηγοριοποίηση ασθενών κατά τον Διεθνή Προγνωστικό Δείκτη και των παραλλαγών του

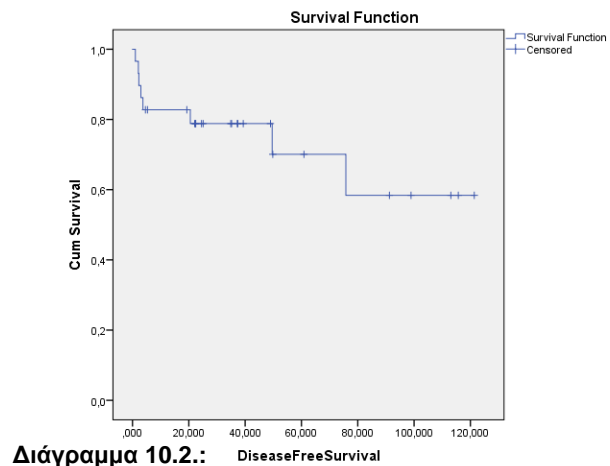
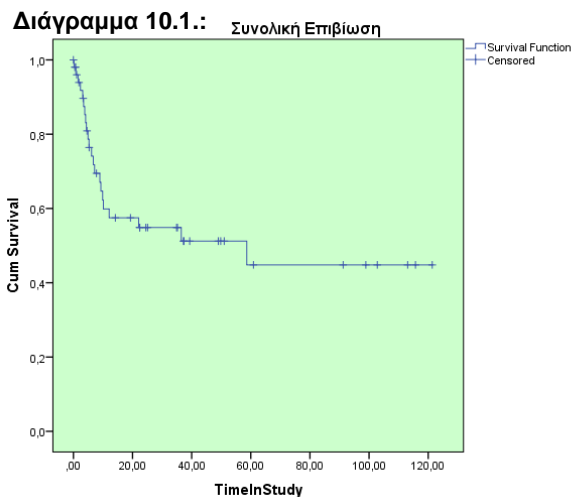
4.4 Θεραπεία και ανταπόκριση

Ύστερα από την ιστολογική διάγνωση και τη σταδιοποίηση της νόσου, οι ασθενείς της παρούσας εργασίας έλαβαν χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία ή/και υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση. Πιο συγκεκριμένα, 54 από τους ασθενείς έλαβαν τουλάχιστον έναν κύκλο χημειοθεραπείας με τα σχήματα R-CHOP και/ή R-CNOP έως και 8 κύκλους. Από αυτούς, σε 2 ασθενείς που έλαβαν συνολικά 8 κύκλους χημειοθεραπείας ακολούθησε θεραπεία συντήρησης με Rituximab. Ένας ασθενής υπεβλήθει σε ολική γαστρεκτομή και 2 ασθενείς σε ακτινοθεραπεία, από τους οποίους ο ένας έλαβε παρηγορητική ακτινοθεραπεία κοτύλης λόγω άλγους και ο δεύτερος ακτινοβολία ολικού κρανίου λόγω συμμετοχής στη νόσο του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος.

Η ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία τους ήταν διαθέσιμη σε 46 ασθενείς, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 9. Πιο συγκεκριμένα, πλήρης ύφεση της νόσου πραγματοποιήθηκε σε 58.7% των ασθενών και μερική ύφεση σε 15.2% των ασθενών.



Η μέση συνολική επιβίωση (OS) των ασθενών ήταν 62.47 ± 8.98 μήνες, ενώ η διάμεση επιβίωση 58.65 ± 33.6 μήνες. Η αντίστοιχη ελεύθερη νόσου (DFS) επιβίωση για 29 ασθενείς εκτιμάται σε 85.28 ± 10.5 μήνες. (Διαγράμματα 10.1. και 10.2.)



4.5 Μελέτη της σχέσης μεταξύ του χρόνου επιβίωσης και των κλινικοεργαστηριακών δεδομένων

Η μελέτη της σχέσης του χρόνου επιβίωσης με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα αποκαλύπτει την ακολουθία των δεδομένων των ασθενών με τα παγκόσμια δεδομένα. Πιο αναλυτικά, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά σε OS και DFS σε σχέση με το φύλο τους, το στάδιο της νόσου, την παρουσία Β συμπτωματολογίας, την παθολογική εκτίμηση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης και την προέλευση του παθολογικού κυττάρου του DLBCL (origin).

Η κατηγοριοποίηση των ασθενών της παρούσας εργασίας ως προς τον Διεθνή Προγνωστικό Δείκτη και των παραλλαγών του και η συσχέτιση των κατηγοριών αυτών με την συνολική και ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση ανέδειξε τα εξής αποτελέσματα:

➤ Η μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα της σχέσης επιβίωσης-Διεθνούς Προγνωστικού Δείκτη παρατηρήθηκε κατά την παραλλαγή NCCN-IP1 γεγονός που συμβαδίζει και με τα παγκόσμια δεδομένα μιας και οι ασθενείς αυτοί έλαβαν χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με Rituximab ($p=0.006$ για OS και $p=0.039$ για DFS, διαγράμματα 11.1. και 11.2., αντίστοιχα).

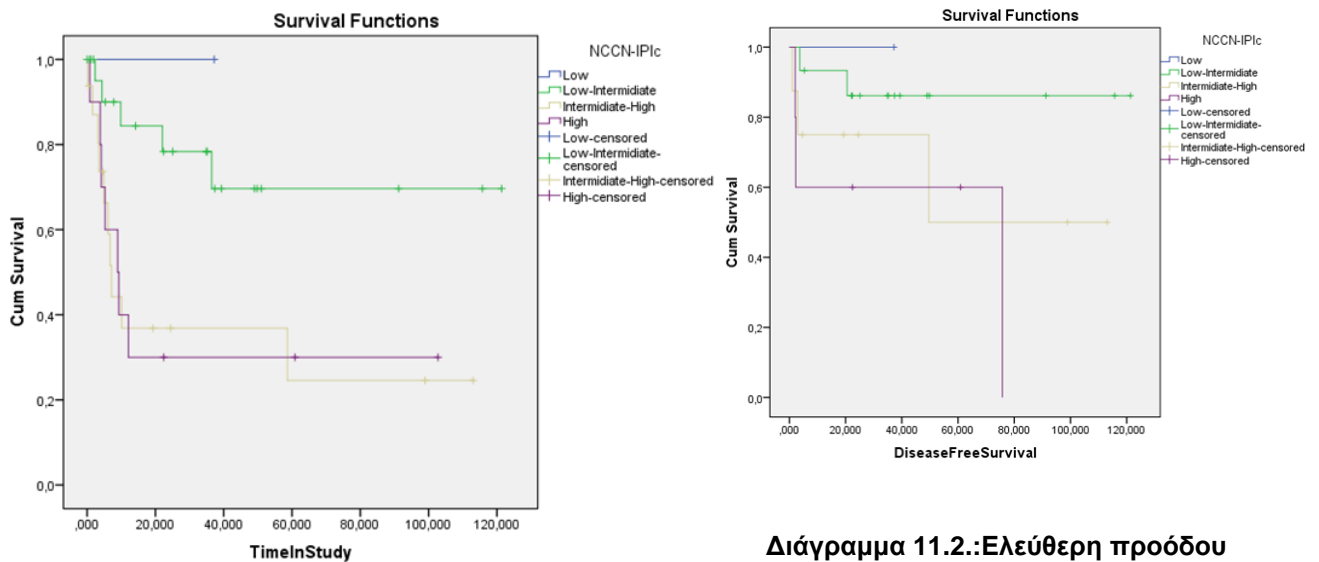
➤ Η μέση ελεύθερη προόδου νόσου και συνολική επιβίωση των κατηγοριών του NCCN-IP1 φαίνεται στους παρακάτω πίνακες 11.1. και 11.2.:

| NCCN-IP1c LLIvsHIH In DFS | Mean | | | |
|------------------------------|---------|--------|-------------------------|-------------|
| | | | 95% Confidence Interval | |
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Low/Low-Intermediate | 107,270 | 9,331 | 88,981 | 125,560 |
| Intermediate-High/High | 63,246 | 14,122 | 35,566 | 90,925 |
| Overall | 85,282 | 10,584 | 64,537 | 106,027 |

