

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ Α' ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ**

**Διευθύντρια: Γκόγκα Ελένη**

**Διευθυντής 2016-2018: Γεώργιος Δαΐκος**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΜΕ ΤΟ**  
**MALT ΛΕΜΦΩΜΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ**

**ΒΕΛΙΣΣΑΡΗ ΑΛΙΚΗ**  
**ΙΑΤΡΟΣ ΒΙΟΠΑΘΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2022**

**Ημερομηνία Αιτήσεως: 16/05/2016**

**Ημερομηνία ορισμός τριμελούς επιτροπής: 22/07/2016**

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 04/11/2016**

**Ημερομηνία κατάθεσης πρότασης για ορισμό επταμελούς επιτροπής: 21-09-2022**

**Μέλη τριμελούς επιτροπής:**

**Σιακαντάρη Μαρίνα, Καθηγήτρια Παθολογίας – Αιματολογίας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ (επιβλέπουσα καθηγήτρια)**

**Δαΐκος Γεώργιος, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμώξεων, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ**

**Κωνσταντόπουλος Κωνσταντίνος, Ομοτιμός Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ**

**Πρόεδρος Ιατρικής σχολής: Γεράσιμος Σιάσος**

**Μέλη επταμελούς επιτροπής:**

**Σιακαντάρη Μαρίνα, Καθηγήτρια Παθολογίας-Αιματολογίας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ (επιβλέπουσα καθηγήτρια)**

**Δαΐκος Γεώργιος, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Λοιμώξεων, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ**

**Κωνσταντόπουλος Κωνσταντίνος, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ**

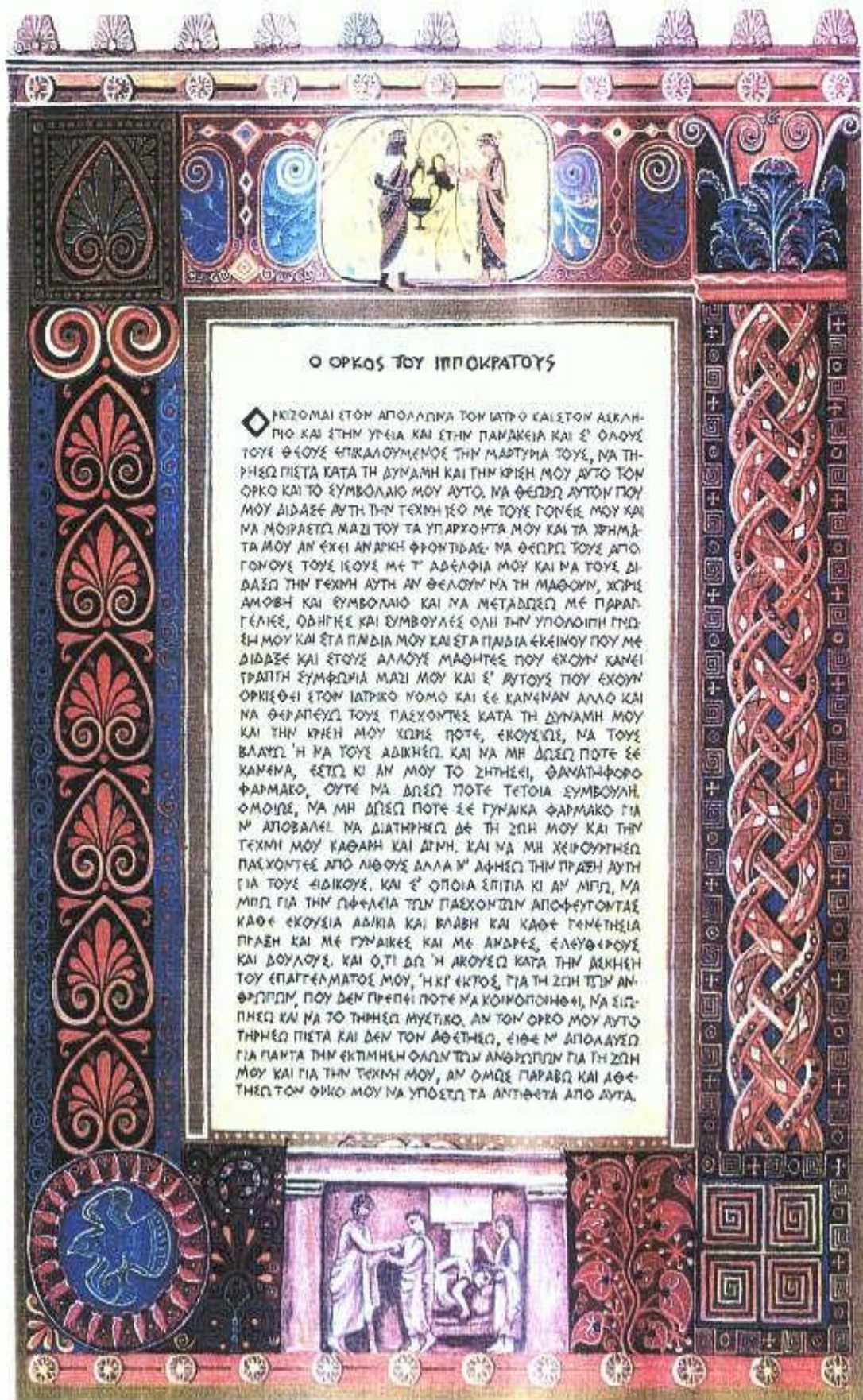
**Κορκολοπούλου Πηνελόπη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ**

**Αγγελοπούλου Μαρία, Καθηγήτρια Αιματολογίας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ**

**Βασιλακόπουλος Θεόδωρος, Καθηγητής Αιματολογίας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ**

**Κοντοπίδου Φλώρα, Καθηγήτρια Αιματολογίας, Ιατρική σχολή, ΕΚΠΑ**

**Βαθμός: Άριστα**



### Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

❖ ΗΚΙΖΟΜΑΙ ΕΤΟΜ ΑΠΟΛΛΗΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙΣΤΟΝ ΑΙΣΧΗ-  
ΠΙΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Ε' ΟΛΟΥΣ  
ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΥΣ ΤΗΝ ΜΑΡΤΥΡΙΑ ΤΟΥΣ, ΝΑ ΤΗ-  
ΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΤΟΝ  
ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΤΟ ΕΥΜΒΟΛΑΙΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΝΑ ΦΕΛΩΣΩ ΑΥΤΟΝ ΠΟΥ  
ΜΟΥ ΔΙΔΑΣΚΕ ΑΥΤΗ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΙΕΘ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ  
ΝΑ ΜΟΙΡΑΕΤΩ ΜΑΖΙ ΤΟΥ ΤΑ ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΑ ΞΗΜΑ-  
ΤΑ ΜΟΥ ΑΝ ΕΧΕΙ ΑΝΑΡΚΗ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ, ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟ-  
ΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥΣ ΙΕΟΥΣ ΜΕ Τ' ΑΔΕΛΦΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟΥΣ ΔΙ-  
ΔΑΣΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ  
ΑΜΟΦΗ ΚΑΙ ΕΥΜΒΟΛΑΙΟ ΚΑΙ ΝΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΜΕ ΠΑΡΑ-  
ΓΕΛΙΚΕ, ΟΔΗΓΕΣ ΚΑΙ ΕΥΜΒΟΥΛΕΣ ΟΛΗ ΤΗΝ ΥΠΟΛΟΙΠΗ ΠΙΣΤΗ  
ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΕΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΕΚΕΙΝΟΥ ΠΟΥ ΜΕ  
ΔΙΔΑΣΚΕ ΚΑΙ ΕΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΚΑΜΗ  
ΤΡΑΠΗ ΣΥΜΦΩΝΙΑ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΚΑΙ Ε' ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ  
ΟΡΚΙΣΘΕΙ ΕΤΟΜ ΙΑΤΡΙΚΟ ΝΟΜΟ ΚΑΙ ΕΣ ΚΑΜΕΝΑΝ ΑΛΛΟ ΚΑΙ  
ΝΑ ΘΕΡΑΠΕΥΩ ΤΟΥΣ ΠΛΕΧΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ  
ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΧΩΡΙΣ ΠΟΤΕ, ΕΚΟΥΣΙΩΣ, ΝΑ ΤΟΥΣ  
ΒΛΑΨΩ Ή ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΔΙΚΗΣΩ, ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΕΣ  
ΚΑΜΕΝΑ, ΕΣΤΩ ΚΙ ΑΝ ΜΟΥ ΤΟ ΣΗΤΗΣΕΙ, ΦΑΝΑΤΗΦΟΡΟ  
ΦΑΡΜΑΚΟ, ΟΥΤΕ ΝΑ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ,  
ΟΜΟΙΩΣ, ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΕΣ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΓΙΑ  
Ν' ΑΠΟΒΑΛΕΙ ΝΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΔΕ ΤΗ ΣΠΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ  
ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΙ ΔΗΜΗ, ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΧΕΙΡΟΥΡΗΣΩ  
ΠΛΕΧΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΛΙΘΟΥΣ ΑΛΛΑ Ν' ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ  
ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΕΙΔΙΚΟΥΣ, ΚΑΙ Ε' ΟΠΟΙΑ ΕΠΙΣΤΙΑ ΚΙ ΑΝ ΜΠΩ, ΝΑ  
ΜΠΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΠΛΕΧΟΝΤΩΝ ΑΠΟΦΕΥΓΟΝΤΑΣ  
ΚΑΘΕ ΕΚΟΥΣΙΑ ΑΔΙΚΙΑ ΚΑΙ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΚΑΘΕ ΓΑΜΕΤΗΣΙΑ  
ΠΡΑΞΗ ΚΑΙ ΜΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕ ΑΝΔΡΕΣ, ΕΛΕΥΘΕΡΟΥΣ  
ΚΑΙ ΔΟΥΛΟΥΣ, ΚΑΙ ΟΤΙ ΔΩ Ή ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΕΚΗΣΗ  
ΤΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ ΜΟΥ, Ή ΚΙ ΕΚΤΟΣ ΤΑ ΤΗ ΣΠΗ ΤΩΝ ΑΝ-  
ΘΡΩΠΩΝ, ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΜΟΠΟΙΗΣΩ, ΝΑ ΣΙΩ-  
ΠΗΣΩ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟ ΤΗΡΗΣΩ ΜΥΣΤΙΚΟ, ΑΝ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ  
ΤΗΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΑΘΕΤΗΣΩ, ΕΙΘΕ Ν' ΔΙΠΛΩΣΩ  
ΓΙΑ ΠΑΝΤΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΦΩΛΩΝ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΣΠΗ  
ΜΟΥ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΑΘΕ-  
ΤΗΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΝΑ ΥΠΟΣΤΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ.

## Σύντομο βιογραφικό σημείωμα

### ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2003 Απολυτήριο Εκπαιδευτήρια «Ο Πλάτων»  
Βαθμός: Άριστα (19,7)  
  
Εισαγωγή στην Ιατρική Αθηνών με 19.566 μόρια  
Σειρά εισαγωγής 30<sup>η</sup>
- 2009: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Πτυχίο Ιατρικής  
  
Βαθμός: Λίαν καλώς (8.07)
- 2011: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Μεταπτυχιακό  
Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Κλινική Βιοχημεία και Μοριακή Διαγνωστική  
Βαθμός: Άριστα (9.0)
- 2017: Τίτλος ειδικότητας Ιατρικής Βιοπαθολογίας

### ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- Υποτροφία για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής με θέμα «Συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών με το MALT λέμφωμα στομάχου» από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ)

### ΟΜΙΛΙΕΣ

- Ηπατική Εγκεφαλοπάθεια, Στρογγυλή Τράπεζα, 15ο συνέδριο ΕΦΙΕ, Θεσσαλονίκη, Μάιος 2009 .
- Ενδείξεις Μετάγγισης Ερυθρών σε Αιματολογικούς Ασθενείς, Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Εταιρείας Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας, Κύκλος XXI , Αθήνα, Δεκέμβριος 2016

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **Velissari A, Skalidakis I, Oliveira SC, Koutsandrea C, Kitsos G, Petersen MB, Kroupis C.**, «Novel association of FCGR2A polymorphism with age-related macular degeneration (AMD) and development of a novel CFH real-time genotyping method.» Clin Chem Lab Med. 2015 Sep 1;53(10):1521-9

- Sarli A, Skalidakis I, **Velissari A**, et al. Investigation of associations of ARMS2,CD14, and TLR4 gene polymorphisms with wet age-related macular degeneration in a Greek population. *Clinical Ophthalmology* (Auckland, NZ). 2017;11:1347-1358.
- Χ. Κόκοτας, Δ. Χήρας, Α. Σαρλή, Ι. Σκαλιδάκης, **Α. Βελισσάρι**, Μ. Γρηγοριάδου, Γ. Κίτσος, Χ. Κρούπης και Μ.Β. Petersen, Γενετικοί και βιοχημικοί δείκτες της Ηλικιακής Εκφύλισης της Ωχράς Κηλίδας (ΗΕΩΚ), Συμμετοχή στον τιμητικό τόμο του καθηγητού Ε. Γ. Καναβάκη, Αθήνα 2016
- **Α. Βελισσάρι**, Φ. Μπαζίγου, Μ. Μουρατίδου, Κ. Λεμπεσόπουλος, Κ. Κουτσογιάννη, Σ. Παγώνης, Περίπτωση ασυμβατότητας με εικόνα πανσυγκολλητίνης, θετικού αυτοελέγχου και αρνητικής άμεσης Coombs, Περιοδικό «Αιμοδοσία και Μετάγγιση», Τεύχος 71, Απρίλιος-Σεπτέμβριος 2016
- **Α. Βελισσάρι**, Φ. Μπαζίγου, Μ. Μουρατίδου, Κ. Λεμπεσόπουλος, Κ. Κουτσογιάννη, Σ. Παγώνης, Αυτόλογη προκατάθεση αίματος, Περιοδικό «Αιμοδοσία και Μετάγγιση», Τεύχος 71, Απρίλιος-Σεπτέμβριος 2016
- Φ. Μπαζίγου, **Α. Βελισσάρι**, Α. Χαιροπούλου, Σ. Μπαλιάγα, Λ. Καβαλλιέρου, Λοίμωξη από ιό Epstein-Barr (EBV) και αντιδραστικότητα για αντισώματα HIV σε δότη αιμοπεταλίων πρώτης φοράς, Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, Δελτίο Οκτωβρίου-Δεκεμβρίου 2016 (Τόμος 61, Τεύχος 4)
- **Α. Βελισσάρι**, Φ. Μπαζίγου, Κ. Λεμπεσόπουλος, Μ. Μουρατίδου, Κ. Κουτσογιάννη, Μ. Μαγούλας, Σ. Παγώνης, Έλεγχος διαλογής για ηπατίτιδα C και διαχείριση αιμοδοτών με θετικούς δείκτες, Περιοδικό «Αιμοδοσία και Μετάγγιση», Τεύχος 78, Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2018
- **Α. Βελισσάρι**, Φ. Μπαζίγου, Κ. Λεμπεσόπουλος, Μ. Μουρατίδου, Κ. Κουτσογιάννη, Μ. Μαγούλας, Σ. Παγώνης, Ηπατίτιδα E και μεταγγισιοθεραπεία, Περιοδικό «Αιμοδοσία και Μετάγγιση», Τεύχος 78, Οκτώβριος-Δεκέμβριος 2018
- Velissari A, Lakiotaki E, Nikolaou V, Argyropoulos KV, Stratigos A, Daikos G, Konstantopoulos K, Siakantaris M. Genetic polymorphisms in immunity related genes and the vitamin D receptor gene and risk of cutaneous T-cell lymphoma in Greek population. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2021 Nov;35(11):e805-e807. doi: 10.1111/jdv.17482. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34173274.
- Velissari A, Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Korkolopoulou P, Bamias G, Daikos G, Konstantopoulos K, Siakantaris M. Genetic polymorphisms and risk of MALT lymphoma in Greek population. *Curr Res Transl Med*. 2022 May;70(2):103330. doi: 10.1016/j.retram.2021.103330. Epub 2021 Dec 31. PMID: 34979486.

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **Βελισσάρη Α.**, Ι. Σκαλιδάκης, S.C. Oliveira, Μ. Αποστολόπουλος, Μ. Στεφανιώτου, Γ. Κίτσος, M.B. Petersen και Χ. Κρούπης. «Συσχέτιση σημειακών πολυμορφισμών (SNPs) στα γονίδια *CFH* και *FCGR2A* με την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας στον Ελληνικό πληθυσμό» Προφορική ανακοίνωση, 7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα, 15-17 Μαρτίου 2012
- Σκαλιδάκης Ι., **Α. Βελισσάρη**, Χ. Κόκοτας, Μ. Αποστολόπουλος, Μ. Μόσχου, Μ. Στεφανιώτου, Γ. Κίτσος, Χ. Κρούπης και M.B. Petersen. «Γενετική ανάλυση γονιδίων *CFH*, *ARMS* και *APOE* σε Ελληνες ασθενείς με ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας» 45<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Χαλκιδική, 24-27 Μαΐου 2012
- Σκαλιδάκης Ι., **Α. Βελισσάρη**, Χ. Κουτσανδρέα, Μ. Μόσχου, Μ. Αποστολόπουλος, Μ. Στεφανιώτου, M.B. Petersen, Χ. Κρούπης και Γ. Κίτσος. «Γενετική ανάλυση και συσχέτιση του πολυμορφισμού στο γονίδιο *FCGR2A* με την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας στον Ελληνικό πληθυσμό» 46<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Οφθαλμολογικό Συνέδριο, Costa Navarino Μεσσηνία, 23-26 Μαΐου 2013
- **Βελισσάρη Α.**, Ι. Σκαλιδάκης, S.C. Oliveira, Χ. Κουτσανδρέα, Μ. Μόσχου, Μ. Στεφανιώτου, Γ. Κίτσος, M.B. Petersen και Χ. Κρούπης «Συσχέτιση σημειακού πολυμορφισμού στο *FCGR2A* με την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας και ανάπτυξη νέας μεθόδου γονοτύπωσης του *CFH* Y402H SNP» 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Συνδέσμου Ιατρικών Γενετιστών Ελλάδος, Αθήνα, 30 Μαΐου -1 Ιουνίου 2013
- Petersen M.B., Ι. Skalidakis, **Α. Velissari**, Μ. Apostolopoulos, Μ. Stefaniotou, G. Kitsos, H. Kokotas and C. Kroupis (2012) “The impact of *CFH*, *ARMS2* and *APOE* gene polymorphisms in Greek age related macular degeneration patients” (European Human Genetics Conference 2012, June 23-26, Nurberg) *Eur J Hum Genet* 20, S219
- **Velissari A.**, Ι. Skalidakis, S.C. Oliveira, C. Koutsandrea, Μ. Moschou, Μ. Stefaniotou, G. Kitsos, M.B. Petersen and C. Kroupis (2013) “Novel association of *FCGR2A* polymorphism with age-related macular degeneration (ARMD) and development of a novel *CFH* real-time genotyping method” (20<sup>th</sup> European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, May 19-23, Milan) *Biochimica Clinica* 37, S119
- **Α. Βελισσάρη**, Σ. Μπακετέα, Σ. Κουβαρδάς, Α. Καψοριτάκη, Γ. Κουπάρη Συχνότητα ανίχνευσης στελεχών *E. coli* που παράγουν εκτεταμένου φάσματος β-λακταμασες (ESBLs) σε καλλιέργειες ούρων και ευαισθησία αυτών σε από του στόματος αντιβιοτικά, 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, Αθήνα 2015.

- Σαρλή Α., **Βελισσάρη Α.**, Σκαλιδάκης Ι., Μόσχου Μ., Κουτσανδρέα Χ., Κίτσος Γ., Petersen M., Κρούπης Χ.  
Συσχέτιση σημειακών πολυμορφισμών (SNPs) στα γονίδια *ARMS2* και *CD14* με την υγρή μορφή ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας στον ελληνικό πληθυσμό, 13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας, Κρήτη 2015.
- **Α. Βελισσάρη**, Σ. Μπακετέα, Σ. Κουβαρδάς, Α. Καψωριτάκη, Γ. Κουππάρη  
Συχνότητα απομόνωσης *Candida spp.* σε καλλιέργειες αίματος και σχετική αναλογία *albicans/non-albicans* στελεχών την επταετία 2009-2015, 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Μυκητολογίας, Αθήνα 2015.
- **Α. Βελισσάρη**, Σ. Μπακετέα, Θ. Παναγέα, Σ. Κουβαρδάς, Α. Καψωριτάκη, Γ. Κουππάρη  
Απομόνωση στελεχών *A. baumannii* με εκτεταμένη αντοχή (XDR) και παναντοχή (PDR) κατά τη διετία 2014-2015, 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα, 2-4 Ιουνίου 2016
- **Α. Βελισσάρη**, Σ. Μπακετέα, Θ. Παναγέα, Σ. Κουβαρδάς, Α. Καψωριτάκη, Γ. Κουππάρη  
Απομόνωση στελεχών *S. aureus* από καλλιέργειες αίματος και μελέτη της αντιμικροβιακής τους αντοχής, 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα, 2-4 Ιουνίου 2016
- **Α. Βελισσάρη**, Σ. Μπακετέα, Γ. Μαραθωνίτης, Δ. Γεωργιάδου  
Συσχέτιση του γλυκαιμικού ελέγχου με το μέσο όγκο αιμοπεταλίων σε διαβητικούς ασθενείς, 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα, 2-4 Ιουνίου 2016
- **Βελισσάρη Α.**, Μπαζίγιο Φ, Κουτσογιάννη Κ, Λεμπεσόπουλος Κ, Μουρατίδου Μ, Μαγουλάς Μ, Παγώνης Σ  
Συχνότητα ανίχνευσης λανθάνουσας ηπατίτιδας Β σε αιμοδοτικό πληθυσμό κατά τη δεκαετία 2006-2015, Προφορική ανακοίνωση, 4η Πανελλήνια Συνάντηση AIDS και Ηπατίτιδες, Αθήνα, 29 Σεπτεμβρίου-01 Οκτωβρίου 2016
- Sarli A, Skalidakis I, **Velissari A**, Koutsandrea C, Petersen M, Kitsos G, Moschos M, Kroupis C  
Innate immunity gene polymorphisms in wet age-related macular degeneration (AMD), IFCC-EFLM EuroMedLab, Αθήνα 2017
- Μ. Ελευθεριώτης, Ι. Μάλιος, **Α. Βελισσάρη**, Ε. Λαούδη, Γ. Κουππάρη, Γ. Μαραθωνίτης, Χ. Λούπα  
Οξεία μηνιγγίτιδα με μικροβιαμία από *Streptococcus sanguis* σε ανοσοεπαρκή γυναίκα, 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων, Αθήνα 3-5 Μαρτίου 2017

- **Βελισσάρη Αλίκη**, Μπαζίγου Φραντζέσκα, Μαγουλάς Μιχαήλ, Λεμπεσόπουλος Κωνσταντίνος, Κουτσογιάννη Κλημεντίνη, Παγώνης Σωτήριος  
Συχνότητα ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι του κυτταρομεγαλοϊού σε εθελοντές αιμοδότες 1ης φοράς, 10<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα 26-28 Απριλίου 2018

#### **ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

- Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Κατερίνης, ειδικευόμενη Ιατρικής Βιοπαθολογίας από 7/2/2012 έως 30/1/2014
- Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Α. Φλέμιγκ, ειδικευόμενη Ιατρικής Βιοπαθολογίας από 21/2/2014 έως 22/05/2016
- Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Λαϊκό, ειδικευόμενη Ιατρικής Βιοπαθολογίας από 18/08/2016 έως 28/06/2017
- Ιδιωτικό βιοπαθολογικό ιατρείο, 2018 έως σήμερα

#### **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ**

- Ετήσιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Εργαστηριακής Αιματολογίας-Αιμοδοσίας, Κύκλος XXI 2016-2017
- Τριήμερο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο στις Λοιμώξεις, Αθήνα 6-8 Νοεμβρίου 2015
- Μετεκπαιδευτικό πρακτικό φροντιστήριο με θέμα « Η μικροσκοπική εξέταση στη διάγνωση της φυματίωσης», Αθήνα, Μάρτιος 2015
- 6<sup>ο</sup> μετεκπαιδευτικό σεμινάριο ιατρικής μυκητολογίας με θέμα «Μυκητικές λοιμώξεις σε ευαίσθητους και βαρέως πάσχοντες ασθενείς», Αθήνα, Δεκέμβριος 2014
- Σεμινάριο εκπαίδευσης με θέμα «Εξωτερικός ποιοτικός έλεγχος στο εργαστήριο: προετοιμασία, σφάλματα, ερμηνεία των αποτελεσμάτων και διορθωτικές κινήσεις», Αθήνα, Ιούνιος 2014
- Σεμινάριο εκπαίδευσης με θέμα «Στρατηγικές στη διαγνωστική προσέγγιση και αξιολόγηση μυκήτων», Ναύπλιο, Μάιος 2014
- Σεμινάριο Βιολογίας και Ιατρικής του ιδρύματος Μποδοσάκη, Βραυρώνα Αττικής, Σεπτέμβριος 2010

#### **ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ**

- 19-22 Μαρτίου 2008, Αθήνα  
35ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού



- 18-19 Απριλίου 2008, Αθήνα  
4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλιμακτηρίου και Εμμηνόπαυσης
- 9-11 Μαΐου 2008, Αθήνα  
14ο Επιστημονικό Συνέδριο φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος
- 29-31 Μαΐου 2008, Αθήνα  
3ο Συνέδριο Κλινικών Καρδιαγγειακών Παθήσεων
- 30-31 Μαΐου 2008, Αθήνα  
6ο Συμπόσιο Επείγουσας και Εντατικής Ιατρικής Ενόπλων Δυνάμεων
- 5-7 Ιουνίου 2008, Αθήνα  
11ο Συνέδριο Εταιρείας Λιπιδιολογίας Αθηροσκλήρωσης και Αγγειακής Νόσου
- 5 Ιουλίου 2008, Αθήνα  
Ημερίδα Μεταβολική Χειρουργική
- 30 Σεπτεμβρίου-3 Οκτωβρίου 2008, Αθήνα  
14ο Πανελλήνιο Συνέδριο Εσωτερικής Παθολογίας
- 22-25 Οκτωβρίου 2008, Αθήνα  
16ο Πανελλήνιο Ακτινολογικό Συνέδριο
- 30 Οκτωβρίου-01 Νοεμβρίου 2008, Αθήνα  
29ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο
- 26-29 Νοεμβρίου 2008, Αθήνα  
20ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας
- 3-6 Δεκεμβρίου 2008, Αθήνα  
3ο Πανελλήνιο συνέδριο Αθηροσκλήρωσης
- 5-6 Δεκεμβρίου 2008, Αθήνα  
2ο Συνέδριο ογκολογίας στην πρωτοβάθμια περίθαλψη
- 23-24 Ιανουαρίου 2009, Αθήνα  
1ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Γενικής Ιατρικής
- 6-8 Φεβρουαρίου 2009, Αθήνα  
9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων και 2η ημερίδα Χημειοθεραπείας
- 13-15 Φεβρουαρίου 2009, Αθήνα  
Πρακτικά ερωτήματα για τη διαγνωση και αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης
- 5-7 Μαρτίου 2009, Αθήνα  
11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υπέρτασης
- 8-10 Μαΐου 2009, Θεσσαλονίκη  
15ο Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος
- 22-24 Οκτωβρίου 2009, Αθήνα  
Σύγχρονο κλινικό εργαστήριο
- 27-29 Νοεμβρίου 2009, Αθήνα  
1<sup>st</sup> International Conference on Molecular Cancer Research
- 7-9 Οκτωβρίου 2010, Αθήνα  
9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Χημείας

- 3-6 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα  
XX Congress of Asthma WCA 2010
- 25-27 Νοεμβρίου 2010, Αθήνα  
8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δεικτών Καρκίνου και Στοχευμένης Θεραπείας
- 1-4 Δεκεμβρίου 2010, Αθήνα  
22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Ρευματολογικό Συνέδριο
- 9-11 Δεκεμβρίου 2010, Αθήνα  
8<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Ανοσολογίας
- 17-19 Μαρτίου 2011, Αθήνα  
12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Αρτηριακής Υπέρτασης
- 14-16 Απριλίου 2011, Αθήνα  
17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας
- 17-21 Μαΐου 2011, Αθήνα  
37<sup>ο</sup> Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο
- 15-17 Μαρτίου 2012, Αθήνα  
7<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας
- 29-31 Μαρτίου 2012, Θεσσαλονίκη  
27<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Βορειοελλαδικό Ιατρικό Συνέδριο
- 9-10 Φεβρουαρίου 2013, Θεσσαλονίκη  
27<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας Βορείου Ελλάδος
- 13-14 Απριλίου 2013, Αθήνα  
2η Πανελλήνια επιστημονική διημερίδα εφαρμοσμένης εργαστηριακής ιατρικής
- 17-19 Οκτωβρίου 2013, Αθήνα  
5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοχημείας
- 15-16 Μαρτίου 2014, Αθήνα  
3η Πανελλήνια επιστημονική διημερίδα εφαρμοσμένης εργαστηριακής ιατρικής
- 1-3 Απριλίου 2014, Καλαμάτα  
9ο συνέδριο Κλινικών Καρδιαγγειακών Παθήσεων
- 29-31 Μαΐου 2014, Αθήνα  
8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας
- 13-15 Νοεμβρίου 2014, Θεσσαλονίκη  
25ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο
- 24 Ιανουαρίου 2015, Αθήνα  
Ημερίδα με θέμα «Θέματα Μυκητολογίας»
- 25-27 Φεβρουαρίου 2015, Αθήνα  
7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας
- 6-8 Μαρτίου 2015, Αθήνα  
15ο πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων
- 7-9 Μαΐου 2015, Αθήνα  
6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοχημείας
- 20-22 Νοεμβρίου 2015, Αθήνα

6ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Μυκητολογίας

- 30-31 Ιανουαρίου 2016, Αθήνα  
23η Διεθνής Διημερίδα Ιογενών Ηπατίτιδων Β & C «Στ. Χατζηγιάννης»
- 14-15 Φεβρουαρίου 2016, Θεσσαλονίκη  
30ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας Βορείου Ελλάδος
- 4-6 Μαρτίου 2016, Αθήνα  
16ο Πανελλήνιο Συνέδριο Λοιμώξεων
- 5 Μαρτίου 2016, Αθήνα  
17ο Εκπαιδευτικό σεμινάριο με θέμα « Διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας και των ηλεκτρολυτών»
- 19 Μαρτίου 2016, Αθήνα  
2η Ημερίδα Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Βιοπαθολογίας-Εργαστηριακής Ιατρικής
- 29 Σεπτεμβρίου-01 Οκτωβρίου 2016, Αθήνα  
4η Πανελλήνια Συνάντηση AIDS και Ηπατίτιδες
- 13-15 Οκτωβρίου 2016, Αθήνα  
19ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Λιπιδολογίας, Αθηροσκλήρωσης και Αγγειακής Νόσου
- 02-04 Νοεμβρίου 2017, Αθήνα  
28ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αιματολογίας
- 03-05 Νοεμβρίου 2017, Αθήνα  
7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Ιατρικής Μυκητολογίας
- 11 Νοεμβρίου 2017, Θεσσαλονίκη  
Ημερίδα Εφαρμοσμένης Εργαστηριακής Ιατρικής
- 26-27 Ιανουαρίου 2018, Αθήνα  
18<sup>η</sup> Διημερίδα Κλινικής Μικροβιολογίας
- 2-4 Μαρτίου 2018, Αθήνα  
18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Λοιμώξεων
- 20-21 Απριλίου 2018, Αθήνα  
Αιματολογία: Νεότερες προσεγγίσεις στη διάγνωση και θεραπεία
- 26-28 Απριλίου 2018, Αθήνα  
10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας
- 10 Νοεμβρίου 2018, Αθήνα  
Εκπαιδευτική Συνάντηση αφιερωμένη στη Διάγνωση των Σεξουαλικά Μεταδιδόμενων Νοσημάτων HPV και Χλαμυδίων με τη χρήση Μοριακών Τεχνικών
- 8 Δεκεμβρίου 2018, Αθήνα  
8ο μετεκπαιδευτικό σεμινάριο ιατρικής μυκητολογίας
- 18-20 Ιανουαρίου 2019, Αθήνα  
Επίκαιρα θέματα ιατρικής μεταγίσεων και αιμόστασης

- 25-26 Ιανουαρίου 2019, Αθήνα  
19η Ετήσια Δημερίδα Κλινικής Μικροβιολογίας με θέμα «Διαρροϊκά σύνδρομα λοιμώδους αιτιολογίας»

#### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

- Αγγλικά: PROFICIENCY University of Cambridge
- Γαλλικά: DELF 2
- Ισπανικά: Diploma de la Lengua Espanola, Nivel Superior
- Γερμανικά: B2 Zertifikat
- Κινέζικα: A2 HSK2
- Ιταλικά: B1
- Τούρκικα: B2
- Αραβικά: B1
- Περσικά: B1

#### **Η/Υ**

•Λειτουργικό σύστημα Windows, Microsoft Word , Excel ,  
Internet Explorer, Outlook Express, Microsoft Access,  
Powerpoint , με πιστοποίηση ECDL

#### **Λοιπά ενδιαφέροντα**

- Συγγραφή ποίησης-πεζογραφίας. Πολυάριθμες δημοσιεύσεις έργων σε ανθολογίες διηγημάτων και λογοτεχνικά περιοδικά. Πολυάριθμα πανελλήνια βραβεία ποίησης, διηγήματος, νουβέλας.

