

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Γ' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**Δ/ΝΤΗΣ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ν. ΣΥΡΙΓΟΣ, MD, PhD, FCCP, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ**

**Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΪΠΟΛΟΧΕΩΝ PD ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΔΙΑΧΥΤΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β ΚΥΤΤΑΡΑ: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ
ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ**

Σταμάτης Ι. Καρακατσάνης

Αιματολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2021

Ημερομηνία κατάθεσης αρχικής αίτησης: 08/10/2012

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 28/01/2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΟΥΣΣΟΥ, τ. ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ**

(ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ)

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Ν. ΣΥΡΙΓΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ-
ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΥΑΝΘΙΑ ΔΙΑΜΑΝΤΗ-ΚΑΝΔΑΡΑΚΗ, ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Ημερομηνία ορισμού του Θέματος: 31/05/2013

Ημερομηνία αλλαγής του Θέματος: 06/02/2015

Ημερομηνία καταθέσεως της Διδακτορικής Διατριβής: 28/12/2020

**Η παρούσα Διατριβή υποστηρίχθηκε επί Προεδρίας στην Ιατρική Σχολή του
Καθηγητή Παθολογίας-Ρευματολογίας Πέτρου Π. Σφηκάκη.**

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Παρασκευή Ρούσσου, τ. Αναπλ. Καθηγήτρια Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή
Πανεπιστημίου Αθηνών
2. Κωνσταντίνος Ν. Συρίγος, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Ιατρική
Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
3. Ευανθία Διαμάντη-Κανδαράκη, Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογίας και
Ενδοκρινολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών
4. Γεώργιος Στεργίου, Καθηγητής Παθολογίας και Υπέρτασης, Ιατρική Σχολή
Πανεπιστημίου Αθηνών
5. Σπυρίδων Ντουράκης, Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου
Αθηνών
6. Ελένη Γκόγκα, Καθηγήτρια Παθολογίας-Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή
Πανεπιστημίου Αθηνών
7. Θεόδωρος Βασιλακόπουλος, Καθηγητής Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή
Πανεπιστημίου Αθηνών

Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διατριβή:

**Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΪΠΟΔΟΧΕΩΝ PD ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΔΙΑΧΥΤΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΑΠΟ ΜΕΓΑΛΑ Β ΚΥΤΤΑΡΑ: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ
ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβλήθηκε στην Ιατρική Σχολή του
Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃς κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χηρῖσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἂ μὴ χηρῖ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῃετα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Απόδοση στα Νέα Ελληνικά

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέλφια μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην

καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στο Αλιβέρι Ευβοίας το 1980 και αποφοίτησα από το 1^ο Λύκειο Χαλκίδας το 1998 με βαθμό «Άριστα». Το 1999 εισήχθη στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και αποφοίτησα με βαθμό «Λίαν Καλώς» (8^{10/62}) τον Νοέμβριο 2005. Τον Μάρτιο 2006 ανέλαβα καθήκοντα ως αγροτικός Ιατρός και ολοκλήρωσα την υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου τον Σεπτέμβριο 2007, ενώ από τον Νοέμβριο 2007 έως τον Αύγουστο 2008 υπηρέτησα ως Ιατρός άνευ ειδικότητας στον Στρατό Ξηράς.

Από τον Σεπτέμβριο 2008 έως τον Νοέμβριο 2009 απασχολήθηκα στο Αιματολογικό Τμήμα της Γ' Πανεπιστημιακής Παθολογικής Κλινικής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) ως Επιστημονικός συνεργάτης. Στην συνέχεια εκπαιδευτήκα στην Παθολογία και στην Αιματολογία στην Παθολογική Κλινική του Γενικού Νομαρχιακού Νοσοκομείου Χαλκίδας (Δεκέμβριος 2009 - Αύγουστος 2011) και ειδικεύτηκα στην Αιματολογία στην Αιματολογική Κλινική - Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού Οστών του Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός» (Αύγουστος 2011 - Νοέμβριος 2015). Παράλληλα, ολοκλήρωσα το Μεταπτυχιακό πρόγραμμα και είμαι κάτοχος Διπλώματος Ειδίκευσης (MSc) στην Ογκολογία Θώρακος: Σύγχρονη Κλινικοεργαστηριακή Προσέγγιση και Έρευνα [Οκτώβριος 2009-Δεκέμβριος 2011 με βαθμό Πτυχίου 7,68/10 (Λίαν Καλώς)], οπότε και έγινα δεκτός ως υποψήφιος Διδάκτορας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ.

Τον Σεπτέμβριο του 2015 ολοκλήρωσα επιτυχώς το Μετεκπαιδευτικό πρόγραμμα της Ευρωπαϊκής Αιματολογικής Εταιρείας (European Hematology Association - EHA), και έχω πιστοποιηθεί δις (με βάση το European Hematology Curriculum) όσον αφορά το επίπεδο γνώσεων και δεξιοτήτων μετά από εξετάσεις υπό την αιγίδα της

ΕΗΑ. Από τον Ιούλιο 2016 εργάζομαι ως Ακαδημαϊκός Υπότροφος ΕΚΠΑ στο Αιματολογικό Τμήμα της Γ' Παν. Παθολογικής Κλινικής, στο ΓΝΝΘΑ «Η Σωτηρία», με πλήρη συμμετοχή σε όλο το φάσμα δραστηριοτήτων της Κλινικής (κλινικό, ερευνητικό και εκπαιδευτικό έργο). Επιπλέον είμαι μέλος της Ελληνικής και της Ευρωπαϊκής Αιματολογικής Εταιρείας και έχω συμμετάσχει στην συγγραφή τόσο επιστημονικών όσο και εκλαϊκευμένων άρθρων που αφορούν αιματολογικά νοσήματα, αλλά και σε ελληνικά και ευρωπαϊκά ιατρικά συνέδρια με την υποβολή προφορικών εργασιών, αναρτημένων ανακοινώσεων και ομιλιών.

Στην Αγγελική και τον Ιωάννη - Ταξιάρχη, χάρη στους οποίους κάθε μου προσπάθεια αποκτά μεγαλύτερη αξία και καινούριο νόημα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας αυτό το μακροχρόνιο πόνημα, έχω την υποχρέωση κατ' αρχήν να ευχαριστήσω τους Καθηγητές που με βοήθησαν στην επιλογή του θέματος και την συγγραφή της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, τον Καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας, κο Κωνσταντίνο Ν. Συρίγο, ο οποίος συνεχίζει και με στηρίζει αδιάκοπα στον επαγγελματικό και επιστημονικό στίβο, την Ομότιμη Καθηγήτρια Παθολογίας και Ενδοκρινολογίας, κα Ευανθία Διαμάντη – Κανδαράκη, η οποία ήταν κάθε φορά παρούσα όταν χρειαζόμουν την βοήθειά της, και ξεχωριστά την τ. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας κα Παρασκευή Ρούσσου, η οποία ήταν και αυτή που με εισήγαγε στον συναρπαστικό κόσμο της Αιματολογίας και με κατεύθυνε στην μέχρι τώρα επαγγελματική και επιστημονική μου πορεία. Προφανώς και ένα μεγάλο κομμάτι της προσπάθειας που καταβλήθηκε όλα αυτά τα χρόνια δεν θα μπορούσε να έχει πραγματοποιηθεί χωρίς την υποστήριξη και την συνεχή παρότρυνση για το «αιέν αριστεύειν» (χωρίς να έχει βέβαια κάθε φορά το επιθυμητό αποτέλεσμα) από τους γονείς μου, Ιωάννη και Ζωή. Το εργαστηριακό τμήμα της παρούσας Διατριβής ολοκληρώθηκε λόγω της διαρκούς υποστήριξης από την Συντ. Διευθύντρια του Αιμοπαθολογοανατομικού Εργαστηρίου, ΓΝΑ «Ο Ευαγγελισμός», κα Ασημίνα Παπανικολάου, τον Διευθυντή κο Λεωνίδα Μαρίνο και ιδιαίτερα από την Δρ. Βιολογίας του Εργαστηρίου, κα Εύη Πούλιου, η οποία με περισσή επιμονή και προθυμία ετοίμασε τα βιοπτικά υλικά. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον φίλο και συνάδελφο Παθολόγο, κο Σταμάτη Παπαδάτο, για την πολύτιμη συνεισφορά του στην στατιστική επεξεργασία των δεδομένων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας Διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Πρόλογος

1.2 Εισαγωγή

1.3 Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός της μελέτης

2.2 Θεραπευτικές προεκτάσεις

2.3 Υλικά και μέθοδοι

2.4 Στατιστική ανάλυση

2.5 Αποτελέσματα

2.6 Συμπεράσματα - Συζήτηση

3. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

4. SUMMARY

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6. ΣΧΕΤΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Πρόλογος

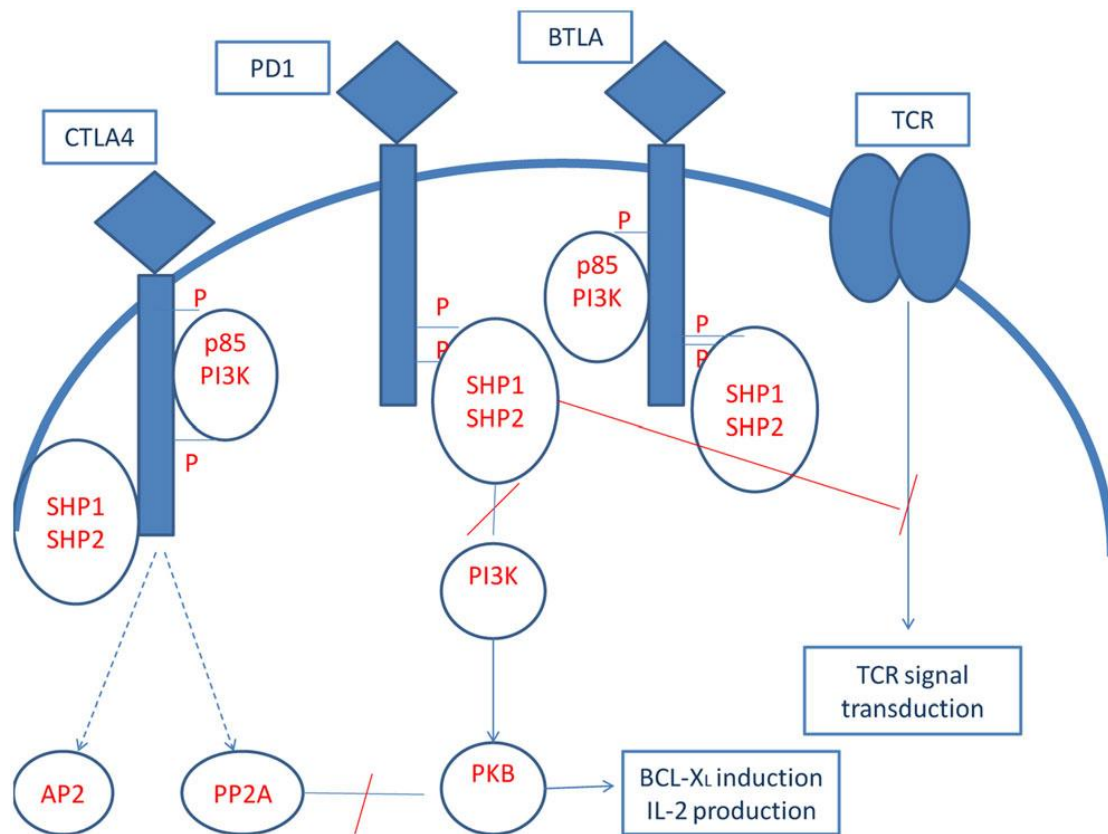
Τα λεμφώματα αποτελούν κακοήθειες του λεμφικού ιστού ο οποίος και αποτελεί σημαντικό συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος. Είναι επομένως αξιοσημείωτο ότι η αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτές τις κακοήθειες ποικίλλει, από εξαιρετικά ζωνρή όπως στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin όπου και τα φλεγμονώδη κύτταρα αποτελούν έως και το 99% του νεοπλασματικού ιστού, μέχρι μάλλον ασθενή όπως παρατηρείται σε ορισμένους ασθενείς με διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα (Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLBCL).¹⁻³ Το τελευταίο αποτελεί και το συνηθέστερο non-Hodgkin λέμφωμα (NHL), αφού αντιπροσωπεύει το 30-40% αυτών. Ανήκει στα υψηλής κακοήθειας λεμφώματα και οι συγκεκριμένοι ασθενείς εμφανίζουν 53-94% 4/ετές διάστημα ελεύθερο νόσου (Progression Free Survival, PFS) και 55-94% 4/ετή συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS), ανάλογα με κλινικούς, εργαστηριακούς και απεικονιστικούς παράγοντες κινδύνου και τον υπολογισμό προγνωστικών score όπως το R-IPI (revised International Prognostic Index) και το National Comprehensive Cancer Network ανάλογό του (NCCN-IPI) (5/ετές PFS 30-91% και 5/ετής OS 33-96%).⁴⁻⁶ Σε κυτταρικό και μοριακό ωστόσο επίπεδο, η κλινική πορεία και πρόγνωση των ασθενών φαίνεται πως εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από την διαφυγή των λεμφωματικών κυττάρων από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος και κυρίως από τα Τ λεμφοκύτταρα, τα οποία και συνιστούν τον κύριο αμυντικό μηχανισμό έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων.⁷⁻¹² Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορους μηχανισμούς όπως την μειωμένη παραγωγή και έκφραση καρκινικών αντιγόνων, την μεταβολική εξάντληση των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος, το παθολογικό ενδοθήλιο των νεοαγγείων, την επιστράτευση ανοσοκατασταλτικών