Πίνακας 11.1.: Μέση ελεύθερη προόδου νόσου Επιβίωση σε κατηγορίες NCCN-IP1

| NCCN-IP1c LLIvsHIH In OS | Mean | | | |
|-----------------------------|--------|--------|-------------------------|-------------|
| | | | 95% Confidence Interval | |
| | | | Lower Bound | Upper Bound |
| Low/Low-Intermediate | 91,822 | 11,405 | 69,468 | 114,175 |
| Intermediate-High/High | 38,364 | 9,935 | 18,892 | 57,836 |
| Overall | 62,321 | 8,984 | 44,714 | 79,929 |

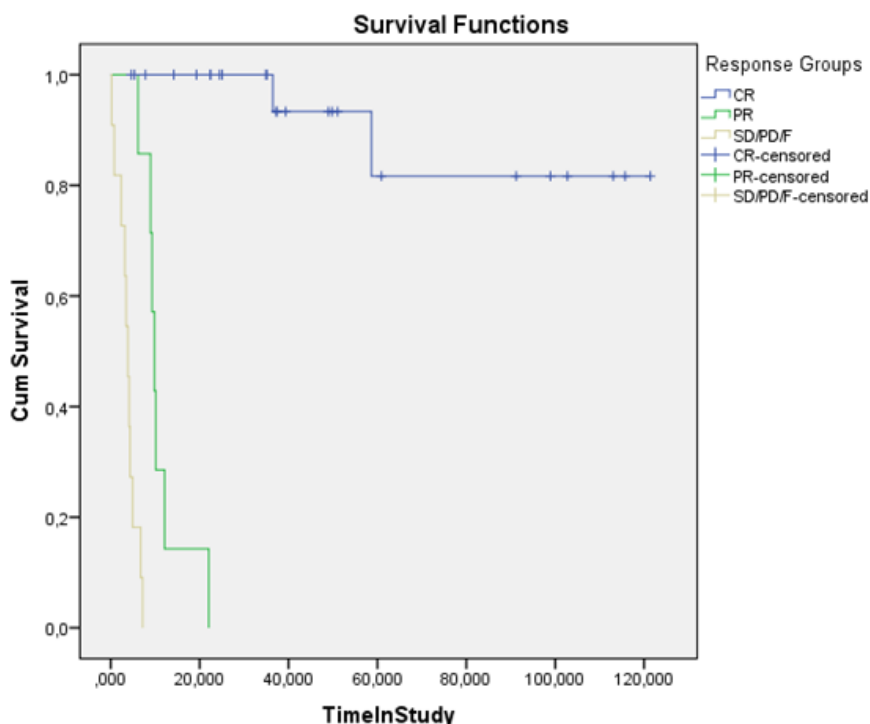
Πίνακας 11.2.: Μέση συνολική Επιβίωση σε κατηγορίες NCCN-IP1



Διάγραμμα 11.1.: Συνολική Επιβίωση στις κατηγορίες NCCN-IP1 , $p=0.006$

Διάγραμμα 11.2.: Ελεύθερη προόδου νόσου Επιβίωση στις κατηγορίες NCCN-IP1 , $p=0.037$

Εφόσον το δείγμα των ασθενών μας ακολουθεί μέχρι στιγμής την στατιστική σημαντικότητα των κλινικοεργαστηριακών παραγόντων σε σχέση με την επιβίωση, είναι λογικό να παρατηρείται η μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα της επιβίωσης ως προς την ανταπόκριση στη θεραπεία ($p=0.000$, διάγραμμα 12.). Οι ασθενείς που παρουσίασαν πλήρη ανταπόκριση μετά τη θεραπεία είχαν μέση συνολική επιβίωση 108.4 ± 8.45 μήνες, ενώ οι ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία 3.74 ± 0.65 αντίστοιχα.

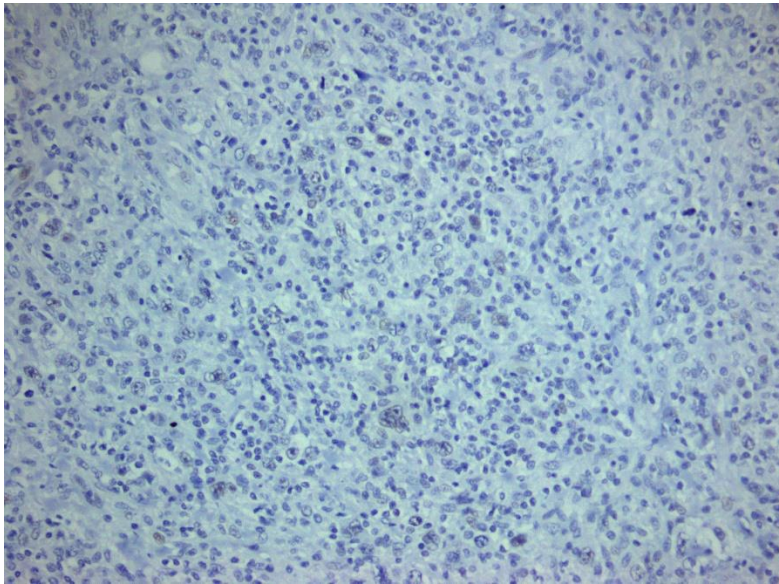


Διάγραμμα 12.:Συνολική επιβίωση ως προς την ανταπόκριση μετά τη θεραπεία , $p=0.000$

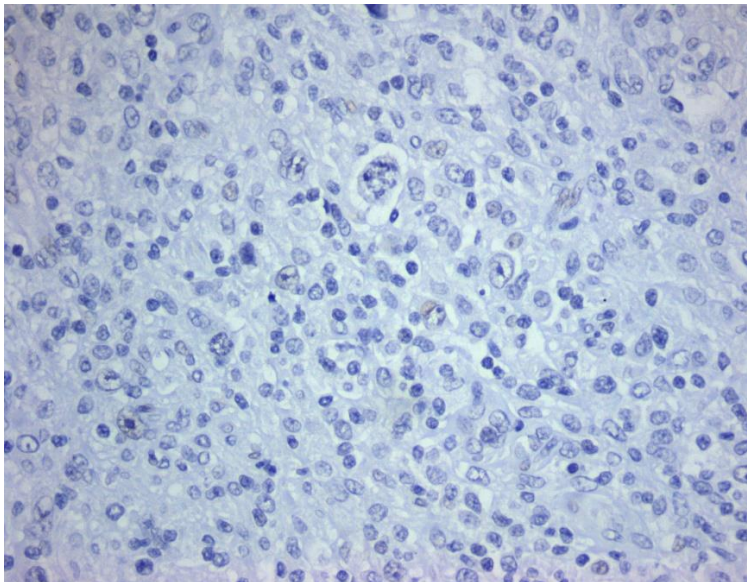
Όσον αφορά τη συσχέτιση τη επιβίωσης με τον μεταγραφικό παράγοντα MEF2C θα αναλυθεί στην ενότητα 4.7.