## Περιεχόμενα

### **A. Θεωρητικό μέρος**

#### **Κεφάλαιο 1: ΚΛΙΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΟΥ MALT ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ**

1.1 MALT λέμφωμα: Ορισμός- επιδημιολογία	16
1.2 Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση	18
1.3 Παθολογοανατομικά ευρήματα-Ανοσοφαινότυπος	22
1.4 Προγνωστικοί παράγοντες-Σταδιοποίηση	26
1.5 Θεραπευτικές επιλογές	28

#### **Κεφάλαιο 2: ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ MALT ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ**

2.1 MALT και φλεγμονή	32
2.2 Γαστρικό MALT και <i>H. pylori</i>	32
2.3 Ανοσιακή απόκριση στο <i>H. pylori</i>	36
2.3.1 Φυσική ανοσία	37
2.3.2 Τ-κυτταρική ανοσία	40
2.3.3. Χυμική ανοσία	46
2.3.4 Μικροπεριβάλλον του MALT	47
2.4 Χλαμύδια και οφθαλμικό MALT λέμφωμα	48
2.5 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο MALT λέμφωμα	49
2.5.1 Η μετάθεση t(11;18)(q21;q21)	50
2.6 Μοριακά μονοπάτια στο MALT λέμφωμα- Η οδός του NF-κΒ	53

#### **Κεφάλαιο 3: ΚΛΙΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ Τ-ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ**

3.1 Τ-δερματικά λεμφώματα: Ορισμός-Κατάταξη-Επιδημιολογία	58
3.2 Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση	62
3.2.1 Σπογγοειδής μυκητίαση	62

3.2.2 Σύνδρομο Sézary (SS)	64
3.3 Παθολογοανατομικά ευρήματα - Ανοσοφαινότυπος - Έλεγχος κλωνικότητας	
3.3.1 Σπογγοειδής μυκητίαση	68
3.2.2 Σύνδρομο Sézary (SS)	71
3.4 Σταδιοποίηση- Πρόγνωση	73
3.5 Θεραπευτικές επιλογές	76
<b>Κεφάλαιο 4: ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ Τ-ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ</b>	
4.1 CTCLs και φλεγμονή	79
4.2 Ανοσοπαθογένεση-Μικροπεριβάλλον στα CTCLs	81
4.3 Γενετικές ανωμαλίες στα CTCLs –Μοριακά ευρήματα	84
4.4 Βιταμίνη D και CTCLs	86
4.4.1 Μεταβολισμός και ρύθμιση βιταμίνης D	86
4.4.2 Δράσεις βιταμίνης D- Αντινεοπλασματικές ιδιότητες	88
4.4.3 Δράση της βιταμίνης D επί των φυσιολογικών Τ λεμφοκυττάρων	91
4.4.4 Βιταμίνη D και δερματική καρκινογένεση	92
4.4.5 Ανεπάρκεια βιταμίνης D – Εργαστηριακή διάγνωση, επίπτωση, κλινικές συστάσεις	94
<b>Κεφάλαιο 5: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΣΤΑ MALT ΚΑΙ Τ-ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ</b>	
5.1 Υπό εξέταση γονίδια και πολυμορφισμοί	108
<b>Σκοπός της εργασίας</b>	124
<b>B. Πειραματικό μέρος</b>	
<b>Κεφάλαιο 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
6.1 Ασθενείς- Μάρτυρες- Κλινικά δείγματα	125
6.2 Μέθοδοι	126
6.3 Πρωτόκολλα γονοτύπωσης των υπό μελέτη πολυμορφισμών	135

<b>Κεφάλαιο 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
A. Αποτελέσματα για MALT λεμφώματα	183
B. Αποτελέσματα για T-δερματικά λεμφώματα	199
<b>Κεφάλαιο 8: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	216
Ελληνική περίληψη	226
Αγγλική περίληψη	228
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	230

## **A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **Κεφάλαιο 1: ΚΛΙΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΟΥ MALT ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ**

#### **1.1 MALT λέμφωμα: Ορισμός- επιδημιολογία**

Το MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) λέμφωμα, δηλαδή το λέμφωμα που εξορμάται από το λεμφικό ιστό που σχετίζεται με τους βλεννογόνους, συνιστά κλωνικό νεόπλασμα Β-κυτταρικής αρχής, το οποίο κατατάσσεται στα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα οριακής ζώνης [1,2].

Περιεγράφηκε για πρώτη φορά ως ξεχωριστή κλινικοπαθολογική οντότητα το 1983 από τους Isaacson και Wright, οι οποίοι μελετώντας περιστατικά λεμφωμάτων στομάχου αναγνώρισαν την προέλευση των παθολογικών κυττάρων από το λεμφικό ιστό εντερικού τύπου που αναπτύσσεται έκτοπα εν μέσω του γαστρικού βλεννογόνου (GALT) [3]. Σε μεταγενέστερη δε δημοσίευσή τους πρότειναν ότι αντίστοιχη αιτιοπαθογένεια υποκρύπτεται της ανάπτυξης MALT λεμφωμάτων σε διαφορετικές ανατομικές θέσεις, όπως στους σιελογόνους αδένες, στο θυρεοειδή αδένα και στον πνεύμονα [4]. Το MALT λέμφωμα συμπεριελήφθη το 1994 στην αναθεωρημένη ευρωπαϊκή και αμερικανική κατάταξη των λεμφωμάτων (REAL classification) και από το 2001 προσετέθη μαζί με το λεμφαδενικό και σπληνικό λέμφωμα οριακής ζώνης στην κατάταξη του παγκόσμιου οργανισμού υγείας (WHO) [1,5]

Από επιδημιολογικής σκοπιάς, τα λεμφώματα οριακής ζώνης (MZL) συνιστούν ένα σχετικά συχνό, ήπιας κλινικής πορείας (indolent) υπότυπο Non-Hodgkin λεμφώματος (NHL) που αναγνωρίζεται κατά προσέγγιση στο 5–17% των περιπτώσεων της νόσου, ενώ τα MALT λεμφώματα αντιπροσωπεύουν το 50-70% των MZL και το 7-8% των NHL [6,7]. Συνιστά παγκοσμίως τον τρίτο συχνότερο υπότυπο NHL μετά το διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα και το οζώδες λέμφωμα [8]. Αδιαμφισβήτητα η συχνότερη και διεξοδικότερα μελετημένη εντόπιση είναι ο στόμαχος, ωστόσο MALT λεμφώματα έχουν περιγραφεί και σε μια μεγάλη ποικιλία άλλων ανατομικών θέσεων, σε όργανα που στερούνται βλαστικών κέντρων, όπως οι σιελογόνοι αδένες, ο εντερικός σωλήνας, η ουροδόχος κύστη, ο οφθαλμός, ο θυρεοειδής αδένας, το δέρμα, ο λάρυγγας, ο πνεύμονας, ο νεφρός, ο μαστός, το ήπαρ, ο προστάτης, ο ρινοφάρυγγας, το κεντρικό νευρικό σύστημα κ.ά. [8-12,13].



Η τυποποιημένη ως προς την ηλικία επίπτωση (age-standardized incidence rate) στο δυτικό κόσμο κυμαίνεται μεταξύ 0,4 και 1,5 ανά 100.000 άτομα-χρόνια (person-years) [14]. Παραταύτα, πρέπει να σημειωθεί ότι σημαντικές επιδημιολογικές διαφορές σημειώνονται μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών, με μεγαλύτερη επίπτωση να παρατηρείται σύμφωνα με παλαιότερες αναφορές στη νότια Ευρώπη [15], όταν μελέτη παρατήρησης στις ΗΠΑ κατά την περίοδο 2001-2009 υπολόγισε επίπτωση 12,3/1.000.000 person-years για το εξωλεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης και 3,8 για τη γαστρική εντόπιση [13]. Ειδικά για τη χώρα μας, αναδρομική καταγραφή του 2005 διαπίστωσε ότι το MALT λέμφωμα είναι το δεύτερο σε επίπτωση NHL στον ελληνικό πληθυσμό [16], ενώ σειρά 97 ελλήνων ασθενών με MZL ανέδειξε πρωτοπαθή εστία το στόμαχο στο 67% των περιπτώσεων, με μέση ηλικία τα 59 έτη και ελαφρά επικράτηση του ανδρικού φύλου [10]. Μεταξύ των διαφόρων σειρών ασθενών καταγράφονται συχνά διαφορές στη διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση, αλλά και την αναλογία γυναικών:ανδρών και τη φυλετική προδιάθεση, γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη για εκτενέστερες επιδημιολογικές καταγραφές που θα αναδείξουν τους δημογραφικούς παράγοντες κινδύνου και τις διαχρονικές τάσεις εξέλιξής τους [13,17-21]. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι η μελέτη των Khalil και συνεργατών, η οποία είναι και η εκτενέστερη μέχρι σήμερα πληθυσμιακή μελέτη στο πεδίο, ανέδειξε επικράτηση του ανδρικού φύλου στα MZL στομάχου, λεπτού εντέρου, δέρματος και νεφρού σε αντίθεση με τα MZL σιελογόνων αδένων και θυρεοειδούς όπου υπερείχε το γυναικείο φύλο και τα MZL παχέως εντέρου, οφθαλμού και πνεύμονα, όπου η επίπτωση βρέθηκε ίση και στα δύο φύλα. Η διάμεση ηλικία υπολογίστηκε στα 66 έτη για το εξωλεμφαδενικό MZL και στα 69 για το λεμφαδενικό [13].

Μεταξύ των μέχρι σήμερα περιγραφθέντων προδιαθεσικών παραγόντων για MALT λέμφωμα, συγκαταλέγονται εκτός της ηλικίας, τα αυτοάνοσα νοσήματα, το οικογενειακό ιστορικό αιματολογικής κακοήθειας και το κάπνισμα, ενώ προστατευτικό ρόλο πιθανώς να έχει η μικρή κατανάλωση αλκοόλ [6,22]. Η γενετική συνιστώσα όπως υποδεικνύουν μεγάλες επιδημιολογικές μελέτες δεν είναι αμελητέα στα εξωλεμφαδενικά MZL, κάτι που άλλωστε ισχύει για όλα τα NHL, ωστόσο πολύ δρόμος μένει να διανυθεί ερευνητικά μέχρι την πλήρη διαλεύκανση των εμπλεκόμενων γενετικών τόπων [6]. Πρέπει όμως να λεχθεί ότι η πιο καλά αναγνωρισμένη συνθήκη που ευοδώνει την ανάπτυξη MALT είναι δίχως άλλο η παρουσία χρονίζουσας φλεγμονής στα πλαίσια λοίμωξης ή αυτοάνοσου διεργασίας,

που ειδικά για τη γαστρική εντόπιση συνδέεται με τη σχεδόν πάντοτε συνυπάρχουσα χρόνια γαστρίτιδα από *H. pylori*, όπως θα αναπτυχθεί εκτενώς σε επόμενο εδάφιο [6,18,23].

## **1.2 Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση**

Η κλινική εικόνα των MALT λεμφωμάτων διαφέρει ανάλογα με την ανατομική θέση, αλλά εν γένει παρουσιάζει κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα οι περισσότεροι ασθενείς εμφανίζουν ήπια νόσο κατά τη διάγνωση, βρίσκονται σε καλή γενική κατάσταση (performance status) και στερούνται Β συμπτωμάτων και δυσμενών βιοχημικών προγνωστικών παραγόντων, όπως υψηλά επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και β2-μικροσφαιρίνης. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η νόσος είναι εντοπισμένη, αν και πολυεστιακές βλάβες ανευρίσκονται στο 30-40% των ασθενών. Η διασπορά επισυμβαίνει είτε σε άλλες βλενογονικές περιοχές ή συχνότερα σε μη βλενογονικές εντοπίσεις όπως ο σπλήνας, ο μυελός των οστών και το ήπαρ. Μυελική επινέμεση διαπιστώνεται στο 20% των περιπτώσεων και είναι σημαντικά συχνότερη σε μη γαστρεντερικά λεμφώματα [21].

Ειδικότερα όσον αφορά το γαστρικό MALT, τα κυριότερα συμπτώματα κατά τη διάγνωση είναι η μη ειδική δυσπεψία και το επιγαστρικό άλγος [24]. Η διάρκεια των συμπτωμάτων πριν την αναζήτηση ιατρικής φροντίδας ποικίλλει και μπορεί να κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες έως και χρόνια [19]. Η συχνότερη εντόπιση της βλάβης αφορά το άντρο, ενώ δεν είναι σπάνια η ανεύρεση πολλαπλών εστιών. Τα κλινικά χαρακτηριστικά του MALT λεμφώματος στομάχου και η σχετική τους συχνότητα συνοψίζονται στον πίνακα 1.

Εντοπισμένη νόσος (στάδιο I)	88%
Διήθηση μυελού των οστών	7%
<b>Κύρια συμπτώματα κατά τη διάγνωση</b>	
Επιγαστραλγία ή κοιλιαλγία	53%
Δυσπεψία	32%
Ναυτία και έμετοι	8%
Γαστρορραγία	2%
B συμπτώματα	1%
Αυξημένη LDH	1%
Αυξημένη β <sub>2</sub> -μικροσφαιρίνη	4%
<b>Κύρια ενδοσκοπικά ευρήματα</b>	
Ερύθημα	30%
Διαβρώσεις	23%
Έλκη	47%
<b>Εντόπιση</b>	
Άντρο	41%
Σώμα	12%
Θόλος	11%
Πολυεστιακή εντόπιση	33%
Γαστρικό κολόβωμα	3%

**Πίνακας 1:** Κλινικά χαρακτηριστικά του MALT λεμφώματος στομάχου και η σχετική τους συχνότητα [24]

Η διάγνωση βασίζεται στη λήψη βιοψιών από τις ύποπτες βλάβες και την παθολογοανατομική επιβεβαίωση. Η κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση του γαστρικού MALT σκιαγραφείται εν συντομία στον πίνακα 2.

Ιστορικό (παρουσία και διάρκεια τοπικών ή/και συστηματικών συμπτωμάτων)
Φυσική εξέταση (επιμελής αξιολόγηση όλων των λεμφαδενικών περιοχών, επιθεώρηση των ανώτερων αεραγωγών και των αμυγδαλών, κλινική αναζήτηση ηπατοσπληνομεγαλίας και τυχόν ψηλαφητών μαζών)
Εργαστηριακός έλεγχος, που περιλαμβάνει γενική εξέταση αίματος και επίχρισμα περιφερικού αίματος, μέτρηση επιπέδων LDH and β <sub>2</sub> -μικροσφαιρίνης, αξιολόγηση ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας
Βιοψία μυελού των οστών
Ακτινογραφία θώρακος
Υπολογιστική τομογραφία κοιλίας
Γαστροδωδεκαδακτυλοσκόπηση και λήψη πολλαπλών βιοψιών από όλες τις ορατές βλάβες αλλά και τις μακροσκοπικά υγιείς περιοχές με πλήρη χαρτογράφηση του οργάνου
Γαστρικός ενδοσκοπικός υπέρηχος

**Πίνακας 2:** Κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση του MALT λεμφώματος στομάχου [24]

Όσον αφορά τις υπόλοιπες ανατομικές θέσεις, η νόσος μπορεί να διαδράμει ασυμπτωματικά ή να δώσει γένεση σε μια ποικιλία εντοπισμένων και σπανιότερα συστηματικών συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα το MALT λέμφωμα εντέρου μπορεί να προκαλέσει κοιλιακά άλγη, απόφραξη ή και διάτρηση εντέρου, η πνευμονική εντόπιση δυνατόν να συνοδεύεται από βήχα, δύσπνοια αιμόπτυση ή θωρακικό άλγος, ενώ το MALT λέμφωμα δέρματος εμφανίζεται ως κνησμώδης ή μη, οζώδης ή ερυθρηματώδης δερματική βλάβη. Ψηλαφητή μάζα μπορεί να είναι το μοναδικό σύμπτωμα στο MALT λέμφωμα σιελογόνων και μαστού, ενώ στο MALT θυρεοειδούς απαντάται σε ένα ποσοστό ασθενών βράγχος φωνής και δυσφαγία. Ο εξώφθαλμος και η διπλωπία συγκαταλέγονται τέλος στα πιθανά εναρκτήρια συμπτώματα του MALT λεμφώματος οφθαλμού (πίνακας 3) [21].

	Έντερο	Πνεύμονας	Θυρεοειδής	Σιελογόνοι	Δέρμα	Οφθαλμός	Μαστός
<b>Εντοπισμένη νόσος</b>	45%	62%	83%	73%	59%	67%	40%
<b>Μυελική συμμετοχή</b>	35%	38%	17%	18%	29%	10-22%	20%
<b>Συμπτώματα</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Κοιλιακό άλγος</li> <li>•Απόφραξη</li> <li>•Διάτρηση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ασυμπτωματική νόσος</li> <li>•Βήχας</li> <li>•Δύσπνοια</li> <li>•Αιμόπτυση</li> <li>•Θωρακικό άλγος</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Μάζα</li> <li>•Βράγχος φωνής</li> <li>•Δυσφαγία</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ασυμπτωματική νόσος</li> <li>•Μάζα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Όζος</li> <li>•Ερύθημα</li> <li>•Κνησμός</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Μάζα</li> <li>•Εξόφθαλμος</li> <li>•Διπλωπία</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Μάζα</li> <li>•Άλγος</li> </ul>

**Πίνακας 3:** Κλινικά χαρακτηριστικά μη γαστρικού MALT λεμφώματος [21]

Για σκοπούς σταδιοποίησης και για την αποκάλυψη τυχόν λανθάνουσας συστηματικής διασποράς, προτείνονται πέραν της αξονικής τομογραφίας θώρακος και κοιλίας και διάφορες κλινικές, απεικονιστικές και βιοχημικές δοκιμασίες αναλόγως της πρωτοπαθούς εστίας, όπως αυτές περιγράφονται στον πίνακα 4.

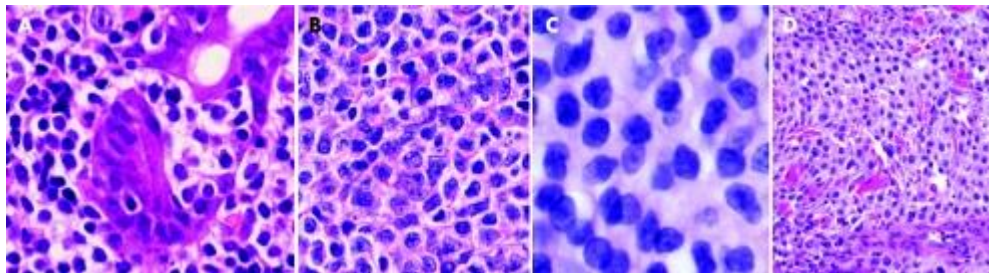
Εντόπιση	Κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση
Σιελογόνοι αδένες	Ωτορινολαρυγγολογική εξέταση και υπέρηχογράφημα. Δοκιμασία anti-SSA/anti-SSB για πιθανή συσχέτιση με σύνδρομο Sjogren
Θυρεοειδής αδένας	Υπερηχογράφημα και αξονική τομογραφία, βιοχημικές δοκιμασίες θυρεοειδικής λειτουργίας
Πνεύμονας	Βρογχοσκόπηση με λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος
Παχύ έντερο	Κολonosκόπηση
Μαστός	Μαστογραφία και MRI
Οφθαλμός	MRI και οφθαλμολογική εξέταση

**Πίνακας 4:** Κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση MALT λεμφώματος επιλεγμένων λοιπών ανατομικών θέσεων [9]

### 1.3 Παθολογοανατομικά ευρήματα-Ανοσοφαινότυπος

Ανεξαρτήτως εντόπισης τα MALT λεμφώματα φέρουν κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά κατά την παθολογοανατομική εξέταση. Τα νεοπλασματικά κύτταρα διηθούν τον ίστο πέριξ των δευτεροπαθών αντιδραστικών λεμφοζιδίων σε κατανομή οριακής ζώνης και εξαπλώνονται φυγόκεντρα. Αν και η αναγνώριση αντιδραστικών λεμφοζιδίων είναι επιβοηθητική, δεν είναι ωστόσο απαραίτητη για τη διάγνωση, καθώς αυτά μπορεί να απουσιάζουν όταν, όπως συμβαίνει συχνά στην κλινική πράξη, τα ιστικά τεμάχια που διατίθενται για τη βιοψία είναι μικρά σε μέγεθος.

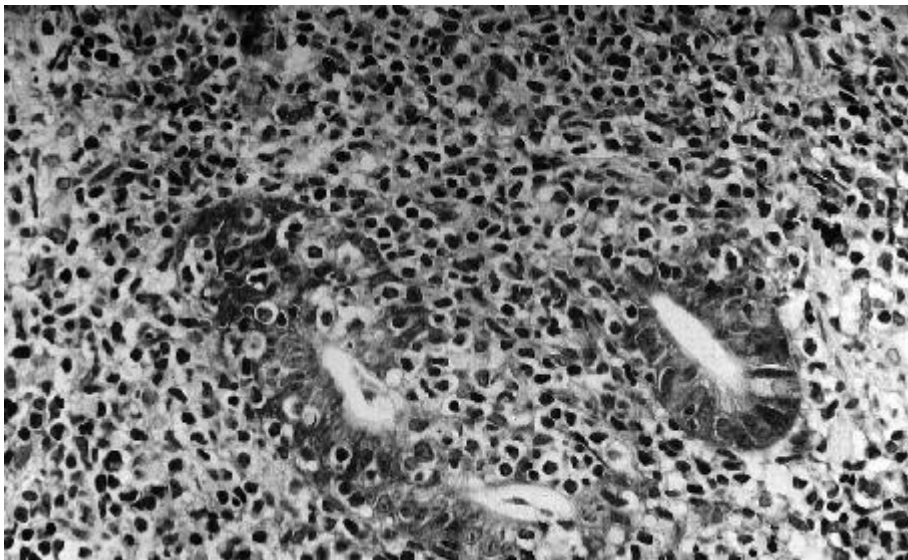
Τα λεμφωματικά κύτταρα λαμβάνουν ποικίλες κυτταρολογικές μορφολογίες, ακόμα και εντός του ίδιου προς εξέταση δείγματος (Εικόνα 1). Χαρακτηριστικά είναι τα κύτταρα εν είδει κεντροκυττάρου, κύτταρα δηλαδή μικρού ή μεσαίου μεγέθους με μικρούς ανώμαλους πυρήνες. Αναγνωρίζονται ακόμη νεοπλασματικά κύτταρα μονοκυττοειδούς μορφολογίας με άφθονο κυτταρόπλασμα και καλά αφορισμένα όρια, κύτταρα ομοιάζοντα μικρά ώριμα λεμφοκύτταρα, αλλά και μεγάλα κύτταρα δίκην κεντροβλάστη ή ανοσοβλάστη που παρατηρούνται διάσπαρτα μέσα στο λεμφωματικό ιστό. Τα πλασματοκύτταρα που ανευρίσκονται σε άλλοτε άλλη συχνότητα και συνήθως εφαιπτόμενα του επιθηλίου αποτελούν στο 1/3 των περιπτώσεων μέρος του νεοπλασματικού κλώνου και μπορεί να παρουσιάζουν άτυπα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως τα σωματίδια Dutcher και άλλα έγκλειστα [24,25].



**Εικόνα 1:** Μορφολογία κυττάρων MALT λεμφώματος: (A) Μικρά κύτταρα με λίγο διαυγές κυτταρόπλασμα, σχηματίζοντα λεμφοεπιθηλιακές βλάβες, (B) Κύτταρα δίκην κεντροκυττάρου, (C) Μικρά λεμφοειδή κύτταρα με συμπυκνωμένη χρωματίνη ομοιάζοντα κύτταρα λεμφώματος μανδύα (D) Μονοκυτταροειδή κύτταρα με άφθονο διαυγές πρωτόπλασμα (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης) [25].

Το παθολογοανατομικό σήμα κατατεθέν της νόσου είναι η παρουσία λεμφοεπιθηλιακών βλαβών, που συνιστούν διηθήσεις των επιθηλιακών δομών από

συσσωματώματα (συνήθως τριών ή περισσότερων) νεοπλασματικών κυττάρων (Εικόνα 2). Το πάσχον επιθήλιο συχνά εμφανίζει απώλεια της αρχιτεκτονικής του με μερική καταστροφή των αδένων και των κρυπτών, καθώς και εκφυλιστικές αλλοιώσεις, όπως κυτταρικό οίδημα και ηωσηνοφιλία. Προϊούσης της διήθησης ο φυσιολογικός ιστός αποδομείται εγκαταλείποντας νησίδια μόνο δυσμορφικών κυττάρων ανάμεσα στον επικρατούντα λεμφικό πληθυσμό. Πρέπει πάντως να τονισθεί ότι η παρουσία μεμονωμένων μικρών λεμφοκυττάρων δεν είναι αρκετή για τον ορισμό της λεμφοεπιθηλιακής βλάβης, αφού μπορεί να αφορά φυσιολογικά B ή T λεμφοκύτταρα που παρατηρούνται σε μια σειρά αντιδραστικών καταστάσεων. Από την άλλη πλευρά, σημειώνεται ότι οι λεμφοεπιθηλιακές βλάβες δεν είναι παθογνωμονικές του MALT λεμφώματος, καθώς δυνατόν ενίοτε να ανευρεθούν σε φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως η γαστρίτιδα [24,25].



**Εικόνα 2:** Λεμφοεπιθηλιακές βλάβες που διηθούν γαστρικούς αδένες (Χρώση Giemsa) [24].

Πράγματι, στο πεδίο του γαστρικού MALT λεμφώματος, οι κυριότεροι διαγνωστικοί προβληματισμοί αφορούν τη διαφοροδιάγνωση από την *H. pylori* γαστρίτιδα. Τα ιστολογικά ευρήματα που συνηγορούν υπέρ μαλώματος είναι τα πυκνά λεμφοειδή διηθήματα που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του βιοπτικού υλικού, η παρουσία λεμφοεπιθηλιακών βλαβών, τα σωμάτια Dutcher στα πλασματοκύτταρα και η μετρίου βαθμού κυτταρολογική ατυπία των λεμφοκυττάρων [25]. Το 1993 οι Wotherspoon και συνεργάτες εισήγαγαν ένα εύχρηστο σύστημα βαθμονόμησης

(scoring system) για την αξιολόγηση των γαστρικών λεμφικών διηθημάτων, που παρουσιάζεται στον πίνακα 5 [26].

Βαθμολογία	Διάγνωση	Ιστολογικά χαρακτηριστικά
0	Φυσιολογικός βλεννογόνος	Διάσπαρτα πλασματοκύτταρα, απουσία λεμφοζιδίων
1	Χρόνια ενεργός γαστρίτις	Μικρά συσσωματώματα λεμφοκυττάρων. Απουσία λεμφοζιδίων και λεμφοεπιθηλιακών βλαβών.
2	Χρόνια ενεργός γαστρίτις με λεμφοζίδια	Λεμφοζίδια με περιβάλλουσα ζώνη μανδύα και πλασματοκύτταρα. Απουσία λεμφοεπιθηλιακών βλαβών.
3	Ύποπτο λεμφικό διήθημα, πιθανώς αντιδραστικό	Λεμφοζίδια περιβαλλόμενα από κύτταρα οριακής ζώνης που διηθούν διάχυτα τη βασική μεμβράνη και ενίοτε το επιθήλιο.
4	Ύποπτο λεμφικό διήθημα, πιθανώς λέμφωμα	Λεμφοζίδια περιβαλλόμενα από κύτταρα οριακής ζώνης που διηθούν διάχυτα τη βασική μεμβράνη και κατά μικρές ομάδες το επιθήλιο.
5	MALT λέμφωμα	Παρουσία πυκνών διάχυτων διηθημάτων κυττάρων οριακής ζώνης στη βασική μεμβράνη με εκσεσημασμένες λεμφοεπιθηλιακές βλάβες.

**Πίνακας 5:** Κατάταξη γαστρικών λεμφικών διηθημάτων κατά Wotherspoon [26].

Πιο πρόσφατα, η ενσωμάτωση ανοσοιστοχημικών και μοριακών δεικτών στη διαγνωστική έχει βοηθήσει έτι περαιτέρω την κατάταξη των βλαβών [24,25]. Ο ανοσοφαινότυπος των κυττάρων του MALT λεμφώματος είναι ταυτόσημος με εκείνον των υπόλοιπων MZL, δηλαδή εμφανίζουν θετικότητα για επιφανειακές ανοσοσφαιρίνες και παν-B αντιγόνα (CD20,CD79a,CD19) και έλλειψη CD5, CD10, CD23, Bcl6 και κυκλίνης D1. Η ανάλυση των επιφανειακών ανοσοσφαιρινών μπορεί να συνδράμει στη διάκριση του λεμφώματος από ένα αντιδραστικό λεμφικό διήθημα,



καθώς στην πρώτη περίπτωση ανευρίσκονται επιφανειακές ανοσοσφαιρίνες (IgM στις περισσότερες περιπτώσεις, IgA σε λίγες, και IgG σπάνια) που παρουσιάζουν περιορισμό ελαφρών αλυσίδων (κλάσμα κ:λ ή λ:κ >10:1). Στο 50% των περιπτώσεων παρατηρείται αθρόα συνέκφραση του CD43 από μικρά CD20 θετικά κύτταρα, ενώ η χρώση για κυτοκερατίνη μπορεί να αποκαλύψει λεμφοεπιθηλιακές βλάβες. Τέλος, η T-λεμφοκυτταρική συμμετοχή, που πιθανολογείται ότι επικουρεί την ανάπτυξη του όγκου, μπορεί να ανδειχθεί με την αξιολόγηση της παρουσίας των αντίστοιχων δεικτών επιφανείας (CD3, CD4, CD8, και CD45RO) [24,25].