μηχανισμών όπως τα ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα αλλά και την καταστολή των ήδη διεγερθέντων λεμφοκυττάρων με αντινεοπλασματική δράση μέσω της παραγωγής και έκκρισης ανοσοκατασταλτικών μορίων και ειδικών συνδετών (ligands).¹³⁻²⁷ Τα παραπάνω παρατηρούνται και σε αιματολογικές κακοήθειες, όπως είναι το DLBCL,²⁸⁻³¹ ενώ σημαντικό ανασταλτικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και επομένως στην ανοσοεπιτήρηση και καταστροφή των λεμφωματικών κυττάρων διαδραματίζει και ο ανοσοκατασταλτικός υποδοχέας των λεμφοκυττάρων programmed cell death-1 (PD-1) μέσω της σύνδεσής του με 2 μόρια-συνδέτες, τα PD-L1 (CD274 ή B7-H1) και PD-L2 (CD273 ή B7-DC), όλοι μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας B7.^{32,33}

1.2 Εισαγωγή

Ο PD-1 (CD279) είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I (διατρέχει μία μόνο φορά την κυτταρική μεμβράνη) που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο PDCD1. Επίσης είναι μέλος της εκτεταμένης οικογένειας των CD28/CTLA-4 ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Αποτελείται από 268 αμινοξέα και περιλαμβάνει μια εξωκυττάρια IgV μεταβλητή περιοχή, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια ουρά η οποία και έχει κατεύθυνση προς το ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου. Η ενδοκυττάρια ουρά περιέχει επίσης δύο θέσεις φωσφορυλίωσης οι οποίες εντοπίζονται σε τυροσινικούς ανοσοϋποδοχείς με ανασταλτική και τροποποιητική λειτουργία, γεγονός που φανερώνει ότι ο PD-1 δρα ανασταλτικά στα διεγερτικά σήματα που καταλήγουν στον υποδοχέα των T λεμφοκυττάρων (T Cell Receptor, TCR).³⁴⁻³⁶

Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων επάγει την έκφραση του PD-1 στην κυτταρική επιφάνεια και την φωσφορυλίωση όλων των ανασταλτικών υποδοχέων. Το φωσφορυλιωμένο μόριο Y201 απελευθερώνει επίσης την φωσφατάση PP2A, η οποία και αναστέλλει την δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB). Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας PD-1 συνδέεται στην συνέχεια με τις φωσφατάσες Src homology 2 (SH2)-domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 και 2 (SHP1 και SHP2). Αυτές οι φωσφατάσες συμβάλλουν τόσο στην άμεση καταστολή της εγγύς TCR σηματοδότησης, όσο και στην αναστολή της ενεργοποίησης της κινάσης της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K) και την επακόλουθη ενεργοποίηση της PKB (Εικόνα 1).³⁷



Εικόνα 1. Κατασταλτικές οδοί της ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων. AP2, Acid-binding Protein 2; BCL-X_L, αντιαποπτωτική πρωτεΐνη (μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών BCL-2); BTLA, B- and T-Lymphocyte Attenuator; CTLA4, Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4; IL-2, Interleukin-2; PD1, programmed cell death-1; p85, ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K; PI3K, κινάση της τριφωσφορικής ινοσιτόλης (Phosphatidylinositol 3-Kinase); PKB, πρωτεϊνική κινάση B (Protein Kinase B); PP2A, φωσφατάση 2A (Protein Phosphatase 2A); SHP1 και SHP2, φωσφατάσες Src homology 2 (SH2)-domain-containing protein tyrosine phosphatase 1 και 2; TCR, υποδοχέας των T λεμφοκυττάρων (T Cell Receptor).

Αρνητική ρύθμιση της λειτουργίας των T λεμφοκυττάρων μέσω του PD-1 πραγματοποιείται εξάλλου και μέσω της αναστολής της διέγερσης της PI3K/Akt οδού από το CD28 μόριο.^{38,39}

Σε μελέτες σε πειραματόζωα είχε βρεθεί αρχικά ότι T λεμφοκύτταρα με γενετική σίγαση του γονιδίου του PD-1 διεγείρονταν πιο έντονα κατά την επαφή με αλλοαντιγόνα.⁴⁰ Έτσι δημιουργήθηκε η υπόθεση ότι η σύνδεση του PD-1 με τους συνδέτες του οδηγεί στην καταστολή της παραγωγής κυτταροκινών και της προόδου του κυτταρικού κύκλου (λειτουργική ανεργία) τόσο των CD4+ όσο και των CD8+ T λεμφοκυττάρων και αποτελεί σημαντικό σημείο ελέγχου στην ρύθμιση των ανοσολογικών απαντήσεων.^{34,41-46}

Την ίδια περίοδο αποδείχθηκε ότι η σύνδεση του PD-L1 στον PD-1 οδηγεί σε απόπτωση των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων και διεγείρει την παραγωγή της ανοσοκατασταλτικής ιντερλευκίνης (IL)-10 από τα λεμφοκύτταρα *in vitro* αλλά και *in vivo*, ενώ τα παραπάνω μπορούν να ανασταλούν με την χορήγηση μονοκλωνικού anti-PD-L1 αντισώματος.^{47,48}

Η σύνδεση του PD-L1 στο PD-1 μόριο που εκφράζεται στη επιφάνεια των μονοκυττάρων οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση των τελευταίων και στην παραγωγή IL-10 που αναστέλλει την λειτουργία των CD4+ T λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με HIV λοίμωξη και κακοήθειες.^{49,50} Η σύνδεση του PD-L1 στον υποδοχέα του προάγει τέλος την λειτουργική ανεργία των T λεμφοκυττάρων καθώς και την παραγωγή και έκπτυξη ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων, τα οποία επίσης δρουν κατασταλτικά στη λειτουργία των διεγερμένων λεμφοκυττάρων ενώ σε πειραματικό επίπεδο η αναστολή του PD-1/PD-L1 άξονα οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή και λειτουργικότητα των ρυθμιστικών T λεμφοκυττάρων.^{41,51-57} Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το

γεγονός ότι τα παραπάνω μπορούν να αναστραφούν, σε πειραματικά πάλι μοντέλα, με την χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης, ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου χημειοθεραπευτικού φαρμάκου στις αιματολογικές και όχι μόνο κακοήθειες, αλλά και σε αυτοάνοσα νοσήματα.⁵⁸

Από την άλλη, η σύνδεση του PD-L2 με τον PD-1 δε φαίνεται να οδηγεί σε απόπτωση αλλά σε αναστολή του πολλαπλασιασμού και της παραγωγής κυτταροκινών από τα CD4+ T λεμφοκύτταρα.⁵⁹

Έτσι, συνολικά η σηματοδότηση μέσω του PD-1 φυσιολογικά αμβλύνει την διέγερση των T λεμφοκυττάρων και προστατεύει τους γειτονικούς ιστούς από την επέκταση της φλεγμονής, παρέχοντας μία ισορροπία μεταξύ αποτελεσματικής ανοσιακής απάντησης και ανοσοεπαγόμενης ιστικής καταστροφής, αλλά στην περίπτωση κακοηθειών διαδραματίζει αρνητικό ρόλο αφού συμβάλλει στην ανοσοδιαφυγή των νεοπλασματικών κυττάρων.^{43-46, 60, 61} Ο υποδοχέας PD-1 εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων, αλλά και σε B λεμφοκύτταρα, κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural Killer, NK) και σε μονοκύτταρα/μακροφάγα, γεγονός που υποδεικνύει ότι έχει περισσότερο διευρυμένο ανοσοκατασταλτικό ρόλο σε σύγκριση με τον επίσης ανοσοκατασταλτικό υποδοχέα CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CD152) ο οποίος εκφράζεται μόνο στα T λεμφοκύτταρα και μάλιστα στην πρώιμη φάση ενεργοποίησής τους.³⁴ Η έκφραση του PD-L2 περιορίζεται στους πνεύμονες, στο ήπαρ και στο πάγκρεας, σε B και T λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά και σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα ενώ ο PD-L1 έχει πιο ευρεία έκφραση καθώς ανιχνεύεται και σε λεμφοαιμοποιητικά, ενδοθηλιακά, και ιστικά παρεγχυματικά/επιθηλιακά κύτταρα μετά από έκθεση σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, πιθανώς προστατεύοντας τους μη αιμοποιητικούς ιστούς από την υπέρμετρη διέγερση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.^{32, 59, 62-65} Επίσης ο PD-L1 έχει

ανιχνευθεί σε διάφορους συμπαγείς όγκους, όπου και δρα προστατευτικά για τα καρκινικά κύτταρα ^{48, 62, 66-69} και έχει συσχετισθεί με πρόοδο νόσου και πτωχή πρόγνωση, ^{46, 68, 70-84} όπως και η ανίχνευση του PD-1 στα T λεμφοκύτταρα τα διηθούντα τον όγκο (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs). ⁸⁵

Φαίνεται επομένως ότι ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες σπάνια εκφράζονται τα μόρια-συνδέτες του PD-1, σε μία ποικιλία καρκινικών ιστών παρατηρείται υπερέκφρασή τους και με αυτό τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διαφύγουν της ανοσοεπιτήρησης μέσω διέγερσης του PD-1, αλλά ταυτόχρονα τέθηκε και η βάση για την ανάπτυξη αντι-PD-1 και αντι-PD-L1 θεραπειών για την καλύτερη καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων. ⁸⁶⁻⁸⁹