4.6 Έκφραση μεταγραφικού παράγοντα MEF2C και σχέση με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους

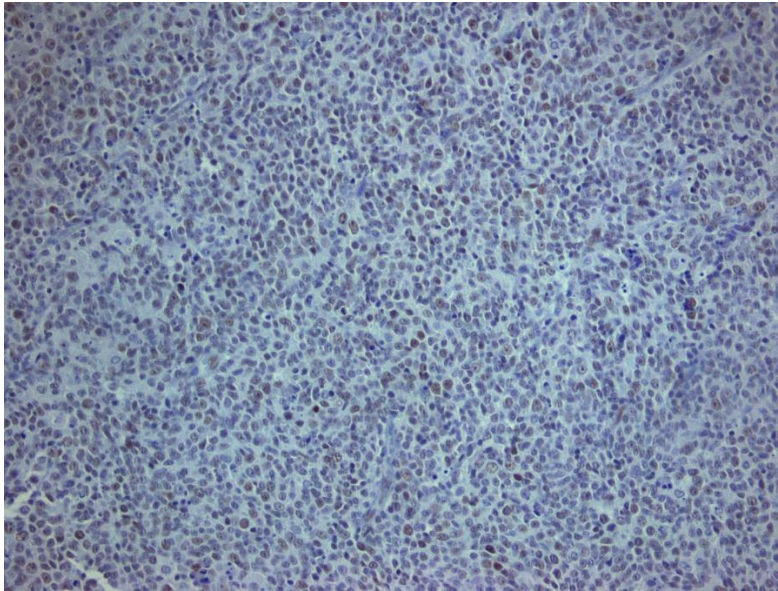
Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C μελετήθηκε σε 62 ιστικά δείγματα σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράψαμε ανωτέρω. Τα δείγματα αυτά εκτιμήθηκαν μικροσκοπικά σε μεγέθυνση 20x και 40x ως προς την αρνητική, ασθενώς θετική, μετρίως θετική και ισχυρά θετική έκφραση του MEF2C. Εν συνεχεία, παραθέτουμε αντίστοιχες εικόνες από κάθε ένταση έκφρασης και στις 2 μεγεθύνσεις (Εικόνες 4-11).



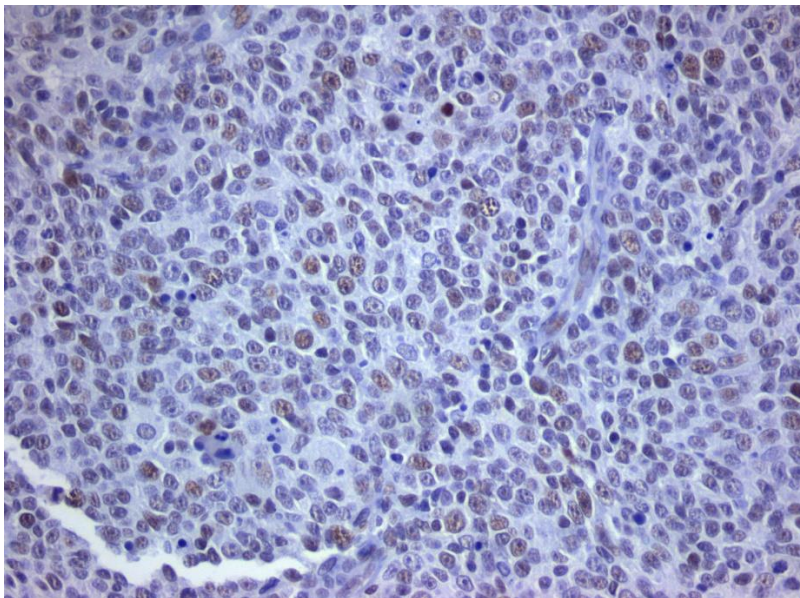
Εικόνα 4.: Αρνητική έκφραση MEF2C σε DLBCL, βιοψία στομάχου, μεγέθυνση 20x



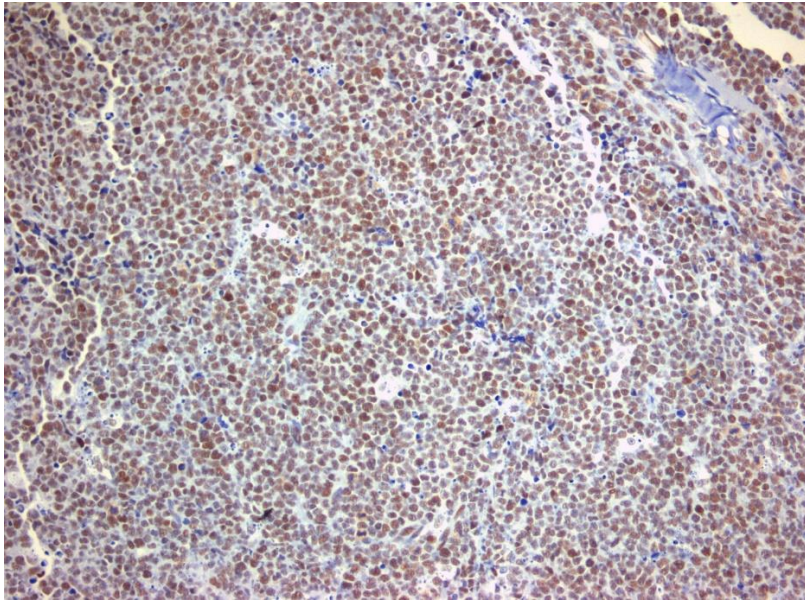
Εικόνα 5.: Αρνητική έκφραση MEF2C σε DLBCL, βιοψία στομάχου, μεγέθυνση 40x



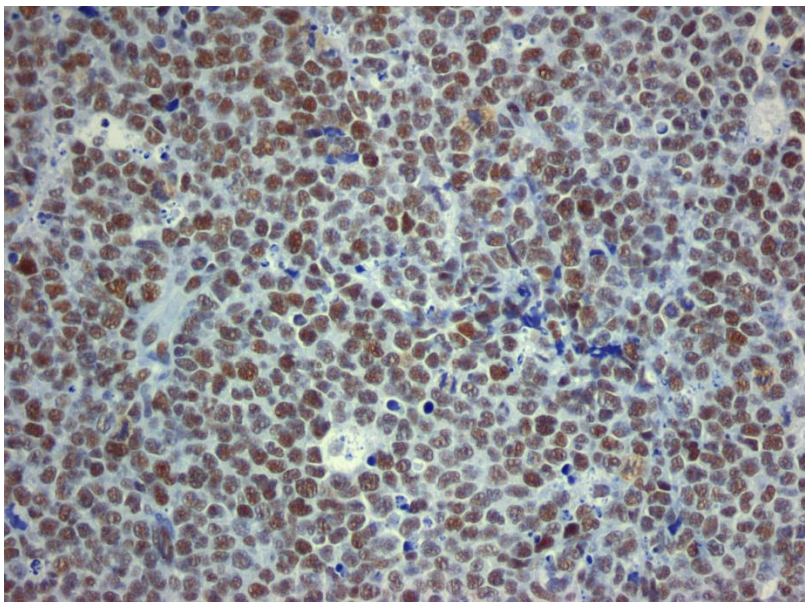
Εικόνα 6.: Ασθενώς θετική έκφραση MEF2C σε DLBCL, βιοψία αμυγδαλής, μεγέθυνση 20x