Σε περιπτώσεις που τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και η ανοσοιστοχημεία δε δύνανται να διασφαλίσουν τη διάγνωση, οι μοριακές τεχνικές μπορούν να προσφέρουν σημαντική βοήθεια. Σε αυτά τα πλαίσια η ανάδειξη B-κυτταρικής κλωνικότητας μέσω μελέτης της αναδιάταξης των *IGH*, *IGK*, και *IGL* γονιδίων με προτυποποιημένους εκκινητές και πρωτόκολλα συνειγορεί έντονα υπέρ της νεοπλασματικής φύσης της βλάβης [25]. Ο συνδυασμός των κριτηρίων Wotherspoon και της B-κλωνικότητας σε γαστρικές βιοψίες έχει δειχθεί να επιβοηθά σημαντικά τη διερεύνηση ύποπτων λεμφικών διηθημάτων [27]. Ωστόσο τα σπάνια παραδείγματα ψευδοκλωνικότητας σε περιπτώσεις εκλεκτικής ενίσχυσης ανασυνδυασμένων *IGH* γονιδίων προερχόμενων από ολιγοκλωνικούς B-πληθυσμούς αντιδραστικών λεμφοζιδίων επί γαστρίτιδος, υπογραμμίζουν το γεγονός ότι, απουσία ιστολογικών στοιχείων δε νοείται διάγνωση MALT λεμφώματος και ως εκ τούτου, η ανάλυση κλωνικότητας έχει νόημα μόνο όταν υφίσταται ένα μορφολογικά ύποπτο διήθημα [25]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι στις διαφορετικές εντοπίσεις του MALT λεμφώματος απαντώνται διαφορετικά πρότυπα IGVH οικογενειών (IGHVH1-69 στους σιελογόνους αδένες, IGHVH3-30 ή IGHVH3-23 σε γαστρικά MALT ανταποκρινόμενα σε θεραπεία εκρίζωσης και χωρίς την μετάθεση t(11;18), IGHVH4-34 στον οφθαλμό, IGHV3 και IGHV4 στον πνεύμονα και IGHVH1-69 ή IGHVH4-59 στο δέρμα) [28]. Τέλος, σε μοριακό επίπεδο χρήσιμη για τη διάγνωση και πρόγνωση του πάσχοντος είναι και η μελέτη των κυτταρογενετικών ανωμαλιών, μεταξύ των οποίων συχνότερες είναι οι μεταθέσεις t(11;18)(q21;q21)/API2-MALT1, t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 και t(1;14)(p22;q32)/IGH-BCL10, που θα περιγραφούν λεπτομερέστερα σε ακόλουθο κεφάλαιο.

#### 1.4 Προγνωστικοί παράγοντες-Σταδιοποίηση

Αν και δεν υπάρχει κοινά αποδεκτό πρωτόκολλο σταδιοποίησης για τα MALT λεμφώματα, τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συστήματα είναι το σύστημα Ann Arbour (πίνακας 6) που αναφέρεται στο σύνολο των NHL των ενηλίκων και ειδικά για τις γαστρικές εντοπίσεις το σύστημα Lugano (πίνακας 7) που προτάθηκε το 1993 από ομάδα μελέτης του γαστρεντερικού λεμφώματος [25,29,30].

Στάδιο	Περιγραφή
I	Συμμετοχή μιας ομάδας λεμφαδένων (I) ή συμμετοχή μιας μόνης εξωλεμφαδενικής εστίας ή οργάνου (IE).
II	Συμμετοχή 2 ή περισσότερων λεμφαδενικών περιοχών από την ίδια πλευρά του διαφράγματος (II) ή συμμετοχή ενός εξωλεμφαδενικού οργάνου ή εστίας με τους επιχώριους λεμφαδένες με ή χωρίς άλλες λεμφαδενικές περιοχές στην ίδια πλευρά του διαφράγματος (IIΕ).
III	Συμμετοχή λεμφαδενικών περιοχών εκατέρωθεν του διαφράγματος (III), που μπορεί επίσης να συνοδεύονται από συμμετοχή εξωλεμφαδενικού οργάνου ή εστίας (IIIΕ), συμμετοχή του σπλήνα (IIIS) ή και τα δύο.
IV	Γενικευμένη (πολυεστιακή) συμμετοχή περισσότερων εξωλεμφαδενικών οργάνων με ή χωρίς συμμετοχή λεμφαδένων ή ενός εξωλεμφαδενικού οργάνου με συμμετοχή απομακρυσμένων αδένων

**Πίνακας 6:** Σύστημα Ann Arbour για τη σταδιοποίηση των NHL.

Στάδιο	Περιγραφή
I	Διήθηση περιορισόμενη στο γαστρεντερικό σύστημα (ΓΕΣ) χωρίς διάσπαση του ορογόνου. Μονήρης βλάβη ή πολλαπλές βλάβες όχι κατά συνέχεια ιστού
II	Διήθηση επεκτεινόμενη στην κοιλιακή χώρα από την πρωτοπαθή βλάβη-συμμετοχή αδένων
	II <sub>1</sub> Γαστρικοί-μεσεντέριοι
	II <sub>2</sub> Απομακρυσμένοι
IIIΕ	Διήθηση του ορογόνου υμένα και συμμετοχή γειτονικών οργάνων
IV	Διήθηση εξωλεμφαδενικών εστιών ή μια βλάβη στο ΓΕΣ με υπερδιαφραγματική συμμετοχή λεμφαδένων

**Πίνακας 7:** Σύστημα Lugano για τη σταδιοποίηση του γαστρικού MALT λεμφώματος. Σημειώνεται ότι δεν περιγράφεται στάδιο III.

Στο γαστρικό MALT λέμφωμα εκτός από το στάδιο νόσου, προγνωστική αξία ως προς τη θεραπευτική ανταπόκριση προτείνεται ότι έχουν και άλλοι παράγοντες, όπως η παρουσία ή μη *H. pylori* γαστρίτιδος [31], η ανεύρεση της μετάθεσης t(11;18) [32] και η εκτίμηση του βάθους διήθησης του γαστρικού τοιχώματος από το νεοπλασματικό ιστό με τη χρήση ενδοσκοπικής υπερηχογραφίας [33]. Η τελευταία αυτή παράμετρος (μαζί με τη λεμφαδενική συμμετοχή και τη διασπορά νόσου) έχει ληφθεί υπ' όψιν στην κατάρτιση ενός ακόμα συστήματος σταδιοποίησης, του Paris staging system, ενός τροποποιημένου TNM συστήματος για τα πρωτοπαθή γαστρεντερικά λεμφώματα, που περιγράφεται στον πίνακα 8 [34].

TX	Έκταση δεν καθορίζεται
TO	Χωρίς στοιχεία λεμφώματος
T1	Λέμφωμα περιορισμένο στο βλεννογόνο/υποβλεννογόνο T1m : Λέμφωμα περιορισμένο στο βλεννογόνο/υποβλεννογόνο T1sm: Λέμφωμα περιορισμένο στον υποβλεννογόνο
T2	Λέμφωμα που διηθεί το βλεννογόνο μυική στοιβάδα ή τον υπορογόνο χιτώνα
T3	Λέμφωμα που εισδύει στον ορογόνο χιτώνα
T4	Λέμφωμα που επινέμεται γειτονικών δομών ή οργάνων
NX	Διήθηση λεμφαδένων δεν καθορίζεται
NO	Χωρίς στοιχεία λεμφαδενικής διήθησης
N1	Διήθηση τοπικών λεμφαδένων
N2	Διήθηση ενδοκοιλιακών λεμφαδένων πέραν των τοπικών
N3	Διήθηση εξωκοιλιακών λεμφαδένων
MX	Διασπορά λεμφώματος δεν καθορίζεται
MO	Χωρίς στοιχεία εξωλεμφαδενικής διασποράς
M1	Διήθηση άλλου σημείου του ΓΕΣ, όχι κατά συνέχεια ιστού
M2	Διήθηση άλλου ιστού ή οργάνου, όχι κατά συνέχεια ιστού
BX	Μυελική συμμετοχή δεν καθορίζεται
B0	Χωρίς στοιχεία μυελικής συμμετοχής
B1	Λεμφωματική διήθηση μυελού των οστών

**Πίνακας 8:** Σύστημα σταδιοποίησης γαστρεντερικού λεμφώματος Paris [34]

## 1.5 Θεραπευτικές επιλογές

Σε καμία άλλη πτυχή του MALT λεμφώματος στομάχου δεν καθίσταται τόσο σαφής η σημασία του παθογενετικού ρόλου του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού, όσο στην επιλογή και παρακολούθηση της κατάλληλης θεραπευτικής στρατηγικής. Έτσι, θεραπεία εκρίζωσης για *H. pylori* συστήνεται σε όλα τα γαστρικά MALT λεμφώματα, ανεξαρτήτως σταδίου. Το σύνηθες σχήμα περιλαμβάνει αναστολέα αντλίας πρωτονίων (PPI: Proton Pump Inhibitor) μαζί με κλαριθρομυκίνη και αμοξικιλίνη ή μετρονιδαζόλη για 10-14 μέρες. Το θεραπευτικό αποτέλεσμα συστήνεται να ελέγχεται με τεστ ουρίας (ή αντιγόνο ελικοβακτηριδίου στα κόπρανα) τουλάχιστον 6 εβδομάδες μετά τη θεραπεία και τουλάχιστον 2 εβδομάδες μετά τη διακοπή των PPIs. Σε περίπτωση αποτυχίας, επιχειρείται εκ νέου εκρίζωση με 2ης γραμμής τριπλό ή τετραπλό σχήμα PPI και αντιβιοτικών [35].

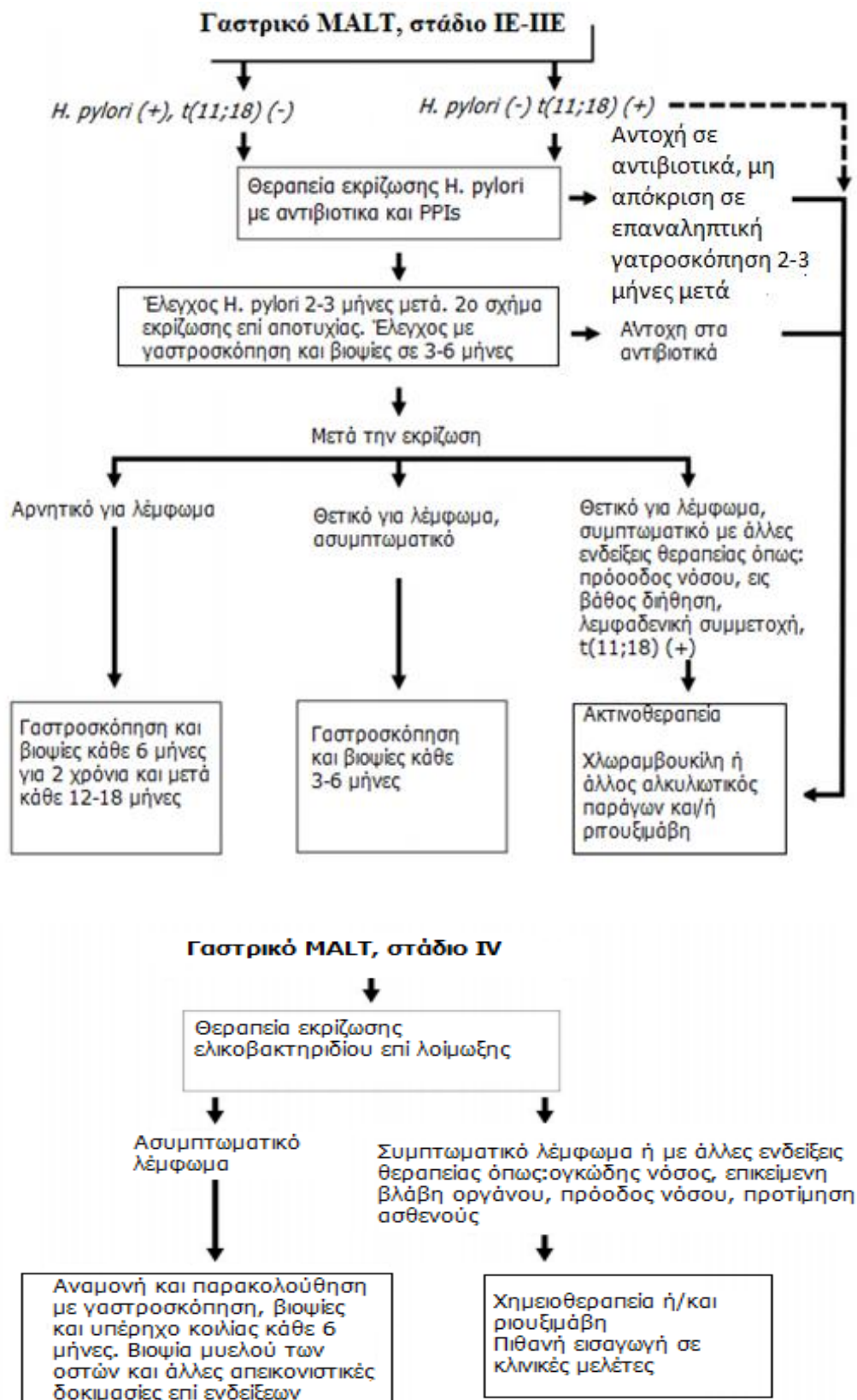
Η εκρίζωση του ελικοβακτηριδίου προκρίνεται ως η μοναδική αρχική αντιμετώπιση των εντοπισμένων *H. pylori* θετικών λεμφωμάτων, αφού είναι ικανή στην πλειοψηφία των πασχόντων να επιφέρει υποτροπή του όγκου και μακροχρόνιο έλεγχο της νόσου. Ακόμα και σε *H. pylori* αρνητικά λεμφώματα, η ανταπόκριση στη θεραπεία εκρίζωσης, αν και απίθανη, αναφέρεται στη βιβλιογραφία, κυρίως σε περιπτώσεις με ψευδώς αρνητικό έλεγχο ή λοίμωξη από άλλα είδη ελικοβακτηριδίου [35,36].

Επί αποτυχίας, οι περαιτέρω θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και πιθανώς χημειοθεραπεία. Σε εντοπισμένη νόσο, η ακτινοθεραπεία με μέτριες δόσεις (24-30 Gy, 3-4 εβδομάδες) φαίνεται να έχει καλά αποτελέσματα και ικανοποιητικό προφίλ ασφάλειας [35,37,38], όπως άλλωστε και η χημειοανοσοθεραπεία [35,39], χωρίς να καθίσταται ακόμα σαφές στη βιβλιογραφία ποια είναι η βέλτιστη προσέγγιση για αυτή την υποομάδα ασθενών. Όπως είναι αναμενόμενο, η συστηματική θεραπεία συνίσταται για τους πάσχοντες με συμπτωματική συστηματική νόσο. Σε καμία περίπτωση δε φαίνεται να έχει θέση η χειρουργική παρέμβαση στην αρχική αντιμετώπιση, καθώς δεν υπερτερεί θεραπευτικά των συντηρητικότερων προσεγγίσεων, ενώ αντίθετα φαίνεται να έχει δυσμενές αντίκτυπο στην ποιότητα ζωής [35].

Μεταξύ των χημειοθεραπευτικών σχημάτων, οι από του στόματος αλκυλιωτικοί παράγοντες (χλωραμβουκίλη, κυκλοφωσφαμίδη), τα νουκλεοσιδικά ανάλογα πουρίνης (κλαδριβίνη, φλουδαραβίνη), ο συνδυασμός ριτουξιμάβης-μπενταμουστίνης και ο συνδυασμός ριτουξιμάβης-χλωραμβουκίλης έχουν επιδείξει ικανοποιητικό

έλεγχο νόσου. Τα μέχρι στιγμής βιβλιογραφικά δεδομένα δεν επαρκούν για την πρόκριση κάποιου συγκεκριμένου σχήματος, αν και υπενθυμίζεται ότι τα πουρινικά ανάλογα συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο δευτεροπαθούς μυελοδυσπλασίας, ενώ η επιθετική αντιμετώπιση με ανθρακυκλίνες πρέπει να φυλάσσεται μόνο για ασθενείς με επιθετική νόσο ή ιστολογική εκτροπή [35]. Αξίζει τέλος να αναφερθεί ότι ελεύθερες χημειοθεραπείας (chemo-free) προσεγγίσεις όπως η χρήση λεναλιδομίδης μόνης ή σε συνδυασμό με ριτουξιμάβη καθώς και η ιμπρουτινίμη έχουν επιδείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε κλινικές μελέτες σε ανθεκτικά ή υποτροπιάζοντα MALT λεμφώματα [40-42].

Ο τρεχόντως προτεινόμενος θεραπευτικός αλγόριθμος για το γαστρικό λέμφωμα MALT κατά την ευρωπαϊκή εταιρεία ογκολογίας (ESMO) παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 3.



Εικόνα 3: Θεραπευτικός αλγόριθμος γαστρικού MALT λεμφώματος [35]

Όσον αφορά τις λοιπές εντοπίσεις του MALT λεμφώματος, η αξία της χορήγησης αντιβιοτικής θεραπείας βρίσκεται υπό αξιολόγηση. Θεραπευτικά σχήματα με βάση τη δοξυκυκλίνη και την κλαριθρομυκίνη προς καταπολέμηση της *C. psittaci* λοίμωξης και με βάση την κεφτριαξόνη έναντι της *B. burgdoferi* λοίμωξης έχουν δοκιμαστεί με ποικίλα αποτελέσματα στη θεραπεία των οφθαλμικών και δερματικών λεμφωμάτων αντίστοιχα [9,43]. Η χειρουργική αντιμετώπιση, η ακτινοθεραπεία, η ριτουξιμάβη μόνη ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες έχουν δείξει αποτελεσματικότητα στη θεραπεία μη γαστρικών MALT λεμφωμάτων [44]. Σε γενικές γραμμές επισημαίνεται ότι η χειρουργική αφαίρεση μπορεί να βοηθήσει σε εντοπισμένες βλάβες, όπου παράλληλα είναι κρίσιμη και για διαγνωστικούς σκοπούς, αλλά σπανίως είναι θεραπευτική αφ'εαυτής και συνδυάζεται ως εκ τούτου με τοπική ακτινοθεραπεία, η οποία άλλωστε είναι και η προκρινόμενη θεραπεία για εντοπισμένη νόσο ή/και τοπική υποτροπή. Η συστηματική νόσος έχει ένδειξη θεραπείας με σχήματα ανάλογα αυτών που χορηγούνται στο συστηματικό γαστρικό MALT λέμφωμα [44].

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ MALT ΛΕΜΦΩΜΑΤΟΣ**

Η αιτιοπαθογένεια του MALT λεμφώματος, παρά τα ολοένα αυξανόμενα σε όγκο ερευνητικά δεδομένα, παραμένει σήμερα ατελώς καθορισμένη. Η παρουσία χρονίζουσας φλεγμονής, η γενετική προδιάθεση του πάσχοντος και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται να είναι οι συνιστώσες εκείνες που δρώντας συνεργικά στη διαδρομή μιας πολυσταδιακής διαδικασίας οδηγούν εντέλει στην εκδήλωση παθολογίας. Οι εμπλεκόμενοι μοριακοί μηχανισμοί αποτελούν αντικείμενο εντατικής μελέτης που φιλοδοξεί να σκιαγραφήσει την πορεία της νόσου από την αρχική διαταραχή της ομοιοστασίας έως την παντελή απώλεια του ελέγχου του νεοπλασματικού πληθυσμού και την εμφάνιση της πλήρους κλινικής εικόνας και στοχεύει στην πιθανή ανάδειξη δυνατοτήτων πρόληψης και νέων θεραπευτικών στόχων. Στις ακόλουθες σελίδες θα επιχειρηθεί μια σύνοψη της τρέχουσας γνώσης πάνω στην παθογένεια του εξωλεμφαδενικού MZL και ιδίως της γαστρικής εντόπισης, καθώς και μια σύντομη μνεία στα ενεχόμενα υποκυτταρικά μονοπάτια.

## 2.1 MALT και φλεγμονή

Όπως προαναφέρθηκε, η κυριότερη επιτρεπτική συνθήκη για την ανάπτυξη εξωλεμφαδενικού MZL είναι η παρουσία χρόνιας φλεγμονής στα πλαίσια βακτηριακής λοίμωξης ή αυτοανοσίας. Η βιβλιογραφία βρίθει αναφορών περί της επιδημιολογικής, κλινικής και βιολογικής συσχέτισης των MALT λεμφωμάτων με διάφορα παθογόνα, αλλά και αυτοάνοσες εξεργασίες στο πάσχον όργανο, καθώς όπως φαίνεται ο χρόνιος αντιγονικός ερεθισμός είναι η κινητήριος δύναμη για την επιβίωση, επικράτηση και εκτροπή του λεμφωματικού κλώνου.

Έτσι, ρόλο στην αιτιοπαθογένεια του μαλτώματος πιστεύεται ότι έχουν διάφοροι μικροοργανισμοί αναλόγως της προσβαλλόμενης ανατομικής θέσης. Συγκεκριμένα ενοχοποιούνται το *H. pylori* στο στόμαχο [23], τα *C. psittaci* στον οφθαλμό [45], η *B. burgdoferi* στο δέρμα [46], το *C. jejuni* στο έντερο [47] και τελευταία το *A. xylosoxidans* στον πνεύμονα [48]. Γνωστή είναι επίσης η αυξημένη συχνότητα MALT λεμφώματος στο θυρεοειδή σε έδαφος θυρεοειδίτιδας Hashimoto [49] και στους σιελογόνους αδένες σε έδαφος συνδρόμου Sjogren [50] (πίνακας 9). Τέλος, αναφέρεται αυξημένη επίπτωση σπληνικού, λεμφαδενικού αλλά και εξωλεμφαδενικού (κυρίως εξωγαστρικού) MZL σε φορείς του ιού της ηπατίτιδας C [51].

Εντόπιση	Μικροοργανισμός/Αυτοάνοση νόσος
Στόμαχος	<i>Helicobacter pylori</i>
Οφθαλμός	<i>Chlamydomphila psittaci</i>
Δέρμα	<i>Borrelia burgdoferi</i>
Έντερο	<i>Cambylobacter jejuni</i>
Θυρεοειδής	Θυρεοειδίτιδα Hashimoto
Σιελογόνοι αδένες	Σύνδρομο Sjogren
Πνεύμονας	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>

**Πίνακας 9:** Συσχέτιση παθογόνων μικροοργανισμών και αυτοάνοσων καταστάσεων με την ανάπτυξη MALT λεμφώματος κατά ανατομική θέση.

## 2.2 Γαστρικό MALT και *H. pylori*

Κοινό τόπο αποτελεί βιβλιογραφικά η σχέση του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού με το MALT λέμφωμα στομάχου, η οποία υποστηρίζεται από ισχυρά δεδομένα επιδημιολογικής και βασικής έρευνας, καθώς φυσικά και από το διαπιστωμένο



θεραπευτικό όφελος των σχημάτων εκρίζωσης . Η αρχική συσχέτιση του *H. pylori* με την ανάπτυξη λεμφοζιδίων στο γαστρικό βλεννογόνο, γνωστή ήδη από το 1988, ενισχύθηκε από περαιτέρω επιδημιολογικές παρατηρήσεις που ανέδειξαν τη λοίμωξη με το βακτήριο ως μια προλεμφοματική κατάσταση, η οποία μπορεί να αναστραφεί σε έως και 80% των ασθενών κατόπιν επιτυχούς αντιβιοτικής αγωγής [52-59].

Το *H. pylori* ταυτοποιήθηκε το 1984 από τους Warren και Marshall οι οποίοι καλλιέργησαν το μικροοργανισμό από γαστρικές βιοψίες ασθενών με γαστρίτιδα και ελκωτικές βλάβες, επίτευγμα για το οποίο τους απονεμήθηκε το βραβείο Nobel ιατρικής το 2005 [60,61]. Πρόκειται για ελικοειδές, μικροαερόφιλο Gram αρνητικό βακτήριο, καταλάση και οξειδάση θετικό, το οποίο φέρει 3-5 μαστίγια και αποικίζει εκλεκτικά το γαστρικό επιθήλιο. Η πλειοψηφία των στελεχών εκφράζει παράγοντες παθογονικότητας ικανούς να επηρεάζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια των κυττάρων του ξενιστή επιτυγχάνοντας να διαφεύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης και να παραμένουν επί δεκαετίες στο γαστρικό βλεννογόνο [60,62]. Σημαντική για την επιβίωση του βακτηρίου στο αφιλόξενο όξινο περιβάλλον του στομάχου είναι η ικανότητα του να μεταβολίζει την ουρία σε αμμωνία δια του ενζύμου ουρεάση που εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής του μεμβράνης [63].

Ο μικροοργανισμός έχει αναγνωρισθεί ως τύπου I καρκινογόνο και θεωρείται ο πιο κοινός αιτιολογικός παράγων καρκίνου σχετιζόμενου με λοιμώξεις [60]. 50% του παγκόσμιου πληθυσμού υπολογίζεται ότι φέρει το βακτήριο, συνύπαρξη που χρονολογείται από πολύ νωρίς στην εξέλιξη, με γενετικές μελέτες να υποστηρίζουν ότι ο μικροοργανισμός αποικίζει το ανθρώπινο είδος εδώ και τουλάχιστον 58.000 έτη [64]. Αν και η κατανομή του βακτηρίου είναι παγκόσμια, η συχνότητα ανεύρεσής του ποικίλλει ευρέως μεταξύ των διάφορων γεωγραφικών περιοχών, με μεγαλύτερη επίπτωση να σημειώνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου ο αποικισμός θεωρείται ότι επισυμβαίνει ήδη από την παιδική ηλικία διά της κοπρανοστοματικής οδού και οι χαμηλές κοινωνικοοικονομικές συνθήκες παριστούν τον πλέον αναγνωρίσιμο παράγοντα κινδύνου [65].

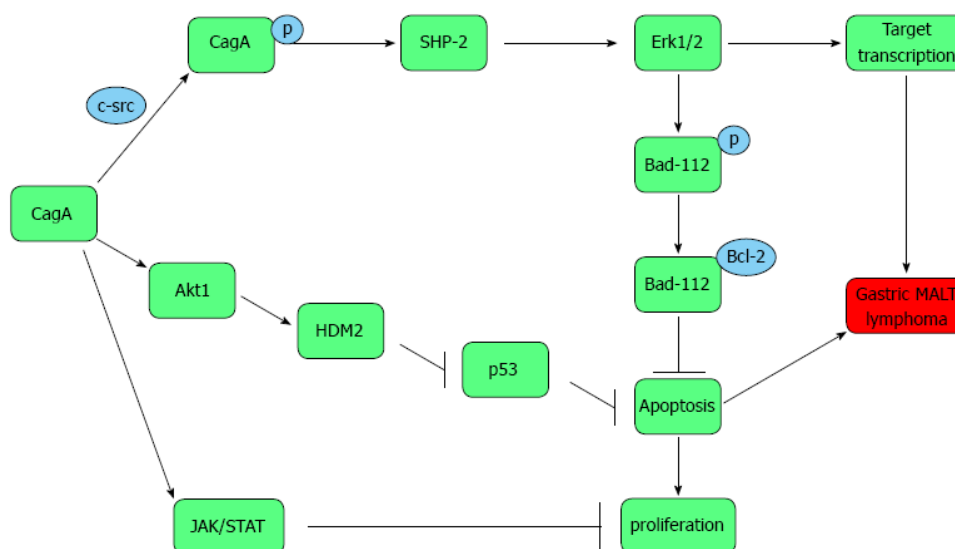
Παρότι το *H. pylori* πληρεί τα κριτήρια του Koch για την πρόκληση MALT λεμφώματος [64], πρέπει να τονισθεί ότι η πιθανότητα λεμφοματογένεσης είναι εξαιρετικά μικρή μεταξύ των φορέων. Οι περισσότεροι εξ αυτών μετά τη λοίμωξη αναπτύσσουν χρόνια φλεγμονή, αλλά παραμένουν ασυμπτωματικοί. Μόνο το 10% των χρόνιων φορέων αναμένεται να προχωρήσει στην ανάπτυξη πεπτικού έλκους, 1-3% να εμφανίσει γαστρικό αδενοκαρκίνωμα , ενώ ποσοστό <0.1% θα εκδηλώσει

MALT λέμφωμα [60]. Διαφορές μεταξύ των βακτηριακών στελεχών, γενετικές ιδιαιτερότητες του ξενιστή αλλά και περιβαλλοντικές μεταβλητές έχει προταθεί ότι επηρεάζουν την κλινική πορεία και εξέλιξη του αποικισμού προς νεοπλασματική εκτροπή, χωρίς η ταυτότητά τους και η περίπλοκη μεταξύ τους αλληλεπίδραση να έχουν μέχρι σήμερα διαλευκανθεί στο σύνολό τους [60,62].

Σε αυτά τα πλαίσια, αρκετός λόγος έχει γίνει στη βιβλιογραφία όσον αφορά τους βακτηριακούς παράγοντες παθογονικότητας και κατά πόσο αυτοί σχετίζονται με την προαγωγή της λεμφωματογένεσης. Ένας από αυτούς, ο οποίος μάλιστα έχει τύχει και της πλέον επισταμένης ερευνητικής προσοχής, είναι μια πρωτεΐνη 120-140 kDa, η CagA (Cytotoxin-associated gene A). Το γονίδιο που την κωδικοποιεί εδράζεται εντός περιοχής 40 kb, επονομαζόμενης «νησίδιο παθογονικότητας cag» (cag PAI: cag pathogenicity island) η οποία περιλαμβάνει συνολικά 27-31 γονίδια. Η CagA ταυτοποιήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 και η έκφρασή της συσχετίστηκε με την ανάπτυξη πεπτικού έλκους, ενώ παθογενετικό ρόλο προτείνεται ότι παίζει στην εκδήλωση τόσο αδενοκαρκινώματος όσο και MALT λεμφώματος στον προσβεβλημένο γαστρικό βλεννογόνο [60].

Δεδομένης λοιπόν της διαφαινόμενης σημασίας της CagA σε όλο το παθογόνο φάσμα του *H. pylori*, διάφορες μελέτες βασικής έρευνας έχουν ενσκήψει στην οργάνωση και λειτουργία του CagPAI. Από τα ευρήματά τους προκύπτει ότι τουλάχιστον 18 εκ των γονιδίων του CagPAI συμμετέχουν στο σχηματισμό ενός μηχανισμού έκκρισης τυπου IV, ο οποίος επιφορτίζεται με την ATP εξαρτώμενη εξαγωγή βακτηριακών πρωτεϊνών -συμπεριλαμβανομένης και της CagA- δια της βακτηριακής μεμβράνης και την προώθησή τους εντός του κυττάρου του ξενιστή. Όταν η CagA εισέλθει στο κύτταρο του ξενιστή υφίσταται φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης που εντάσσονται σε μοτίβα EPIYA (επαναλαμβανόμενες αλεπάλληλες αλληλουχίες γλουταμικού-προλίνης-ισολευκίνης-τυροσίνης-αλανίνης) στο C-τελικό άκρο της. Τέσσερα διαφορετικά μοτίβα EPIYA έχουν περιγραφεί έως σήμερα (A,B,C και D), με διαφορετική κατανομή σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές και κυμαινόμενη συσχέτιση με τον κίνδυνο καρκινογένεσης. Όλα τα CagA θετικά στελέχη φέρουν τα μοτίβα A και B. Το EPIYA C ανευρίσκεται στο δυτικό κόσμο, συνήθως σε 1 έως 3 επαναλήψεις (στελέχη ABC, ABCC, ABCCC), ενώ το EPIYA D επικρατεί στα στελέχη της Ανατολικής Ασίας (στελέχη ABD), όπου και έχει δειχθεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος, πιθανώς λόγω της ισχυρότερης του πρόσδεσης στην πρωτεΐνη SHP2, ενώ φαίνεται να επάγει και μεγαλύτερη έκκριση IL-8 [60,55].

Μετά τη φωσφορυλίωση της, η οποία στα β-λεμφοκύτταρα έχει δειχθεί να επιτελείται από αναστελλόμενες από την ιματινίμη και ντασιτινίμη κινάσες των οικογενειών Abl και Src, η CagA επηρεάζει ποικιλοτρόπως την κυτταρική λειτουργία [66]. Συγκεκριμένα όπως αποδεικνύουν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, συνδέεται με την φωσφατάση SHP2, οδηγώντας σε εμμένουσα ενεργοποίηση των κινασών ERK1/2(extracellular signal regulated kinases 1/2). Αυτές με τη σειρά τους επάγουν τη φωσφορυλίωση της σερίνης στη θέση 112 του Bad, γεγονός που εμποδίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ Bad και Bcl-2 και προκρίνει έμμεσα το σχηματισμό Bax/Bcl-2 ετεροδιμερών αντί των προαποπτωτικών Bax ομοδιμερών [67]. Επιπρόσθετα, μελέτη των Lin και συνεργατών, πρότεινε ότι η εισαγωγή της CagA στα β-λεμφοκύτταρα είναι ικανή να αυξήσει την έκφραση των αντιαποπτωτικών μορίων Bcl-2 and Bcl-XL [68]. Ακόμα δε και χωρίς να υποστεί φωσφορυλίωση, η CagA δύναται να παρεμβεί στη φυσιολογική σηματοδότηση του JAK-STAT μονοπατιού καθώς και να εμποδίσει την απόπτωση που προξενείται από την υδροξυουρία, δια αναστολής της συσσώρευσης της p53 [69]. Κατά τους μηχανισμούς αυτούς στο σύνολό τους, εικάζεται ότι η CagA παρεμβαίνοντας στα σηματοδοτικά μονοπάτια των λεμφοκυττάρων, τα καθιστά ικανά να διαφεύγουν της απόπτωσης, ευοδώνοντας έτσι τον κίνδυνο λεμφωματογένεσης (εικόνα 4) [55].