1.3 Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

Σε T κυτταρικές σειρές στις οποίες έχει ανασταλεί η έκφραση του PD-1 παρατηρείται αυξημένη κυτταρολυτική δραστηριότητα και παραγωγή IL-2, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η διέγερση του PD-1 υποδοχέα μέσω του PD-L1 δρα κατασταλτικά στη δράση των CD8⁺ T λεμφοκυττάρων έναντι καρκινικών κυττάρων.⁹⁰ Σε άλλες κυτταρικές σειρές η επαγωγή της έκφρασης του PD-L1 οδηγεί σε αναστολή της διαμεσολαβούμενης από τα CD8⁺ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα και σε αυξημένο πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των οδών ERK και mTOR.⁹¹⁻⁹³ Τα παραπάνω μπορούν να ανασταλούν με αντισώματα κατά του PD-L1 (anti-PD-L1 antibodies, Abs) ή με γενετική σίγαση του PD-1.^{66, 91} Επομένως, η έκφραση του PD-L1 στα καρκινικά ή/και σε άλλα κύτταρα μπορεί να οδηγεί στην ανοσοδιαφυγή των κακόηθων κυττάρων μέσω της διέγερσης της PD-L1/PD-1 οδού, τόσο στα CD4⁺ όσο και στα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα.^{94, 95} Τα κύτταρα που εκφράζουν την πρωτεΐνη PD-L1 διαφεύγουν από τους μηχανισμούς της κυτταρικής ανοσίας με διάφορους τρόπους, και από τους κυριότερους είναι η επαγωγή της απόπτωσης στα PD-1 θετικά T λεμφοκύτταρα που διηθούν τον νεοπλασματικό ιστό, μέσω της ενεργοποίησης της PD-1/PD-L1 οδού.^{48, 62}

Οι PD-1 και PD-L1 έχουν ανιχνευθεί και σε αιματολογικές κακοήθειες^{9, 56, 96-109} και μάλιστα σε μία μελέτη η μείωση στο ποσοστό έκφρασης του PD-1 συσχετίστηκε με παράλληλη κλινική βελτίωση.¹⁰⁶ Η διαγνωστική και προγνωστική αξία των PD-1 θετικών TILs έχει αναδειχθεί σε διάφορες κακοήθειες του λεμφικού ιστού.^{97, 101, 102, 110, 111, 112} Ο PD-L1 έχει ανιχνευθεί σε βιοψίες κυρίως από ασθενείς με πρωτοπαθές λέμφωμα μεσοθωρακίου (Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma, PMLBCL) αλλά και σε ασθενείς με DLBCL του ιστολογικού υπότυπου του μη προερχόμενου από το βλαστικό κέντρο (non-Germinal Center B-cell like, non-GCB).^{7, 104, 107, 110 - 114}

Ο PD-L1 εκφράζεται και στα νεοπλασματικά και στα μη νεοπλασματικά κύτταρα (μακροφάγα κυρίως) και η ανίχνευσή του (ή οι αντίστοιχες γονιδιακές αλλοιώσεις) φαίνεται ότι επηρεάζει την πρόγνωση των ασθενών ¹¹¹⁻¹¹⁷, αν και όχι σε όλες τις μελέτες. ¹¹⁸ Τα διαφορετικά αυτά αποτελέσματα πιθανά οφείλονται σε διαφορετικούς πληθυσμούς μεταξύ των μελετών, διαφορετικά PD-L1 αντιδραστήρια ή ακόμα και σε μία πιο πολύπλοκη βιολογία του μικροπεριβάλλοντος και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διάφορων μορίων και κυττάρων που εμπλέκονται στην παθογένεια αυτού του ετερογενούς νοσήματος.

Σε ασθενείς με DLBCL ο PD-1 υποδοχέας έχει ανιχνευθεί τόσο στα λεμφωματικά κύτταρα όσο και στα TILs - στα τελευταία σε ποσοστό που ανέρχεται ως και το 40-60% των ασθενών με DLBCL ¹¹⁶ - και η αυξημένη παρουσία PD-1 θετικών TILs έχει συσχετισθεί κυρίως με καλύτερη συνολική επιβίωση ^{8, 105, 113, 114, 116, 118} (αντίθετα αποτελέσματα περιγράφονται στην πλέον πρόσφατη μελέτη ¹¹⁹) σε αντίθεση με τα ευρήματα μελετών σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους. ^{84, 85} Τέλος, σε ασθενείς με DLBCL έχει βρεθεί ότι η παρουσία βοηθητικών CD4+ T λεμφοκυττάρων καταστέλλεται από την παρουσία T ρυθμιστικών κυττάρων και μέσω της αλληλεπίδρασης PD-1/PD-L1. ⁹⁸

Η γενετική βάση της ανοσοδιαφυγής των λεμφωματικών κυττάρων μέσω της PD-1/PD-L1 οδού δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη. Προς το παρόν, έχει συσχετισθεί η αυξημένη έκφραση του PD-L1 μέσω της γονιδιακής του ενίσχυσης αλλά και της διαμετάθεσης έκτοπου υποκινητή. ^{104, 107, 114, 115} Πρόσφατα έχουν περιγραφεί και επιπλέον μηχανισμοί, οι οποίοι περιλαμβάνουν είτε δομικές αλλοιώσεις του 3' άκρου του PD-L1 γονιδίου είτε αυξημένη ενεργοποίηση του υποδοχέα των B λεμφοκυττάρων (B cell receptor, BCR) και περαιτέρω μετάδοσης του ενδοκυττάρου σήματος μέσω του μορίου Myc ή του NF-kappaB μονοπατιού. ^{120, 121} Άλλοι

μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αυξημένη έκφραση του PD-L1 φαίνεται πως είναι μεταλλάξεις των μορίων MYD88 και SOCS-1, η λοίμωξη από τον Epstein-Barr Virus (EBV) και τα αυξημένα επίπεδα κυτταροκινών όπως η ιντερφερόνη γ (IFN-γ) και η IL-10.¹²²

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα εργασία στοχεύει στην διερεύνηση παθογενετικών οδών και της χημειοανθεκτικότητας στα DLBCL και συγκεκριμένα στα DLBCL, not otherwise specified (NOS), τα οποία και συνιστούν τουλάχιστον το 25-30% των DLBCL.¹²³ Για τον συγκεκριμένο τύπο λεμφώματος έχουν ήδη περιγραφεί δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες, όπως ο ιστολογικός υπότυπος ο μη προερχόμενος από το βλαστικό κέντρο (non-GCB type), η υπερέκφραση της myc πρωτεΐνης ή αναδιατάξεις των γονιδίων MYC, BCL2 και BCL6.¹²⁴⁻¹²⁸ Η αναγνώριση επιπρόσθετων αρνητικών προγνωστικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει και στην πληρέστερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας αυτών των λεμφωμάτων αλλά και στην καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπισή τους. Για τον σκοπό αυτό θα αναλυθεί ο ρόλος ενός σημαντικού για την αντικαρκινική και αντιλεμφωματική δραστηριότητα των T λεμφοκυττάρων υποδοχέα (ανοσοϋποδοχέα), του PD-1. Η υπόθεση εργασίας είναι ότι στους ασθενείς με DLBCL, NOS και πτωχή ανταπόκριση στην θεραπεία 1^{ης} γραμμής υπάρχει αυξημένη έκφραση των PD-L1 και PD-1 και, μέσω ενεργοποίησης της PD-1/PD-L1 οδού, ανοσοδιαφυγή των λεμφωματικών κυττάρων.

2.2 Θεραπευτικές προεκτάσεις

Ασθενείς με DLBCL, NOS και αυξημένη έκφραση PD-1 ή/και PD-L1 θα μπορούσαν να ωφεληθούν από περισσότερο εντατικές θεραπείες ή την προσθήκη μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά των PD-1 ή/και PD-L1 στα καθιερωμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα.

2.3 Υλικά και μέθοδοι

Έγινε ανασκόπηση των βιοπτικών υλικών ασθενών του Αιμ/κού Τμήματος της Γ' Παν. Παθ. Κλινικής ΕΚΠΑ με DLBCL, NOS τα οποία είχαν αποσταλεί στο Αιμοπαθολογοανατομικό Εργαστήριο του Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός» μεταξύ των ετών 2006 και 2018. Από τα δείγματα εξαιρέθηκαν εκείνα από ασθενείς με υποτροπιάζον νόσημα ή που αρχικά ήταν χαμηλής κακοήθειας και στην συνέχεια υπέστησαν εκτροπή προς υψηλής κακοήθειας και έτσι παρέμειναν 27 δείγματα μονιμοποιημένα με φορμόλη και σταθεροποιημένα σε παραφίνη (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE). Σε όλες τις βιοψίες έγινε επιβεβαίωση της αρχικής διάγνωσης σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας [World Health Organization (WHO) classification, 4^η έκδοση] ¹²⁹ από τους Αιμοπαθολογοανατόμους (Α.Π. και Λ.Μ.). Παράλληλα καταγράφηκαν τα κλινικά στοιχεία από τους φακέλους των ασθενών. Η περίοδος παρατήρησης ήταν από 29/6/2006 έως και 28/06/2018. Η χρήση των υλικών και των κλινικών πληροφοριών ήταν εγκεκριμένη από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Νοσοκομείου και εναρμονισμένη με τη Σύμβαση του Ελσίνκι.

Τα βιοπτικά υλικά επεξεργάστηκαν σύμφωνα με τις καθιερωμένες διαδικασίες. Συνοπτικά, το κύριο αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των λεμφωμάτων ήταν το PDL-1 (Dako). Η αποκάλυψη του επιτόπου μέσω θερμότητας πραγματοποιήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων με θέρμανση των πλακιδίων για 5 λεπτά στα 750 W και στην συνέχεια για 15 λεπτά στα 500 W και σε ρυθμιστικό διάλυμα με Ph 6.0. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αντίχενωσης Envision (Dako). Η παραγωγή της χρώσης στηρίχθηκε στην 3,3'-διαμινοβενζιδίνη και το H₂O₂, και στα πλακίδια εφαρμόστηκε και χρώση με αιματοξυλίνη. Η ανοσοϊστοχημική

χρώση πραγματοποιήθηκε σε Dako Autostainer (Dako), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Ως όριο θετικότητας για τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τα μόρια BCL2, BCL6, CD10 και MUM1 επιλέχθηκε το 30%, αντικατοπτρίζοντας την καθιερωμένη κλινική πρακτική. Η έκφραση των μορίων MYC και Ki-67 καταγράφηκε χρησιμοποιώντας μια ποσοστιαία κλίμακα από 0 έως και 100%, και το όριο θετικότητας για την MYC χρώση ήταν το 40%, και πάλι αντικατοπτρίζοντας την καθιερωμένη κλινική πρακτική. Η θετικότητα στην PD-L1 χρώση βαθμολογήθηκε ως εξής: 0 (απουσία χρώσης ή χρώση σε <5% των λεμφωματικών κυττάρων), 1 (κανένα στοιχείο λόγω απουσίας υλικού, μη βιώσιμου ιστού ή τεχνικού σφάλματος), 2 (ασθενώς θετική, ασθενής χρώση στο 5-20% των λεμφωματικών κυττάρων), ή 3 (ισχυρά θετική, μέτρια έως έντονη χρώση σε >20% των λεμφωματικών κυττάρων).¹³⁰ Η θετικότητα της PD-1 χρώσης στηρίχθηκε στον αριθμό των PD-1 θετικών TILs, εκτιμήθηκε με ημιποσοτική μέθοδο και βαθμολογήθηκε ως εξής: 0 [καθόλου θετικά κύτταρα/πεδίο υψηλής ανάλυσης (high-power field, HPF)], 1 (λιγότερα από 10 θετικά κύτταρα/HPF), 2 (10-30 θετικά κύτταρα/HPF) ή 3 (περισσότερα από 30 θετικά κύτταρα/HPF).¹¹⁸ Για την ανάλυση των δεδομένων, και για τους δύο δείκτες (PD-L1 και PD-1) αποφασίσθηκε να θεωρούνται τα scores 0 και 1 ως αρνητικά και τα scores 2 και 3 ως θετικά.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση των κλινικών και παθολοανατομικών δεδομένων έγινε χρησιμοποιώντας τον ακριβή έλεγχο του Fisher και την ανάλυση επιβίωσης με το λογισμικό IBM SPSS Statistics 23. Για την σύγκριση της μέσης διάρκειας OS καθώς και την μέση διάρκεια πλήρους ανταπόκρισης (Complete Response, CR) μεταξύ των PD-L1 θετικών και PD-L1 αρνητικών ασθενών χρησιμοποιήθηκε το t test ανεξάρτητων δειγμάτων και για την σύγκριση των καμπυλών επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε ο εκτιμητής Kaplan-Meier εφαρμόζοντας το test log-rank. Τέλος, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η προγνωστική αξία των προτεινόμενων παραγόντων κινδύνου πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις προσαρμοσμένες στην ηλικία και το φύλο των ασθενών, καθώς και πολυπαραγοντική ανάλυση χρησιμοποιώντας το μοντέλο αναλογικού κινδύνου του Cox.