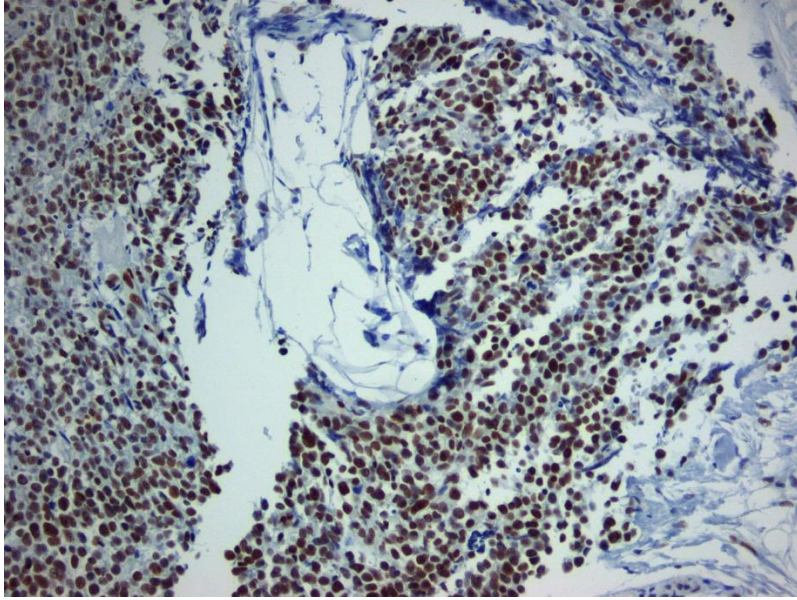
Εικόνα 7.: Ασθενώς θετική έκφραση MEF2C σε DLBCL, βιοψία αμυγδαλής, μεγέθυνση 40x



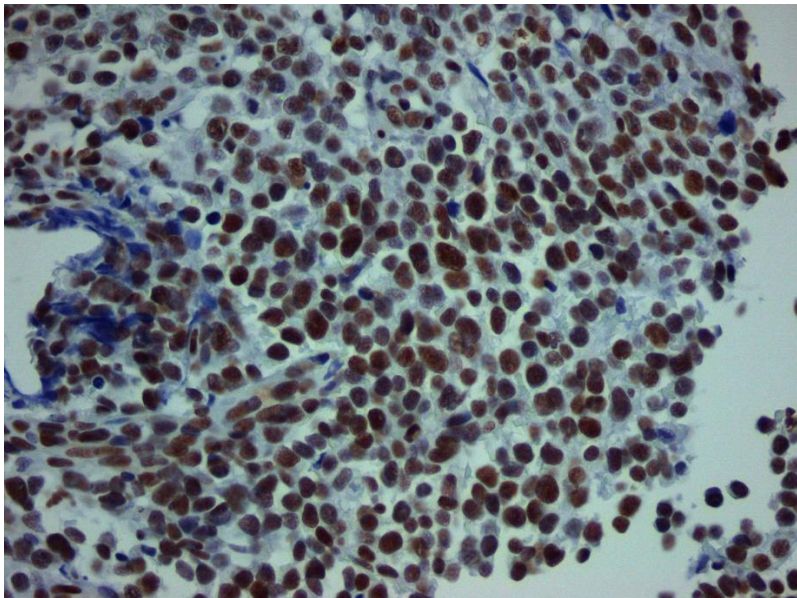
Εικόνα 8.: Μετρίως θετική έκφραση MEF2C σε DLBCL, βιοψία μαλθακής υπερώας, μεγέθυνση 20x



Εικόνα 9.: Μετρίως θετική έκφραση MEF2C σε DLBCL, βιοψία μαλθακής υπερώας, μεγέθυνση 40x



Εικόνα 10.: Ισχυρά θετική έκφραση MEF2C σε DLBCL, βιοψία λεμφαδένα, μεγέθυνση 20x



Εικόνα 11.: Ισχυρά θετική έκφραση MEF2C σε DLBCL, βιοψία λεμφαδένα, μεγέθυνση 40x

Η ποσοτικοποίηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του παράγοντα MEF2C έγινε με βάση την ως άνω περιγραφόμενη ημιποσοτική μέθοδο του H score και συγκεκριμένα:

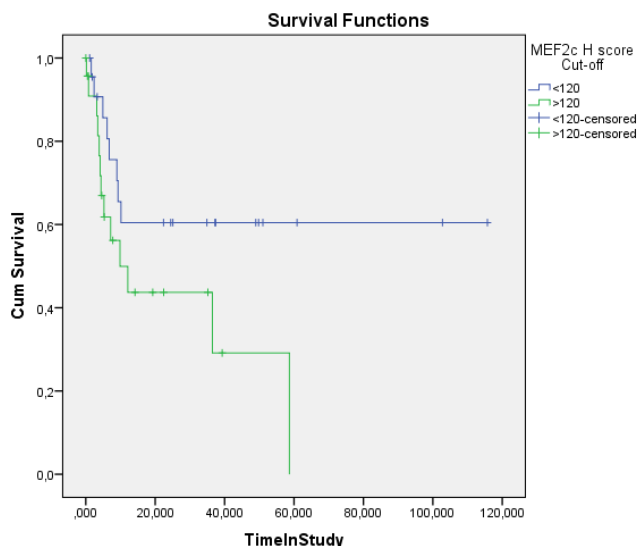
$$H\ score = (\% \text{ των κυττάρων της κατηγορίας έντασης } 1 \times 1) + (\% \text{ των κυττάρων της κατηγορίας έντασης } 2 \times 2) + (\% \text{ των κυττάρων της κατηγορίας έντασης } 3 \times 3)$$

Τα 62 ιστικά δείγματα που αξιολογήθηκαν είχαν τιμές MEF2C H score από 3 έως 265 με μέση τιμή και διάμεση τιμή 120 ± 58 . Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική κανονικότητα των τιμών του H score ως προς την κατάσταση (status) των ασθενών (κριτήρια *Kolmogorov-Smirnov* και *Shapiro-Wilk*). Από τους 48 ασθενείς που είχαμε πληροφορίες και για την έκφραση του MEF2C και για την επιβίωσή τους, η μέση και η διάμεση τιμή του MEF2C H score για τους 26 ζωντανούς ασθενείς ήταν 102 ± 56.72 και 100 αντίστοιχα, ενώ για τους 22 ασθενείς που είχαν αποβιώσει ήταν 130.77 ± 56.34 και 141 αντίστοιχα ($p=0.766$).

Συσχετίζοντας την έκφραση του MEF2C μέσω του H score με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών της παρούσας εργασίας ($p=0.021$) και με τις τιμές της LDH ($p=0.018$). Αυτή η σχέση, όμως, δεν επαληθεύεται για κάθε κατηγορία έντασης του MEF2C. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της έκφρασης του MEF2C με το στάδιο της νόσου, τις κατηγορίες του IPI και των παραλλαγών του, των εργαστηριακών τιμών (Hb, PLT, WBC, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, $\beta 2M$), της παρουσίας των B συμπτωμάτων, της προέλευσης του καρκινικού κυττάρου (origin) και της έκφρασης του Ki 67 και του BCL6.