**Εικόνα 4:** Πιθανοί μηχανισμοί εμπλοκής της CagA στη λεμφωματογένεση [55]

Σε κλινικό επίπεδο, αναφέρεται ότι αντι-CagA αντισώματα ανευρίσκονται σημαντικά συχνότερα στον ορό και στο γαστρικό βλεννογόνο των ασθενών με MALT σε σχέση με τους ασθενείς που εμφανίζουν μόνο *H. pylori* γαστρίτιδα [70,71], αν και μελέτη

των Delchier και συνεργατών υποστηρίζει ισχυρότερη συσχέτιση με το γαστρικό διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα [72]. Η πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί σε λεμφωματικά κύτταρα ασθενών και η παρουσία της φαίνεται να αφορά κυρίως τα *H. pylori*-εξαρτώμενα λεμφώματα που ανταποκρίνονται ταχύτερα στη θεραπεία εκρίζωσης [73,74]. Δε λείπουν ωστόσο και τα δεδομένα που αμφισβητούν τη σχέση της CagA με την εκδήλωση MALT λεμφώματος, προκρίνοντας τη σημασία της ως επί το πλείστον στην αιτιοπαθογένεια του αδενοκαρκινώματος [75,76].

Όσον αφορά άλλους παράγοντες παθογονικότητας, διάφορα γονίδια έχουν μελετηθεί στη βιβλιογραφία. Το *vacA* (vacuolating cytotoxin A) σχετίζεται με τη δημιουργία κενοτοπίων στη μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή και διαφορές στην αλληλουχία στην μέση, ενδιάμεση περιοχή και την περιοχή σήματος (middle, intermediate, signal regions) πιθανολογείται ότι παίζουν ρόλο στην εξέλιξη της *H. pylori* λοίμωξης [77]. Μελέτη του 2004 αποδίδει πιθανό ρόλο στην παθογένεση του MALT λεμφώματος στην περιοχή Jhp0950 [78], ενώ διαφορές στο λιποπολυσακχαρίτη του βακτηρίου προτείνεται ότι μπορεί επίσης να εμπλέκονται μέσω της διαφορικής ενεργοποίησης των δενδριτικών κυττάρων [79]. Άλλα γονίδια που εντάσσονται στο CagPAI (*cagE*, *virB11*, *cagT*, *cagG*, *cagM*), κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (*babA*, *oipA*, *sabA*, *hopQ*), ή συνδέονται με την κινητικότητα του βακτηρίου (*flaA* και *flaB*) επίσης έχουν διερευνηθεί [77]. Η αξία τους στην παθογένεια του MALT λεμφώματος δεν έχει ακόμα αποδειχθεί [75] και η θέση τους αναμένεται να διευκρινισθεί μελλοντικά με πιο εκτεταμένες ερευνητικές απόπειρες [80,81].

Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι πέραν του *H. pylori* και άλλα σπανιότερα είδη ελικοβακτηριδίου, όπως το *H. helmanii*, έχουν ενοχοποιηθεί στην πρόκληση της νόσου, με εξίσου καλή ανταπόκριση στην αντιβιοτική αγωγή [82-84].

### **2.3 Ανοσιακή απόκριση στο *H. pylori***

Όπως προαναφέρθηκε, η χρονιότητα της φλεγμονής είναι καθοριστικός παράγοντας για την προαγωγή της λεμφωματογένεσης. Υπό αυτή την έννοια η ανοσιακή απόκριση αποκτά ιδιαίτερη σημασία, καθώς είναι εκείνη που θα επιτρέψει τη μακροχρόνια παραμονή του μικροοργανισμού στο γαστρικό βλεννογόνο, θα αποτύχει στον περιορισμό της φλεγμονώδους εξεργασίας, θα πυροδοτήσει τον ανοσιακό καταρράκτη που θα εγκαταστήσει τους διεγερμένους λεμφοκυτταρικούς πληθυσμούς στο όργανο και θα εξασφαλίσει το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη του όγκου. Η φυσιολογική και παθοφυσιολογική απάντηση του ανοσιακού συστήματος

απέναντι στο *H. pylori* μπορεί έτσι να αποτελέσει το κλειδί για τη μετάβαση από τον απλό αποικισμό στην εκδήλωση λεμφώματος ή αδενοκαρκινώματος.

Πολλές συνιστώσες του ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται να επιστρατεύονται έναντι του *H. pylori*, ενώ από την άλλη μεριά ο μικροοργανισμός έχει αναπτύξει ποικίλες στρατηγικές για να διαφεύγει αυτών. Η δυναμική αυτής της σχέσης αποτελεί ενεργό πεδίο μελέτης τόσο ως προς την παθοφυσιολογία της, όσο και ως προς τους υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς και τη βαρύτητα της γενετικής συνεισφοράς στην έκβαση της λοίμωξης.

### 2.3.1 Φυσική ανοσία

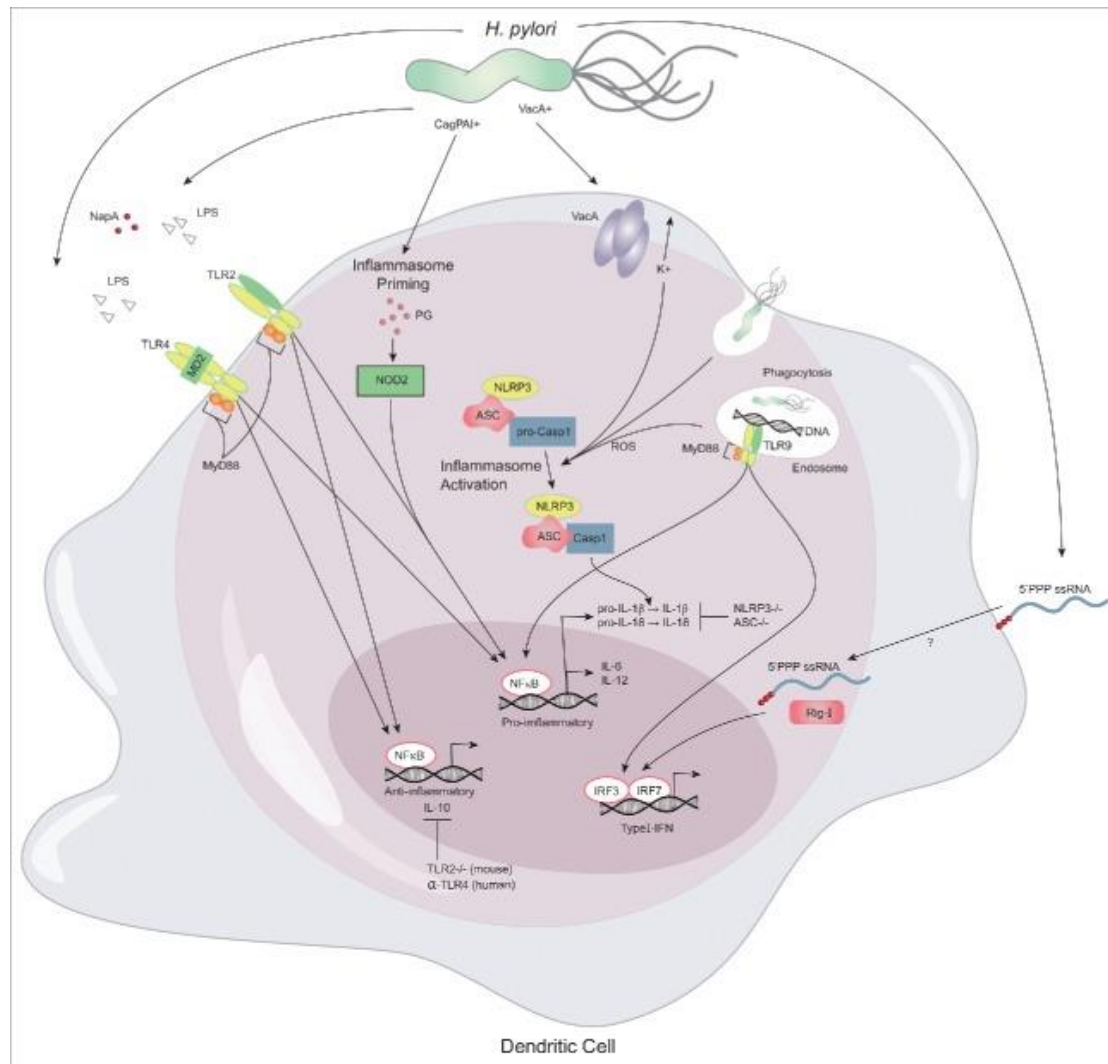
Κατά την πορεία της ανοσιακής απάντησης έναντι του *H. pylori*, ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων, υποδοχέων και διαλυτών ουσιών τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας συστρατεύονται και αλληλεπιδρούν σε έκταση και χρονική αλληλουχία που δεν έχει σκιαγραφηθεί πλήρως. Μπορεί σε γενικές γραμμές να λεχθεί ότι μετά την είσοδό του στον ξενιστή, ο μικροοργανισμός αναμετράται αρχικά με τους φυσικούς φραγμούς του στομάχου και τους μηχανισμούς αναγνώρισής του από τα επιθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα των ιστών, τα οποία μέσω της έκκρισης χημειοκινών θα στρατολογήσουν στην περιοχή ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα. Η κινητοποίηση αυτή θα θέσει τις βάσεις για την εκδήλωση σε δεύτερο χρόνο των ειδικών ανοσιακών αποκρίσεων.

Εξειδικεύοντας, το πρώτο εμπόδιο που καλείται να υπερπηδήσει το ελικοβακτηρίδιο κατά την είσοδό του στο ανώτερο πεπτικό σύστημα, είναι η ίδια η περισταλτικότητα και οξύτητα του στομάχου, μηχανισμούς άμυνας που είναι σε θέση να αντιμετωπίσει επιτυχώς μέσω της κινητικότητας που του προσδίδουν τα μαστίγια, μέσω της προσκόλλησης στο γαστρικό βλενογόνο που διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs: Outer Membrane Proteins) και με την παραγωγή ουρεάσης [85-87].

Στην αναγνώριση του ελικοβακτηριδίου από τα επιθηλιακά κύτταρα, τα αντιγονοπαρουσιαστικά και τα ουδετερόφιλα φαίνεται να μετέχουν οι Toll-like receptors (TLRs), αλλά και άλλοι υποδοχείς της ευρύτερης οικογενείας PRRs (Pattern Recognition Receptors), οι οποίοι αναγνωρίζουν συντηρημένες δομές που σχετίζονται με παθογόνους οργανισμούς (PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns) και εκκινούν την ανοσιακή απάντηση [86]. Οι TLRs εκφράζονται στη μεμβράνη των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, αλλά και στην επιφάνεια των επιθηλιακών

κυττάρων του γαστρεντερικού συστήματος όπου θεωρείται ότι δρουν εντός στενής ισορροπίας που εξασφαλίζει μεν την άμυνα έναντι των πραγματικών μικροβιακών απειλών, αλλά αποτρέπει παράλληλα και την άσκοπη ενεργοποίηση έναντι μη παθογόνων αποικιστών [86]. Ο ακριβής ρόλος των PRRs στην *H. pylori* λοίμωξη δεν έχει διευκρινισθεί, αλλά φαίνεται να επιτελούν τόσο προφλεγμονώδεις όσο και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Σε καλλιέργειες ανθρώπινων ουδετεροφίλων ο μικροοργανισμός μέσω των TLR2 και TLR4 επάγει την ταχεία έκκριση IL-8, IL-1β και TNF-α και εν συνεχεία την αύξηση στην παραγωγή IL-10 [88]. Ακόμα, η πρωτεΐνη NapA (Neutrophil Activating protein A) του *H. pylori*, ένας αγωνιστής του TLR2, προκαλεί την έκκριση IL-12 και IL-23 από τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα και ευοδώνει την εκδήλωση μιας αντιγονοειδικής Th1 απόκρισης [89]. Τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μέσω των επιφανειακών και ενδοσωμικών TLRs οδηγούνται στην σύνθεση τόσο προφλεγμονωδών όσο και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών συμπεριλαμβανομένων των IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 και τύπου 1 IFN [87]. Επιπρόσθετα, ο κυτταροπλασματικός υποδοχέας RIG-I (retinoic acid inducible gene I, μέλος της οικογένειας RIG-like helicase receptor family-RLRs) αναγνωρίζει το τριφωσφορυλιωμένο RNA του μικροοργανισμού και πυροδοτεί την παραγωγή τύπου 1 IFN στα δενδριτικά κύτταρα [90]. Τέλος, έχει δειχθεί ότι τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου σε απάντηση στο *H. pylori* αυξάνουν τη μεμβρανική έκφραση του TLR4 και του μορίου MD-2 (Myeloid Differentiation-2), παρουσιάζουν αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κΒ και έκκριση IL-8 [91], χωρίς ωστόσο να έχει ξεκαθαρισθεί η σχετική συνεισφορά των διαφόρων TLRs στις διαδικασίες αυτές [91-94]. Στα ίδια δε κύτταρα, ο υποδοχέας NOD-1 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1) συνδεόμενος με την πεπτιδογλυκάνη του βακτηρίου, επάγει τη μετακίνηση του NF-κΒ στον πυρήνα [95], αλλά και ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα AP-1 μέσω μονοπατιών που εμπλέκουν τις πρωτεΐνες ERK και p38 [96], με άμεσο αποτέλεσμα μεταξύ άλλων την έκκριση του αντιμικροβιακού πεπτιδίου beta-defensin 2 [97]. Όσον αφορά την ικανότητα διαφυγής εκ των ανοσιακών μηχανισμών, είναι γνωστό ότι το βακτήριο μπορεί εν πολλοίς να αποφεύγει την αναγνώριση του λιποπολυσακχαρίτη του (LPS) από τον TLR4, λόγω χημικών μεταβολών στο μόριο (ακετυλίωση, φωσφορυλίωση λιπιδίου A), αλλά και τη δέσμευση της φλαγελλίνης από τον TLR5, εξαιτίας αμινοξικών αλλαγών στην περιοχή αναγνώρισης [86,98-100]. Όλα τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στη διερεύνηση των γενετικών πολυμορφισμών στα γονίδια

διαφόρων PRRs σε σχέση με την ευπάθεια στην εκδήλωση γαστρίτιδος, αδενοκαρκινώματος και MALT λεμφώματος με αντικρουόμενα ωστόσο μέχρι σήμερα αποτελέσματα [101]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει τέλος μελέτη των Adam και συνεργατών που μέσω ανοσοιστοχημείας ανέδειξε την έκφραση TLR4 και σε μικρότερο βαθμό TLR5 στη μεμβράνη των κυττάρων του MALT λεμφώματος σε γαστρικές βιοψίες, αποδίδοντάς της πιθανή σημασία στην αλληλεπίδραση του νεοπλασματικού κλώνου με αντιγόνα του ελικοβακτηριδίου και αυτοαντιγόνα [102]. Ένας άλλος εμπλεκόμενος μηχανισμός ανοσιακής επαγρύπνησης είναι το φλεγμονοσώμα (inflammasome), ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που διαμεσολαβεί την ενεργοποίηση της κασπάσης 1 και την επακόλουθη έκκριση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών IL-1 $\beta$  και IL-18 σε απάντηση σε εξωγενή ή ενδογενή σήματα κινδύνου [103]. Ο σχηματισμός του φλεγμονοσώματος κατά την *H. pylori* λοίμωξη σχετίζεται με την παρουσία της πρωτεΐνης NLRP3 (μέλος της οικογένειας NOD-like υποδοχέων) και του αντάπτορα ASC [104-108], πειραματική εξουδετέρωση των οποίων συσχετίστηκε με εντονότερο βακτηριακό αποικισμό και μειωμένη φλεγμονή σε ζωικά μοντέλα [104,105]. Η επιστράτευση του φλεγμονοσώματος φαίνεται να εξαρτάται σύμφωνα με κάποιες αναφορές από την αλληλουχία του CagPAI και του VacA [104,108], την είσοδο ιόντων καλίου και ασβεστίου στο κύτταρο και την παρουσία ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) [104,106] Τέλος, στη διαδικασία προτείνεται ότι συμμετέχει η πεπτιδογλυκάνη του βακτηρίου, η οποία αναγνωριζόμενη από τον υποδοχέα NOD-2 στο κυτταρόπλασμα του δενδριτικού κυττάρου επάγει τη σύνθεση pro-IL-1 $\beta$  [108] . Μια σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης αντιγόνων του ελικοβακτηριδίου με PRRs και παράγοντες του φλεγμονοσώματος προς παραγωγή προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών παρουσιάζεται στην εικόνα 5.



**Εικόνα 5:** Έκκριση προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών από το δενδριτικό κύτταρο κατά την αναγνώριση αντιγόνων του ελικοβακτηριδίου από μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας [87].

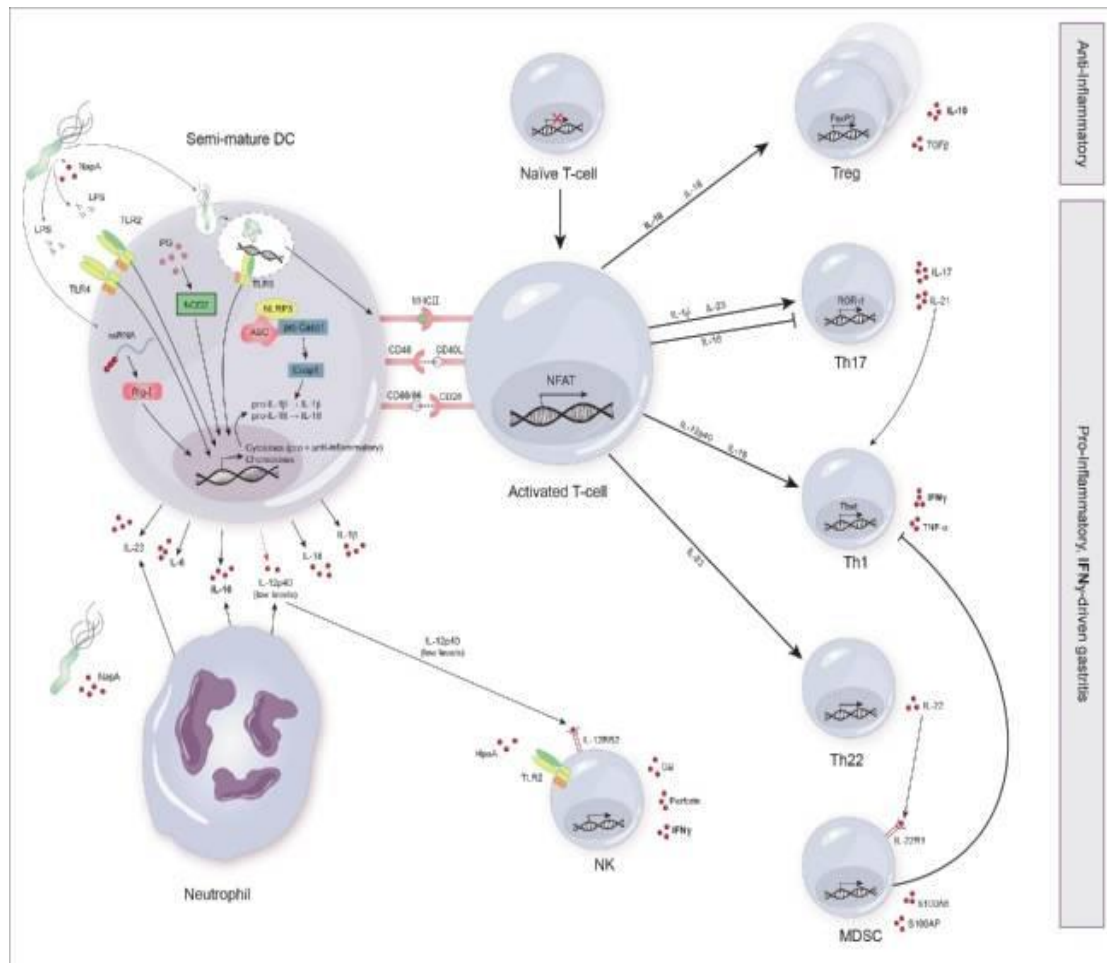
### 2.3.2 Τ-κυτταρική ανοσία

Μετά την προσέλκυση και ενεργοποίηση τους, τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα προχωρούν στην επαγωγή και καθοδήγηση της ιδιαίτερα πολύπλοκης Τ-κυτταρικής απόκρισης (εικόνα 6). Διάφοροι υποπληθυσμοί Τ-κυττάρων αναγνωρίζονται και η δυναμική σχέση που αναπτύσσεται μεταξύ τους πιθανολογείται ότι φέρει βαρύνουσα συνεισφορά στην εξέλιξη της λοίμωξης και τη λεμφωματογένεση [109].

Πιο συγκεκριμένα, τα δενδριτικά κύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με τον μικροοργανισμό, σε συνεργασία με τα ουδετερόφιλα, εκκρίνουν, όπως προαναφέρθηκε, μεγάλο αριθμό κυτταροκινών, οι οποίες σε συνδυασμό με την παρουσίαση των αντιγονικών επιτόπων στα αθώα Τ-κύτταρα οδηγούν στην επέκταση *H. pylori*-ειδικών υποπληθυσμών. Υπενθυμίζεται ότι τα αθώα Τ CD4<sup>+</sup> βοηθητικά



κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν προς Th1, Th2, Th17, Th22 και ρυθμιστικούς (regulatory-Treg) φαινοτύπους αναλόγως του τοπικού κυτταροκινικού περιβάλλοντος [109,110]. Αρχικά τα T βοηθητικά κύτταρα διαχωρίζονταν σε δύο λειτουργικές υποομάδες, τα Th1 και Th2, που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά μοτίβα ανοσιακής δραστηριότητας: τα Th1 κύτταρα παράγουν IL-2 και IFN- $\gamma$  και επάγουν κυτταροεξαρτώμενες ανοσιακές αποκρίσεις (cell-mediated immune responses), ενώ τα Th2 κύτταρα εκκρίνουν IL-4, IL-5, IL-6, και IL-10 και προάγουν την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των B-κυττάρων. Όπως είναι αναμενόμενο, τα περισσότερα ενδοκυττάρια βακτήρια πυροδοτούν Th1 αποκρίσεις, ενώ τα εξωκυττάρια παθογόνα προκρίνουν Th2 αποκρίσεις [110, 111]. Αργότερα, το μοντέλο αυτό εμπλουτίστηκε με επιπρόσθετους CD4<sup>+</sup> υποπληθυσμούς. Τα Th17 κύτταρα παράγουν IL-17A, IL-17F, IL-21 και IL-22 και εμπλέκονται στην άμυνα έναντι διαφόρων λοιμώξεων, κυρίως εξωκυττάρων βακτηριακών, αλλά και στην παθογένεια αυτοάνοσων νοσημάτων [110,112]. Η έκκριση IL-22 απουσία IL-4, IL-17 και IFN- $\gamma$  χαρακτηρίζει τα Th22 κύτταρα, τα οποία φυσιολογικά συμμετέχουν στην προστασία των επιθηλιακών φραγμών, αλλά μπορεί να διαδραματίσουν παθογενετικό ρόλο και σε διάφορες αυτοάνοσες, αλλεργικές και νεοπλασματικές εξεργασίες [113]. Τέλος, τα ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg) επιφορτίζονται με την καταστολή του T κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της έκκρισης κυτταροκινών, συνεισφέροντας έτσι στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ ανοσίας και φλεγμονής, στην οριοθέτηση της πρόσφορης ανοσιακής απόκρισης και την αποφυγή εκδήλωσης σοβαρών αυτοάνοσων νόσων [114]. Στα πλαίσια της *H. pylori* λοίμωξης, όλοι αυτοί οι υποπληθυσμοί T κυττάρων φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιον-όχι πλήρως κατανοητό-ρόλο και η σχετική τους αναλογία καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την αποδοτικότητα της άμυνας έναντι του βακτηρίου ή την αποτυχία εκρίζωσής του που θα επιτρέψει τον χρόνια αποικισμό, την ανάπτυξη έλκους, αυτοάνοσης γαστρίτιδος, αδενοκαρκινώματος ή MALT λεμφώματος [87,109].



**Εικόνα 6:** Πόλωση της T-κυτταρικής απόκρισης κατά την *H. pylori* λοίμωξη [87].

Συγκεκριμένα, το προφίλ των κυτταροκινών υποδεικνύει την εμπλοκή τόσο της Th1 όσο και της Th2 απόκρισης, ωστόσο η πρώτη, καθοδηγούμενη από την επικράτηση των IFN- $\gamma$ , IL-12 και IL-18, φαίνεται να είναι εκείνη που υπερέχει [87,110]. Μάλιστα η IFN- $\gamma$  διαγράφεται ως το μόριο οδηγός στην εγκατάσταση της γαστρίτιδος, αν και δεν είναι απαραίτητο ότι η μοναδική πηγή προέλευσης του μορίου είναι τα τα Th1 κύτταρα [115]. Μια τέτοια εναλλακτική πηγή IFN- $\gamma$  είναι και τα NK κύτταρα, τα οποία μέσω σύνδεσης του HpaA (*H. pylori* specific membrane bound lipoprotein A) στον TLR2 και σηματοδότησης εξαρτώμενης από τον IL-12RB2 (IL-12 receptor  $\beta$  2), ωθούνται στην έκκριση κοκκοενζύμων (granzyme) B, περφορίνης και IFN- $\gamma$  [116,117]. Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), που απελευθερώνεται στα πλαίσια της Th1 πόλωσης, είναι επίσης σημαντικός στην εκδήλωση της κλινικής εικόνας, με μελέτη των D'Elis και συνεργατών να επιβεβαιώνει εντονότερη έκφρασή του σε βιοψίες ασθενών με ελικοβακτηριδιακό πεπτικό έλκος [118]. Τέλος, άξια λόγου στο πεδίο είναι και η πρωτεΐνη T-bet (T-box expressed in T cells), ένας

μεταγραφικός παράγοντας που απαιτείται για τη διαφοροποίηση των T CD4+ κυττάρων και κατέχει κεντρικό ρόλο στην ανοσιακή διεργασία, με ζωικά μοντέλα να δείχνουν ότι η έλλειψή της ισοδυναμεί με αδυναμία έκφρασης IFN- $\gamma$  και αποτυχία εγκατάστασης Th1 απόκρισης [119].

Από την άλλη μεριά, ο Th2 φαινότυπος προτείνεται ότι έχει προστατευτική δράση απέναντι στη λοίμωξη. Έτσι, μεταφορά Th2 κυτταρικής σειράς από ποντικούς με λοίμωξη *Helicobacter felis* σε πειραματόζωα-αποδέκτες που εν συνεχεία μολύνθηκαν με τον μικροοργανισμό οδήγησε σε δραματική μείωση του βακτηριακού φορτίου [120]. Στο ίδιο μήκος κύματος, ποντικοί με έλλειψη IL-4 επέδειξαν αυξημένο αριθμό βακτηριακών κυττάρων, αν και οι Garhart και συνεργάτες εργαζόμενοι στο ίδιο μοντέλο, διαπίστωσαν ότι προστασία μετά εμβολιασμό είναι δυνατό να επιτευχθεί, παρά την απουσία της IL-4, εύρημα που σαφώς μετριάζει την αποδιδόμενη σημασία στο ρόλο της Th2 απόκρισης στο φαινόμενο [121]. Στο πεδίο του MALT λεμφώματος, έχει δειχθεί ότι ο όγκος διηθείται από μεγάλο αριθμό CD4+ κυττάρων εκκρίνοντων Th2 κυτταροκίνες, οι οποίες σε συνδυασμό με τη σηματοδότηση μέσω του CD40 προτείνεται ότι κατέχουν κεντρική θέση στην παθογενετική διαδικασία [122,123]. Φαίνεται πως συντηρούν τη B κυτταρική ανάπτυξη τουλάχιστον στα αρχικά στάδια, οπότε και ο όγκος είναι ευαίσθητος στην απόσυρση των *H. pylori*-ειδικών T κυττάρων, κάτι που εξηγεί και την τάση του να παραμένει εντοπισμένος αλλά και την υποχώρηση του κατόπιν εκρίζωσης του μικροοργανισμού [109]. Άξιο αναφοράς είναι και το εύρημα ότι οι γαστρικοί T κυτταρικοί κλώνοι από περιπτώσεις MALT βρέθηκε να εμφανίζουν μειωμένη κυτταροτοξικότητα μέσω περφορίνης και φτωχή ικανότητα να προκαλούν απόπτωση μέσω του μονοπατιού του Fas, με αποτέλεσμα να ανεπαρκούν στον έλεγχο της  $\beta$  κυτταρικής ανάπτυξης [124]. Αυτή η ανεπαρκής T-κυτταρική απάντηση θα μπορούσε να οφείλεται σε ερεθίσματα του μικροπεριβάλλοντος, τοξίνες του μικροοργανισμού ή σε γενετικούς πολυμορφισμούς του ξενιστή, όπως παραδείγματος χάριν στο γονίδιο CTLA-4, ενός αρνητικού ρυθμιστή της T-κυτταρικής ενεργοποίησης.

Η συνεισφορά των Th17 κυττάρων στη λοίμωξη υποστηρίζεται από πολυάριθμες αναφορές και από την παρατήρηση ότι τα δενδριτικά κύτταρα που έρχονται σε επαφή με το *H. pylori* επάγουν την έκκριση εκτός IFN- $\gamma$  και υψηλών επιπέδων IL-17 από τα CD4+ T κύτταρα [87]. Πράγματι, η μεταφορά T βοηθητικών κυττάρων με έλλειψη IFN- $\gamma$  ή T-bet προκαλεί γαστρίτιδα- αν και σε μικρότερο βαθμό- σε ποντικούς αποδέκτες, υπογραμμίζοντας το ρόλο άλλων υποπληθυσμών πέραν των Th1 [115]. Σε

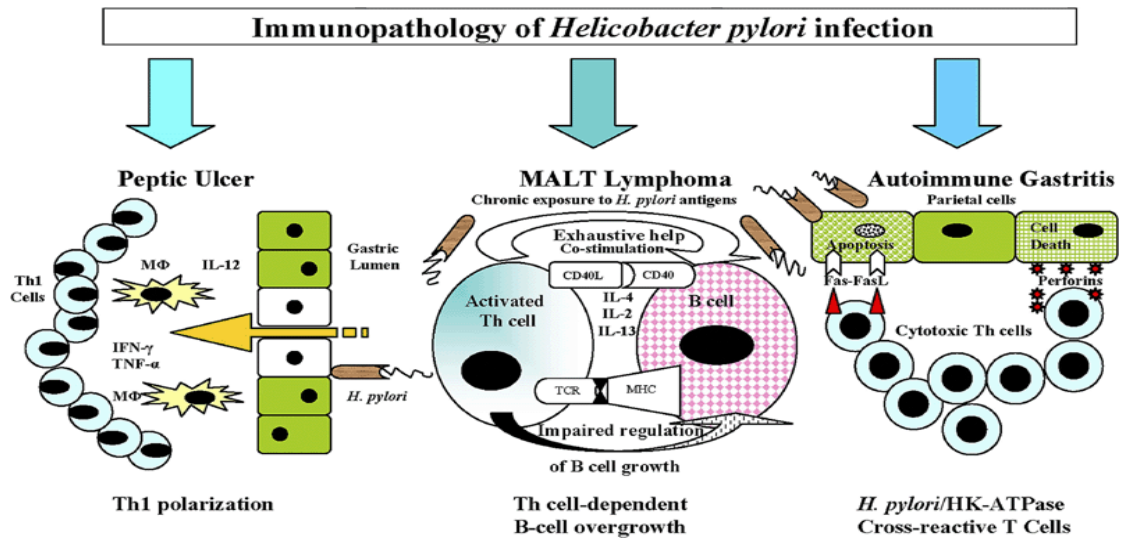
αυτό το πλαίσιο, μελέτη του 2010 έδειξε ότι σπληνικά μακροφάγα ποντικού εκτιθέμενα στο ελικοβακτηρίδιο αυξάνουν σημαντικά την έκφραση κυτταροκινών που σχετίζονται τόσο με την Th1 όσο και με την Th17 πόλωση, όπως οι IL-6, TGF- $\beta$ , IL-23 p19, IL-12/IL-23 p40 και η IL-12 p35 [125]. Ακόμα τα δενδριτικά κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη παραγωγή IL-23 (p19/p40), συνθήκη που ισχύει και στα γαστρικά μυελοειδή δενδριτικά καθώς και στα επιθηλιακά κύτταρα ασθενών με *H. pylori* γαστρίτιδα [126,127]. Όπως είναι γνωστό, η IL-23, μέλος της οικογένειας της IL-12, προάγει την επέκταση και επιβίωση των Th17 κυττάρων, με τους παράγοντες παθογονικότητας CagA και CagE να προκαλούν ισχυρότερη έκκριση [87]. Τέλος η κυτταροκίνη BAFF, απελευθερούμενη από τα μακροφάγα, επικουρεί την Th17 διαφοροποίηση με άμεσες ή έμμεσες δράσεις της [128]. Όσον αφορά δε τη αλληλεπίδραση με άλλους πλυθυσμούς ανοσιακών κυττάρων, σημαντική είναι η παρατήρηση ότι τα Th17 ασκούν ρυθμιστικό ρόλο στην έκκριση της προφλεγμονώδους IL-8 από τα ουδετερόφιλα και μέσω της απελευθέρωσης IL-21 υποστηρίζουν την Th1 πόλωση και κατ'επέκταση τη διατήρηση του Th1/Th17 άξονα στη γαστρίτιδα [129-130].