2.5 Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά των 27 ασθενών των οποίων τα βιοπτικά υλικά ήταν τελικά διαθέσιμα. Η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν τα 64,5 έτη, η πλειοψηφία τους ήταν πρωχής πρόγνωσης σύμφωνα με τα R-IPI και NCCN-IPI, και 6 (22%) από αυτούς είχαν διαγνωσθεί με DLBCL από κύτταρα του βλαστικού κέντρου (Germinal Center B-cell ή GCB-type DLBCL), ενώ 20 (74%) με non-GCB DLBCL ιστολογικό υπότυπο.

	N (%)
Ηλικία (έτη)	
διάμεση τιμή	64,5
εύρος	27 – 96
άρρεν φύλο	13 (48%)
Revised International Prognostic Index (R-IPI)	
προγνωστικό score	
πολύ καλής πρόγνωσης	5 (19%)
καλής πρόγνωσης	7 (26%)
πτωχής πρόγνωσης	15 (55%)
National Comprehensive Cancer Network (NCCN)-IPI	
προγνωστικό score	
χαμηλού κινδύνου	3 (11%)
χαμηλού - ενδιάμεσου κινδύνου	4 (15%)
υψηλού - ενδιάμεσου κινδύνου	8 (30%)
υψηλού κινδύνου	6 (22%)
άγνωστο	6 (22%)
Στάδιο κατά Ann-Arbor	
I και II	11 (41%)
III και IV	16 (59%)
Κύτταρο προέλευσης (Cell Of Origin, COO)	
Germinal Center B-cell like (GCB)	6 (22%)
non-GCB	20 (74%)
άγνωστο	1 (4%)
Διάμεση παρακολούθηση (μήνες)	31,5

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ασθενών.

Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται τα παθολογοανατομικά ευρήματα από τις βιοψίες των ασθενών. Η ανίχνευση του PD-1 κυμάνθηκε σε ποσοστό περίπου 22%, ενώ από τα 27 βιοπτικά υλικά ασθενών με DLBCL, NOS το 77,8% βρέθηκε να είναι θετικό στο PD-L1. Τα θετικά για τον δείκτη PD-L1 δείγματα συσχετίστηκαν με υψηλότερο ποσοστό non-GCB φαινοτύπου, θετικότητας στο BCL-2 μόριο και απουσίας θετικότητας για το μόριο MYC και με πιο έντονη θετικότητα για τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 σε σύγκριση με τα υλικά στα οποία δεν ανιχνεύθηκε ο δείκτης PD-L1. Όσον αφορά τα 21 βιοπτικά υλικά στα οποία δεν ανιχνεύθηκε ο PD-1, αυτά ανήκαν συχνότερα στον non-GCB ιστολογικό υπότυπο, ήταν θετικά στο BCL-2 μόριο και αρνητικά για το μόριο MYC, και είχαν πιο έντονη θετικότητα στον δείκτη Ki-67 σε σχέση με τα PD-1 θετικά δείγματα. Ωστόσο, καμία από τις διαφορές δεν βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική.

Παθολογοανατομικά ευρήματα		PD-1 στα TILs, N (%)		PD-L1 θετικότητα, N (%)			Συνολικός αριθμός PD-L1 θετικών δειγμάτων, N (%)	PD-L1 αρνητικά δείγματα, N (%)	P ¹	P ²	P ³
		θετικά	αρνητικά	μόνο στα κακοήθη κύτταρα	μόνο στα μη κακοήθη κύτταρα	και στα κακοήθη και στα μη κακοήθη κύτταρα					
Συνολικά		6 (22,2)	21 (77,8)	7 (25,9)	1 (3,7)	13 (48,1)	21 (77,8)	6 (22,2)			
Φαινότυπος	GCB	3 (11,1)	2 (7,4)	2 (7,4)	0 (0)	1 (3,7)	3 (11,1)	2 (7,4)	0.303	0.056	1.00
	non-GCB	3 (11,1)	19 (70,4)	5 (18,5)	1 (3,7)	12 (44,4)	18 (66,6)	4 (14,8)			0.544
BCL-2	<30%	4 (14,8)	7 (25,9)	1 (3,7)	1 (3,7)	6 (22,2)	8 (29,6)	3 (11,1)	0.662	0.187	0.576
	≥30%	2 (7,4)	14 (51,8)	6 (22,2)	0 (0)	7 (25,9)	13 (48,1)	3 (11,1)			0.475
MYC	<40%	3 (11,1)	14 (51,8)	5 (18,5)	0 (0)	9 (33,3)	14 (51,8)	3 (11,1)	0.638	0.638	0.082
	≥40%	3 (11,1)	7 (25,9)	2 (7,4)	1 (3,7)	4 (14,8)	7 (25,9)	3 (11,1)			1.00
Ki-67	<80%	3 (11,1)	7 (25,9)	2 (7,4)	0 (0)	7 (25,9)	9 (33,3)	1 (3,7)	0.363	0.638	0.183
	≥80%	3 (11,1)	14 (51,8)	5 (18,5)	1 (3,7)	6 (22,2)	12 (44,4)	5 (18,5)			1.00

Πίνακας 2. Παθολογοανατομικά ευρήματα και σύγκριση με τον ακριβή έλεγχο του Fisher. P¹: PD-L1 θετικοί vs PD-L1 αρνητικών ασθενών. P²: PD-1 θετικοί vs PD-1 αρνητικών ασθενών. P³: έκφραση του PD-1 vs έκφρασης του PD-L1 σε μη κακοήθη κύτταρα μόνο. Επιλεγμένο επίπεδο σημαντικότητας = 0.05. Τα ποσοστά αναφέρονται στον συνολικό αριθμό ασθενών.

Όλοι οι ασθενείς με PD-L1 θετικό DLBCL εκτός από έναν (95%) ολοκλήρωσαν τους προβλεπόμενους κύκλους χημειοθεραπείας (ΧΜΘ), όπως και όλοι οι ασθενείς με PD-L1 αρνητικό DLBCL. Οι PD-L1 θετικοί ασθενείς ήταν κυρίως >60 ετών, και εμφάνιζαν συχνότερα συστηματικά συμπτώματα, είχαν υψηλότερα R-IPI και NCCN-IPI και μικρότερο μέγιστο μέγεθος λεμφαδενικού block, ενώ επιτύγχαναν και πιο συχνά ανταπόκριση στην 1^{ης} γραμμής θεραπεία, σε σχέση με τους PD-L1 αρνητικούς ασθενείς. Και πάλι όμως, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά τα κλινικά χαρακτηριστικά δεν βρέθηκε μεταξύ των PD-L1 θετικών και PD-L1 αρνητικών ασθενών (Πίνακας 3).

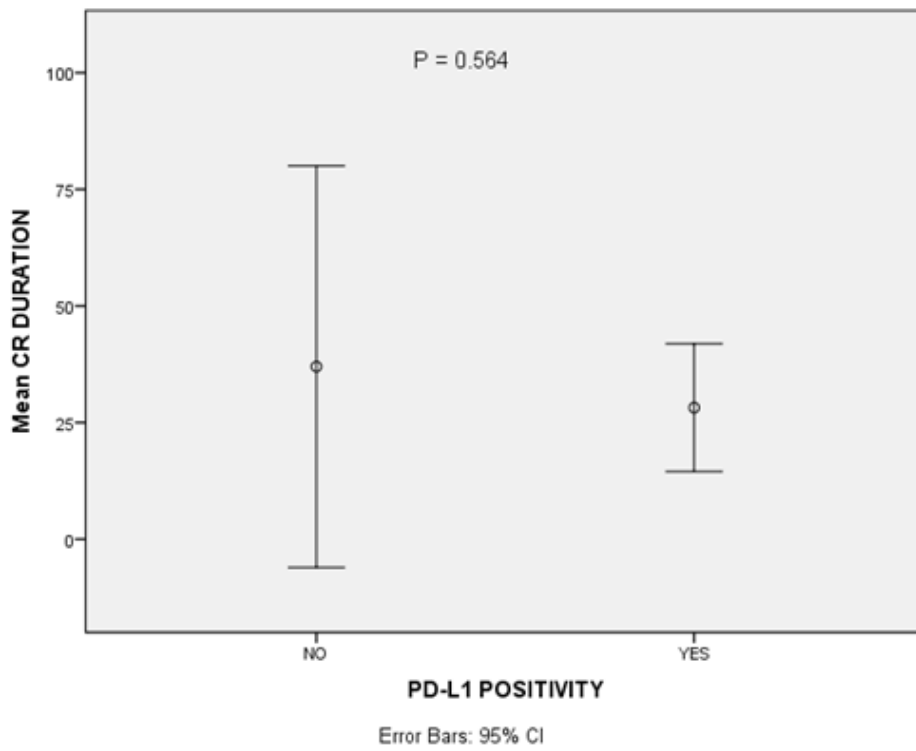
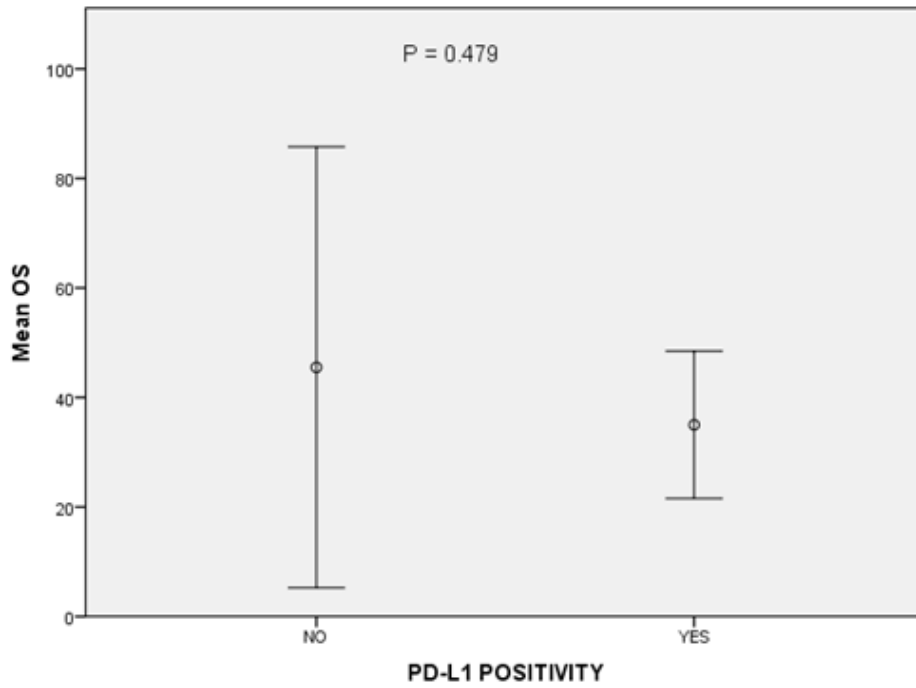
		Παθολογοανατομικά ευρήματα		P
		PD-L1 θετικά δείγματα, N (%)	PD-L1 αρνητικά δείγματα, N (%)	
Συνολικός πληθυσμός		21 (77,8)	6 (22,2)	
Ηλικιακή ομάδα	≤60 ετών	10 (37)	3 (11,1)	1.00
	>60 ετών	11 (40,7)	3 (11,1)	
Φύλο	Άρρενες ασθενείς	9 (33,3)	4 (14,8)	0.385
	Θήλειες ασθενείς	12 (44,4)	2 (7,4)	
Συστ. συμπτώματα	Ναι	13 (48,1)	2 (7,4)	1.00
	Όχι	8 (29,6)	4 (14,8)	
R-IPI score	Πτωχής πρόγνωσης	12 (44,4)	3 (11,1)	1.00
	Καλής/ Πολύ καλής πρόγνωσης	9 (33,3)	3 (11,1)	
NCCN-IPI score	L	4 (14,8)	2 (7,4)	0.588
	L - I/ H / H- I	17 (63)	4 (14,8)	
Στάδιο κατά Ann- Arbor	I - II	9 (33,3)	2 (7,4)	1.00
	III - IV	12 (44,4)	4 (14,8)	
Μέγιστο μέγεθος μάζας	≤7,5 εκ.	13 (48,1)	3 (11,1)	0.662
	>7,5 εκ.	8 (29,6)	3 (11,1)	
CR στην 1 ^η γραμμής θεραπεία	Ναι	14 (51,9)	4 (14,8)	1.00
	Όχι	7 (25,9)	2 (7,4)	

Πίνακας 3. Ακριβής έλεγχος του Fisher. P: PD-L1 θετικοί vs PD-L1 αρνητικών ασθενών. Επιλεγμένο επίπεδο σημαντικότητας = 0.05. Τα ποσοστά αναφέρονται στον συνολικό αριθμό ασθενών. L, low risk/ L - I, low - intermediate risk / H - I, high intermediate risk / H, high risk (χαμηλού, χαμηλού - ενδιάμεσου, υψηλού - ενδιάμεσου και υψηλού κινδύνου), σύμφωνα με το προγνωστικό score NCCN-IPI.