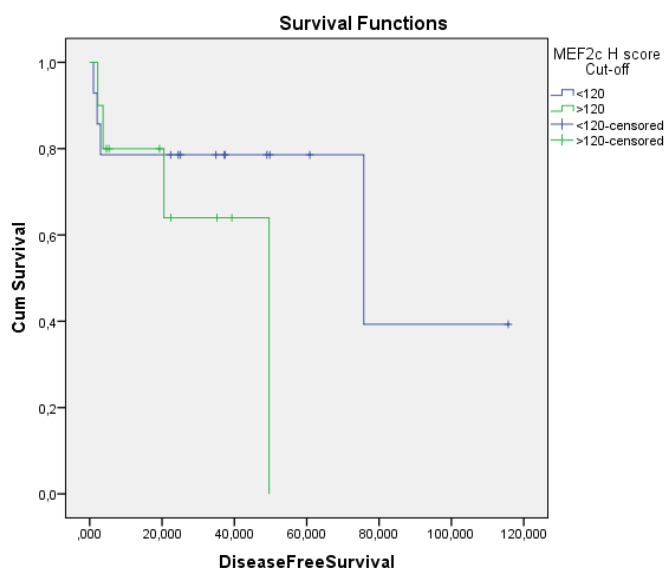
4.7 Σχέση μεταγραφικού παράγοντα MEF2C με την επιβίωση

Μελετήσαμε την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα MEF2C μέσω του H score ως προς την επιβίωση 47 ασθενών, για τους οποίους γνωρίζαμε και τις 2 παραμέτρους. Χρησιμοποιώντας την μέση και διάμεση τιμή H score=120 ως κριτήριο διαχωρισμού του δείγματος των ασθενών μας, παρατηρήσαμε μια οριακά μη στατιστικά σημαντική σχέση με τη συνολική επιβίωσή τους ($p=0.066$, διάγραμμα 13.).



**Διάγραμμα 13.:Συνολική
Επιβίωση με cut off MEF2C H
score=120, p=0.066, N=47**

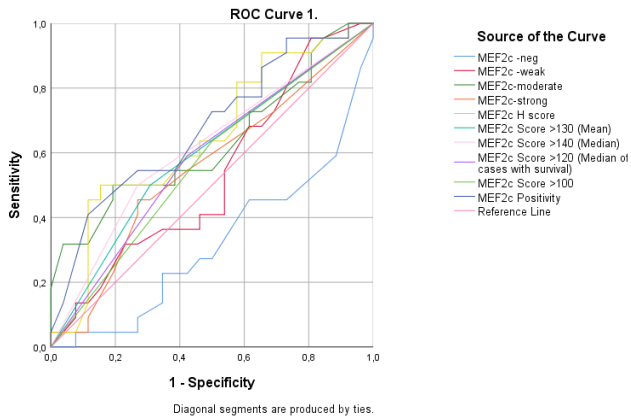
Οι ασθενείς με H score<120 παρουσίασαν μέση συνολική επιβίωση 72.47 ± 11.93 μήνες, ενώ οι ασθενείς με H score>120 αντίστοιχα 25.40 ± 6.16 μήνες. Η αντίστοιχη ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση για ασθενής με H score<120 ήταν 75.67 ± 15.13 μήνες και για H score>120 35.63 ± 7.66 μήνες ($p=0.304$, διάγραμμα 14.).



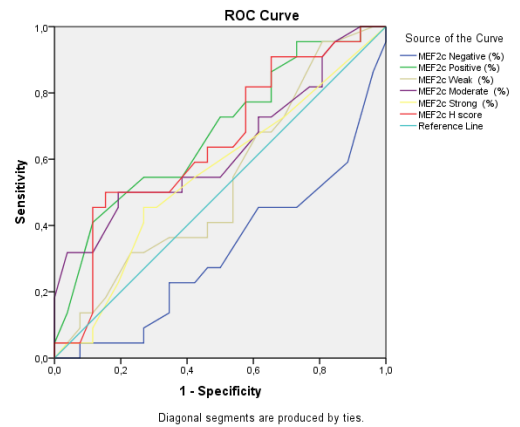
**Διάγραμμα 14.:Ελεύθερη προόδου νόσου
Επιβίωση με cut off MEF2C H score=120,
p=0.304, N=24**

Από την άλλη πλευρά, μελετώντας τη θετικότητα του MEF2C ανεξαρτήτως κατηγορίας έντασης, παρατηρήσαμε ότι οι ασθενείς της παρούσας εργασίας είχαν μέση τιμή θετικότητας MEF2C ίση με 70%, ενώ η διάμεση τιμή ήταν 80%. Συμπληρωματικά, σύμφωνα με καμπύλη χαρακτηριστικού λειτουργικού δέκτη (ROC curve 1. Και 2.), η θετική έκφραση

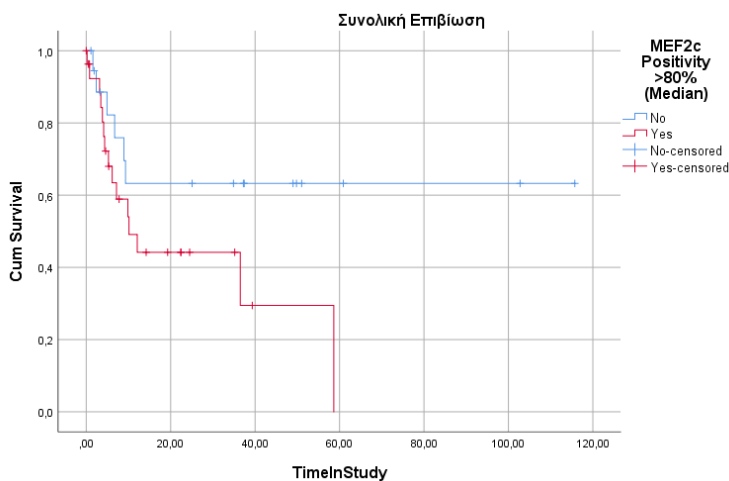
του MEF2C παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα ως προς τον θάνατο. Όσον αφορά τη συνολική επιβίωση, ασθενείς με θετικότητα MEF2C >80% παρουσίασαν οριακά στατιστικά μη σημαντική διαφορά, σύμφωνα με το διάγραμμα 15. ($p=0.083$).



ROC curve 1.



ROC curve 2



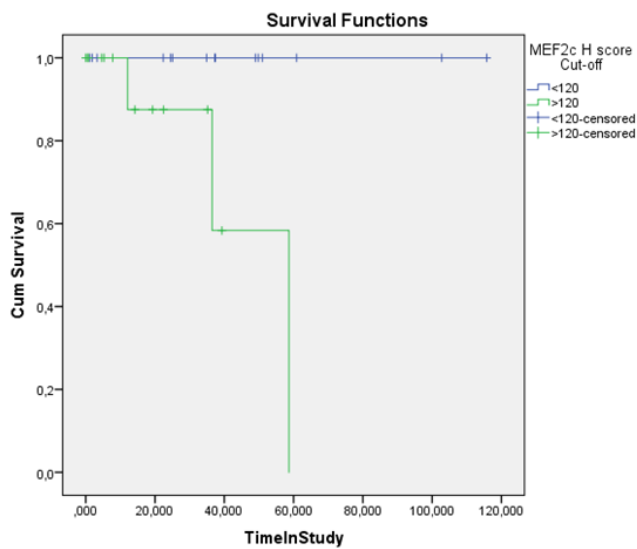
Διάγραμμα 15.:Συνολική Επιβίωση με cut off MEF2C θετικότητα= 80%, $p=0.083$, N=47

Τέλος, βασιζόμενοι και πάλι στη μέση και διάμεση τιμή του MEF2C H score παρατηρήσαμε ότι αν υπολογίσουμε τους ασθενείς που επιβίωσαν το πρώτο έτος της νόσου (N=29) παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη συνολική επιβίωσή τους και τη μέση τιμή του MEF2C H score=120, όπως παρατηρείται στον πίνακα 12. και το διάγραμμα 16.