Ένας άλλος πρόσφατα περιγραφθείς υποπληθυσμός T κυττάρων που αναγνωρίζεται στη γαστρίτιδα είναι τα Th22 κύτταρα. Οι Zhuang και συνεργάτες έδειξαν ότι ο εν λόγω υποπληθυσμός είναι αυξημένος στο γαστρικό βλεννογόνο ασθενών και ποντικών με *H. pylori* λοίμωξη, υποστηριζόμενος από την έκκριση IL-23 από δενδριτικά κύτταρα σε απόκριση σε CagA+ στελέχη. Αυτό οδηγεί στην προσέλκυση CXCR2+ μονοκυτταρικών myeloid derived suppressor cells (MDSC) μέσω σηματοδότησης δια του υποδοχέα IL-22R1 που επάγει έκκριση CXCL2 από τα επιθηλιακά κύτταρα. Τα MDSC υπό την επίδραση της IL22 παράγουν τις προφλεγμονώδεις πρωτεΐνες S100A8/S100A9 και καταστέλλουν την Th1 πόλωση [131].

Τέλος, η ευθύνη του ελέγχου της ανοσιακής απόκρισης εναποτίθεται στα T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) [87]. Αυξημένος αριθμός τέτοιων κυττάρων ανευρίσκεται στο στόμαχο των πασχόντων και ιδίως σε παιδιατρικούς ασθενείς, όπου η κυριαρχία της Treg έναντι της Th17 απόκρισης εξηγεί τη σπανιότερη ανάπτυξη φλεγμονωδών βλαβών [132,133]. Πράγματι ασθενείς με λιγότερα ή εξασθενημένης λειτουργικότητας Tregs εμφανίζουν συχνότερα πεπτικά έλκη ή βαρύτερης κλινικής εικόνας γαστρίτιδα, ενώ σε αντίθετη περίπτωση προκρίνεται ο μακροχρόνιος αποικισμός του γαστρικού βλεννογόνου [134]. Έχει μάλιστα δειχθεί ότι το ίδιο το

ελικοβακτηρίδιο μπορεί να παρέμβει στη φυσιολογική ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων και να προκαλέσει έναν τύπο «επαναπρογραμματισμού» τους, προσδίδοντάς τους έναν ημιώριμο φαινότυπο (SIGN+HLA-DRhi,CD80lo,CD86lo) που επιβοηθά την πόλωση προς Treg και άρα επιτρέπει τη χρονιότητα της βακτηριακής παραμονής στο μολυσμένο στόμαχο [87,135,136]. Στο φαινόμενο σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει και η παρουσία του CagA παράγοντα παθογονικότητας [137]. Έτσι, η παρουσία των ρυθμιστικών κυττάρων διαγράφεται ως ο παράγοντας εκείνος που θα γείρει τη ζυγαριά προς τη μεριά των φλεγμονωδών βλαβών ή της χρονίζουσας επιμονής του ελικοβακτηριδίου που μπορεί να προδιαθέσει ορισμένους ασθενείς στην ανάπτυξη νεοπλασίας ή ατροφικής γαστρίτιδος [110]. Τέλος, ρόλος προτείνεται για τα Tregs στην αλληλεπίδραση των T και B λεμφοκυττάρων στο MALT λέμφωμα, όπου ο αριθμός τους είναι αυξημένος και εμφανίζει θετική συσχέτιση με την ανταπόκριση στην αντιβιοτική θεραπεία [138,139].

Συνοψίζοντας και θέτοντας το μεγάλο όγκο των ερευνητικών δεδομένων σε ένα πλέον λειτουργικό πλαίσιο, μπορεί να λεχθεί ότι η διατήρηση επί μακρόν της Th1 απόκρισης συσχετίζεται στην *H. pylori* λοίμωξη με ανάπτυξη πεπτικού έλκους, ενώ η παρατεταμένη και ατελώς ελεγχόμενη διέγερση των B κυττάρων υπό την καθοδήγηση Th2 κυτταροκινών μπορεί να οδηγήσει σε λεμφοματογένεση. Σε ορισμένους ασθενείς η επέκταση *H. pylori*-ειδικών T κυττάρων που εμφανίζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με επιτόπους της H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase είναι το εναρκτήριο γεγονός στην εκδήλωση αυτοάνοσης γαστρίτιδος (εικόνα 7). Σε κάθε περίπτωση, καθίσταται σαφές ότι αν και τα T κύτταρα είναι αναμφίβολα απαραίτητα για την αντιμετώπιση της μικροβιακής απειλής, η λανθασμένη, άκαιρη ή μη ισορροπημένη κινητοποίησή τους μπορεί να αποβεί κατά πολλούς τρόπους επιζήμιος για τον ξενιστή.



Εικόνα 7: Ανοσοπαθοφυσιολογία πεπτικού έλκους, MALT λεμφώματος και αυτοάνοσης γαστρίτιδας με βάση την T-κυτταρική απόκριση έναντι του *H. pylori* [109]

### 2.3.3. Χυμική ανοσία

Έκφραση χυμικής ανοσίας έναντι στο *H. pylori* παρατηρείται σχεδόν σε όλους τους μολυσμένους ασθενείς [140], με τα IgM αντισώματα να είναι παρόντα 4 εβδομάδες μετά τη λοίμωξη [141]. Οι ανοσοσφαιρίνες, που μπορούν να ανευρεθούν στον ορό, σε γαστρικά αναρροφήματα αλλά και στο σίελο, στα ούρα και τα κόπρανα των ασθενών με εμπορικά διαθέσιμες ορολογικές μεθόδους [142], εμφανίζουν ειδικότητα για μια σειρά κεκαθαρμένων αντιγόνων, όπως η φλαγελλίνη, η ουρεάση, ο λιποπολυσακχαρίτης, οι πρωτεΐνες NAP, HpaA και άλλοι επίτοποι [143,144]. Ακόμα, άξια αναφοράς είναι η αύξηση των πλασματοκυττάρων που παρατηρείται στο γαστρικό βλεννογόνο, με μελέτη από τη Σουηδία να ανευρίσκει 40πλάσιο αριθμό κυττάρων εκκρίνοντων IgA and IgG ανοσοσφαιρίνες στο άντρο ασθενών σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [145]. Ο ρόλος των εν λόγω ανοσοσφαιρινών είναι ελλιπώς καθορισμένος, αλλά αναφέρεται ότι τα IgA αντισώματα μπορεί να εξουδετερώνουν την ουρεάση και τη VacA, αλλά και να παρεμποδίζουν την προσκόλληση του μικροοργανισμού στο επιθήλιο [146].

Σημαντικό είναι στο σημείο αυτό να λεχθεί ότι οι ανοσοσφαιρίνες που συντίθενται από τα νεοπλασματικά κύτταρα στο MALT λέμφωμα δε φαίνεται να έχουν ειδικότητα έναντι ελικοβακτηριδιακών επιτόπων και μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις έχει δειχθεί ότι στρέφονται έναντι αυτοανιγόνων [9,147-150]. Λόγω της ταυτοποίησης των MALT νεοπλασματικών κυττάρων ως B κύτταρα με λειτουργικά αντισώματα που φέρουν ανασυδυνδασμένα και σωματικώς μεταλλαγμένα γονίδια

ανοσοσφαιρινών με διακλωνική ποικιλότητα (intraclonal variation), υποστήριχθηκε εξ αρχής η υπόθεση ότι τα καρκινικά κύτταρα επιλέγονται στα βλαστικά κέντρα και βασίζονται έως ένα σημείο τον πολλαπλασιασμό τους στην παρουσία κατάλληλου άμεσου αντιγονικού ερεθισμού [147,151,152]. Ωστόσο με βάση την απουσία αντιδραστικότητας έναντι εμπλεκόμενων επιτόπων, η εξάρτηση του νεοπλασματικού κλώνου από το ελικοβακτηρίδιο φαίνεται μάλλον να ανατανακλά την εξάρτηση των λεμφοματικών κυττάρων από την T κυτταρική απόκριση και υποδοχείς που συμμετέχουν στη αντιγονοεξαρτώμενη σηματοδότηση (antigen induced signalling), παρά στο ανοσοσφαιρινικό τους ρεπερτόριο [147,153,139].

### **2.3.4 Μικροπεριβάλλον του MALT**

Όπως περιγράφηκε έως τώρα, η χρονίζουσα λοίμωξη από ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού οδηγεί στην κινητοποίηση της φυσικής και επίκτητης ανοσίας και την ανάπτυξη λεμφοζιδίων, ωστόσο η εξασφάλιση κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος είναι απαραίτητη για την περαιτέρω πρόοδο αυτών προς MALT λέμφωμα. Το επιτρεπτικό αυτό χημικό περιβάλλον απαρτίζεται πέραν από τις κυτταροκίνες των T βοηθητικών κυττάρων, που αναφέρθηκαν ήδη, και από άλλα διαλυτά μόρια του ανοσιακού συστήματος [154]. Επί παραδείγματι, τα μακροφάγα που συνδέονται με τον όγκο (tumour-associated macrophages) εκκρίνουν τον παράγοντα APRIL (A proliferation inducing ligand), μέλος της οικογενείας του TNF, ο οποίος υποστηρίζει τον πολλαπλασιασμό και τη λεμφοματική εκτροπή [155]. Επί λεμφώματος η έκφραση του υποδοχέα CXCR7 ανευρίσκεται αυξημένη και εκείνη του CXCR4 ελαττωμένη σε σχέση με τη γαστρίτιδα και πιθανολογείται ότι συμμετέχουν στην παθογενετική διαδικασία, καθώς αμφότεροι προσδένουν τη χημειοκίνη CXCL12 η οποία έχει δειχθεί να συνδέεται με την αύξηση, επιβίωση, διείσδυση και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε πολλούς όγκους [156]. Τέλος, η επίδραση του οξειδωτικού στρες μπορεί να ενέχει κάποιο ρόλο, με μελέτη του 2012 να βρίσκει αυξημένη έκφραση του NOX2 σε γαστρικές βιοψίες ασθενών με MALT σε σύγκριση με ασθενείς με γαστρίτιδα [157]. Η έντονη παρουσία ουδετεροφίλων στο μολυσμένο γαστρικό βλεννογόνο και η επακόλουθη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου ίσως να επιβαρύνει περαιτέρω την οξειδωτική ισορροπία [154]. Η διερεύνηση των τοπικών συνθηκών στο μικροπεριβάλλον του λεμφικού κλώνου που ευοδώνουν την εκτροπή του, αποτελεί μείζονα ερευνητικό στόχο, καθώς μπορεί να

χαρτογραφήσει αναξιοποίητα μέχρι σήμερα παθοφυσιολογικά μονοπάτια, αποκαλύπτοντας πιθανά σημεία πρόωμης θεραπευτικής παρέμβασης.

#### **2.4 Χλαμύδια και οφθαλμικό MALT λέμφωμα**

Τα χλαμύδια είναι υποχρεωτικώς ενδοκυττάριοι οργανισμοί, υπεύθυνοι για ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ασθενειών. Τα *Chlamydia psittaci* (Cp) είναι ο αιτιολογικός παράγων της ψιττάκωσης, μιας ζωνόσου που μεταδίδεται κατόπιν άμεσης επαφής με μολυσμένα πτηνά, ή μέσω εισπνοής μικροσταγονιδίων από εκκρίσεις αυτών.

Cp λοίμωξη ανιχνεύεται στο 11% των B-λεμφωμάτων. Η παρουσία Cp DNA έχει ανευρεθεί σε κυμαινόμενα ποσοστά σε μικρές υποομάδες ασθενών με MALT πνευμόνων, δέρματος, θυρεοειδούς, και σιελογόνων αδένων, ενώ η επικράτησή της ήταν χαμηλή σε γαστρικά λεμφώματα. Ωστόσο ο πιο σημαντικός όγκος σχετιζόμενος με τα χλαμύδια της ψιττάκωσης είναι το οφθαλμικό MZL, με το μικρόβιο να ανιχνεύεται σε ποσοτά μεταξύ 47% και 80% των περιπτώσεων με μεγάλη διακύμανση μεταξύ διαφόρων χωρών, ακόμα και μεταξύ διαφορετικών περιοχών της ίδιας χώρας, που μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τους διαφορετικούς δημογραφικούς παράγοντες κινδύνου όσο κι από την κυμαινόμενη ευαισθησία ανίχνευσης των διαγνωστικών μεθόδων στις διάφορες μελέτες [9].

Κατ' αντιστοιχία και με το γαστρικό MALT η παθογένεση του οφθαλμικού φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία χρονίζουσας φλεγμονής. Τα χλαμύδια δυνατόν να εγκαταστήσουν εμμένουσα οφθαλμική λοίμωξη, εμφανίζουν μιτογόνες ιδιότητες *in vitro*, προκαλούν πολυκλωνικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό *in vivo*, και προσδίδουν στα μολυσμένα κύτταρα ανθεκτικότητα στην απόπτωση. Ακόμα, επίτοποι του μικροβίου, με καλύτερα χαρακτηρισμένο παράδειγμα τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, μέσω μοριακού μιμητισμού είναι ικανοί να επάγουν ανοσιακές αντιδράσεις έναντι αυτοαντιγόνων, συντηρώντας μια επιβλαβή χρόνια ανοσιακή διέγερση. Σε θεραπευτικό επίπεδο η χορήγηση δοξκυκλίνης παριστά μια ασφαλή και συχνά αποτελεσματική επιλογή. Τα ποσοστά ανταπόκρισης τόσο σε CP-θετικές όσο και σε CP-αρνητικές περιπτώσεις έφθασε στο 65% σε ασθενείς με εντοπισμένο οφθαλμικό λέμφωμα και συσχετίστηκε στη συνέχεια με καλύτερο ORR και PFS, καταδεικνύοντας ότι η θεραπευτική ανταπόκριση οφείλεται στην ίδια την εκρίζωση του μικροβίου και όχι σε κάποια άμεση δράση του αντιβιοτικού επί του όγκου. Η δραστηριότητα της δοξκυκλίνης φαίνεται να μην είναι κατώτερη αυτών που αναφέρονται για τη ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία και ως εκ τούτου συνιστά μια



εύλογη αρχική θεραπευτική επιλογή προ της ενάρξεως πιο εντατικών ή τοξικών σχημάτων. Όπως είναι ωστόσο αναμενόμενο, ασθενείς με Cr-θετικά λεμφώματα που συνεχίζουν να έρχονται σε επαφή με πιθανώς μολυσμένα ζώα, εκτίθενται στον κίνδυνο επαναλοιμώξεων, με αρνητικό θεραπευτικό αντίκτυπο [9].

## **2.5 Χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο MALT λέμφωμα**

Πέραν της ανοσολογικής διέγερσης- και επικουρικά προς αυτή- γενετικές ανωμαλίες στον εκτρεπόμενο λεμφοκυτταρικό κλώνο έχουν ουσιαστική επίδραση στην επικράτηση και επιβίωση του, καθώς και στον καθορισμό της βιολογικής του συμπεριφοράς. Η διαγνωστική, προγνωστική και προβλεπτική αξία των χρωμοσωμικών αυτών αλλαγών και σωματικών μεταλλάξεων βρίσκεται σήμερα υπό μελέτη με τελικό ζητούμενο τη σύντομη εφαρμογή της στην κλινική πράξη στα γενικότερα πλαίσια αναζήτησης εξατομικευμένων προσεγγίσεων στην ογκοαιματολογία.

Οι συνηθέστερες κυτταρογενετικές ανωμαλίες που απαντώνται στο MALT λέμφωμα είναι οι τρισωμίες 3 και 18, η διαγραφή του 6q23 και οι μεταθέσεις t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21), t(1;14)(p22;q32) , t(3;14)(p13;q32), t(9;14)(p24;q32), t(X;14)(p11;q32) και t(5;14)(q34;q32) [9,158-160]. Η συχνότητα τους, η συνηθέστερη ανατομική εντόπιση, τα εμπλεκόμενα γονίδια και μοριακά μονοπάτια και η πιθανή κλινική τους σημασία συνοψίζονται στον πίνακα 10. Όπως είναι φανερό, πολλές από αυτές παρεμβαίνουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-Kb, όπως θα αναλυθεί λεπτομερέστερα στη συνέχεια. Όσον αφορά τις σωματικές μεταλλάξεις, η συνηθέστερη αφορά έλλειψη ή μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον αναστολέα της NF-κB ενεργοποιητικής οδού TNFAIP3 (Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 ή A20). Η μετάλλαξη απαντάται συχνότερα σε MALT λέμφωμα οφθαλμού και συνδέεται με βαρύτερη πρόγνωση [161-163]. Άλλες ανωμαλίες περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις στους γενετικούς τόπους του c-Myc, PIM1 και Myd88, απώλεια ετεροζυγωτίας στο γονίδιο P53, σωματικές μεταλλάξεις του Fas και επιγενετικές αλλαγές [158,164-168].

Κυτταρογενετική ανωμαλία	Εμπλεκόμενο γονίδιο	Εμπλεκόμενο μοριακό μονοπάτι	Επιπολα-σμός %	Ανατομική θέση	Κλινική σημασία
t(11;18)(q21;q21)	<i>BIRC3-MALT1</i>	NF-κB	15-40	Στόμαχος, πνεύμονας	Μη ανταπόκριση στα αντιβιοτικά-αλκυλιωτικούς παράγοντες;
t(14;18)(q32;q21)	<i>IGHV-MALT1</i>	NF-κB	20	Πνέμονας, σιελογόνοι αδένες, δέρμα, οφθαλμός	Μη ανταπόκριση στα αντιβιοτικά;
t(1;14)(p22;q32)	<i>IGHV-BCL10</i>	NF-κB	<5	Άγνωστο	Μη ανταπόκριση στα αντιβιοτικά
t(3;14)(p13;q32)	<i>IGHV-FOXP</i>	Wnt	<5	Άγνωστο	Κίνδυνος εκτροπής
t(9;14)(p24;q32)	<i>IGHV-JMJD2C</i>	Αναδιαμόρφωση χρωματίνης	<5	Άγνωστο	
t(X;14)(p11;q32)	<i>IGHV-GPR34</i>	NF-κB;	<5	Άγνωστο	
t(5;14)(q34;q32)	<i>IGHV-TENM2</i>	Άγνωστο	<5	Ομοιογενής κατανομή	
Τρισωμία 3	Άγνωστο	Άγνωστο	20-40	Ομοιογενής κατανομή	Χειρότερη πρόγνωση;
Τρισωμία 8	Άγνωστο	Άγνωστο	20-40	Ομοιογενής κατανομή	
Del (6q23)	TNFAIP3	NF-κB	15-30	Ομοιογενής κατανομή	

**Πίνακας 10:** Κυτταρογενετικές ανωμαλίες στο MALT λέμφωμα [9]

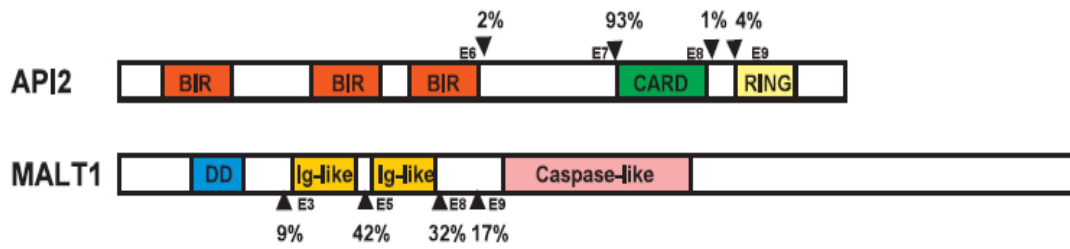
### 2.5.1 Η μετάθεση t(11;18)(q21;q21)

Η μετάθεση t(11;18)(q21;q21) είναι η συχνότερη κυτταρογενετική ανωμαλία που ανευρίσκεται στα MALT λεμφώματα [169]. Η μετακίνηση των χρωμοσωμικών θραυσμάτων προκαλεί τη σύντηξη του γονιδίου που κωδικοποιεί τον αναστολέα της απόπτωσης 2 (apoptosis inhibitor 2-API2) στο χρωμόσωμα 11 και του γονιδίου MALT1 (MALT lymphoma-associated translocation 1) στο χρωμόσωμα 18 με αποτέλεσμα την παραγωγή λειτουργικής χημειοκίνητης πρωτεΐνης [170]. Η συχνότητα της μετάθεσης διαφέρει ανά ανατομική θέση, με συνηθέστερη την ανεύρεση στον πνεύμονα και το στομάχο και σπάνια στο δέρμα, τον οφθαλμό, το θυρεοειδή και

στους σιελογόνους αδένες [171-173]. Αξιοπρόσεκτη είναι η παρατήρηση ότι η εν λόγω κυτταρογενετική ανωμαλία περιγράφεται μόνο στα MALT λεμφώματα και όχι στα σπληνικά ή λεμφαδενικά MZLs και ότι στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελεί τη μοναδική παρατηρούμενη χρωμοσωμική διαταραχή [174,175].

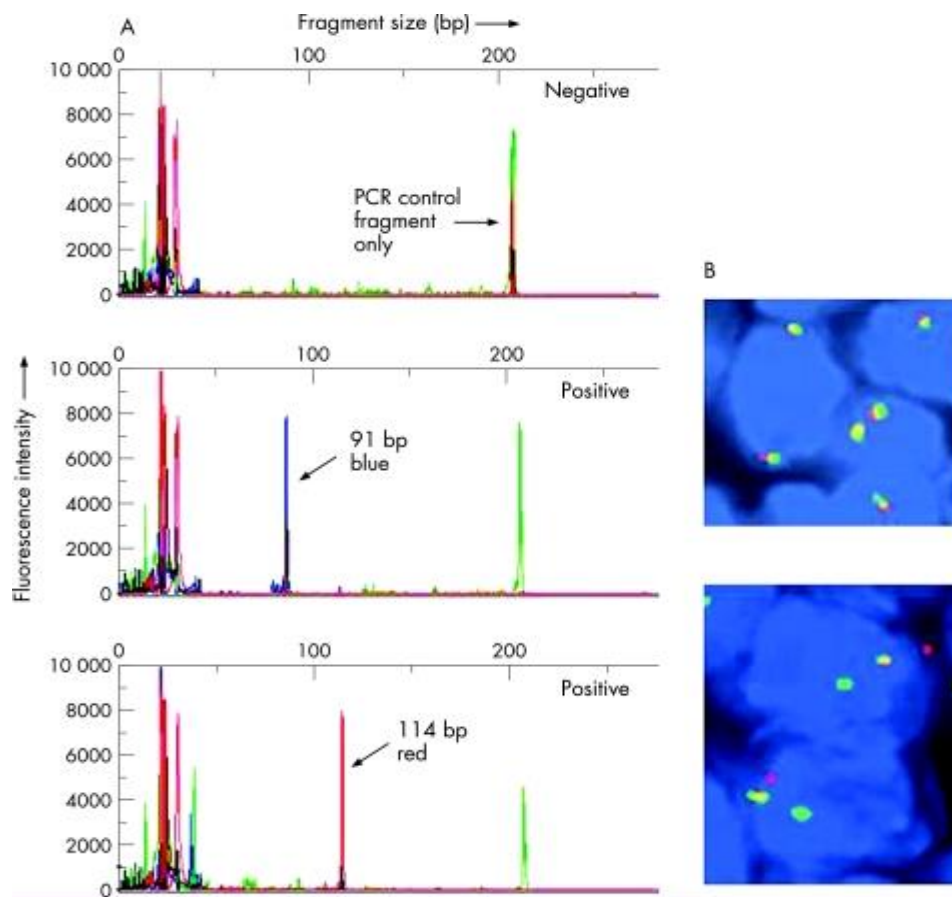
Το γονίδιο API2 ανήκει στην οικογένεια των αναστολέων της απόπτωσης (Inhibitors of apoptosis-IAP), καθώς το πρωτεϊνικό του προϊόν καταστέλλει το μονοπάτι της απόπτωσης αναστέλλοντας άμεσα ή έμμεσα τη δραστηριότητα των κασπασών 3 και 7 και την προκασπάση 9 [173,176]. Από την άλλη μεριά, η δράση του MALT1 γονιδίου, το οποίο κλωνοποιήθηκε από τρεις ανεξάρτητες ομάδες το 1999 στα πλαίσια της μελέτης της μετάθεσης t(11;18)(q21;q21), αφορά κυρίως την εμπλοκή του στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB [170,177-179].

Τα σημεία θραύσης που έχουν αναγνωρισθεί στα δύο γονίδια βρίσκονται συνήθως στο εσώνιο 7 και εξώνιο 8 του API2 και στα εσώνια 4, 6, 7 και 8 του MALT1 (εικόνα 8), ενώ αναφέρονται 8 εκδοχές API2-MALT1 χμαιρικών μεταγράφων [64,158,170,180,181]. Ειδικά για το API2, τα σημεία θραύσης εδράζονται πάντα καθοδικά της τρίτης BIR (Baculovirus Inhibitors of apoptosis Repeat) περιοχής, αλλά ανοδικά της C-τελικής RING (Really Interesting New Gene) περιοχής. Αντίστοιχα για το MALT1, το σημείο θραύσης εντοπίζεται σταθερά ανοδικά της C-τελικής ομοιάζουσας κασπάση περιοχής (caspase-like domain). Έτσι, η προκύπτουσα χμαιρική πρωτεΐνη φέρει πάντα το N-τελικό τμήμα της API2 πρωτεΐνης με 3 ακέραιες BIR περιοχές και τη C-τελική αλληλουχία του MALT1, που είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του NF-κB. Δεν έχει περιγραφεί κάποιος ειδικός εξαρτώμενος από την αλληλουχία μηχανισμός χρωμοσωμικού ανασυνδυασμού και η σύντηξη πιθανώς σχετίζεται με τη σταθερότητα του χμαιρικού προϊόντος, το οποίο σε αντίθεση με τις ακέραιες πρωτεΐνες API2 και MALT1, δεν υφίσταται απόδόμηση μέσω πρωτεασώματος [64,158,173,178,182-184]. Επίσης, ενώ καμία εκ των δύο πρωτεϊνών δεν είναι ικανή αφ'εαυτής να προκαλέσει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, το χμαιρικό προϊόν είναι σε θέση να την επιτυχει [64].



**Εικόνα 8:** Σημεία θραύσης στα γονίδια API2 και MALT1 και η σχετική τους συχνότητα. (BIR: Bacilovirus IAP Repeat, CARD: Caspase Recruitment Domain, RING: Really intersting New Gene, DD: Death Domain) [64]

Η εργαστηριακή ανίχνευση της διαμετάθεσης κερδίζει σημαντικό έδαφος στο πεδίο της διάγνωσης και εξατομικευμένης αντιμετώπισης ασθενών με γαστρικό MALT λέμφωμα. Μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με ανοσοϋβριδισμό (FISH: Fluorescence In Situ Hybridization) είτε με ανάστροφη PCR (RT-PCR) (εικόνα 9) τόσο σε κατεψυγμένα δείγματα όσο και σε τομές εγκλεισμένες σε παραφίνη, γεγονός που αποδεικνύεται εξαιρετικά χρήσιμο στην καθημέρα πράξη, καθώς τα δείγματα του όγκου που λαμβάνονται είναι συνήθως μικρά σε μέγεθος και αποτελούνται από διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς [173].



**Εικόνα 9:** Ανίχνευση της μετάθεσης t(11;18) με πολυπλεκτική RT\_PCR (A) ή FISH (B) [25].

Η ώθηση που δόθηκε στην ανάπτυξη εργαστηριακών μεθόδων αποτέλεσε αναπόφευκτη συνέπεια της αναγνώρισης της κλινικής σημασίας της μετάθεσης στην πρόγνωση και φυσική ιστορία της νόσου. Πιο συγκεκριμένα αναγνωρίζεται ότι οι όγκοι που φέρουν την εν λόγω κυτταρογενετική ανωμαλία δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία εκρίζωσης του ελικοβακτηριδίου, εμφανίζουν πιο προχωρημένο στάδιο με εν τω βάθει διήθηση του τοιχώματος και πιθανά λεμφαδενική συμμετοχή, αλλά σπάνια εκτρέπονται προς διαχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β κύτταρα. Προς επίρρωση των παραπάνω, σημειώνεται ότι όγκοι που απαντούν ικανοποιητικά στη θεραπεία εκρίζωσης είναι αρνητικοί για τη διαμετάθεση, ενώ σε μεγάλη συχνότητα ανευρίσκεται αυτή στα *H. pylori*-αρνητικά λεμφώματα [32,185-187]. Ακόμα ορισμένες αναφορές υποδεικνύουν ότι η t(11;18)(q21;q21) σχετίζεται με πλημμελή απόκριση σε μονοθεραπεία με αλκυλιωτικούς παράγοντες (χλωραμβουκίλη ή κυκλοφωσφαμίδη), αλλά δεν επηρεάζει την επιτυχία της αγωγής με κλαδριβίνη ή ριτουξιμάβη [188-190]. Οι σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες για το νόσημα λαμβάνουν υπόψη τη χρωμοσωμική αυτή αναδιάταξη και συστήνουν την αναζήτησή της κατά την πρωτοδιάγνωση [35,191].

## **2.6 Μοριακά μονοπάτια στο MALT λέμφωμα- Η οδός του NF-κΒ**

Όπως φαίνεται και από τα ανωτέρω, ένα κεντρικό μοριακό μονοπάτι του οποίου η σηματοδότηση διαταράσσεται ποικιλοτρόπως στο MALT λέμφωμα είναι αυτό του NF-κΒ. Λόγω της νευραλγικής θέσης της στην παθογένεια του όγκου, σκόπιμη κρίνεται στο σημείο αυτό μια σύντομη περιγραφή της σύνθεσης και αλληλουχίας ενεργοποίησής της οδού NF-κΒ υπό φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές λεμφωματογόνες συνθήκες.