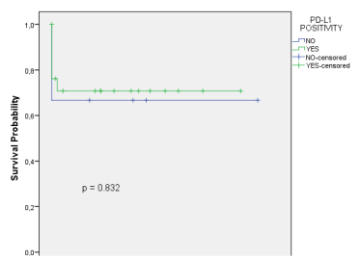
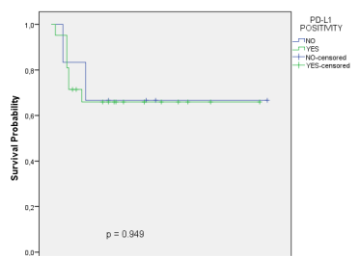
Έντεκα (52,4%) ασθενείς με PD-L1 θετικό DLBCL δεν επιβίωσαν, σε σύγκριση με 2 (33%) PD-L1 αρνητικούς ασθενείς. Η κύρια αιτία θανάτου ήταν η υποτροπιάζουσα/ανθεκτική νόσος. Οι ασθενείς με PD-L1 θετικό DLBCL είχαν μικρότερη διάρκεια OS και CR, αλλά καμία από τις διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 4 και Σχήμα 2). Το test log-rank απέτυχε να αποκαλύψει οποιαδήποτε διαφορά μεταξύ των PD-L1 θετικών και PD-L1 αρνητικών ασθενών σχετικά με την μέση τιμή της OS (35 έναντι 45,5 μηνών, $P = 0.479$) (Πίνακας 4). Επιπλέον, η μέση διάρκεια CR για τους PD-L1 αρνητικούς ασθενείς ήταν 28,19 και 41,03 μήνες για τους PD-L1 θετικούς ασθενείς αντίστοιχα, χωρίς καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0.564$) (Πίνακας 4).

	Έκφραση PD-L1		μέση τιμή διαφοράς (μέση τιμή ± SEM)	95% CI	P
	θετική (μέση τιμή ± SEM)	αρνητική (μέση τιμή ± SEM)			
Διάρκεια CR (μήνες)	28,19 ± 6,561	41,03 ± 16,75	8,81 ± 15,07	[0, 39,85)	0.564
OS (μήνες)	35 ± 6,453	45,50 ± 15,66	10,50 ± 14,60	[0, 40,56)	0.479

Πίνακας 4. Σύγκριση των OS και διάρκειας CR μεταξύ των PD-L1 θετικών και αρνητικών ασθενών, χρησιμοποιώντας το t test ανεξάρτητων δειγμάτων. SEM: Standard error of the mean, τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής. CI: Confidence Intervals, διάστημα εμπιστοσύνης. Επιλεγμένο επίπεδο σημαντικότητας = 0.05.



Σχήμα 2. Μέση τιμή OS και διάρκειας CR στους PD-L1 θετικούς και αρνητικούς ασθενείς.



Σχήμα 3. Καμπύλες Kaplan-Meier για OS και CR στους PD-L1 θετικούς και αρνητικούς ασθενείς .

Όσον αφορά την OS των ασθενών, χρησιμοποιώντας το μοντέλο αναλογικού κινδύνου του Cox προσαρμοσμένο στην ηλικία και το φύλο τους, φάνηκε ότι το προχωρημένο στάδιο (III, IV), η παρουσία συστηματικών συμπτωμάτων και ένα μη χαμηλό κινδύνου NCCN-IPI score είναι αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες αλλά χωρίς στατιστική σημασία. Σε ένα μοντέλο πολυπαραγοντικής ανάλυσης που συμπεριέλαβε τους προαναφερθέντες παράγοντες, το μη χαμηλό NCCN-IPI score εξακολουθούσε να είναι κακός προγνωστικός παράγοντας χωρίς στατιστική σημασία (Πίνακας 5).

Παράμετρος	Ανάλυση προσαρμοσμένη στην ηλικία και το φύλο		Πολυπαραγοντική ανάλυση #	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
<i>PD-L1 θετικοί vs PD-L1 αρνητικών ασθενών</i>	0.872 (0.168-4.515)	0.871	0.461 (0.069-3.070)	0.423
<i>Non-GCB vs GCB φαινότυπος</i>	0.452 (0.055-3.715)	0.452	0.223 (0.020-2.752)	0.248
<i>Στάδια III-IV vs I-II</i>	2.205 (0.388-12.532)	0.372	0.263 (0.006-11.179)	0.485
<i>Παρουσία vs απουσία συστ. συμπτωμάτων</i>	1.006 (0.256-3.948)	0.994	0.494 (0.105-2.328)	0.373
<i>Πτωχής vs καλής/πολύ καλής πρόγνωσης (R-IPI)</i>	0.212 (0.021-2.113)	0.186	0.034 (0.002-4.076)	0.167
<i>Χαμηλού- και υψηλού-ενδιάμεσου, υψηλού vs χαμηλού κινδύνου (NCCN-IPI)</i>	1.402 (0.141-13.913)	0.773	2.982 (0.165-53.752)	0.459

Πίνακας 5. Προγνωστικοί παράγοντες που επηρεάζουν την OS. Επιλεγμένο επίπεδο σημαντικότητας = 0.05. HR: Hazard Ratio, σχετικός στιγμιαίος κίνδυνος. CI: Confidence Intervals, διάστημα εμπιστοσύνης. #: οι μεταβλητές που συμπεριελήφθησαν στην πολυπαραγοντική ανάλυση σχετικά με την OS ήταν η ηλικία, το φύλο, η έκφραση του PD-L1, το κύτταρο προέλευσης, το στάδιο, η παρουσία συστηματικών συμπτωμάτων και τα scores κατά R-IPI και NCCN-IPI.

2.6 Συμπεράσματα - Συζήτηση

Στα DLBCL η έντονη παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων που εκφράζουν ανοσορυθμιστικά μόρια συνεπάγεται την άμεση συσχέτιση της ανοσοδιαφυγής τους με την επακόλουθη επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους, αλλά και πιθανή αντοχή στην ΧΜΘ.^{9, 131} Στην μελέτη που πραγματοποιήσαμε φάνηκε ότι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του PD-1 ήταν ασυνήθης στα βιοπτικά υλικά ασθενών με DLBCL, NOS και ότι η έκφραση του PD-L1 δεν αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την OS και την διάρκεια CR αυτών των ασθενών, αντίθετα με την μελέτη των Miyoshi et al στην οποία φάνηκε ότι η έκφραση του PD-L1 έχει προγνωστικό ρόλο και μάλιστα ανάλογα με τα κύτταρα στα οποία ανιχνεύεται.¹⁰⁹ Στην μέχρι σήμερα διεθνή βιβλιογραφία πάντως φαίνεται ότι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των ανοσοϋποδοχέων και των συνδετών τους στα DLBCL, NOS απέχει ακόμα από το να θεωρηθεί αντικειμενική ή αξιόπιστη. Στην μελέτη των Laurent και συν. καθώς και σε άλλες ανευρέθηκε ένα πολύ υψηλό ποσοστό θετικότητας στον PD-L1, όπως και στον PD-1 και στον PD-L2,^{9, 118, 132} ενώ σε άλλη μελέτη μόλις 11-15% των δειγμάτων αυτών ήταν θετικά για το PD-L1.¹¹⁵ Ένας από τους λόγους για αυτές τις διαφορές που παρατηρούνται είναι ότι ως κατώτερο όριο θετικότητας για το PD-L1 στις πλέον πρόσφατες μελέτες έχει υιοθετηθεί το ποσοστό του 30%,^{31, 111, 113, 115} ενώ σε άλλες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί άλλα όρια όπως το 5% του συνόλου των κυττάρων, ή αρκούσε απλά η πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων να εκφράζει το PD-L1,^{7, 107, 132, 133} και σε άλλες δεν υπήρχε όριο θετικότητας.¹³⁴ Μία ακόμα αιτία ύπαρξης πολυάριθμων προτάσεων ενός συγκεκριμένου ορίου θετικότητας του PD-L1 είναι και η ενδογενής υποκειμενικότητα της εκτίμησης της θετικότητας μίας ανοσοϊστοχημικής χρώσης. Αυτή η δυσκολία αντικειμενικής εκτίμησης της θετικότητας των δειγμάτων στο PD-L1 θα μπορούσε να διορθωθεί με τη χρήση τεχνικών διπλής βαφής, όπως

αυτή για τις PD-L1 και PAX5 πρωτεΐνες.^{7, 9, 115} Στην μελέτη μας πάντως, όσον αφορά τον δείκτη PD-L1, χρησιμοποιήσαμε την πλέον κοινή μεθοδολογία, δηλαδή αρχικά προσδιορίσαμε το ποσοστό των θετικών κυττάρων και την ένταση της θετικότητάς τους, και στην συνέχεια θεωρήσαμε ως θετικά τα δείγματα εκείνα με τουλάχιστον το 5% των λεμφωματικών κυττάρων να είναι έστω και ασθενώς θετικά στην ανοσοϊστοχημική χρώση. Για λόγους ομοιομορφίας και επειδή και για τον PD-1 δεν υπάρχει συγκεκριμένο όριο θετικότητας, για την αξιολόγηση του συγκεκριμένου δείκτη χρησιμοποιήσαμε μία ημιποσοτική μέθοδο αξιολόγησης, θεωρώντας ως θετικά εκείνα τα δείγματα με τουλάχιστον 10 θετικά στην PD-1 ανοσοϊστοχημική χρώση TILs/HPF.

Τα PD-L1 θετικά DLBCL, NOS συσχετίζονται κατά κύριο λόγο με τον non-GCB ιστολογικό υπότυπο^{7, 9, 107, 115} κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και στην μελέτη μας. Ο συγκεκριμένος ιστολογικός υπότυπος χαρακτηρίζεται από μάλλον δυσμενέστερη πρόγνωση σε σχέση με τον GCB.¹³⁵ Φαίνεται επομένως ότι ενώ η έκφραση του PD-L1 στα B NHL είναι ασυνήθης, αυτή αφορά κυρίως τον non-GCB ιστολογικό υπότυπο του οποίου το γονιδιακής έκφρασης ανάλογο (Activated B Cell, ABC λέμφωμα) χαρακτηρίζεται από σαφώς χειρότερη πρόγνωση από τον GCB γονιδιακό υπότυπο.¹³⁵⁻¹⁴⁰ Είναι άρα πιθανό ότι και η έκφραση του PD-L1 συνεισφέρει σε αυτή την διαφορά στην επιβίωση μεταξύ ασθενών με GCB και ABC DLBCL, κάτι το οποίο μένει να διασαφηνισθεί σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης.