Overall Comparisons

| | Chi-Square | df | Sig. |
|--------------------------------|------------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 6,895 | 1 | ,009 |
| Breslow (Generalized Wilcoxon) | 4,301 | 1 | ,038 |
| Tarone-Ware | 5,626 | 1 | ,018 |

Πίνακας 12.: Στατιστικά σημαντική διαφορά συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς που επεβίωσαν >12 μήνες, N=29



Διάγραμμα 16.: Συνολική Επιβίωση με cut off MEF2C H score=120 και επιβίωση >12 μήνες, $p=0.009$, N=29

5. Συμπεράσματα- Συζήτηση

Η παθογένεια των DLBCL δεν είναι πλήρως κατανοητή, γεγονός που συνεπάγεται μεταξύ άλλων τη μερική μόνο ταύτιση της μορφολογικής και ανοσοϊστοχημικής ταξινόμισής τους με τους υποτύπους του πορτρέτου γονιδιακής έκφρασης. Η αναγνώριση μεταγραφικών παραγόντων ή σηματοδοτικών μονοπατιών, που οδηγούν σε μεταβολές πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη φυσιολογική λειτουργία των Β λεμφοκυττάρων μπορεί να αποτελέσει τη βάση για νέες θεραπευτικές επιλογές. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν τα γονίδια *BCL2*, *BCL6* και *MYC*, η συνέκφραση των οποίων παρατηρείται στα “τριπλής έκφρασης” (“triple-expressor lymphomas”) (13-15, 21, 22). Το πρώτο γονίδιο κωδικοποιεί έναν αντιαποπτωτικό παράγοντα, το δεύτερο έναν ρυθμιστή του βλαστικού κέντρου και το τρίτο έναν ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου.

Αντίστοιχα, ο MEF2C συμβάλλει στην ενεργοποίηση της λεμφοειδούς σειράς και στη διαμόρφωση των βλαστικών κέντρων των λεμφαδένων. Παρά το διπλό ρόλο του σε διάφορους ιστούς, ο MEF2C παρουσιάζει κυρίως ογκογόνο δράση στις αιματολογικές κακοήθειες. Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του όμως δεν έχει αναλυθεί. Στο πλαίσιο κατανόησης της έκφρασης του MEF2C στα DLBCL, μελετήσαμε στην παρούσα εργασία την ανοσοϊστοχημική έκφρασή του σε ιστικά δείγματα ασθενών, τα οποία συλλέχθηκαν πριν την έναρξη θεραπείας και εκτιμήθηκαν στο Β Έργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α.. Εν συνεχεία, οι ασθενείς αυτοί παρακολούθηθηκαν και αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά στην Αιματολογική Μονάδα της Β΄ Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α., Π.Γ.Ν. Αττικών, κατά τη χρονική περίοδο 2003-2017.

Από τα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα των ασθενών που συλλέχθηκαν παρατηρήθηκε ότι ακολουθούν την τάση του παγκόσμιου πληθυσμού ασθενών με DLBCL ως προς το φύλο, το στάδιο της νόσου, την παρουσία Β συμπτωματολογίας, την παθολογική εκτίμηση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης και την προέλευση του παθολογικού κυττάρου του DLBCL (origin). Η αναλογία ανδρών και γυναικών πλησίασε το 1,5:1, η μεγαλύτερη επίπτωση εμφανίστηκε στην ηλικιακή ομάδα των 61-80 ετών. Η κατανομή των ασθενών στις κατηγορίες του IPI και των παραλλαγών του ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση αυτού με την επιβίωση, γεγονός που επαληθεύει τα παγκόσμια δεδομένα ασθενών. Τέλος, ο αριθμός των αιμοπεταλίων κατά την αρχική διάγνωση σχετίζεται με την

ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία, γεγονός που έχει αξιολογηθεί και σε άλλες μελέτες (71).

Όσον αφορά τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της έκφρασης του MEF2C, αυτή ημιποσοτικοποιήθηκε με τη βοήθεια του H score, λαμβάνοντας έτσι τιμές εύρους από 0 έως 300. Η μέση και διάμεση τιμή του MEF2C H score ήταν 120 ± 58 . Η ηλικία των ασθενών και οι τιμές της LDH παρουσίασαν στατιστικά σημαντική θετική σχέση με την έκφραση του MEF2C, αποτέλεσμα το οποίο πρέπει να επιβεβαιωθεί και σε μεγαλύτερο αριθμό ιστικών δειγμάτων. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε σχέση της έκφρασης του MEF2C με την προέλευση του νεοπλασματικού κυττάρου (GCB vs non-GCB) και την έκφραση του BCL6, γεγονός το οποίο διαφέρει από τη δράση ενός άλλου μέλους της οικογένειας των MEF2 μεταγραφικών παραγόντων, του MEF2B, ο οποίος συνδέεται με την έκφραση και τη δράση του BCL6, ενός ογκογονιδίου που ρυθμίζει την λειτουργία του φυσιολογικού βλαστικού κέντρου και την ανάπτυξη διαχύτου από μεγάλα B κύτταρα λεμφώματος (72, 73).

Ως προς τη σχέση της έκφρασης του MEF2C με την επιβίωση, παρατηρήθηκε μια αξιοσημείωτη τάση συσχέτισης της υψηλότερης έκφρασής του με χειρότερη συνολική και ελεύθερη νόσου επιβίωση. Εφόσον μάλιστα οι ασθενείς επιβιώσουν περισσότερο από 12 μήνες και εκφράζουν υψηλότερη τιμή MEF2C H score κατά τη διάγνωσή τους, η τάση αυτή ξεπερνάει τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας. Η παρατήρηση αυτή συμβαδίζει με το γεγονός ότι ο MEF2C μπορεί να έχει επίσης ογκογόνο δράση στα DLBCL, αντίστοιχη με αυτή του MEF2B, πιθανά με διαφορετικό μηχανισμό, καθώς και αντίστοιχη με τη δράση που έχει περιγραφεί και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες. Τα αποτελέσματα αυτά οφείλουν να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών με DLBCL και στη συνέχεια να διερευνηθεί ο υποκείμενος μηχανισμός ογκογόνου δράσης στο νεόπλασμα αυτό.

6. Περίληψη

Εισαγωγή: Ο συνηθέστερος τύπος των non-Hodgkin λεμφωμάτων είναι τα διάχυτα από μεγάλα Β κύτταρα λεμφώματα (DLBCL). Η παθογένεια των DLBCL όμως δεν είναι πλήρως κατανοητή. Η αναγνώριση μεταγραφικών παραγόντων ή σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν στην ανάπτυξη των DLBCL μπορεί να αποτελέσει τη βάση για μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους. Ένας τέτοιος μεταγραφικός παράγοντας είναι ο MEF2C (Myocyte-specific enhancer factor 2C), ο οποίος συμβάλλει στην ενεργοποίηση της λεμφοειδούς σειράς και στη διαμόρφωση των βλαστικών κέντρων.

Μέθοδος: Στην παρούσα εργασία εντάχθηκαν 87 ασθενείς με DLBCL. Σε 62 από αυτούς μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση του MEF2C σε τομές παραφίνης και την ημιποσοτικοποίησή του με τη μέθοδο H score. Μελετήθηκαν τα κλινικά, εργαστηριακά και παθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών σε σχέση με τη συνολική (OS) και ελεύθερη νόσου (DFS) επιβίωση και την έκφραση του MEF2C.