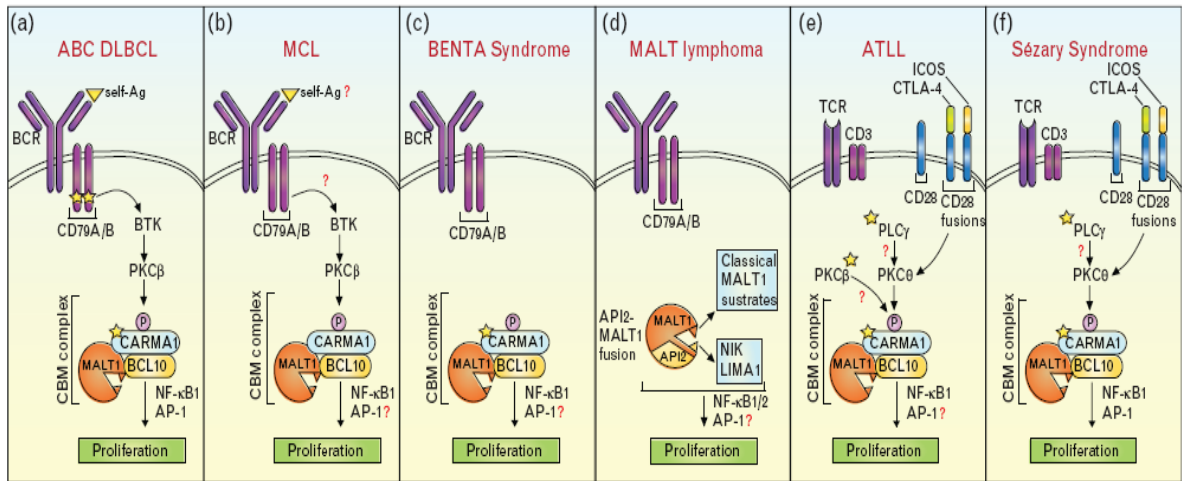
Ο NF-κΒ (nuclear factor κ light chain enhancer of activated B cell) είναι ένας μείζων μεταγραφικός παράγοντας που παίζει καταλυτικό ρόλο σε ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών διεργασιών που εντάσσονται τόσο στη φυσική όσο και την επίκτητη ανοσία. Επάγει τη μεταγραφή περισσότερων από 200 γονιδίων που κωδικοποιούν μεταξύ άλλων αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και αναστολείς της απόπτωσης. Σε γενικές γραμμές μπορεί να λεχθεί ότι η δράση του NF-κΒ ευοδώνει την κυτταρική ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό και ευνοεί τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη των λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Γίνεται έτσι αντιληπτή η σημασία του κατάλληλου ελέγχου του μονοπατιού, το οποίο φυσιολογικά ενεργοποιείται κατά τρόπο παροδικό και σύντομο. Αντίθετα,

αναγνωρίζεται ότι σε πολλούς υποτύπους λεμφώματος η οδός, μέσω γενετικής στόχευσης, εκφεύγει της φυσιολογικής ρύθμισης και επιτρέπει την ανεξέλεγκτη επέκταση του νεοπλασματικού κλώνου [154, 192].

Επισκοπώντας τη δομή του μοριακού μονοπατιού, πρέπει να αναφερθεί ότι η οικογένεια του NF-κB αποτελείται από αρκετές πρωτεΐνες και τα πρόδρομά τους μόρια, όπως είναι οι NF-κB1 (p50 και το πρόδρομο μόριο p105), NF-κB2 (p52 και το πρόδρομο μόριο p100), RelA (p65), RelB και c-Rel. Κοινό χαρακτηριστικό της οικογένειας είναι η περιοχή RHD (REL homology domain) στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών που συμμετέχει στο σχηματισμό διαφόρων όμο- ή έτερο-διμερών μέσω RHD-RHD αλληλεπιδράσεων. Τα NF-κB διμερή όταν είναι συνδεδεμένα με έναν εκ των τριών αναστολέων τους (IκBa, IκBb and IκBc) διατηρούνται ανενεργή στο κυτταρόπλασμα. Η πρόσδεση όμως κατάλληλων διεγερτών σε επιφανειακούς υποδοχείς μπορεί να οδηγήσει στην αποδέμευσή των διμερών από τους αναστολείς και στην επακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού, η οποία δυνατόν να ακολουθήσει δύο διαφορετικές οδούς που αναφέρονται ως κανονική (canonical) και μη κανονική (non-canonical pathway) [192].

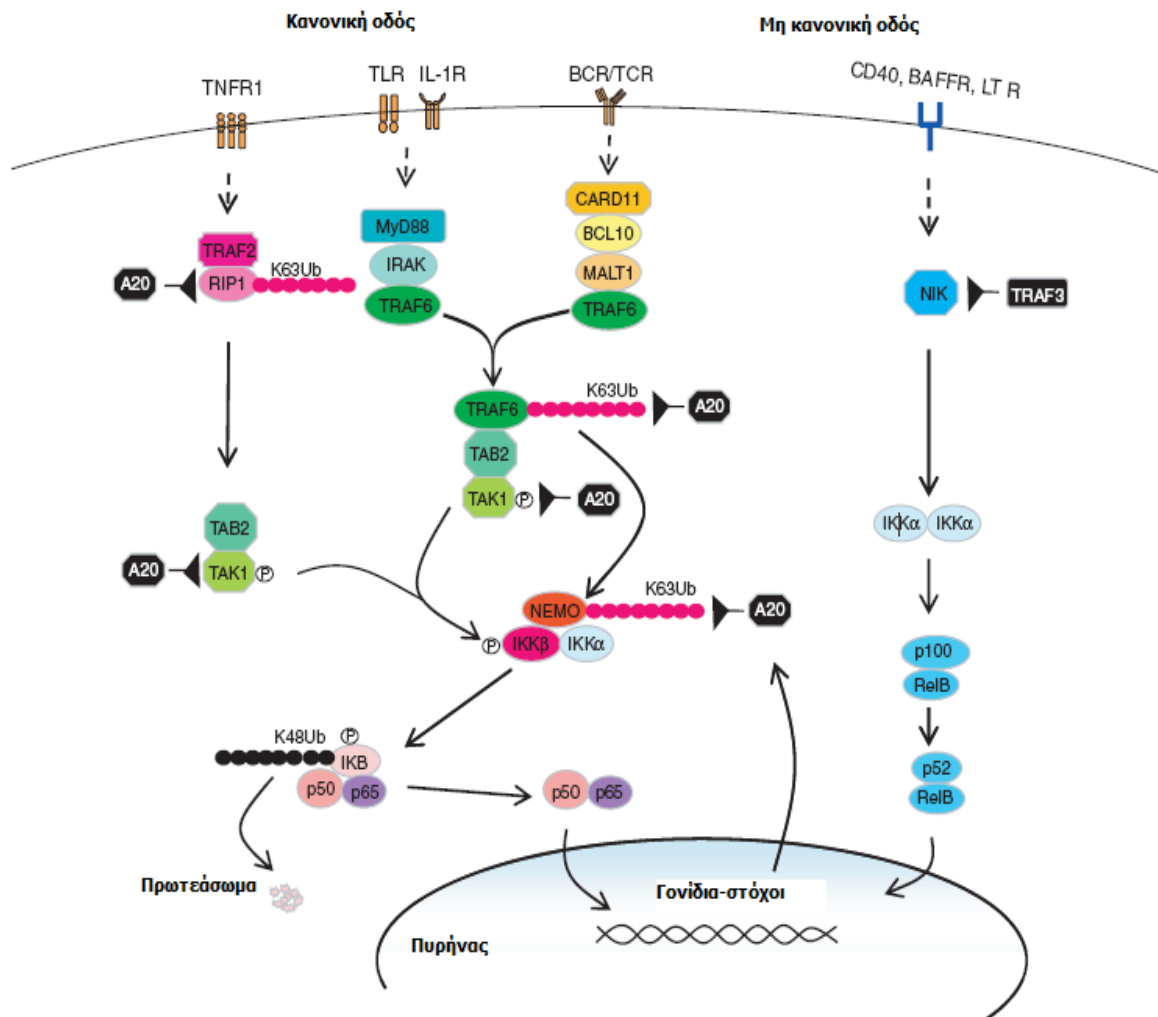
Κατά την κανονική οδό, η διέγερση ανοσολογικών υποδοχέων όπως οι BCR (B-cell receptor), TCR (T-cell receptor), TLRs (toll like receptors), IL-1R (interleukin 1 receptor) και TNFR (tumour necrosis factor receptor) κινητοποιεί το συμπλόκο της IκB κινάσης (IKK), το οποίο αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες, τις IKKα και IKKβ, και τη ρυθμιστική υπομονάδα IKKγ, γνωστή και ως NEMO (NF-κB essential modulator). Το ενεργοποιημένο IKK σύμπλοκο φωσφορυλιώνει το IκB, προκαλώντας την πολυουβικουτινίωσή του και την αποδόμησή του από το 26s πρωτεάσωμα. Με τον τρόπο αυτό τα NF-κB διμερή απελευθερώνονται και μετακινούνται στον πυρήνα όπου καταλύουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Η ενεργοποίηση του IKK συμπλόκου μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους. Παραδείγματος χάριν, η σηματοδότηση μέσω των BCR και TCR προκαλεί την επιστράτευση και φωσφορυλίωση του αντάπτορα CARMA1 (CARD11) με αξιοποίηση διαφόρων αγγελιοφόρων μορίων (CD79, BTK, PKC, PLC). Οι επακόλουθες δομικές μεταβολές του CARMA1 επιτρέπουν τη σύνδεση με τη BCL10 και τη συναρμολόγηση του συμπλόκου CARMA1 / BCL10 / MALT1 (CBM σύμπλοκο), το οποίο με τη σειρά του αλληλεπιδρά με το TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) με τελική κατάληξη την ουβικουτινίωση των TRAF6 και του NEMO. Το CBM σύμπλοκο φαίνεται να διαμεσολαβεί σημαντικές δράσεις στη

φυσιολογική λεμφοκυτταρική λειτουργία και γενετικές διαταραχές του έχουν σχετιστεί με σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας, αλλά και άλλες λεμφοπερπλαστικές παθήσεις όπως το DLBCL, σύνδρομο BENTA και οξεία T-λεμφοκυτταρική λευχαιμία/λέμφωμα ή σύνδρομο Sézary (εικόνα 10) [193]. Ο ενεργοποιημένος TRAF6 προκαλεί επίσης τη φωσφορυλίωση του IKKb από τις κινάσες TAB2 (TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2) και την TAK1 (tat-associated kinase 1) με συνέπεια την ενεργοποίηση του συμπλόκου IKK. Παρομοίως, η σηματοδότηση από τους IL-1R και TLR υποδοχείς συγκλίνει στο ίδιο σημείο του μονοπατιού επιστρατεύοντας όμως τις πρωτεΐνες MyD88, IRAK και TRAF6. Από την άλλη μεριά, η μη κανονική οδός, η οποία εξυπηρετεί τη σηματοδότηση των υποδοχέων CD40, BAFFR (B cell-activating factor receptor) και LTbR (lymphotoxin b receptor), χαρακτηρίζεται από τη διαδοχική ενεργοποίηση της κινάσης NIK (NF-κB inducible kinase) και του IKKa με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και μερική πρωτεόλυση του NF-κB2 / p100. Με τον τρόπο αυτό διαμορφώνεται η λειτουργική πρωτεΐνη p52, η οποία, συχνά σε σύνδεση με το RelB, μετακινείται στον πυρήνα όπου ασκεί τη ρυθμιστική της δράση επί της μεταγραφής. Και οι δύο οδοί ελέγχονται από αρκετούς αρνητικούς ρυθμιστές με κύριους εκπροσώπους τους A20 (TNFAIP3) και TRAF3 (εικόνα 10). Μάλιστα, καθώς η μεταγραφή αρκετών εκ των αρνητικών ρυθμιστών εξαρτάται από τον ίδιο τον NF-κB, σχηματίζεται μια -υπό φυσιολογικές συνθήκες- αποτελεσματική οδός παλίνδρομης ρύθμισης (εικόνα 11) [158,160,173,192].



**Εικόνα 10:** Συμμετοχή του CBM συμπλόκου στην παθογένεση B- και T- λεμφοεπιπλαστικών νόσων. Οι εμπλεκόμενες μεταλλάξεις σημαίνονται με κίτρινο άστρο. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν (a) μεταλλάξεις στο CD79A ή CD79B και το CARMA1/CARD11, και αναγνώριση αυτοαντιγόνου, (b) αναγνώριση αυτοαντιγόνου ή μεταλλάξεις ανοδικά του BTK, (c) συγγενείς μεταλλάξεις του CARMA1, (d) παραγωγή MALT1-API2 χιμαιρικής πρωτεΐνης (e, f) μεταλλάξεις στα PLCg1, PKCb, ή CARMA1 και χιμαιρικά παράγωγα του CD28 με το ICOS ή το CTLA-4. ABC DLBCL: διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα B-κύτταρα υποτύπου ενεργοποιημένου B κυττάρου (diffuse large B-cell lymphoma of the activated B-cell subtype), ATLL: οξεία T λευχαιμία/λέμφωμα (acute T-cell leukemia/lymphoma), BENTA: B-κυτταρική επέκταση με NF-κB και T-κυτταρική ανεργία (B-cell expansion with NF-κB and T-cell anergy), CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, ICOS, inducible costimulator, MCL: λέμφωμα μανδύα (mantle cell lymphoma), PKC: πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C), BTK: Bruton's Tyrosine Kinase, PLC: Phospholipase C [193].





**Εικόνα 11:** Η κανονική και μη κανονική οδός ενεργοποίησης του μονοπατιού του NF-κB και η δράση των αρνητικών ρυθμιστών. (TNFR: tumour necrosis factor receptor, TLR: Toll-like receptor, IL-1R: interleukin 1 Receptor, BCR: B cell receptor, TCR: T cell receptor, TRAF: TNF-associated factor, RIP1: receptor interacting protein 1, TAK1: transforming growth factor b activating kinase, TAB: TAK binding protein, IKK: inhibitor of NF-κB kinase, NEMO: NF-κB essential modulator, IκB: inhibitor of NF-κB, BAFFR: B cell-activating factor receptor, LTβR: lymphotoxin b receptor, NIK: NF-κB-inducing kinase, K63Ub: K63-linked ubiquitin chain, K48Ub: K48-linked ubiquitin chain) [192].

Γίνεται λοιπόν σαφές, ότι η λειτουργία της σηματοδοτικής οδού του NF-κB στο MALT λέμφωμα θίγεται σε σοβαρό βαθμό τόσο λόγω του ανοσολογικού περιβάλλοντος όσο και από τις σωματικές μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που εμφανίζονται στην πορεία της νόσου. Έτσι προτείνεται ότι η κανονική οδός ενεργοποιείται σταθερά και χρόνια από την πρόσδεση των αυτοαντιγόνων στο λειτουργικό BCR του λεμφοματικού κυττάρου, καθώς και από τη δράση των διαφόρων μεσολαβητών της φλεγμονής. Ταυτόχρονα, η έκκριση δαλυτών προσδετών από τα T-λεμφοκύτταρα συντηρεί τη σηματοδότηση μέσω της μη

κανονικής οδού. Οι κυριότερα απαντώμενες χρωμοσωμικές αναδιατάξεις [t(14;18)(q32;q21), t(1;14)(p22;q32), (t(11;18)(q21;q21))] όπως προαναφέρθηκε οδηγούν, μέσω υπερέκφρασης του MALT1, του BCL10 και της χμιαϊρικής πρωτεΐνης API2-MALT1 αντίστοιχα, σε μια απρόσφορη ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού. Το ίδιο άλλωστε αποτέλεσμα έχει και η απώλεια της φυσιολογικής δράσης του αναστολέα TNFAIP3 ή οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του Myd88. Με άλλα λόγια, η συνεργιστική δράση της ανοσολογικής διέγερσης και της γενετικής στόχευσης απαρτιούμενη στην υπέρμετρη ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-κΒ, φαίνεται να είναι σε θέση να προάγει τη λεμφωματική εκτροπή. Όπως είναι προφανές, κρισιμο για τη φυσική ιστορία και αντιμετώπιση της νόσου είναι το στάδιο πριν την εγκατάσταση γενετικών μεταλλάξεων, οπότε και η απόσυρση του αντιγόνου του υπεύθυνου για την ανοσιακής αρχής σηματοδότηση μπορεί να επιφέρει ίαση στην πλειοψηφία των πασχόντων. [192,194,195]

### **Κεφάλαιο 3: ΚΛΙΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ ΤΩΝ Τ-ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ**

#### **3.1 Τ-δερματικά λεμφώματα: Ορισμός-Κατάταξη- Επιδημιολογία**

Τα πρωτοπαθή δερματικά λεμφώματα είναι NHL εμφανιζόμενα στο δέρμα, χωρίς στοιχεία εξωδερματικής νόσου κατά τη διάγνωση [196]. Συνιστούν ετερογενή ομάδα Τ και Β λεμφωμάτων που επιδεικνύουν κοινά κλινικά χαρακτηριστικά, δυσχεραίνοντα τόσο τη διάγνωση όσο και την ταξινόμησή τους, γεγονός που αιτιολογεί και την κατάταξή τους ως διακριτή κλινική οντότητα στις ταξινόμησεις των λεμφωμάτων [196,197]. Κλινικά και ιστολογικά πρέπει να διακρίνονται από μορφολογικά παρόμοια λεμφαδενικά λεμφώματα με δευτεροπαθή προσβολή του δέρματος καθώς απαιτούν διαφορετικούς θεραπευτικούς χειρισμούς. Στο δυτικό κόσμο τα Β κυτταρικής προέλευσης δερματικά λεμφώματα (CBCL: Cutaneous B-Cell Lymphomas) υπολείπονται σε συχνότητα (20-30%) των συνηθέστερων Τ-κυτταρικής προέλευσης λεμφωμάτων (CTCL: Cutaneous T-Cell Lymphomas, 70-80%) [196-197]. Μεταξύ των τελευταίων τα κοινότερα είναι η σπογγοειδής μυκητίαση (MF: Mucosis Fungoides) και το σύνδρομο Sézary που υπολογίζεται ότι αποτελούν το 45-53% των δερματικών λεμφωμάτων (πίνακας 11) [196,197]. Με βάση την κυτταρική τους προέλευση, τα CTCLs αποτελούν τη μειοψηφία των Τ-λεμφωμάτων, καθώς είναι σπανιότερα από τα περιφερικά Τ-λεμφώματα (PTCLs),

ένα σύνολο νόσων ώριμων Τ-λεμφοκυττάρων με ποικίλα φαινοτυπικά, προγνωστικά και μοριακά γνωρίσματα [198].

Ταξινόμηση WHO-EORTC 2018	Συχνότητα, %	5-y DSS, %
<b>CTCL</b>		
MF	39	88
Παραλλαγές MF		
Folliculotropic MF	5	75
Paquetoid reticulosis	<1	100
Granulomatous slack skin	<1	100
SS	2	36
Adult T-cell leukemia/lymphoma	<1	NDA
Primary cutaneous CD30+ LPDs		
C-ALCL	8	95
LyP	12	99
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma	1	87
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type	<1	16
Chronic active EBV infection	<1	NDA
Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, rare subtypes		
Primary cutaneous $\gamma/\delta$ T-cell lymphoma	<1	11
CD8+ AECTCL (provisional)	<1	31
Primary cutaneous CD4+ small/medium T-cell lymphoproliferative disorder (provisional)	6	100
Primary cutaneous acral CD8+ T-cell lymphoma (provisional)	<1	100
Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, NOS	2	15
<b>CBCL</b>		
PCMZL	9	99
PCFCL	12	95
PCDLBLC, LT	4	56
EBV+ mucocutaneous ulcer (provisional)	<1	100
Intravascular large B-cell lymphoma	<1	72

**Πίνακας 11:** Κατάταξη, σχετική συχνότητα και 5ετής επιβίωση (DSS: Disease Specific Survival) πρωτοπαθών δερματικών λεμφωμάτων [196].

Οι περισσότερες επιδημιολογικές πληροφορίες αναφορικά με την επίπτωση των CTCLs και τους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνισή τους ανευρίσκονται στις δυο

μεγαλύτερες επιδημιολογικές καταγραφές στο πεδίο (International T-cell Lymphoma project, International Lymphoma Epidemiology Consortium-Interlymph) καθώς και άλλες διαθέσιμες εθνικές καταγραφές με τα σημαντικότερα στοιχεία να προέρχονται από τις ΗΠΑ (SEER-Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry)[198-200]. Σύμφωνα με τα τελευταία, η επίπτωση των CTCLs παρουσιάζει σταθερή αύξηση στις ΗΠΑ από τη δεκαετία του 1970 έως και τα τέλη της δεκαετίας του 1990 της τάξεως του 5,7% (95% CI, 4.9%-6.5%) κατ'έτος, που ακολουθήθηκε από μια σταθεροποίηση στο χρονικό διάστημα μετά το 1998 [200]. Η ανοδική αυτή πορεία αποδίδεται κυρίως στην αυξημένη κλινική υποψία και τις βελτιωμένες διαγνωστικές μεθόδους, καθώς άλλωστε έχει συσχετιστεί με την πυκνότητα του ιατρικού προσωπικού στο σύστημα υγείας [200]. Αντίστοιχες χρονικές διακυμάνσεις έχουν καταγραφεί και σε άλλες χώρες όπου αναζητήθηκαν, όπως παραδείγματος χάριν στη Νορβηγία όπου η επίπτωση αυξήθηκε από 0.16 (95% confidence interval, CI 0.11-0.20) ανά 100,000 person-years το διάστημα 1980-84 σε 0.29 (95% CI 0.22-0.36) ανά 100,000 person-years την περίοδο 2000-2003 [201] και τη Γαλλία όπου οι αντίστοιχες κανονικοποιημένες επιπτώσεις ανήλθαν από το 0.20 (95% CI: 0.04–0.35) στο 0.57 (95% CI: 0.28–0.86) [202,203]. Για τις ΗΠΑ η η επίπτωση μετά το 2005 αναφέρεται στο 0.55 ανά 100,000 person years με αναλογία ανδρών:γυναικών 1.6–2.1:1 [197,204]. Η διάμεση ηλικία διάγνωσης όσο αφορά την MF αναφέρεται στα 55–60 έτη, ωστόσο προϋούσης της ηλικίας η επίπτωση αυξάνεται, αναφερόμενη έως και τετραπλάσια μετά τα 70 έτη, ενώ σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες η νόσος είναι εξαιρετικά σπάνια και συνήθως αφορά ιστολογικές παραλλαγές της MF [204]. Στη χώρα μας, παλαιότερη αναδρομική μελέτη ασθενών που διαγνώστηκαν με δερματικό λέμφωμα μεταξύ 1993-2006 στο νοσοκομείο Συγγρός, αναφέρει διάμεση ηλικία διάγνωσης τα 68,5 έτη (εύρος 17-90 έτη) με το 69,8% των ασθενών να είναι μεγαλύτεροι των 60 ετών, ενώ η αναλογία ανδρών:γυναικών βρέθηκε 4:1 [205]. Αντίστοιχα μεγάλη μελέτη του 2016 από δύο κέντρα σε Αθήνα και Θεσσαλονίκη και με συνολικά 473 ασθενείς με MF, αναφέρει μέση ηλικία διάγνωσης 61,7 έτη και αναλογία ανδρών γυναικών 2:1 [206].

Παρά τη σπανιότητα της πάθησης, έχουν αναφερθεί περιοχές όπου καταγράφεται συρροή κρουσμάτων και επίπτωση μεγαλύτερη της αναμενόμενης, όπως στο Västernorrland της Σουηδίας [207], το Pittsburgh [208], και τμήματα του Texas στις ΗΠΑ [209] καθώς και σε σημεία με ανεπτυγμένη βιομηχανία στον Καναδά (Winnipeg, Hamilton και Oakville) [203]. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν ότι

εξωγενείς περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στην εμφάνιση της πάθησης [198,203].

Έτσι, προκαταρκτικές μελέτες προτείνουν ότι η έκθεση σε ατμοσφαιρική ρύπανση, χημικούς παράγοντες (εντομοκτόνα, απορρυπαντικά κ.ά) καθώς και φάρμακα (αναλγητικά, ηρεμιστικά, θειαζίδες, αντιεπιληπτικά, αντισταμινικά κ.ά) μπορεί να αποτελούν παράγοντες άξιους μελέτης στην αιτιοπαθογένεια των CTCLs [203]. Ειδικά για τις θειαζίδες, μελέτη παρατήρησης ανέφερε ότι η διακοπή της υδροχλωροθειαζιδής για τον έλεγχο της υπέρτασης σε 125 ασθενείς με MF συνδέθηκε στο 28.8% των ασθενών αυτών με βελτίωση των δερματικών βλαβών και μερική ή πλήρη ύφεση της νόσου, ενώ η επαναχορήγηση συνδέθηκε με υποτροπή, χωρίς όμως να πιστοποιείται αιτιολογική σχέση [210]. Ακόμα η χορήγηση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων (όπως άλλωστε και η λοίμωξη από HIV ή η μεταμόσχευση οργάνων) έχουν αναφερθεί ως παράγοντες κινδύνου [203,211-212].

Κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες έχουν μελετηθεί στη βιβλιογραφία, με το αυξημένο εισόδημα και επίπεδο εκπαίδευσης να παριστούν επιβαρυντικούς παράγοντες σε κάποιες μελέτες, πιθανώς αντανακλώντας την καλύτερη πρόσβαση σε υπηρεσίες υγείας. Ακόμα, ο δείκτης μάζας σώματος, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, το ατομικό ιστορικό εκζέματος και T- ενεργοποιουσών αυτοάνοσων παθήσεων, το οικογενειακό ιστορικό πολλαπλού μυελώματος, η ενασχόληση με γεωργικές και ξυλουργικές εργασίες έχουν συσχετιστεί με κίνδυνο εμφάνισης MF και SS [203,213]. Η έκθεση στον ήλιο έχει τέλος αναφερθεί ως προστατευτικός παράγοντας, ενώ μελέτη Talpur και συνεργατών διαπίστωσε χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στο 76.9% των ασθενών με MF/SS, ποσοστό συγκρίσιμο με πάσχοντες από άλλους τύπους καρκίνου [214].

Από ανοσογενετικής άποψης το ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο ταξης II DRB1\*11 ανευρίσκεται συχνότερα σε ασθενείς με MF συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες, ενώ το DQB1\*03 συνδέεται με οικογενή MF σε κάποιες αναφορές [215].

Τέλος, ο πιθανός ρόλος λοιμογόνων παραγόντων στην εμφάνιση και φυσική ιστορία των CTCLs έχει απασχολήσει αρκετές μελέτες. Πολλές εξ αυτών εστίασαν στον σχετιζόμενο με το Adult T-Cell Lymphoma ιό HTLV-1, ωστόσο με αντικρουόμενα μέχρι στιγμής ευρήματα. Σαφείς συσχετίσεις δεν κατέστη δυνατό να αποδειχθούν και για παθογόνα όπως οι HSV1 και HSV2, ο VZV, ο ιός Epstein-Barr, ο κυτταρομεγαλοϊός, οι HHV6, HHV7, HHV8, polyomavirus, parvovirus,

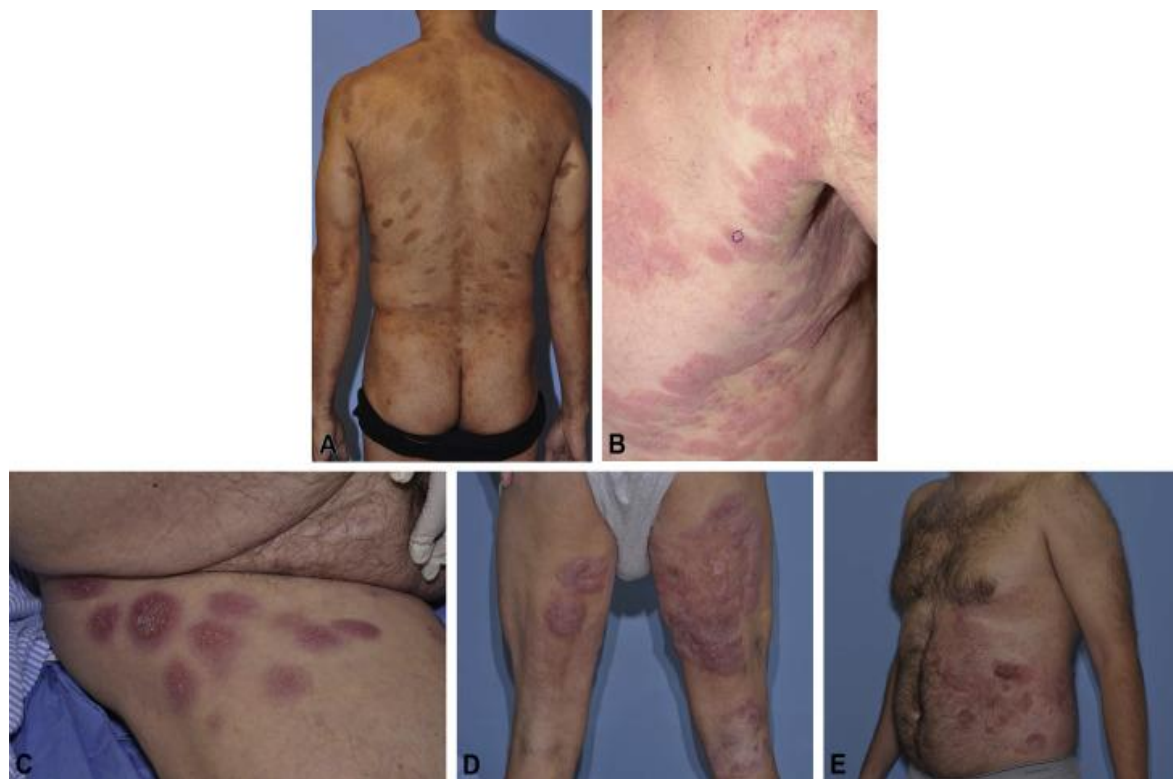
HCV, *Staphylococcus aureus*, *Chlamydomphila pneumoniae*, και *Borrelia burgdorferi* [216].

### 3.2 Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Κλινικοεργαστηριακή προσέγγιση

#### 3.2.1 Σπογγοειδής μυκητίαση

Η MF αποτελεί μια βραδέως εξελισσόμενη νόσο που κλασσικά διακρίνεται στα στάδια των κηλίδων (patch stage MF), των πλακών (plaque stage MF) , των όγκων (tumor stage MF) και της γενικευμένης ερυθροδερμίας (εικόνα 12) [197,217]. Αρχικά εμφανίζεται με σαφώς αφορισμένες, συχνά κνησιμώδεις ερυθρηματώδεις κηλίδες, κατανεμημένες συνηθέστερα σε μη εκτιθέμενες στον ήλιο περιοχές, όπως οι μαστοί, οι γλουτοί, το εσωτερικό τμήμα του μηρού, η περιοχή πέριξ της μασχάλης και το κατώτερο τμήμα του κορμού [197]. Οι περισσότερες κηλίδες είναι μεγάλες (πλάτους >5 εκατοστά) και εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση στο σχήμα, μέγεθος και χρώμα. Σπάνια είναι η παρουσία μιας μονήρους βλάβης, με τυπικότερη την εμφάνιση πολλαπλών βλαβών σε περισσότερα του ενός σημεία του σώματος. Χαρακτηριστικό γνώρισμα που επιβοηθά τη διάγνωση είναι η επιμονή των βλαβών και η μικρή ανταπόκρισή τους στην τοπική θεραπεία με κορτικοστεροειδή που δεν επιτυγχάνει την πλήρη ή μόνιμη εξάλειψή τους, ενώ δεν αποτρέπει και την εμφάνιση νέων βλαβών σε μη θεραπευόμενες περιοχές του δέρματος [218]. Από την άλλη μεριά, πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι ασύνηθες ορισμένες βλάβες να υποχωρούν αυτόματα άνευ θεραπείας και χωρίς να καταλείπουν ουλή [217]. Οι κηλίδες μπορούν να εξελιχθούν σε διηθούσες λεπιδώδεις ερυθρο-καστανού χρώματος πλάκες που δυνατόν να συρρέουν καλύπτοντας εκτεταμένες δερματικές περιοχές [217]. Στο στάδιο των όγκων, παρατηρούνται άλλοτε άλλου μεγέθους όζοι με λεία ή εξελκωμένη επιφάνεια που επηρεάζουν πρότερα πάσχουσες ή μη περιοχές του δέρματος με ιδιαίτερη προτίμηση στο πρόσωπο, τις μασχάλες και τις υπομαζικές περιοχές στις γυναίκες. Η ερυθροδερμία αναφέρεται σε ένα γενικευμένο, διάχυτο ερύθημα παρόμοιο με εκείνο που απαντάται στο σύνδρομο Sézary, από το οποίο διαχωρίζεται λόγω της μικρής ή παντελώς ελίππουσας αιματογενούς διασποράς. Διαφορετικοί τύποι βλαβών μπορούν να παρατηρηθούν ταυτόχρονα στον ίδιο ασθενή, ενώ μέχρι και σχεδόν το 30% των ασθενών φέρει ήδη όγκους ή ερυθροδερμία κατά τη διάγνωση [197,217,218]. Διάφορες παραλλαγές της κλασσικής MF έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Folliculotropic, Hypopigmented, Granulomatous, Bullous, Interstitial

Poikilodermatous κ.ά), ενώ σπανιότερα κλινικά σημεία περιλαμβάνουν την αλωπεκία, την προσβολή των ονύχων και υπερκερατωσικές βλάβες των άκρων [217,219].