Από τις μέχρι τώρα μελέτες ανοσοϊστοχημικής έκφρασης και στους περισσότερους τύπους κακοηθειών έχουν καταγραφεί αυξημένα ποσοστά ανταπόκρισης στις θεραπείες με μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν τον άξονα PD-1/PD-L1 στους ασθενείς εκείνους στους οποίους εκφράζεται ο PD-L1 συνδέτης.^{64, 141} Υπάρχουν ωστόσο και ασθενείς οι οποίοι έχουν εντυπωσιακές ανταποκρίσεις στις παραπάνω

θεραπείες, χωρίς να εκφράζουν τον συνδέτη PD-L1, ενώ δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμα αν η διαφορετική ένταση έκφρασης του PD-L1 στις διάφορες κακοήθειες είναι υπεύθυνη και για το διαφορετικό ποσοστό ανταπόκρισης. Το τελευταίο φαίνεται πάντως να εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως την ίδια την ανοσολογική απάντηση στην περιοχή του όγκου (η οποία με την σειρά της αποτελεί την συνισταμένη της δράσης πολλών μορίων) αλλά και τις υποκείμενες γενετικές αλλαγές ή την συμμετοχή άγνωστων μέχρι τώρα κυτταρικών στοιχείων.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Δεν αποτελεί έτσι έκπληξη το γεγονός ότι προοπτικές κλινικές μελέτες με αναστολείς του άξονα PD-1/PD-L1 αναφέρουν διαφορετικά αποτελέσματα, ιδιαίτερα λαμβάνοντας υπόψη την μη επαρκή ακόμα ποιότητα ή αναπαραγωγιμότητα των ανοσοϊστοχημικών μεθόδων και τα διάφορα μη πιστοποιημένα score έκφρασης στον κακοήθη ιστό.

Συνοψίζοντας, η έκφραση του PD-L1 στον νεοπλασματικό ιστό ασθενών με DLBCL, NOS θα μπορούσε να οδηγεί σε επιθετικότερες βιολογικές συμπεριφορές και η αναστολή της PD-1/PD-L1 οδού με μονοκλωνικά αντισώματα μπορεί να έχει θέση σε αυτούς τους ασθενείς. Μάλιστα από προηγούμενες ήδη μελέτες έχει βρεθεί ότι η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά του PD-1 μπορεί να είναι δραστική σε ασθενείς με DLBCL και PMBCL.^{87, 146, 147} με τα αποτελέσματα ωστόσο ειδικά για τους ασθενείς με υποτροπιάζον / ανθεκτικό στην θεραπεία DLBCL να είναι μάλλον απογοητευτικά.¹⁴⁸ Από την μελέτη μας φαίνεται ότι η έκφραση του PD-L1 ίσως συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση και διαγράφεται επίσης η προοπτική, η ανοσολογική στόχευση της PD-1/PD-L1 οδού να ωφελήσει κάποιους ασθενείς με DLBCL, NOS, ίσως ανάλογα και με τον βαθμό έκφρασης του PD-L1.^{143, 149}

Τα παραπάνω υποστηρίζουν την χορήγηση αντι-PD-1 ή αντι-PD-L1 θεραπείας σε ασθενείς με DLBCL, NOS. Μία τέτοια θεραπευτική προσέγγιση έχει εγγενή πλεονεκτήματα, όπως την τροποποίηση της λειτουργίας των κυττάρων του

ανοσοποιητικού συστήματος σε τοπικό κυρίως επίπεδο (στον καρκινικό ιστό), την θεραπευτική στόχευση των ανοσιακών ελλειμμάτων που οφείλονται στα νεοπλασματικά κύτταρα αλλά και την σύγχρονη αποκατάσταση της λειτουργίας των ήδη διεγερθέντων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.¹⁵⁰ Ωστόσο, θα πρέπει να προσδιοριστούν με σαφήνεια οι ασθενείς εκείνοι που θα ωφεληθούν περισσότερο από τις στοχευμένες ανοσοτροποποιητικές θεραπείες (όπως και εκείνοι που είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν σοβαρού βαθμού παρενέργειες), ο πλέον κατάλληλος χρόνος και τρόπος χορήγησής τους και η διάρκειά τους, αλλά και δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία, όπως έχει γίνει προσπάθεια για παράδειγμα με τα κριτήρια ανταπόκρισης τα σχετιζόμενα με τις ανοσολογικές αντιδράσεις (immune-related response criteria, irRC) όσον αφορά τους συμπαγείς όγκους και τα κριτήρια LYRIC (LYmphoma Response to Immunomodulatory therapy Criteria) όσον αφορά ασθενείς με λεμφώματα.¹⁵¹⁻¹⁵³

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η θεραπευτική στόχευση του PD-L1 ενδέχεται να έχει διαφορετικές βιολογικές επιδράσεις από την στόχευση του PD-1. Ο PD-L1 θεωρείται ότι μπορεί να έχει αρνητική σηματοδοτική δράση στα T λεμφοκύτταρα και μέσω αρνητικής αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα B7.¹⁵⁴ Έτσι, η αναστολή του PD-L1 θα αναστείλει και αυτή την οδό, ενώ η αναστολή του PD-1 δεν θα έχει καμία επίδραση. Εξάλλου, η αναστολή του PD-L1 δεν εμποδίζει την σύνδεση του PD-1 με τον PD-L2 συνδέτη, αν και το βιολογικό αποτέλεσμα αυτή της σύνδεσης είναι ακόμα ασαφές.

Ο πιθανός συνδυασμός κυτταροτοξικών θεραπειών με αναστολείς των ανοσοϋποδοχέων εμφανίζει επίσης εξαιρετικό ενδιαφέρον. Η προφλεγμονώδης δράση και απελευθέρωση ανοσογονικών μορίων στην περιοχή του κακοήθους όγκου μετά από την χορήγηση ΧΜΘ μπορεί να αυξήσει την αντινεοπλασματική δράση των

παραπάνω θεραπειών, και μάλιστα με ταχύτητα ανάλογη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, αφού όσο πιο γρήγορα διαιρούνται αυτά, τόσο και πιο ευάλωτα είναι στην δράση της ΧΜΘ. Από την άλλη, έχει φανεί ότι οι παραπάνω συνδυασμοί οδηγούν σε λεμφοπενία, με κίνδυνο την εξασθένηση της δράσης των αναστολέων του άξονα PD-1/PD-L1 η οποία και στηρίζεται στην δράση επαρκή αριθμού ανοσοδραστικών Τ λεμφοκυττάρων.¹⁵⁵ Παρόμοια αντίθετα αποτελέσματα από τις προσφάτως αναπτυχθείσες ανοσοθεραπείες φαίνεται ότι έχει και η συμβατική (κλασματοποιημένη) ακτινοθεραπεία (Α/Θ), τόσο αυξάνοντας την έκφραση του PD-L1 σε λεμφωματικά κύτταρα αλλά και του PD-1 στα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα, όσο και οδηγώντας σε καταστροφή των TILs τα οποία και εμφανίζονται στον πάσχοντα ιστό 7 ημέρες από την έναρξη της Α/Θ.¹⁵⁶

Η μεγαλύτερη ωστόσο πρόκληση στο εγγύς μέλλον θα είναι η εύρεση του βέλτιστου δυνατού συνδυασμού θεραπειών που στοχεύουν στους διάφορους μηχανισμούς ανοσοδιαφυγής των λεμφωματικών κυττάρων. Αυτή η ανακάλυψη θα ανοίξει τον δρόμο για εντελώς εξατομικευμένες θεραπείες ανάλογα με τον ασθενή που έχει υποτροπιάζον / ανθεκτικό στην θεραπεία ή ακόμα και νεοδιαγνωσθέν επιθετικό λέμφωμα, είτε κατευθύνοντας τον προς την χορήγηση συνδυασμού ΧΜΘ και ανταγωνιστή του άξονα PD1/PDL-1, είτε προς την εξ ολοκλήρου αναδόμηση ενός επαρκούς ανοσοποιητικού αντινεοπλασματικού μηχανισμού, αποκλειστικά μέσω συνδυαστικών, ανοσολογικών θεραπειών όπως οι αναστολείς των ανοσοϋποδοχέων, μονοκλωνικά αντισώματα, συνδιεγερτικά μόρια, δι-ειδικά αντισώματα (Bispecific T-cell Engagers, BiTEs) και γενετικά τροποποιημένα Τ λεμφοκύτταρα (Chimeric Antigen Receptor, CAR T cells), ή μέσω συνδυασμού τους με άλλες αντιλεμφωματικές, μη χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις όπως οι μικρομοριακοί αναστολείς.^{91, 93, 157-160}

Η μελέτη μας έχει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως η κεντρική ανασκόπηση των βιοπτικών υλικών και η ομοιογενής θεραπεία και παρακολούθηση των ασθενών. Μειονεκτήματα της μελέτης συνιστούν το μικρό δείγμα των ασθενών, το οποίο και υπαγορεύει την ανάγκη επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων σε μεγαλύτερο πληθυσμό, ο αναδρομικός χαρακτήρας της, η σχετικά μικρή περίοδος παρακολούθησης, όπως επίσης και το γεγονός ότι η ανίχνευση των μορίων PD-1 και PD-L1 έγινε μόνο με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, οπότε χρειάζονται επιπλέον γονιδιακές και μεταγραφικές μελέτες ώστε να διερευνηθεί πλήρως η βιολογική σημασία της έκφρασής τους σε ασθενείς με DLBCL, NOS.

3. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα (Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLBCL) αποτελεί το συνηθέστερο non-Hodgkin λέμφωμα και ανήκει στα υψηλής κακοήθειας λεμφώματα. Σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, η κλινική πορεία και πρόγνωση των ασθενών με αυτή την κακοήθεια φαίνεται πως εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από την διαφυγή των λεμφωματικών κυττάρων από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος και συγκεκριμένα από τα Τ λεμφοκύτταρα. Ανασταλτικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και στην ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων και επομένως στην ανοσοεπιτήρηση και καταστροφή των νεοπλασματικών κυττάρων διαδραματίζει ο ανοσοκατασταλτικός υποδοχέας των λεμφοκυττάρων programmed cell death-1 (PD-1) μέσω της σύνδεσής του με 2 μόρια-συνδέτες, τα PD-L1 (CD274 ή B7-H1) και PD-L2 (CD273 ή B7-DC). Η σηματοδότηση μέσω του PD-1 φυσιολογικά αμβλύνει την διέγερση των Τ λεμφοκυττάρων και προστατεύει τους γειτονικούς ιστούς από την επέκταση της φλεγμονής, παρέχοντας μία ισορροπία μεταξύ αποτελεσματικής ανοσιακής απάντησης και ανοσοεπαγόμενης ιστικής καταστροφής, αλλά στην περίπτωση κακοηθειών διαδραματίζει αρνητικό ρόλο αφού συμβάλλει στην ανοσοδιαφυγή των νεοπλασματικών κυττάρων.

Ο PD-L1 έχει ανιχνευθεί σε βιοψίες κυρίως από ασθενείς με πρωτοπαθές λέμφωμα μεσοθωρακίου (Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma, PMLBCL) αλλά και σε ασθενείς με DLBCL του ιστολογικού υπότυπου του μη προερχόμενου από το βλαστικό κέντρο (non-Germinal Center B-cell like, non-GCB). Επίσης, σε ασθενείς με DLBCL, ο PD-1 υποδοχέας έχει ανιχνευθεί τόσο στα λεμφωματικά κύτταρα όσο και στα λεμφοκύτταρα που ανευρίσκονται μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων (Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs).