Αποτελέσματα: Η μέση και διάμεση τιμή του MEF2C H score ήταν 120 ± 58 . Παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση με την ηλικία των ασθενών ($p=0.021$) και τάση για συσχέτιση με τις τιμές της γαλακτικής δεϋδρογονάσης (LDH) ($p=0.18$). Η έκφραση του MEF2C δεν σχετίστηκε με το στάδιο της νόσου, τις κατηγορίες του IPI και των παραλλαγών του, τις εργαστηριακές τιμές, την παρουσία των Β συμπτωμάτων, την προέλευση του καρκινικού κυττάρου (origin) και την έκφραση του Ki 67 και του BCL6. Η θετικότητα MEF2C $>80\%$ συσχετίστηκε με οριακά μη σημαντική διαφορά ως προς τη συνολική επιβίωση ($p=0.083$). Τέλος, οι ασθενείς με συνολική επιβίωση μεγαλύτερη από 12 μήνες και MEF2C H score >120 παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά χειρότερη συνολική επιβίωση σε σχέση με ασθενείς που είχαν MEF2C H score <120 ($p=0.009$).

Συμπεράσματα: Η υψηλότερη έκφραση του MEF2C παρουσιάζει τάση για χειρότερη συνολική επιβίωση ασθενών με DLBCL. Τα αποτελέσματα αυτά οφείλουν να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών με DLBCL και στη συνέχεια να διερευνηθεί ο υποκείμενος μηχανισμός ογκογόνου δράσης στο νεόπλασμα αυτό.

7. Abstract

Background: Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) are the most common subtype of non-Hodgkin's lymphomas. However, the pathogenesis of DLBCL is not fully understood. Transcription factors or signaling pathways implicated in normal B lymphocytes function may be the basis for future therapeutic targets. Such transcription factor is MEF2C (Myocyte-specific enhancer factor 2C) contributing to the activation of the lymphoid lineage and the formation of the germinal center.

Methods: 82 patients with DLBCL were enrolled in our study. We evaluated the expression of MEF2C by performing immunohistochemistry on paraffin slides of 62 tissue blocks from our patients. We used the semi-quantification method of H score. We analyzed the clinical, laboratory and pathologic characteristics of patients in relation to overall survival (OS), disease free survival (DFS) and the expression of MEF2C.

Results: Mean and median value of MEF2C H score was 120 ± 58 . We observed a significant correlation with age ($p = 0.021$) and a tendency to correlate with lactate dehydrogenase (LDH) ($p = 0.18$). The expression of MEF2C was not associated with stage, International Prognostic Index (IPI) and its variants, laboratory values, presence of B symptoms, origin and expression of Ki 67 and BCL6. MEF2C positivity >80% correlated with borderline non-significant difference in OS ($p = 0.083$). Finally, patients with OS more than 12 months and MEF2C H score >120 had a significant worse OS comparing with those with MEF2C H score <120 ($p = 0.009$).

Conclusion: Patients with higher expression of MEF2C showed a trend of worse overall survival compared to patients with lower expression of MEF2C. However, these results should be confirmed in larger groups of DLBCL patients and the underlying oncogenic mechanism of MEF2C in DLBCL should be further explored.

8. Βιβλιογραφία

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(1):7-30.
2. Morgan G, Vornanen M, Puitinen J, Naukkarinen A, Brincker H, Olsen J, et al. Changing trends in the incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Europe. *Biomed Study Group. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 1997;8 Suppl 2:49-54.
3. Kubuschok B, Held G, Pfreundschuh M. Management of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Cancer treatment and research*. 2015;165:271-88.
4. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26 Suppl 5:v116-25.
5. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116(19):3724-34.
6. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) database, Cancer Stat Facts: NHL-diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) [Internet]. National Cancer Institute. 1994-2015. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/dlbcl.html>.
7. Wu XC, Andrews P, Chen VW, Groves FD. Incidence of extranodal non-Hodgkin lymphomas among whites, blacks, and Asians/Pacific Islanders in the United States: anatomic site and histology differences. *Cancer epidemiology*. 2009;33(5):337-46.
8. Ferlay J ea. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013 [Available from: <http://globocan.iarc.fr>].
9. Morton LM, Slager SL, Cerhan JR, Wang SS, Vajdic CM, Skibola CF, et al. Etiologic heterogeneity among non-Hodgkin lymphoma subtypes: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2014;2014(48):130-44.
10. Πάγκαλης ΓΑ. *Αιματολογία στην Κλινική Πράξη. Γ' Ανατύπωση* ed: Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης; 2008.
11. Sander CA, Kind P, Kaudewitz P, Raffeld M, Jaffe ES. The Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms (REAL): a new perspective for the classification of cutaneous lymphomas. *Journal of cutaneous pathology*. 1997;24(6):329-41.

12. S. H. Swerdlow EC, N. L. Harris, El. S. Jaffe, St. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, D. A. Arber, R. P. Hasserjian, M. M. Le Beau, At. Orazi, R. Siebert. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th ed2017.
13. Ott G. Aggressive B-cell lymphomas in the update of the 4th edition of the World Health Organization classification of haematopoietic and lymphatic tissues: refinements of the classification, new entities and genetic findings. *Br J Haematol.* 2017;178(6):871-87.
14. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-90.
15. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology American Society of Hematology Education Program.* 2009:523-31.
16. Barry EV, Vrooman LM, Dahlberg SE, Neuberg DS, Asselin BL, Athale UH, et al. Absence of secondary malignant neoplasms in children with high-risk acute lymphoblastic leukemia treated with dexrazoxane. *J Clin Oncol.* 2008;26(7):1106-11.
17. Hsiao SC, Cortada IR, Colomo L, Ye H, Liu H, Kuo SY, et al. SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma. *Histopathology.* 2012;61(4):685-93.
18. Zeng W, Fu K, Quintanilla-Fend L, Lim M, Ondrejka S, Hsi ED. Cyclin D1-negative blastoid mantle cell lymphoma identified by SOX11 expression. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(2):214-9.
19. Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hematol.* 2014;51(3):219-27.
20. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(12):976-90.
21. Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol.* 2014;25(11):2124-33.
22. Tsuyama N, Sakata S, Baba S, Mishima Y, Nishimura N, Ueda K, et al. BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. *Blood.* 2017;130(4):489-500.
23. Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, Slymen DJ, Rybski JA, Rangel CS, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood.* 1988;71(4):1157-60.
24. Koh YW, Hwang HS, Park CS, Yoon DH, Suh C, Huh J. Prognostic effect of Ki-67 expression in rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone-treated diffuse large B-cell lymphoma is limited to non-germinal center B-cell-like subtype in late-elderly patients. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(9):2630-6.
25. Yoon DH, Choi DR, Ahn HJ, Kim S, Lee DH, Kim SW, et al. Ki-67 expression as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP. *Eur J Haematol.* 2010;85(2):149-57.

26. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011;117(18):4836-43.
27. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14(6):460-7 e2.
28. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-82.
29. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*. 2012;26(9):2103-13.
30. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200-7.
31. Gualco G, Bacchi LM, Domeny-Duarte P, Natkunam Y, Bacchi CE. The contribution of HGAL/GCET2 in immunohistological algorithms: a comparative study in 424 cases of nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2012;25(11):1439-45.
32. Boltezar L, Prevodnik VK, Perme MP, Gasljevic G, Novakovic BJ. Comparison of the algorithms classifying the ABC and GCB subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Lett*. 2018;15(5):6903-12.
33. Swerdlow SH. Diagnosis of 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):90-9.
34. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1971;31(11):1860-1.
35. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors P. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;329(14):987-94.
36. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857-61.

37. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2373-80.
38. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123(6):837-42.
39. Advani RH, Chen H, Habermann TM, Morrison VA, Weller EA, Fisher RI, et al. Comparison of conventional prognostic indices in patients older than 60 years with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP in the US Intergroup Study (ECOG 4494, CALGB 9793): consideration of age greater than 70 years in an elderly prognostic index (E-IPI). *Br J Haematol*. 2010;151(2):143-51.
40. Maurer MJ, Jais JP, Ghesquieres H, Witzig TE, Hong F, Haioun C, et al. Personalized risk prediction for event-free survival at 24 months in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2016;91(2):179-84.
41. Maurer MJ, Ghesquieres H, Jais JP, Witzig TE, Haioun C, Thompson CA, et al. Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1066-73.
42. Zelenetz AD, Gordon LI, Wierda WG, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, et al. Diffuse Large B-Cell Lymphoma Version 1.2016. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016;14(2):196-231.
43. Peyrade F, Jardin F, Thieblemont C, Thyss A, Emile JF, Castaigne S, et al. Attenuated immunochemotherapy regimen (R-miniCHOP) in elderly patients older than 80 years with diffuse large B-cell lymphoma: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(5):460-8.
44. Fields PA, Townsend W, Webb A, Counsell N, Pocock C, Smith P, et al. De novo treatment of diffuse large B-cell lymphoma with rituximab, cyclophosphamide, vincristine, gemcitabine, and prednisolone in patients with cardiac comorbidity: a United Kingdom National Cancer Research Institute trial. *J Clin Oncol*. 2014;32(4):282-7.
45. Di Giorgio E, Gagliostro E, Clocchiatti A, Brancolini C. The control operated by the cell cycle machinery on MEF2 stability contributes to the downregulation of CDKN1A and entry into S phase. *Mol Cell Biol*. 2015;35(9):1633-47.
46. Wu Y, Dey R, Han A, Jayathilaka N, Philips M, Ye J, et al. Structure of the MADS-box/MEF2 domain of MEF2A bound to DNA and its implication for myocardin recruitment. *J Mol Biol*. 2010;397(2):520-33.
47. Han A, Pan F, Stroud JC, Youn HD, Liu JO, Chen L. Sequence-specific recruitment of transcriptional co-repressor Cabin1 by myocyte enhancer factor-2. *Nature*. 2003;422(6933):730-4.

48. Cante-Barrett K, Pieters R, Meijerink JP. Myocyte enhancer factor 2C in hematopoiesis and leukemia. *Oncogene*. 2014;33(4):403-10.
49. Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. 2006;442(7104):818-22.
50. Stehling-Sun S, Dade J, Nutt SL, DeKoter RP, Camargo FD. Regulation of lymphoid versus myeloid fate 'choice' by the transcription factor Mef2c. *Nat Immunol*. 2009;10(3):289-96.
51. Herglotz J, Unrau L, Hauschildt F, Fischer M, Kriebitzsch N, Alawi M, et al. Essential control of early B-cell development by Mef2 transcription factors. *Blood*. 2016;127(5):572-81.
52. Kong NR, Davis M, Chai L, Winoto A, Tjian R. MEF2C and EBF1 Co-regulate B Cell-Specific Transcription. *PLoS Genet*. 2016;12(2):e1005845.
53. Wilker PR, Kohyama M, Sandau MM, Albring JC, Nakagawa O, Schwarz JJ, et al. Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation. *Nat Immunol*. 2008;9(6):603-12.
54. Di Giorgio E, Hancock WW, Brancolini C. MEF2 and the tumorigenic process, hic sunt leones. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018;1870(2):261-73.
55. Zuurbier L, Gutierrez A, Mullighan CG, Cante-Barrett K, Gevaert AO, de Rooij J, et al. Immature MEF2C-dysregulated T-cell leukemia patients have an early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia gene signature and typically have non-rearranged T-cell receptors. *Haematologica*. 2014;99(1):94-102.
56. Homminga I, Pieters R, Langerak AW, de Rooij JJ, Stubbs A, Verstegen M, et al. Integrated transcript and genome analyses reveal NKX2-1 and MEF2C as potential oncogenes in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;19(4):484-97.
57. Nagel S, Meyer C, Quentmeier H, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RA. MEF2C is activated by multiple mechanisms in a subset of T-acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leukemia*. 2008;22(3):600-7.
58. Vitali C, Bassani C, Chiodoni C, Fellini E, Guarnotta C, Miotti S, et al. SOCS2 Controls Proliferation and Stemness of Hematopoietic Cells under Stress Conditions and Its Deregulation Marks Unfavorable Acute Leukemias. *Cancer Res*. 2015;75(11):2387-99.
59. Brown FC, Still E, Koche RP, Yim CY, Takao S, Cifani P, et al. MEF2C Phosphorylation Is Required for Chemotherapy Resistance in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*. 2018;8(4):478-97.
60. Yang M, Chen J, Su F, Yu B, Su F, Lin L, et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer*. 2011;10:117.
61. Bai XL, Zhang Q, Ye LY, Liang F, Sun X, Chen Y, et al. Myocyte enhancer factor 2C regulation of hepatocellular carcinoma via vascular endothelial growth factor and Wnt/beta-catenin signaling. *Oncogene*. 2015;34(31):4089-97.

62. Barr FG. Molecular genetics and pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1997;19(6):483-91.
63. Zhang M, Zhu B, Davie J. Alternative splicing of MEF2C pre-mRNA controls its activity in normal myogenesis and promotes tumorigenicity in rhabdomyosarcoma cells. *J Biol Chem.* 2015;290(1):310-24.
64. Ignatius MS, Hayes MN, Lobbardi R, Chen EY, McCarthy KM, Sreenivas P, et al. The NOTCH1/SNAIL1/MEF2C Pathway Regulates Growth and Self-Renewal in Embryonal Rhabdomyosarcoma. *Cell Rep.* 2017;19(11):2304-18.
65. MacQuarrie KL, Yao Z, Fong AP, Diede SJ, Rudzinski ER, Hawkins DS, et al. Comparison of genome-wide binding of MyoD in normal human myogenic cells and rhabdomyosarcomas identifies regional and local suppression of promyogenic transcription factors. *Mol Cell Biol.* 2013;33(4):773-84.
66. Nagel S, Meyer C, Kaufmann M, Drexler HG, MacLeod RA. Aberrant expression of homeobox gene SIX1 in Hodgkin lymphoma. *Oncotarget.* 2015;6(37):40112-26.
67. Liu Q, Zhang M, Jiang X, Zhang Z, Dai L, Min S, et al. miR-223 suppresses differentiation of tumor-induced CD11b(+) Gr1(+) myeloid-derived suppressor cells from bone marrow cells. *Int J Cancer.* 2011;129(11):2662-73.
68. Agatheeswaran S, Singh S, Biswas S, Biswas G, Chandra Pattnayak N, Chakraborty S. BCR-ABL mediated repression of miR-223 results in the activation of MEF2C and PTBP2 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2013;27(7):1578-80.
69. Agatheeswaran S, Chakraborty S. MEF2C and CEBPA: Possible co-regulators in chronic myeloid leukemia disease progression. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;77(Pt A):165-70.
70. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* 2008;451(7182):1125-9.
71. Ni J, Wang YQ, Zhang YP, Wu W, Zeng QS, Yang MZ, et al. [Value of Neutrophil/Lymphocyte Ratio and Platelet/Lymphocyte Ratio for Prognostic Evaluation of Diffuse Large B-cell Lymphoma]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2016;24(2):427-32.
72. El Jamal SM, Grada Z, El Dinali MH, Zhou H, Hassan SY, Saad AG, et al. MEF2B is a member of the BCL6 gene transcriptional complex and induces its expression in diffuse large B-cell lymphoma of the germinal center B-cell-like type. *Lab Invest.* 2018.
73. Ying CY, Dominguez-Sola D, Fabi M, Lorenz IC, Hussein S, Bansal M, et al. MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1084-92.