**Εικόνα 12:** Κηλίδες (A), πλάκες (B,C) και όγκοι (D,E) σε ασθενείς με MF [197]

Η οριστική διάγνωση της νόσου ειδικά κατά το στάδιο των κηλίδων/πλακών παριστά πρόκληση, καθώς τα κλινικά και παθολογοανατομικά ευρήματα συχνά δεν είναι ειδικά [204]. Τα συμπτώματα πλήθους ασθενών αποδίδονται επί μακρόν σε έκζεμα ή παραψωρίαση με το διάμεσο χρόνο διάγνωσης να φτάνει τα 3-4 χρόνια σε αναδρομικές μελέτες, αν και κατά περίπτωση μπορεί να υπερβεί και τις 3-4 δεκαετίες [204]. Εκτός από την κλινική εκτίμηση και την παθολογοανατομική διερεύνηση με λήψη βιοψιών από τις πάσχουσες περιοχές, βοήθεια μπορούν να προσφέρουν και ο ανοσοφαινότυπος καθώς και η ανάδειξη κλωνικότητας των T-λεμφοκυττάρων με μοριακές μεθόδους που θα συζητηθούν αργότερα, ειδικά στις όχι σπάνιες περιπτώσεις εκείνες όπου η ιστολογική εικόνα είναι ενδεικτική, αλλά όχι και παθογνωμονική της νόσου [204,218]. Δεδομένης της ανάγκης ύπαρξης ομοιόμορφων διαγνωστικών κριτηρίων για την MF, η Παγκόσμια Εταιρεία Δερματικών Λεμφωμάτων (International Society for Cutaneous Lymphoma-ISCL) θέσπισε τον κλινικοεργαστηριακό αλγόριθμο που παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα :

<b>Κριτήρια</b>	<b>Βαθμονόμηση</b>
<p><b>Κλινικά:</b></p> <p><u>Βασικό κριτήριο:</u> Εμμένουσα ή προϊούσα εμφάνιση κηλίδων/λεπτών πλακών</p> <p><u>Επιπρόσθετα κριτήρια:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.Μη εκτεθειμένες στον ήλιο περιοχές</li> <li>2.Ποικιλία σε σχήμα/μέγεθος</li> <li>3.Ποικιλοδερμία</li> </ol>	<p>2 βαθμοί για ένα βασικό και δύο επιπρόσθετα κριτήρια</p> <p>1 βαθμός για ένα βασικό και ένα επιπρόσθετο κριτήριο</p>
<p><b>Ιστοπαθολογικά:</b></p> <p><u>Βασικό κριτήριο:</u> Επιφανειακό λεμφοκυτταρικό διήθημα</p> <p><u>Επιπρόσθετα κριτήρια:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.Επιδερμοτροπισμός χωρίς σπογγίωση</li> <li>2.Λεμφοκυτταρική ατυπία (κύτταρα με υπερμεγέθεις υπερχρωματικούς πυρήνες ή εγκεφαλόμορφο περίγραμμα)</li> </ol>	<p>2 βαθμοί για ένα βασικό και δύο επιπρόσθετα κριτήρια</p> <p>1 βαθμός για ένα βασικό και ένα επιπρόσθετο κριτήριο</p>
<p><b>Μοριακά:</b></p> <p>Κλωνική αναδιάταξη του TCR γονιδίου</p>	<p>1 βαθμός για κλωνικότητα</p>
<p><b>Ανοσοιστοχημικά:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.&lt;50% CD2+, CD3+, και/ή CD5+ T-λεμφοκύτταρα</li> <li>2. &lt;10% CD7+ T-λεμφοκύτταρα</li> <li>3.Απώλεια των CD2, CD3, CD5, ή CD7 T-κυτταρικών αντιγόνων στην επιδερμίδα και διατήρηση τους στη δερμίδα</li> </ol>	<p>1 βαθμός για ένα ή περισσότερα κριτήρια</p>

**Πίνακας 12:** Βαθμονόμηση διαγνωστικών κριτηρίων για την MF. Συνολικά 4 βαθμοί απαιτούνται για τη διάγνωση [218].

### 3.2.2 Σύνδρομο Sézary (SS)

Το σύνδρομο Σέζαρυ, συνιστά μια επιθετική, λευχαιμική μορφή CTCL που χαρακτηρίζεται από γενικευμένο ερύθημα (ερυθροδερμία), κυκλοφορούντα άτυπα T



κύτταρα (κύτταρα Sézary) και έντονο κνησμό με ή χωρίς λεμφαδενοπάθεια. Το σύνδρομο εμφανίζεται συνήθως de novo και εξελίσσεται γρήγορα, αν και ορισμένοι ασθενείς αναφέρουν ένα πρόδρομο στάδιο κνησμού και μη ειδικής δερματίτιδας, ενώ σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις το SS μπορεί να ακολουθήσει την κλασική MF. Η κλινική εικόνα μπορεί να κυμαίνεται από ήπιο ερύθημα έως γενικευμένη αποφολιδωτική ερυθροδερμία με κερατόδερμα και ρωγμές των παλαμών και των πελμάτων (εικόνα 13), που μπορεί να συνοδεύονται από ηλεκτρολυτικές διαταραχές, υποθερμία, αλωπεκία και βλάβες βλεφάρων/εκτρόπιο [197].



**Εικόνα 13:**Ερυθροδερμία (A), απολέπιση και ρωγμές παλαμών και πελμάτων (B,C) και εκτρόπιο (D) σε ασθενείς με SS [197]

Το ερυθροδερμικό στάδιο της MF και το SS μαζί με σπανιότερες ερυθροδερμικές παραλλαγές περιγράφονται συλλήβδην ως ερυθροδερμικά CTCL, με την ειδοποιό διαφορά μεταξύ τους να αφορά το φορτίο των άτυπων T-κυττάρων στην κυκλοφορία όπως ήδη αναφέρθηκε (πίνακας 13) .

Ερυθροδερμικά CTCL	Προυπάρχουσα MF	Ευρήματα στο αίμα	TNM-αιματολογική σταδιοποίηση
Σύνδρομο Sézary	Σπάνια	Λευχαιμική εικόνα	T4, N0-3, M0-1, B2
Ερυθροδερμική MF	Πάντα	Απόντα ή ελάχιστα	T4, N0-3, M0-1, B0-1
Ερυθροδερμικό CTCL μη άλλως προσδιοριζόμενο	Ποτέ	Απόντα ή ελάχιστα	T4, N0-3, M0-1, B0-1

**Πίνακας 13:** Προτεινόμενη κατάταξη των ερυθροδερμικών CTCLs από τη διεθνή εταιρεία δερματικών λεμφωμάτων (B0: <5% κυκλοφορούντα κύτταρα Sézary, B1: κύτταρα Sézary <1000/mm<sup>3</sup> ή <20% άτυπα T κύτταρα στο επίχρισμα περιφερικού αίματος, B2: κύτταρα Sézary >1000/mm<sup>3</sup> ή >20% άτυπα T κύτταρα στο επίχρισμα περιφερικού αίματος) [197,220].

Έτσι πλην της κλινικής εικόνας, η διάγνωση του συνδρόμου απαιτεί και εργαστηριακά κριτήρια που σκοπεύουν στην αποκάλυψη της λευχαιμικής συμμετοχής. Και εδώ ο ανοσοφαινότυπος και η αναζήτηση κλωνικότητας αποτελούν σημαντικά διαγνωστικά εργαλεία. Συνοπτικά τα προτεινόμενα από την ISCL κριτήρια περιλαμβάνουν την ερυθροδερμία σε συνδυασμό με:

1. Απόλυτο αριθμό κυττάρων Sézary 1000/mm<sup>3</sup> ή μεγαλύτερο
2. Αναλογία CD4/CD8 ίση με 10 ή μεγαλύτερη λόγω αύξησης των CD3+ ή CD4+ κυττάρων με κυτταρομετρία ροής
3. Αυξημένη έκφραση παν-T-κυτταρικών δεικτών (CD2, CD3, CD4, CD5) με κυτταρομετρία ροής. Ελλιπής έκφραση του CD7 (ή CD4+CD7- κύτταρα ≥40%) αποτελεί επίσης πιθανό κριτήριο του συνδρόμου.
4. Λεμφοκυττάρωση με στοιχεία κλωνικότητας με μοριακές μεθόδους στο αίμα
5. Παρουσία T- κυτταρικού κλώνου με κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία [220]

Περιληπτικά ο ενδεδειγμένος κλινικός και παρακλινικός έλεγχος με στόχο τη διάγνωση και τη σταδιοποίηση του ασθενούς με MF/SS παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα [220-221].

<b>Πλήρης κλινική εξέταση που περιλαμβάνει:</b>
<p>1..Καθορισμό του τύπου των δερματικών βλαβών</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Σε περίπτωση πλακών/κηλίδων ή ερυθροδερμίας, υπολογισμός ποσοστού της πάσχουσας επιφάνειας σώματος και καταγραφή τυχόν εξέλκωσης των βλαβών</li> <li>• Επί παρουσίας ογκιδίων, καταγραφή του αριθμού των βλαβών, του μέγιστου μεγέθους και των εμπλεκόμενων δερματικών περιοχών</li> </ul> <p>2. Ταυτοποίηση ψηλαφητών λεμφαδένων , ιδίως εκείνων με διάμετρο <math>\geq 1.5</math> cm ή σκληρών, ανώμαλων, ακίνητων ή σε block</p> <p>3. Αναζήτηση οργανομεγαλίας</p>
<b>Βιοψία δέρματος</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Επιλογή της περιοχής με τη μεγαλύτερη σκληρία, αν λαμβάνεται μόνο μία βιοψία</li> <li>• Ο ανοσοφαινότυπος συνίσταται να περιλαμβάνει τουλάχιστον έναν από τους ακόλουθους δείκτες: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, και έναν β-κυτταρικό δείκτη (π.χ. CD20). Ο CD30 ενδείκνυται σε περπτώσεις όπου υπάρχει υποψία lymphomatoid papulosis, αναπλαστικού λεμφώματος ή μετάπτωσης σε μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα</li> <li>• Αναζήτηση κλωνικότητας (αναδιάταξη του TCR γονιδίου)</li> </ul>
<b>Αιματολογικές εξετάσεις</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Γενική αίματος με εκτίμηση περιφερικού επιχρίσματος, αξιολόγηση ηπατικής λειτουργίας, LDH</li> <li>• Αξιολόγηση αναδιάταξης TCR γονιδίου και συσχέτιση με τυχόν ευρήματα από τη βιοψία</li> <li>• Αξιολόγηση παθολογικών λεμφοκυττάρων είτε με καταμέτρηση των κυττάρων Sézary είτε με κυτταρομετρία ροής (CD4<sup>+</sup>/CD7<sup>-</sup> ή CD4<sup>+</sup>/CD26<sup>-</sup>)</li> </ul>
<b>Ακτινολογική εκτίμηση</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Σε ασθενείς με στάδιο νόσου T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>B<sub>0</sub>, κατά τα λοιπά υγείς και χωρίς άλλη συμπτωματολογία, καθώς και σε επιλεγμένους ασθενείς σταδίου T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>B<sub>0</sub> με περιορισμένη δερματική συμμετοχή, η ακτινολογική αξιολόγηση μπορεί να περιορισθεί σε μια απλή ακτινογραφία θώρακος ή υπερηχογραφική εκτίμηση περιφερικών λεμφαδενικών ομάδων προς αποκλεισμό λεμφαδενοπάθειας</li> <li>• Σε όλους τους υπόλοιπους ασθενείς εκτελείται αξονική θώρακος, κοιλίας και πυέλου μόνες ή σε συνδυασμό με FDG-PET scan .</li> </ul>
<b>Βιοψία λεμφαδένα</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Βιοψία εκτομής ενδείκνυται αν ο λεμφαδένας είναι διαμέτρου <math>\geq 1.5</math> cm ή είναι σκληρός, ανώμαλου σχήματος, ακίνητος ή σε block</li> <li>• Προτιμάται ο μεγαλύτερος λεμφαδένας που παροχετεύει μια πάσχουσα δερματική περιοχή, ή αν έχει γίνει FDG-PET scan, ο λεμφαδένας με τη μεγαλύτερη πρόσληψη (Standardized Uptake Value-SUV).</li> <li>• Αν δεν υπάρχουν απεικονιστικά δεδομένα και αναευρίσκονται πολλαπλοί, ισομεγέθεις λεμφαδένες, η σειρά προτίμησης είναι: τραχηλικοί, μασχαλιαίοι, βουβωνικοί</li> <li>• Η παθολογοανατομική εκτίμηση περιλαμβάνει μικροσκόπηση, κυτταρομετρία ροής και αναζήτηση της αναδιάταξης του TCR γονιδίου.</li> </ul>

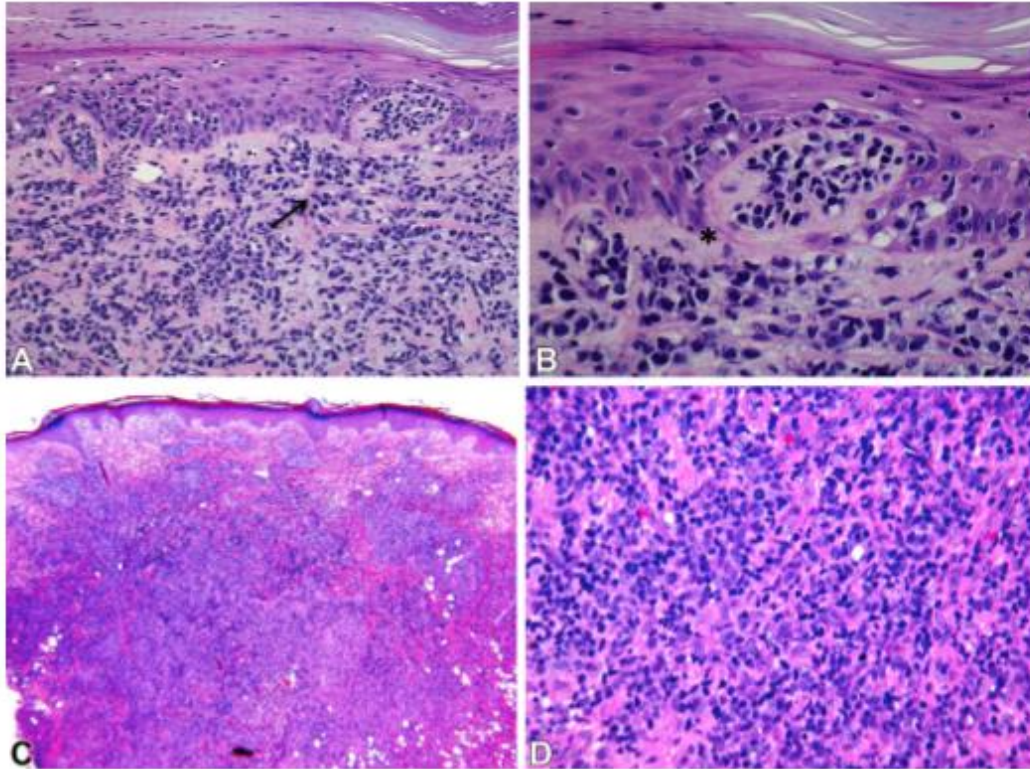
**Πίνακας 14:** Κλινικοεργαστηριακός έλεγχος για τη διάγνωση και σταδιοποίηση ασθενών με MF/SS [221].

### 3.3 Παθολογοανατομικά ευρήματα - Ανοσοφαινότυπος - Έλεγχος κλωνικότητας

#### 3.3.1 Σπογγοειδής μυκητίαση

Όπως αναφέρθηκε, η παθολογοανατομική προσέγγιση της MF, ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια αυτής, καθώς και η διάκρισή της από καλοήθειες φλεγμονώδεις καταστάσεις συνιστά διαγνωστική πρόκληση. Για το λόγο αυτό η λήψη πολλαπλών βιοψιών από ποικιλία βλαβών, που περιλαμβάνουν τόσο τις παλαιότερες, πιο οργανωμένες, όσο και τις νεότερες βλάβες δεν πρέπει να παραλείπεται. Σημασία έχει η διακοπή για τουλάχιστον 2-4 εβδομάδες προ της λήψης βιοψίας όλων των τοπικών θεραπειών και ιδίως των τοπικών κορτικοστεροειδών καθώς και των συστηματικών ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, ώστε να μην αλλοιώνεται η ήδη απαιτητική στην αξιολόγησή της ιστολογική εικόνα [218].

Χαρακτηριστικά ευρήματα κατά την εξέταση ενός διηθήματος MF περιλαμβάνουν την παρουσία άτυπων λεμφοκυττάρων μεγέθους ελαφρώς μεγαλύτερου του φυσιολογικού με υπερχρωματικούς, ανώμαλου σχήματος πυρήνες, που περιγράφονται ως «κύτταρα μυκητίασης», «κύτταρα Lutzner ή «κύτταρα Sézary», καθώς και άτυπων λεμφοκυττάρων με άλω στην επιδερμίδα. Δυνατόν ακόμα να σημειωθεί αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων (όχι απαραίτητα άτυπων), ως επί τυπικής δερματίτιδος, κατανεμημένων κατά μόνας ή κατά μικρές ομάδες σε επιδερμίδα χωρίς σπογγιωτική μικροαγγείωση, φαινόμενο περιγραφόμενο ως «δυσανάλογος επιδερμοτροπισμός». Τα μικροαποστήματα Pautrier, παρότι παθολογικά, ανευρίσκονται μόνο στο 25% των πασχόντων. Ακόμα, μπορεί να παρατηρούνται μονήρη λεμφοκύτταρα γραμμικά τοποθετημένα κατά μήκος της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδος συχνά με περικυτταρική άλω, κενοτοπιώδης δερματίτιδα, θηλώδης δερματική ίνωση, αποπτωτικά κερατινοκύτταρα, έγκλειστα Civatte στην επιδερμίδα και κολλοειδή σωματίδια στη δερμίδα. Κι ενώ στο στάδιο των κηλίδων και το πλακών τα λεμφοκυτταρικά διηθήματα περιορίζονται στην επιδερμίδα ή στην δερμοεπιδερμική συμβολή, στο στάδιο των όγκων αυτά επεκτείνονται βαθύτερα στη δερμίδα επιδεικνύοντας ελαττωμένο ή απόντα επιδερμοτροπισμό (εικόνα 14) [197,218].



**Εικόνα 14:** Πλάκα MF με διήθημα μικρών-μεσαίων άτυπων λεμφοκυττάρων με υπερχρωματικούς, ανώμαλους πυρήνες και άλω (βέλος εικόνα A). Παρατηρείται επιδερμοτροπισμός με μικροαποστήματα Pautrier (αστερίσκος εικόνα B). Στις εικόνες C και D παρουσιάζεται δερματικό ογκίδιο με βαθιά, πυκνά λεμφοκυτταρικά διηθήματα και απώλεια επιδερμοτροπισμού [197].

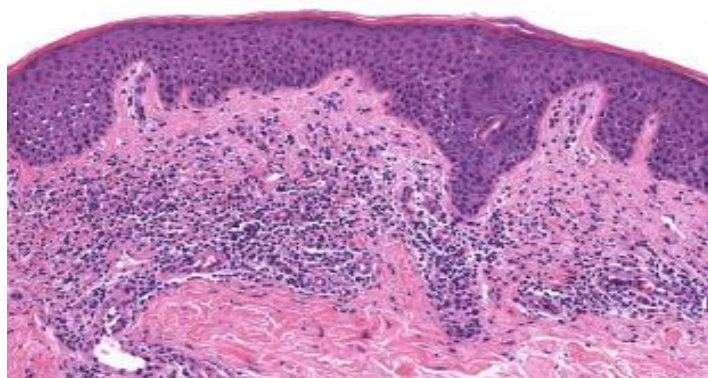
Από ανοσοφαινοτυπικής σκοπιάς, στην MF ο κλασικός φαινότυπος αφορά ώριμα βοηθητικά T-κύτταρα μνήμης (CD4+CD45RO+) , αν και αναφέρονται επίσης CD8+, CD30+, CD56+, CD4/CD8 διπλά θετικοί ή και CD4/CD8 διπλά αρνητικοί φαινότυποι. Κανείς εξ αυτών των φαινοτύπων δεν φαίνεται να έχει προγνωστική αξία, αν και περιπτώσεις πρώιμης MF με έκφραση του CD30 και υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, ιδιαιτέρως στο τμήμα του διηθήματος που εκτείνεται στη δερμίδα, έχουν συνδεθεί με επιθετικότερη συμπεριφορά. Αυξημένη αναλογία CD4:CD8 (μεγαλύτερη του 8:1) συνηγορεί προς τη διάγνωση, χωρίς όμως αυτή να μπορεί να αποκλεισθεί όταν η αναλογία είναι φυσιολογική ή ακόμα και μειωμένη. Απώλεια δεικτών, όπως των CD2, CD5 και CD7, παρατηρούνται συχνά αλλά όχι αποκλειστικά στην MF, καθώς μπορεί να ανευρεθούν και σε περιπτώσεις φλεγμονώδους δερματίτιδας. Η έκφραση του CD7 σε <10% του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού έχει προταθεί ως διαγνωστικό κριτήριο της πρώιμης MF, με το εύρημα αυτό ωστόσο να είναι ιδιαιτέρως σπάνιο. Ως εκ τούτου το εν λόγω κριτήριο μικρή μόνο βοήθεια μπορεί να προσφέρει διαγνωστικά. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί ότι ορισμένοι

φαινότυποι συνδέονται συχνότερα με συγκεκριμένες κλινικές εκδηλώσεις. Παραδείγματος χάριν, η CD8+ MF εκδηλώνεται συχνά με υποχρωστικές ή υπερχρωστικές κηλίδες και πλάκες, ενώ ο CD4/CD8 διπλά αρνητικός φαινότυπος σχετίζεται με δακτυλιοειδείς βλάβες. Τέλος όσον αφορά στο στάδιο των όγκων, δεν είναι σπάνια η απώλεια T-κυτταρικών δεικτών, αλλά η έκφραση του CD30 έχει αναγνωρισθεί ως ανεξάρτητος δείκτης καλύτερης σχετιζόμενης με τη νόσο επιβίωσης [197,223].

Όσον αφορά τον έλεγχο κλωνικότητας στην MF, αυτός θεωρείται μια αναγκαία συμπληρωματική εξέταση που μπορεί να αναδείξει κλωνικές αναδιατάξεις του T κυτταρικού υποδοχέα. Από πρακτικής απόψεως, προκρίνεται, μεταξύ των διαθέσιμων τεχνικών, η εφαρμογή PCR βασιζόμενων μεθόδων και συγκεκριμένα το πρωτόκολο BIOMED-2 που επιδεικνύει μεγαλύτερη ειδικότητα και ευαισθησία σε σχέση με την Southern Blot, είναι ταχύτερη στην εκτέλεση, δεν απαιτεί μεγάλο όγκο δείγματος και επιτρέπει την εξέταση και ιστών εγκλεισμένων σε παραφίνη. Κλωνικότητα ανευρίσκεται στο 50-90% των περιπτώσεων MF, ποσοστό που φαίνεται να αυξάνεται προϊόντος του σταδίου, κυμαινόμενο περί το 50% στο στάδιο των κηλίδων και γύρω στο 73% επί πλακών, φθάνοντας στο 83-100% σε όγκους και ερυθροδερμική MF. Με άλλα λόγια, η διαπίστωση κλωνικότητας σε περιπτώσεις πρώιμης νόσου με μικρό λεμφοκυτταρικό πληθυσμό είναι δυσχερής και έτσι η απουσία της σαφώς δεν αποκλείει τη διάγνωση. Από την άλλη μεριά, η απόδειξη κλωνικότητας δεν είναι συνώνυμη λεμφώματος, καθώς αυτή πιστοποιείται σε μεγάλο ποσοστό (έως και 65%) καλοηθών φλεγμονωδών δερματοπαθειών. Η ανεύρεση ωστόσο του ίδιου κλώνου σε πολλαπλές βιοψίες κατευθύνει προς MF[197,222,224,225]. Τελευταίως, η εισαγωγή της αλληλούχισης επόμενης γενεάς για την αξιολόγηση των αναδιατάξεων του TCR δείχνει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Μέσω αλληλούχισης των CDR3 περιοχών των γονιδίων που κωδικοποιούν τα TCRβ και TCRγ, καθίσταται δυνατή η αναγνώριση των διαφορετικών T-κυτταρικών κλώνων που ανευρίσκονται σε ένα δείγμα καθώς και η σχετική τους αναλογία. Η τεχνική αυτή, πιο ευαίσθητη από τις παλιότερες προσεγγίσεις, δύναται να προσφέρει σημαντική αρωγή στην απαιτητική πρωτοδιάγνωση της πρώιμης MF, αλλά και εν συνεχεία στην παρακολούθηση της υποτροπιάζουσας ή προϊούσας νόσου. Εξάλλου η συλλογή δεδομένων από την όλο και ευρύτερη εφαρμογή της μεθόδου μπορεί να αξιοποιηθεί ερευνητικά για την ανάδειξη υποπληθυσμών ασθενών με δυσμενέστερη πρόγνωση και επιθετικότερη νόσο [224].

### 3.3.2 Σύνδρομο Sézary

Το σύνδρομο Sézary διακρίνεται από μεγάλη ποικιλία στην παρατηρούμενη ιστολογική μορφολογία, η οποία μπορεί να μην είναι ειδική σε έως και το 40% των περιπτώσεων [223]. Παρότι διακριτή κλινική οντότητα από την MF, εν πολλοίς εμφανίζει παρόμοιους ιστοπαθολογικούς χαρακτήρες με αυτή. Έτσι κι εδώ είναι δυνατόν να ανευρεθούν τα χαρακτηριστικά άτυπα λεμφοκύτταρα, ο επιδερμοτροπισμός και τα μικροαποστήματα Pautrier, ενώ η παρουσία των λεμφοκυττάρων στη δερμίδα μπορεί να κυμαίνεται από μια περιορισμένη περιαγγειακή κατανομή, έως και το σχηματισμό πυκνών, λειχηνοειδών διηθημάτων [197]. Η πλέον τυπική μορφολογία αφορά πυκνά, μονότονα διηθήματα μικρών λεμφοκυττάρων με πυρηνική ατυπία, στα οποία μπορεί να παρεμβάλλονται ηωσινόφιλα ή πλασματοκύτταρα (εικόνα 15) [223]. Διάφορες σειρές ασθενών δημοσιευμένες στη βιβλιογραφία καταδεικνύουν την ποικιλότητα της παθολογοανατομικής εικόνας με τον επιδερμοτροπισμό να απουσιάζει σε έως και το 62% των διηθημάτων [226], τα μικροαποστήματα Pautrier να λείπουν στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, ενώ τα διάχυτα διηθήματα στη δερμίδα που μπορούν να απομακρύνουν τη διάγνωση μη λεμφωματικών αιτιών ερυθροδερμίας να αποτελούν την εξαίρεση [227]. Τέλος, η μη σταθερή παρουσία άτυπων λεμφοκυττάρων στο SS, σε συνδυασμό με την ενίοτε ανεύρεσή τους σε άλλες φλεγμονώδεις οντότητες καθώς και την αναπόφευκτη υποκειμενικότητα στη μορφολογική ταυτοποίησή τους, επιτείνει έτι περαιτέρω τη διαγνωστική σύγχυση [227].

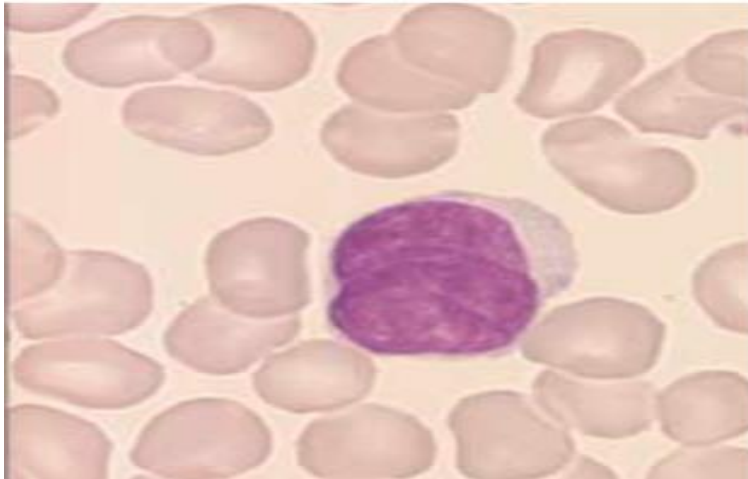


**Εικόνα 15:** Βιοψία δέρματος σε σύνδρομο Sézary. Παρατηρείται μονότονο, περιαγγειακό λεμφοκυτταρικό διήθημα στην ανώτερη δερμίδα. Σημειώνεται η απουσία επιδερμοτροπισμού (HE, ×100). [223]

Ανοσοφαινοτυπικά, τα λεμφωματικά κύτταρα εκφράζουν τους δείκτες CD3, CD4, και συχνά τον PD-1 (programmed death 1). Μάλιστα ο τελευταίος αυτός δείκτης, όπως και οι CD7 και TOX μπορούν να επιβοηθήσουν τη διαφορική διάγνωση μεταξύ του συνδρόμου και άλλων καλοήθων ερυθροδερμικών φλεγμονωδών καταστάσεων. Έτσι, έκφραση του PD-1 σε >50%, του CD7 σε <20% και του TOX σε >50% των T-κυττάρων του διηθήματος συνάδει με τη διάγνωση του συνδρόμου Sézary [223].

Καθώς τονίσθηκε ανωτέρω, η διάγνωση του SS απαιτεί την αξιολόγηση του λεμφοκυτταρικού πληθυσμού στο περιφερικό αίμα, με μεθόδους που περιλαμβάνουν τη μορφολογική παρατήρηση, τον ανοσοφαινοτυπικό και μοριακό έλεγχο. Η καταμέτρηση των κυττάρων Sézary σε επίχρισμα buffy coat (Sézary cell prep) αποτελεί το πρώτο βήμα. Το κύτταρο Sézary, που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1938 από τον Sézary σε ασθενή με χρόνια ερυθροδερμία, είναι λεμφοκύτταρο μεγέθους ίσου ή μεγαλύτερου του φυσιολογικού λεμφοκυττάρου με χαρακτηριστικές αναδιπλώσεις και βαθιές εντομές στον πυρήνα που του προσδίδουν «εγκεφαλοειδή» όψη (εικόνα 16) [220]. Μειονεκτήματα της προσέγγισης αυτής είναι αφενός η έλλειψη ειδικότητας, καθώς κύτταρα Sézary μπορεί να παρατηρηθούν και σε καλοήθεις δερματοπάθειες, όπως και σε φυσιολογικούς ενήλικες και αφετέρου η υποκειμενική φύση της τεχνικής, η οποία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εμπειρία του παρατηρητή. Σημαντική ωστόσο είναι η συμβολή της μικροσκοπικής παρατήρησης στην αποκάλυψη περιπτώσεων όπου ο κλωνικός πληθυσμός έχει απωλέσει τους αναμενόμενους χαρακτηριστικούς δείκτες επιφανείας και ως εκ τούτου δεν είναι δυνατόν να αναγνωρισθεί από την κυτταρομετρία ροής [222]. Για όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις, η κυτταρομετρία ροής και οι μοριακές τεχνικές αναζήτησης κλωνικότητας συνιστούν πιο αντικειμενικές και ειδικές μεθόδους αναγνώρισης και καταμέτρησης των λεμφωματικών κυττάρων. Η αξιολόγηση του λόγου CD4/CD8 και των CD4+CD26<sup>-</sup> και CD4+CD7<sup>-</sup> κυττάρων, καθώς και η ανεύρεση κλωνικών αναδιατάξεων του TCR και η συσχέτιση τους με τα ανοσοιστοχημικά και μοριακά δεδομένα των βιοψιών μπορούν να ταυτοποιήσουν και ποσοτικοποιήσουν τη διασπορά του κλώνου στο περιφερικό αίμα και να υπαγορεύσουν τη διάγνωση του συνδρόμου, κατά τα ISCL κριτήρια που αναφέρθηκαν σε προηγούμενο εδάφιο. Τέλος, η κυτταρομετρία ροής αποτελεί σήμερα ένα χρήσιμο εργαλείο στην παρακολούθηση της προόδου νόσου ή της ανταπόκρισης στη θεραπεία που μεταφράζεται σε άυξηση ή μείωση αντίστοιχα του κυκλοφορούντος κλώνου σύμφωνα με καθορισμένα ποσοτικά κριτήρια [222,228].