Η παρούσα εργασία στόχευε στην διερεύνηση πιθανών παθογενετικών οδών και μοριακών μηχανισμών χημειοανθεκτικότητας στα DLBCL και συγκεκριμένα στα DLBCL, not otherwise specified (NOS), τα οποία και συνιστούν τουλάχιστον το 25-30% των DLBCL. Στην μελέτη που πραγματοποιήσαμε φάνηκε ότι η έκφραση του PD-L1 δεν αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την συνολική επιβίωση των ασθενών με DLBCL, NOS, φαίνεται ωστόσο ότι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των ανοσοϋποδοχέων και των συνδετών τους στα DLBCL, NOS απέχει ακόμα από το να θεωρηθεί αντικειμενική ή αξιόπιστη. Ένα άλλο εύρημα της μελέτης μας είναι ότι τα PD-L1 θετικά DLBCL, NOS συσχετίζονται κατά κύριο λόγο με τον non-GCB ιστολογικό υπότυπο, όπως περιγράφεται και σε άλλες μελέτες. Συνοψίζοντας, από την μελέτη μας φαίνεται ότι η έκφραση του PD-L1 στον νεοπλασματικό ιστό ασθενών με DLBCL, NOS θα μπορούσε να οδηγήσει σε επιθετικότερες βιολογικές συμπεριφορές και η αναστολή της PD-1/PD-L1 οδού με μονοκλωνικά αντισώματα μπορεί να έχει θέση σε αυτούς τους ασθενείς. Ωστόσο, θα πρέπει να προσδιοριστούν με σαφήνεια οι ασθενείς εκείνοι που θα ωφεληθούν περισσότερο από τις στοχευμένες ανοσοτροποποιητικές θεραπείες (όπως και εκείνοι που είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν σοβαρού βαθμού παρενέργειες), ο πλέον κατάλληλος χρόνος και τρόπος χορήγησής τους και η διάρκειά τους, αλλά και δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο πιθανός συνδυασμός κυτταροτοξικών θεραπειών με αναστολείς των ανοσοϋποδοχέων. Η μεγαλύτερη ωστόσο πρόκληση στο εγγύς μέλλον θα είναι η εύρεση του βέλτιστου δυνατού συνδυασμού θεραπειών που στοχεύουν στους διάφορους μηχανισμούς ανοσοδιαφυγής των λεμφωματικών κυττάρων. Αυτή η ανακάλυψη θα ανοίξει τον δρόμο για εντελώς εξατομικευμένες θεραπείες για τον ασθενή που έχει υποτροπιάζον / ανθεκτικό στην θεραπεία λέμφωμα ή ακόμα και σε θεραπείες 1^{ης} γραμμής.

4. SUMMARY

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) is the most common non-Hodgkin lymphoma and belongs to the aggressive subtypes. At cellular and molecular level its clinical course and the prognosis of patients with this malignancy appear to depend to a large extent on the escape of lymphoma cells from the immune system and specifically from T lymphocytes. The immunosuppressive receptor of lymphocytes, programmed cell death-1 (PD-1), plays an inhibitory role in the proliferation and activation of T lymphocytes and, therefore, in the immune surveillance and destruction of neoplastic cells through its binding to 2 ligands, PD-L1 (CD274 or B7-H1) and PD-L2 (CD273 or B7-DC). PD-1 signaling physiologically attenuates T cell activation and protects adjacent tissues from the spread of inflammation, providing a balance between an effective immune response and immune-induced tissue damage, but in the case of malignant cells PD-1 plays a negative role as it contributes to the immune escape of neoplastic cells.

PD-L1 has been detected in biopsies mainly of patients with Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma (PMLBCL) but also in patients with DLBCL of the non-germinal center histological subtype (non-GCB). Moreover, in patients with DLBCL, the PD-1 receptor has been detected in both lymphoma cells and tumor infiltrating lymphocytes (TILs).

The present study aimed to investigate possible pathogenetic pathways and molecular mechanisms of refractoriness to chemotherapy of DLBCL cells, specifically among DLBCL, not otherwise specified (NOS) patients, who constitute at least 25-30% of all DLBCL cases. Our study showed that PD-L1 expression is not an independent prognostic factor for the overall survival in patients with DLBCL, NOS, it appears

however that immunohistochemical detection of immunoreceptors and their ligands in DLBCL, NOS is still far from being objective or trustworthy. Another finding of our study is that PD-L1 positive DLBCL, NOS is primarily associated with the non-GCB histological subtype, as described in other studies as well. In summary, our study suggests that PD-L1 expression in patients with DLBCL, NOS could lead to more aggressive biological behaviors and inhibition of the PD-1 / PD-L1 pathway with monoclonal antibodies may be of value in these patients. However, the patients who will benefit the most from targeted immunomodulatory therapies (as well as those who are most likely to experience severe side effects), the most appropriate time and route of administration, and their duration are still unknown and should be clearly identified, as well as predictors of response to treatment.

Of great interest is the possible combination of cytotoxic therapies with immunoreceptor inhibitors. However, the biggest challenge in the near future will be to find the optimal possible combination of therapies that target the various mechanisms by which lymphoma cells evade immune system mechanisms. This discovery will pave the way for completely personalized treatments for patients with recurrent or refractory lymphoma, or even under 1st line treatment.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*. 2005;105(5):1851–61.
2. Mani H, Jaffe ES. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with newer insights into classification. *Clinical lymphoma & myeloma*. 2009;9(3):206-16.
3. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8):517-34.
4. 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.
5. 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.
6. Caimi PF, Hill BT, Hsi ED, Smith MR. Clinical approach to diffuse large B cell lymphoma. *Blood Rev*. 2016;30(6):477-491.
7. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, Sun HH, Roemer MG, Xu ML, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3462-73.

8. Ahearne MJ, Bhuller K, Hew R, Ibrahim H, Naresh K, Wagner SD. Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Virchows Arch.* 2014;465(3):351-8.
9. Laurent C, Charmpi K, Gravelle P, Tosolini M, Franchet C, Ysebaert L, et al. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology.* 2015;4(8):e1026530. eCollection 2015.
10. Care MA, Westhead DR, Tooze RM. Gene expression meta-analysis reveals immune response convergence on the IFN γ -STAT1-IRF1 axis and adaptive immune resistance mechanisms in lymphoma. *Genome Med.* 2015;7(1):96.
11. Nicholas NS, Apollonio B, Ramsay AG. Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(3):471-82.
12. Xu ML, Fedoriw Y. Lymphoma Microenvironment and Immunotherapy. *Surg Pathol Clin.* 2016;9(1):93-100.
13. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science.* 1996;271(5256):1734-6.
14. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(8):4712-7.
15. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res.* 2006;66(11):5527-36.

16. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8372-7.
17. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J, et al. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(32):13134-9.
18. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1147-54.
19. Rodriguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev*. 2008;222:180-91.
20. Löb S, Königsrainer A, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer*. 2009;9(6):445-52.
21. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-23.
22. Huang X, Bai X, Cao Y, Wu J, Huang M, Tang D, et al. Lymphoma endothelium preferentially expresses Tim-3 and facilitates the progression of lymphoma by mediating immune evasion. *J Exp Med*. 2010;207(3):505-20.

23. Ninomiya S, Hara T, Tsurumi H, Hoshi M, Kanemura N, Goto N, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor tissue indicates prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Ann Hematol.* 2011;90(4):409-16.
24. Yoneda A, Jinushi M. T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3 as an emerging target for immunotherapy in cancer management. *Immunotargets Ther.* 2013;2:135-41.
25. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med.* 2014;20(6):607-15.
26. Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol.* 2016;28(8):401-9.
27. Chen X, Du Y, Lin X, Qian Y, Zhou T, Huang Z. CD4+CD25+ regulatory T cells in tumor immunity. *Int Immunopharmacol.* 2016;34:244-9.
28. Yoshikawa T, Hara T, Tsurumi H, Goto N, Hoshi M, Kitagawa J, et al. Serum concentration of L-kynurenine predicts the clinical outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Eur J Haematol.* 2010;84(4):304-9.
29. Ninomiya S, Hara T, Tsurumi H, Hoshi M, Kanemura N, Goto N, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor tissue indicates prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Ann Hematol.* 2011;90(4):409-16.

30. Chen BJ, Dashnamoorthy R, Galera P, Makarenko V, Chang H, Ghosh S, Evens AM. The immune checkpoint molecules PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2019;10(21):2030-2040.
31. Hara T, Tsurumi H, Takemura M, Goto H, Yamada T, Sawada M, et al. Serum-soluble fas level determines clinical symptoms and outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol*. 2000;64(4):257-61.
32. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):336-47.
33. Hude I, Sasse S, Engert A, Bröckelmann PJ. The emerging role of immune checkpoint inhibition in malignant lymphoma. *Haematologica*. 2017;102(1):30-42.
34. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-34.
35. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, et al. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett*. 2004;574(1-3):37-41.
36. Riley JL, June CH. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood*. 2005;105(1):13-21.
37. Karakatsanis S, Bertsiias G, Roussou P, Boumpas D. Programmed death 1 and B and T lymphocyte attenuator immunoreceptors and their association with malignant T-lymphoproliferative disorders: brief review. *Hematol Oncol*. 2014;32(3):113-9.

38. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2005;25(21):9543–53.
39. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1069-86.
40. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999;11(2):141–51.
41. Sandner SE, Clarkson MR, Salama AD, Sanchez-Fueyo A, Domenig C, Habicht A, et al. Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *J Immunol.* 2005;174(6):3408-15.
42. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:677-704.
43. Wei S, Shreiner AB, Takeshita N, Chen L, Zou W, Chang AE. Tumor-induced immune suppression of in vivo effector T-cell priming is mediated by the B7-H1/PD-1 axis and transforming growth factor beta. *Cancer Res.* 2008;68(13):5432-8.
44. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009;114(8):1537-44.
45. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer.* 2010;116(7):1757-66.

46. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012;4(127):127ra37.
47. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999;5(12):1365–9.
48. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8(8):793-800.
49. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med.* 2010;16(4):452-9.
50. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature.* 2017;545(7655):495–9.
51. Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Höfler G, Guthann E, Korthäuer U, et al. B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J Immunol.* 2003;170(7):3637–44.
52. Tsushima F, Yao S, Shin T, Flies A, Flies S, Xu H, et al. Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood.* 2007;110(1):180–5.

53. Goldberg MV, Maris CH, Hipkiss EL, Flies AS, Zhen L, Tudor RM, et al. Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood*. 2007;110(1):186–92.
54. Kitazawa Y, Fujino M, Wang Q, Kimura H, Azuma M, Kubo M, et al. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation*. 2007;83(6):774-82.
55. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009;206(13):3015–29.
56. Amarnath S, Mangus CW, Wang JC, Wei F, He A, Kapoor V, et al. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci Transl Med*. 2011;3(111):111ra20.
57. Han Y, Wu J, Bi L, Xiong S, Gao S, Yin L, et al. Malignant B cells induce the conversion of CD4+CD25- T cells to regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *PLoS One*. 2011;6(12):e28649.
58. Ding ZC, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH, Zhou G. Chemotherapy rescues tumor-driven aberrant CD4+ T-cell differentiation and restores an activated polyfunctional helper phenotype. *Blood*. 2010;115(12):2397-406.
59. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3):261-8.

60. Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, Münz C, Romero P, Zehn D. T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):768-74.
61. Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(4):203-20.
62. Zhang Y, Chung Y, Bishop C, Daugherty B, Chute H, Holst P, et al. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 1;103(31):11695-700.
63. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(6):467–77.
64. Flies DB, Sandler BJ, Sznol M, Chen L. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *Yale J Biol Med.* 2011;84(4):409–21.
65. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2443–54.
66. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(19):12293-7.
67. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res.* 2004;10(15):5094-100.

68. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3360-5.
69. Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser AD, van Tinteren H, van Boven H, Blank C. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer*. 2011;117(10):2192-201.
70. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17174-9.
71. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2947-53.
72. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2005;104(10):2084-91.
73. Thompson RH, Webster WS, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Leibovich BC, et al. B7-H1 glycoprotein blockade: a novel strategy to enhance immunotherapy in patients with renal cell carcinoma. *Urology*. 2005;66:10-4.
74. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang XG, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem*. 2006;108(1):19-24.

75. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006;66(7):3381–5.
76. Ghebeh H, Mohammed S, Al-Omair A, Qattan A, Lehe C, Al-Qudaihi G, et al. The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. *Neoplasia.* 2006;8(3):190-8.
77. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(8):1173-82.
78. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2151–7.
79. Thompson RH, Dong H, Kwon ED. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 2):709s-15s.
80. Geng L, Huang D, Liu J, Qian Y, Deng J, Li D, et al. B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008;134(9):1021-7.
81. Loos M, Giese NA, Kleeff J, Giese T, Gaida MM, Bergmann F, et al. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2008;268(1):98-109.

82. Routh JC, Ashley RA, Sebo TJ, Lohse CM, Husmann DA, Kramer SA, et al. B7-H1 expression in Wilms tumor: correlation with tumor biology and disease recurrence. *J Urol*. 2008;179 (5):1954-9.
83. Gao Q, Wang XY, Qiu SJ, Yamato I, Sho M, Nakajima Y, et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):971-9.
84. Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Kim KM, et al. Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS One*. 2013;8(12):e82870.
85. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(6):1757-61.
86. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455-65.
87. Armand P, Nagler A, Weller EA, Devine SM, Avigan DE, Chen YB, et al. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(33):4199-206.
88. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;372(4):311-9.

89. Westin JR, Chu F, Zhang M, Fayad LE, Kwak LW, Fowler N, et al. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):69–77.
90. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res.* 2004;64(3):1140-5.
91. Majchrzak A, Witkowska M, Smolewski P. Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: current knowledge and clinical significance. *Molecules.* 2014;19(9):14304-15.
92. Black M, Barsoum IB, Truesdell P, Cotechini T, Macdonald-Goodfellow SK, Petroff M, et al. Activation of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint confers tumor cell chemoresistance associated with increased metastasis. *Oncotarget.* 2016;7(9):10557-67.
93. Mundi PS, Sachdev J, McCourt C, Kalinsky K. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;82(4):943-56.
94. Carter L, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 2002;32(3):634-43.
95. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1974-82.

96. Saudemont A, Buffenoir G, Denys A, Desreumaux P, Jouy N, Hetuin D, et al. Gene transfer of CD154 and IL12 cDNA induces an anti-leukemic immunity in a murine model of acute leukemia. *Leukemia*. 2002;16(9):1637-44.
97. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(7):802-10.
98. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107(9):3639-46.
99. Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, Sugita K, Yamada Y, Hino R, et al. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer*. 2007;121(12):2585-90.
100. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111(6):3220-4.
101. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G, Villamor N, Colomo L, Martinez A, et al. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(9):1470-6.
102. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the

tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*. 2009;113(12):2765-75.

103. Kozako T, Yoshimitsu M, Fujiwara H, Masamoto I, Horai S, White Y, et al. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Leukemia*. 2009;23(2):375-82.

104. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010;116(17):3268-77.

105. Muenst S, Hoeller S, Willi N, Dirnhofera S, Tzankov A. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas. *Dis Markers*. 2010; 29(1):47-53.

106. Samimi S, Benoit B, Evans K, Wherry EJ, Showe L, Wysocka M, et al. Increased programmed death-1 expression on CD4+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma: implications for immune suppression. *Arch Dermatol*. 2010;146(12):1382-8.

107. Andorsky DJ, Yamada RE, Said J, Pinkus GS, Betting DJ, Timmerman JM. Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4232-44.

108. Ramsay AG, Clear AJ, Fatah R, Gribben JG. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood*. 2012;120(7):1412-21.

109. Miyoshi H, Kiyasu J, Kato T, Yoshida N, Shimono J, Yokoyama S, et al. PD-L1 expression on neoplastic or stromal cell is respectively poor or good prognostic factor for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 2016;128(10):1374-81.
110. Muenst S, Hoeller S, Dirnhofer S, Tzankov A. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Hum Pathol*. 2009;40(12):1715-22.
111. Qiu L, Zheng H, Zhao X. The prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):273.
112. Pollari M, Brück O, Pellinen T, Vähämurto P, Karjalainen-Lindsberg ML, Mannisto S, et al. PD-L1+ tumor-associated macrophages and PD-1+ tumor infiltrating lymphocytes predict survival in primary testicular lymphoma. *Haematologica*. 2018;103(11):1908-14.
113. Xing W, Dresser K, Zhang R, Evens AM, Yu H, Woda BA, et al. PD-L1 expression in EBV-negative diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic features and prognostic implications. *Oncotarget*. 2016;7(37):59976-86.
114. Georgiou K, Chen L, Berglund M, Ren W, de Miranda NF, Lisboa S, et al. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2016;127(24):3026-34.
115. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2015;126(19):2193-201.

116. Fang X, Xiu B, Yang Z, Qiu W, Zhang L, Zhang S, et al. The expression and clinical relevance of PD-1, PD-L1, and TP63 in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(15):e6398.
117. Godfrey J, Tumuluru S, Bao R, Leukam M, Venkataraman G, Phillip J, et al. PD-L1 gene alterations identify a subset of diffuse large B-cell lymphoma harboring a T-cell-inflamed phenotype. *Blood*. 2019;133(21):2279-90.
118. Kwon D, Kim S, Kim PJ, Go H, Nam SJ, Paik JH, et al. Clinicopathological analysis of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1 expression in the tumour microenvironments of diffuse large B cell lymphomas. *Histopathology*. 2016;68(7):1079-89.
119. Xu-Monette Z, Xiao M, Au Q, Padmanabhan R, Xu B, Hoe N, et al. Immune profiling and quantitative analysis decipher the clinical role of immune checkpoint expression in the tumor immune microenvironment of DLBCL. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(4):644-57.
120. Ogawa S. Novel mechanism of immune evasion in cancer via structural variations of the PD-L1 gene. *Rinsho Ketsueki*. 2017;58(8):957-65.
121. Wang WG, Jiang XN, Sheng D, Sun CB, Lee J, Zhou XY, Li XQ. PD-L1 over-expression is driven by B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Lab Invest*. 2019;99(10):1418-27.
122. Song MK, Park BB, Uhm J. Understanding Immune Evasion and Therapeutic Targeting Associated with PD-1/PD-L1 Pathway in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1326.

123. Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC, Campo E. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue (IARC WHO Classification of Tumours) 4th Edition, by The International Agency for Research on Cancer (Author), S. Swerdlow (Editor), E. Campo (Editor), N. Lee Harris (Editor), E.S. Jaffe (Editor), S.A. Pileri (Editor), H. Stein (Editor), J. Thiele (Editor), J.W. Vardiman (Editor).
124. 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.
125. Xu-Monette ZY, Dabaja BS, Wang X, Tu M, Manyam GC, Tzankov A, et al. Clinical features, tumor biology, and prognosis associated with MYC rearrangement and Myc overexpression in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*. 2015;28(12):1555–73.
126. Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, Castillo JJ, Rajguru S, Yang DT, et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood*. 2014;124(15):2354–61.
127. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3452–9.
128. Snuderl M, Kolman OK, Chen Y-B, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal Cin P, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive

neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):327–40.

129. Stein H, Warnke RA, Chan WC, Jaffe ES, Chan JKC, Gatter KC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow S, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (Eds): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue (IARC WHO Classification of Tumours) 4th Edition, by The International Agency for Research on Cancer.

130. Panjwani PK, Charu V, DeLisser M, Molina-Kirsch H, Natkunam Y, Zhao S. Programmed death-1 ligands PD-L1 and PD-L2 show distinctive and restricted patterns of expression in lymphoma subtypes. *Hum Pathol.* 2018;71:91-9.

131. Liu J, Quan L, Zhang C, Liu A, Tong D, Wang J. Over-activated PD-1/PD-L1 axis facilitates the chemoresistance of diffuse large B-cell lymphoma cells to the CHOP regimen. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3321-8.

132. Dong L, Lv H, Li W, Song Z, Li L, Zhou S, et al. Co-expression of PD-L1 and p-AKT is associated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma via PD-1/PD-L1 axis activating intracellular AKT/mTOR pathway in tumor cells. *Oncotarget.* 2016;7(22):33350-62.

133. Rossille D, Gressier M, Damotte D, Maucort-Boulch D, Pangault C, Semana G, et al; Groupe Ouest-Est des Leucémies et Autres Maladies du Sang; Groupe Ouest-Est des Leucémies et Autres Maladies du Sang. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell

lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia*. 2014;28(12):2367-75.

134. Kwiecinska A, Tsesmetzis N, Ghaderi M, Kis L, Saft L, Rassidakis GZ. CD274 (PD-L1)/PDCD1 (PD-1) expression in de novo and transformed diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2018;180(5):744-8.

135. 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.

136. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503–11.

137. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(28):4587–94.

138. Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM, et al. Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers. *J Clin Oncol*. 2008;26(16):2717–24.

139. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008;359(22):2313–23.

140. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1417-29.
141. Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD, et al. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(34):4311-8.
142. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*. 2007;13(1):84-8.
143. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, Kim JH, et al. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(19):5064-74.
144. Atefi M, Avramis E, Lassen A, Wong DJ, Robert L, Foulad D, et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(13):3446-57.
145. Wang G, Fu X, Chang Y, Li X, Wu X, Li L, et al. B7-CD28 gene family expression is associated with prognostic and immunological characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(12):3939-57.
146. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, Scott EC, Halwani A, Gutierrez M, et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J Clin Oncol*. 2016;34(23):2698-704.
147. Zinzani PL, Ribrag V, Moskowitz CH, Michot JM, Kuruvilla J, Balakumaran A, et al. Safety and tolerability of pembrolizumab in patients with relapsed/refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2017;130(3):267-270.

148. Ansell SM, Minnema MC, Johnson P, Timmerman JM, Armand P, Shipp MA, et al. Nivolumab for Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Patients Ineligible for or Having Failed Autologous Transplantation: A Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2019;37(6):481-9.
149. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563-7.
150. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3384-91.
151. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: Immune-related response criteria. *Clin Cancer Res*. 2009;15(23):7412-20.
152. Hoos A, Eggermont AM, Janetzki S, Hodi FS, Ibrahim R, Anderson A, et al: Improved endpoints for cancer immunotherapy trials. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(18):1388-97.
153. Cheson BD, Ansell S, Schwartz L, Gordon LI, Advani R, Jacene HA, et al. Refinement of the Lugano Classification lymphoma response criteria in the era of immunomodulatory therapy. *Blood*. 2016;128(21):2489-96.
154. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 2007;27(1):111-22.
155. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(29):3293-304.

156. Dutt S, Atallah MB, Minamida Y, Filatenkov A, Jensen KP, Iliopoulou BP, et al. Accelerated, but not conventional, radiotherapy of murine B-cell lymphoma induces potent T cell-mediated remissions. *Blood Adv.* 2018;2(19):2568-80.
157. Camicia R, Winkler HC, Hassa PO. Novel drug targets for personalized precision medicine in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a comprehensive review. *Mol Cancer.* 2015;14:207.
158. Li L, Zhang J, Chen J, Xu-Monette ZY, Miao Y, Xiao M, et al. B-cell receptor-mediated NFATc1 activation induces IL-10/STAT3/PD-L1 signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2018;132(17):1805-17.
159. Pascual M, Mena-Varas M, Robles EF, Garcia-Barchino MJ, Panizo C, Hervas-Stubbs S, et al. PD-1/PD-L1 immune checkpoint and p53 loss facilitate tumor progression in activated B cell diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2019;133(22):2401-12.
160. Miao Y, Medeiros LJ, Li Y, Li J, Young KH. Genetic alterations and their clinical implications in DLBCL. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019;16(10):634-52.