**Εικόνα 16:** Κύτταρο Sézary μεγάλου μεγέθους με χαρακτηριστικό πυρήνα [220]

### 3.4 Σταδιοποίηση- Πρόγνωση

Η σταδιοποίηση των ασθενών με MF/SS πραγματοποιείται με το σύστημα TNMB που αξιολογεί την έκταση της νόσου στο δέρμα και το ποσοστό κάλυψης της ολικής επιφάνειας σώματος (T), τη συμμετοχή λεμφαδένων (N), την ύπαρξη σπλαχνικών μεταστάσεων (M) και την παρουσία κλώνου στο περιφερικό αίμα (B) σύμφωνα με τα ISCL/EORTC/USCLC κριτήρια που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

<b>TNMB διαβάθμιση-Περιγραφή</b>	
<u>Δέρμα:</u>	
T <sub>1</sub>	Περιορισμένες κηλίδες ή/και πλάκες καλύπτουσες <10% της δερματικής επιφάνειας: μπορεί να σταδιοποιηθεί περαιτέρω σε T <sub>1a</sub> (κηλίδες μόνο) ή T <sub>1b</sub> (πλάκες +/- κηλίδες)
T <sub>2</sub>	Κηλίδες ή πλάκες καλύπτουσες ≥10% της δερματικής επιφάνειας: μπορεί να σταδιοποιηθεί περαιτέρω σε T <sub>2a</sub> (κηλίδες μόνο) ή T <sub>2b</sub> (πλάκες +/- κηλίδες)
T <sub>3</sub>	Ένας ή περισσότεροι όγκοι (διαμέτρου ≥1 cm)
T <sub>4</sub>	Ερύθημα καλύπτον ≥80% της επιφάνειας σώματος
<u>Λεμφαδένες:</u>	
N <sub>0</sub>	Δεν ανευρίσκονται κλινικά παθολογικοί περιφερικοί ή κεντρικοί λεμφαδένες, δεν απαιτείται βιοψία
N <sub>1</sub>	Παθολογικοί περιφερικοί ή κεντρικοί λεμφαδένες, παθολογοανατομικά κριτήρια: Dutch grade 1 ή NCI LN <sub>0-2</sub>
N <sub>1a</sub>	Αρνητική κλωνικότητα
N <sub>1b</sub>	Θετική κλωνικότητα

N <sub>2</sub>	Παθολογικοί περιφερικοί ή κεντρικοί λεμφαδένες, παθολογοανατομικά κριτήρια: Dutch grade 2 ή NCI LN <sub>3</sub>
N <sub>2a</sub>	Αρνητική κλωνικότητα
N <sub>2b</sub>	Θετική κλωνικότητα
N <sub>3</sub>	Παθολογικοί περιφερικοί ή κεντρικοί λεμφαδένες, παθολογοανατομικά κριτήρια: Dutch grade 3–4 ή NCI LN <sub>4</sub>
	Θετική ή αρνητική κλωνικότητα
N <sub>x</sub>	Παθολογικοί περιφερικοί ή κεντρικοί λεμφαδένες, άνευ ιστολογικής επιβεβαίωσης
<b><u>Σπλαχνική συμμετοχή:</u></b>	
M <sub>0</sub>	Χωρίς συμμετοχή σπλαχνικού οργάνου
M <sub>1</sub>	Σπλαχνική συμμετοχή (απαραίτητη η ιστολογική επιβεβαίωση και η αναφορά του εμπλεκόμενου οργάνου)
<b><u>Αίμα:</u></b>	
B <sub>0</sub>	Απουσία σημαντικής αιματολογικής συμμετοχής: ≤5% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος αναγνωρίζονται ως άτυπα ( κύτταρα Sézary), <15% CD4+CD7 <sup>-</sup> ή CD4+CD26 <sup>-</sup> κύτταρα; ή <250/ul κύτταρα Sézary, CD4+CD7 <sup>-</sup> or CD4+CD26 <sup>-</sup>
B <sub>0a</sub>	Αρνητική κλωνικότητα
B <sub>0b</sub>	Θετική κλωνικότητα
B <sub>1</sub>	Χαμηλό λεμφωματικό φορτίο: >5% των λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος αναγνωρίζονται ως κύτταρα Sézary, χωρίς να φθάνουν τα κριτήρια του σταδίου B <sub>2</sub>
B <sub>1a</sub>	Αρνητική κλωνικότητα
B <sub>1b</sub>	Θετική κλωνικότητα
B <sub>2</sub>	Υψηλό λεμφωματικό φορτίο: κύτταρα Sézary ή CD4+CD7 <sup>-</sup> ή CD4+CD26 <sup>-</sup> >1000/uL ή >40% CD4+CD7 <sup>-</sup> ή >30% CD4+CD26 <sup>-</sup> ή λόγος CD4/CD8 >10, θετική κλωνικότητα

**Πίνακας 15:** Περιγραφή της TNMB βαθμονόμησης στα CTCLs [222]

Με βάση την αξιολόγηση των παραμέτρων TNMB καθορίζεται το στάδιο σύμφωνα με τα ακόλουθα:

<b>Στάδιο</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>B</b>
IA	1	0	0	0,1
IB	2	0	0	0,1
IIA	1-2	1,2	0	0,1
IIB	3	0-2	0	0,1
IIIA	4	0-2	0	0
IIIB	4	0-2	0	1
IVA <sub>1</sub>	1-4	0-2	0	2
IVA <sub>2</sub>	1-4	3	0	0-2
IVB	1-4	0-3	1	0-2

**Πίνακας 16:** EORTC/ISCL σταδιοποίηση για τα MF/SS [222]

Σχεδόν τα 2/3 των ασθενών βρίσκονται σε στάδιο IA-IIA κατά τη διάγνωση και παρότι η πρόγνωση είναι άριστη για την πλειοψηφία, ένα 25% αναμένεται να εμφανίσει πρόοδο νόσου. Αντιθέτως, η πρόγνωση για ασθενείς με προχωρημένη νόσο κατά τη διάγνωση (IIB-IVB) είναι πτωχή (πίνακας 17) [229]. Μια ποικιλία προγνωστικών παραγόντων έχει ταυτοποιηθεί και απαρτιωθεί σε δύο διαφορετικά προταθέντα μοντέλα, ένα για πρόωμη νόσο κι ένα για νόσο προχωρημένου σταδίου. Στους δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες περιλαμβάνονται το ανδρικό φύλο και η ηλικία >60 και στα δύο μοντέλα, η παρουσία πλακών και ψηλαφητών λεμφαδένων στο μοντέλο της πρόωμης νόσου και η λεμφαδενική, αιματολογική και σπλαχνική συμμετοχή στο μοντέλο της προχωρημένης νόσου. Ακόμα πιθανή σημασία αποδίδεται και στις υψηλές τιμές LDH κατά τη διάγνωση [230]. Μια διεθνής προοπτική συλλογή ασθενών για την κατάρτιση ενός διεθνούς προγνωστικού δείκτη στα δερματικά λεμφώματα (CLIP: Cutaneous Lymphoma International Prognostic Index) κατά τα πρότυπα άλλων αιματολογικών παθήσεων βρίσκεται τρεχόντως σε εξέλιξη [231]

<b>Στάδιο</b>	<b>5-y-OS, %</b>	<b>10-y-OS, %</b>
<b>IA</b>	94-100	88
<b>IB</b>	73-86	70
<b>IIA</b>	78	52
<b>IIB</b>	40-65	34
<b>IIIA</b>	47-60	37

<b>IIIΒ</b>	40-56	25
<b>IVA1</b>	37-48	18
<b>IVA2</b>	18-33	15
<b>IVB</b>	18-39	-

**Πίνακας 17:** Πρόγνωση αναλόγως σταδίου νόσου για 5ετή (5-y-OS) και 10ετή επιβίωση (10-y-OS) [229]

### 3.5 Θεραπευτικές επιλογές

Οι διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές για την σπογγοειδή μυκητίαση και το σύνδρομο Sézary είναι αρκετές και κυμαίνονται από την απλή παρακολούθηση έως και τη χορήγηση συστηματικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων. Το στάδιο νόσου, η ηλικία, η γενική κατάσταση και οι προτιμήσεις του ασθενούς πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την κατάρτιση της κατάλληλης θεραπευτικής προσέγγισης [229,232].

Μεταξύ των τοπικών θεραπειών, δηλαδή των θεραπειών που εφαρμόζονται αποκλειστικά στο πάσχον δέρμα, περιλαμβάνονται η εφαρμογή τοπικών κορτικοστεροειδών, μεγλωραιθαμίνης (nitrogen mustard) και ρετινοειδών, η φωτοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία. Εξ αυτών τα κορτικοστεροειδή είναι η συχνότερα χορηγούμενη τάξη τόσο ως μονοθεραπεία σε πρώιμη νόσο όσο και σαν συμπληρωματική θεραπεία σε πλέον προχωρημένα στάδια. Μέσω ποικίλων μοριακών δράσεων όπως η επαγωγή της απόπτωσης, η παρεμπόδιση της λεμφοκυτταρικής προσκόλλησης στο ενδοθήλιο, η παρεμβολή στην κυτταρική σηματοδότηση και την παραγωγή κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και παραγόντων προσκόλλησης, είναι σε θέση να επάγουν πλήρη ύφεση σε μέρος των ασθενών με πρώιμη MF (63% σε στάδιο T1 και 25% σε στάδιο T2 στη μεγαλύτερη μέχρι στιγμής σχετική προοπτική μελέτη [233]) , η οποία ωστόσο δε διατηρείται μετά τη διακοπή τους. Θετική είναι και η επίδρασή τους στον κνησμό και το ερύθημα επί ερυθροδερμικών CTCLs, αλλά η πιθανότητα συστηματικής απορρόφησης και τοξικότητας επί μακροχρόνιας και εκτεταμένης εφαρμογής δεν πρέπει να λησμονείται [232,229,234]. Ικανοποιητικά αποτελέσματα επιτυγχάνονται και με τη χρήση του αλκυλιωτικού παράγοντα nitrogen mustard (CR: 65% στάδιο IA και 34% στάδιο II σε μεγάλη αναδρομική μελέτη [235]) καθώς και του ρετινοειδούς bexaroten (CR:21% σε ασθενείς σταδίου IA-IIA [236]) κατά την τοπική εφαρμογή τους σε πρώιμη νόσο με ολιγάριθμες βλάβες, αλλά αμφοτέρωτα έχουν συνδεθεί με τοπικό ερεθισμό του δέρματος [232,234].

Η φωτοθεραπεία συνιστά μια ακόμα δημοφιλή τακτική στην αντιμετώπιση της πρώιμης MF και περιλαμβάνει τη χορήγηση 8-μεθόξυψωραλενίου με στόχο την ευαισθητοποίηση του δέρματος στην ακόλουθη ακτινοβολία με UVA ακτινοβολία (PUVA). Η αρχική δόση των  $0,5 \text{ J/cm}^2$  αυξάνεται προοδευτικά, εφαρμοζόμενη τρεις εβδομαδιαίως μέχρι την επίτευξη πλήρους απόκρισης και κατόπιν με σταδιακά ελαττούμενη συχνότητα (ανα 4-6 εβδομάδες) ως θεραπεία συντήρησης [232]. Η ανταπόκριση στην PUVA σε ασθενείς με αρχικά στάδια νόσου (T1a/T2a) αναφέρεται υψηλή, με ποσοστά πλήρους ύφεσης 30%-58% και ποσοστά συνολικής απόκρισης (Overall Response Rates-ORRs) 70%-95% [237,238]. Ωστόσο οι υποτροπές δεν είναι σπάνιες και θα πρέπει να λαμβάνεται η κατάλληλη μέριμνα για τη μη υπέρβαση του μέγιστου ορίου σωρευτικής δόσης ακτινοβολίας ( $1000 \text{ J/cm}^2$  ή 250 θεραπείες) καθώς ο κίνδυνος άλλων δερματικών κακοηθειών, όπως μελανώματος και πλακώδους καρκινώματος αυξάνεται [229,239,240]. Εκτός της UVA διατίθεται και στενού φάσματος υπεριώδης Β ακτινοβολία (NUVB), η οποία λόγω της μικρότερης διεισδυτικότητας της έχει χαμηλότερο ποσοστό ανταπόκρισης και διάρκεια ύφεσης σε ασθενείς με παχύτερες πλάκες κι έτσι στην κλινική πρακτική προτιμάται μόνο σε ασθενείς με κηλίδες. Το προφίλ ασφαλείας είναι καλύτερο εν σχέσει με την PUVA, αλλά θα πρέπει παρομοίως να τηρούνται προφυλάξεις για τον κίνδυνο δερματικής καρκινογένεσης [229].

Τέλος, ακτινοθεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν βρει εφαρμογή και στο πεδίο των CTCLs. Σε μεμονωμένους/εντοπισμένους όγκους ή χρόνιες, εξελκωμένες και επίπονες βλάβες η τοπική ακτινοθεραπεία έχει καλά αποτελέσματα [229,232]. Ακόμα, η TSEB (Total Skin Electron Beam) θεραπεία, μέσω της εφαρμογής ιονίζουσας ακτινοβολίας στο σύνολο της δερματικής επιφάνειας, μπορεί να αποφέρει σημαντική βελτίωση με περιορισμένη όμως διάρκεια και επιλέγεται ιδίως σε ασθενείς με εκτεταμένη, ταχέως εξελισσόμενη ή ανθεκτική/υποτροπιάζουσα νόσο. Ωστόσο η δοσοεξαρτώμενη τοξικότητά της TSEB (ερύθημα, ξηροδερμία, απολέπιση, δυστροφία/απώλεια νυχιών, αλωπεκία, ανιδρωσία, ατροφία/νέκρωση δέρματος) δεν είναι καθόλου αμελητέα και περιορίζει τη δυνατότητα επαναληπτικών συνεδριών, οι οποίες θα πρέπει να πραγματοποιούνται με χαμηλότερες-πλην όμως όχι εξίσου αποτελεσματικές- δόσεις ακτινοβολίας [229,232].

Πέραν των δερματικών θεραπειών ή επι αποτυχίας αυτών, ένας αριθμός συστηματικών παραγόντων έχουν ένδειξη σε ασθενείς με ανθεκτική ή προχωρημένη νόσο. Η χορήγηση από του στόματος ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων όπως τα

ρετινοειδή (bexarotene) και η ιντερφερόνη είναι είναι μια κοινή μονοθεραπεία σε προχωρημένη MF, ενώ μπορούν να δοθούν και σε μικρότερες δόσεις σε συνδυασμό με τοπικές θεραπείες. Το bexarotene στις μελέτες φάσεις II/III και σε ασθενείς με ανθεκτική νόσο σταδίου IIB-IVB επέδειξε ORR 45%, συνδέεται με μείωση του κνησμού, απολέπισης και ερυθήματος επί ερυθροδερμικής MF και SS και η διάμεση διάρκεια ανταπόκρισης αναφέρεται στους 7-9 μήνες. Από την άλλη μεριά η ιντερφερόνη εμφανίζει δραστηριότητα σε όλα τα στάδια με ORRs που κυμαίνονται από 29-80% και CR:4-41% στις διάφορες σειρές ασθενών. Το bexarotene διαθέτει το πλεονέκτημα της εύκολης από του στόματος χορήγησης και των λιγότερο σοβαρών παρενεργειών (εξάνθημα, κεφαλαλγία) σε σχέση με την ιντερφερόνη που χορηγείται υποδορίως και λόγω της κόπωσης, ανορεξίας και διαταραχών της διάθεσης που προκαλεί είναι λιγότερο καλά ανεκτή και ως εκ τούτου προβληματική ως προς τη συμμόρφωση. Ο εργαστηριακός έλεγχος για την ανάδειξη διαταραχών της θυρεοειδικής λειτουργίας και επιπρόσθετα για την αναζήτηση τυχόν υπερτριγλυκεριδαϊμίας (bexarotene) ή κυτταροπενιών (ιντερφερόνη) δεν πρέπει να αμελείται [229,232].

Άλλες συστηματικές θεραπείες περιλαμβάνουν τους αναστολείς αποκετυλάσης των ιστονών (vorinostat, romidepsin), την από του στόματος μεθοτρεξάτη (και την παρόμοια πραλατρεξάτη), την αλεμτουζουμάβη (ιδίως για περιπτώσεις ερυθροδερμικής MF και SS), καθώς και μονοπαραγοντικά (γεμισιταβίνη, λιποσωμική πεγκυλιωμένη δοξορουβικίνη) ή πολύπαραγοντικά (με βάση το συνδυασμό βινκριστίνης, πρεδνιζόνης, δοξορουβικίνης, κυκλοφωσφαμίδης) χημειοθεραπευτικά σχήματα, τα οποία φυλλάσσονται για ιδιαίτερα ανθεκτικές ή ταχέως εξελισσόμενες περιπτώσεις. Τέλος, η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιματοποιητικών κυττάρων, μια θεραπεία που μπορεί μεν να αποφέρει πλήρη ίαση, αλλά συνδέεται με μεγάλη θνητότητα (έως και 30%) εφαρμόζεται σε πολύ επιλεγμένα περιστατικά [229,232].

#### **Κεφάλαιο 4: ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ Τ-ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ**

Παρά την παντελώς διαφορετική κλινική εικόνα, κυτταρική προέλευση και φυσική ιστορία των δύο κατηγοριών λεμφωμάτων που μελετώνται στο παρόν κείμενο, δεν μπορεί παρά να αναγνωριστούν οι ομοιότητες στην παθογένεια των MALT και των T-δερματικών λεμφωμάτων. Καθώς θα αναλυθεί στις επόμενες σειρές, και στα CTCLs πιστεύεται ότι το εναρκτήριο γεγονός δεν είναι άλλο από μια ατελώς

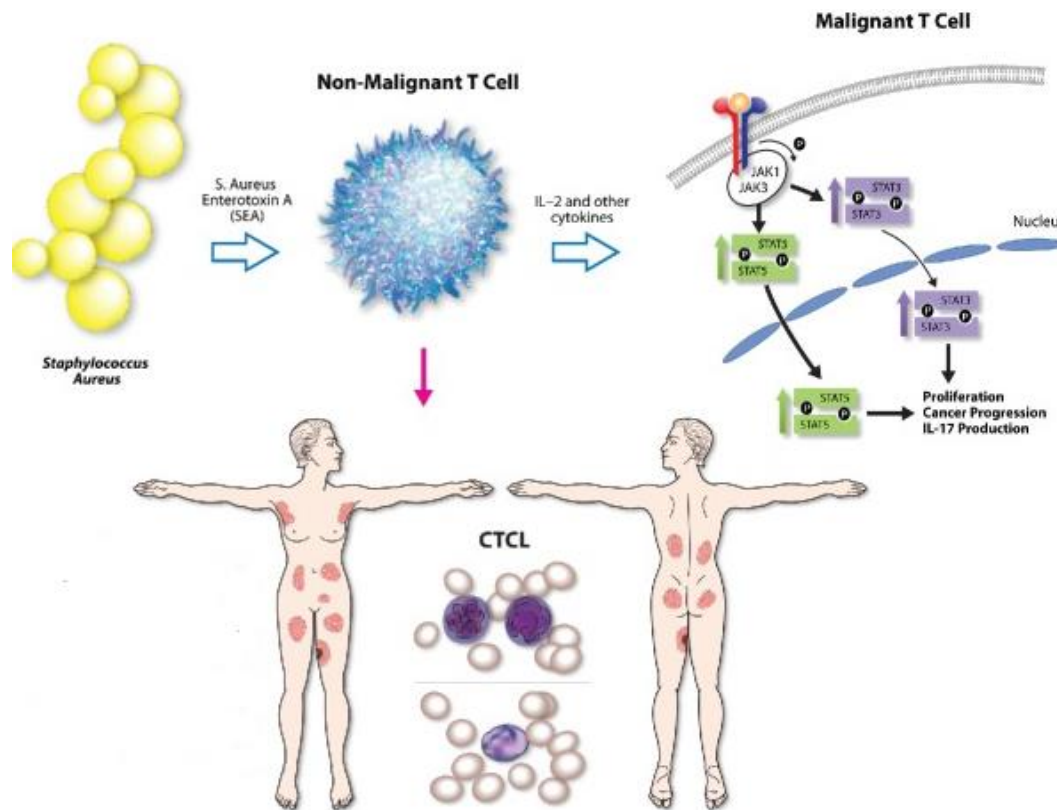
ελεγχόμενη, χρονίζουσα φλεγμονή επάγουσα την ανάπτυξη του κακοκήθους κλώνου, που υπό επιτρεπτική σηματοδότηση και το κατάλληλο χημικό μικροπεριβάλλον δύναται να επικρατήσει και να συσσωρεύσει χρωμοσωμικές και σωματικές μεταλλάξεις ικανές να καθορίσουν τη συμπεριφορά και περαιτέρω εξέλιξή του. Η αδυναμία του ανοσολογικού συστήματος να περιορίσει τον εκτρεπόμενο T-κυτταρικό πληθυσμό ενέχει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεια και πιθανώς καθορίζεται από γενετικές συνιστώσες, κατ'αναλογία με τα MZLs. Σε αντίθεση όμως με τα MZLs, ο όγκος των πειραματικών δεδομένων για τα CTCLs είναι σαφώς πιο περιορισμένος και πολλά ερωτήματα μένει να απαντηθούν σχετικά με την ταυτότητα των εμπλεκόμενων μικροβιακών-περιβαλλοντικών παραγόντων που εκκινούν τη φλεγμονή, τα μόρια που κρατούν το λεμφωματικό πληθυσμό στο δέρμα, τη διευκρίνιση των ανοσολογικών δυσλειτουργιών που επιτρέπουν την επέκτασή του και τέλος των γενετικών πολυμορφισμών που πιθανώς προδιαθέτουν στην εμφάνιση της νόσου.

#### **4.1 CTCL και φλεγμονή**

Η υπόθεση που θέλει την επιμονή της αντιγονικής διέγερσης ως γενεσιουργό αίτιο της νόσου, παρότι υποστηρίζεται από την ιστολογικά διαπιστούμενη ανοσιακή κινητοποίηση, στερείται μέχρι και σήμερα δεδομένων σχετικά με την ταυτότητα των ενεχόμενων αντιγόνων. Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν εξετασθεί στα πλαίσια επαγγελματικής κυρίως έκθεσης, ωστόσο οι μη σταθερές συσχετίσεις και το γεγονός ότι οι πάσχουσες περιοχές βρίσκονται στα κατ'έξοχήν σημεία του δέρματος που είναι προφυλλαγμένα από περιβαλλοντική έκθεση, δυσχεραίνουν την υποστήριξη της θεωρίας αυτής [197,241]. Από μικροβιολογικής σκοπιάς, όπως γράφθηκε και παραπάνω, μελέτες σε διάφορα παθογόνα (HTLV-1, HTLV-2, HIV, HSV-1 και 2, VZV, EBV, CMV, HHV 6, 7, και 8, HCV, πολυομα-ιοί, ενδογενείς ρετροιοί, *C. Pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*) δεν τελεσφόρησαν στην ανάδειξη σταθερών αιτιολογικών σχέσεων [216], χωρίς ωστόσο να λείπουν και κάποιες θετικές αναφορές, που δε στάθηκε δυνατόν να αναπαραχθούν. Αυτό μπορεί ίσως να εξηγηθεί στα πλαίσια της μεγάλης ποικιλίας δερματικών λοιμώξεων που σημειώνονται σε ασθενείς με CTCL, λόγω διαταραχής του δερματικού φραγμού και της ανοσιακής λειτουργίας, με τη μεγάλη αυτή συσσώρευση παθογόνων να καθιστά την αναζήτηση εκείνου που πιθανά ενέχει αιτιολογικό ρόλο δύσκολη. Ένα από τα πιο μελετημένα βακτηριακά μοντέλα είναι αυτό του χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου, ενός κοινού

παθογόνου, μέρους ενίοτε και της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και του πιο κοινού βακτηριακού αποικιστή του πάσχοντος δέρματος επί CTCL [197,241-243]. Μελέτη των Talpur και συνεργατών ανέδειξε την αυξημένη επίπτωση του αποικισμού με *S. aureus* σε ασθενείς με CTCLs και την κλινική βελτίωση τόσο του ερυθροδέρματος όσο και της έκτασης της δερματικής συμμετοχής κατόπιν χορήγησης αντιβιοτικής θεραπείας [244]. Αντίστοιχα προοπτική μελέτη του 2019 σε 8 ασθενείς με προχωρημένου σταδίου νόσο, προτείνει ότι η επιθετική παροδική αντιβιοτική αγωγή μπορεί να μειώσει τη βαρύτητα των κλινικών συμπτωμάτων και να αναχαιτίσει τον πολλαπλασιασμό των κακοηθών T-κυττάρων στο πάσχον δέρμα [245]. Από μοριακής άποψης φαίνεται ότι ο *S. aureus* μπορεί να ενεργοποιήσει τη σηματοδοτική οδό του STAT3 στα κακοήθη κύτταρα και να αυξήσει κατ'επέκταση την έκφραση της IL-17, δράση διαμεσολαβούμενη από τη σταφυλοκοκκική εντεροτοξίνη τύπου A, τη μόνη παρούσα εκ των εντεροτοξινών σε στελέχη απομονωθέντα από δέρμα ασθενών με CTCLs. Η SEA προτείνεται ότι ασκεί τη δράση της έμμεσα μέσω της ενεργοποίησης των μη κακοηθών κυττάρων, που υπερπαράγουν IL-2 και άλλες κυτταροκίνες και η παρακρινής επίδραση των τελευταίων οδηγεί στην επιτρεπτική για την εξέλιξη του κλώνου κινητοποίηση του JAK3/STAT μονοπατιού (εικόνα 17)[246]. Ακόμα, μελέτη του 2019 υποδεικνύει ότι κυτταρικές σειρές από ασθενείς με CTCL εμφανίζουν αυξημένη αντίσταση έναντι της κυτταροτοξικής δράσης της σταφυλοκοκκικής τοξίνης A μέσω υποέκφρασης του ADAM10 και άλλων μηχανισμών, με αποτέλεσμα την επικράτησή τους επί των μη κακοηθών T-κυττάρων παρουσία του σταφυλοκόκκου [247]. Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι η επιβαρυντική δράση του χρυσίζοντος σταφυλόκοκκου ως προς την εξέλιξη της νόσου έχει δειχθεί σε ασθενείς με προχωρημένα στάδια και δεν έχει συνδεθεί με την πρόιμη νόσο ούτε με την αιτιολογία αυτής [243].





**Εικόνα 17:** Προτεινόμενη μοριακή δράση του χρυσίζοντος σταφυλοκκόκου και της εντεροτοξίνης Α αυτού επί του κακοήθους κλώνου [246].

#### 4.2 Ανοσοπαθγένεση-Μικροπεριβάλλον στα CTCLs

Το δερματικό- και ιδιαιτέρως το κυτταροκινικό - μικροπεριβάλλον συνιστά σημαντικό παράγοντα στην εξέλιξη των CTCLs και η σταδιακή μεταβολή στη σύσταση και αναλογία των παρόντων υποπληθυσμών ανοσιακών κυττάρων και των εκκρίσεών τους φαίνεται να συμπορεύεται με την πρόοδο της νόσου [197].

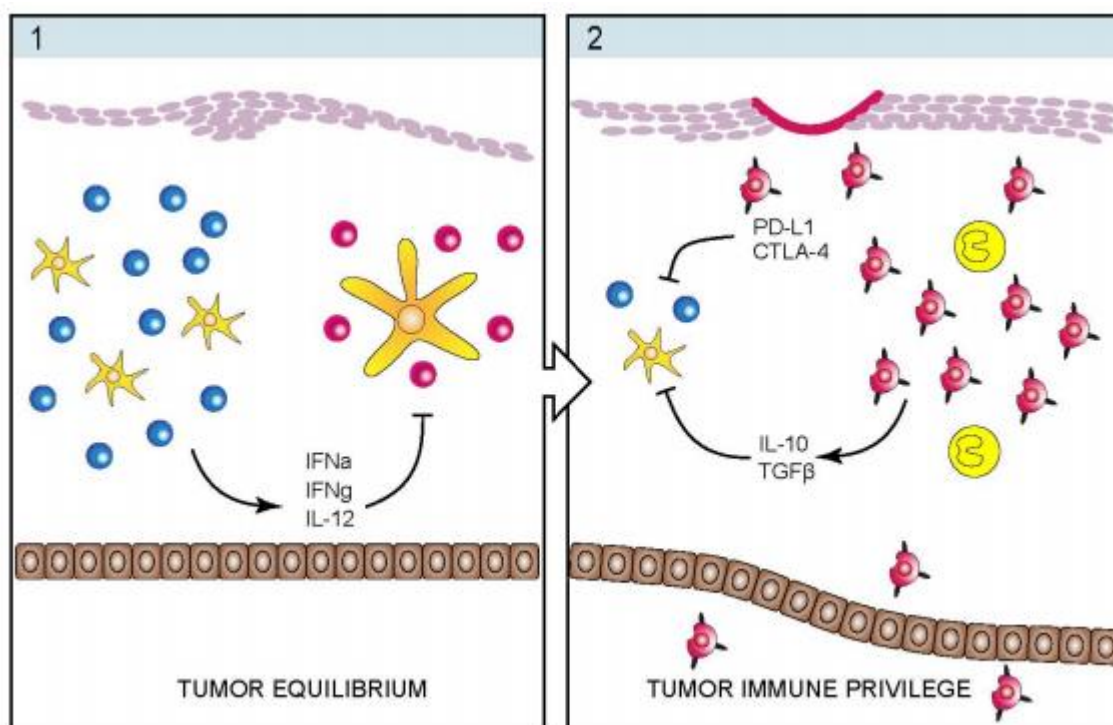
Έτσι στις αρχικών σταδίων βλάβες επικρατούν CD4 T κύτταρα με TH1 φαινότυπο, που φαίνεται να διαθέτουν την ικανότητα να ελέγχουν την ανάπτυξη του λεμφωματικού κλωνου μέσω των επιτρεπτικών για την κυτταροτοξικότητα κυτταροκινών τους. Έχει άλλωστε δείχθει ότι η παρουσία CD8 T κυττάρων εντός των CTCL βλαβών αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα, ενώ αντιθέτως η χρήση της ανασταλτικής για τα CD8 λεμφοκύτταρα κυκλοσπορίνης έχει συνδεθεί με ταχύτερη πρόοδο νόσου και μεγαλοκυτταρικό μετασχηματισμό σε διάφορες αναφορές περιστατικών. Κατά την εξέλιξη του CTCL, το κυτταροκινικό προφίλ ρέπει σταδιακά προς την επικράτηση της TH2 πόλωσης, γεγονός που δυσχεραίνει την αποτελεσματική κυτταρική ανοσία έναντι του όγκου. Στο φαινόμενο αυτό

προτείνεται ότι συνεισφέρουν τα ίδια τα λεμφωματικά κύτταρα μέσω ποικίλων μηχανισμών που αναπτύσσουν για να επιτύχουν την ανοσολογική διαφυγή τους [243,248].

Συγκεκριμένα, σε προχωρημένη νόσο τα κακοήθη κύτταρα έχει δειχθεί να εμφανίζουν αυξημένη έκφραση της BLK (B lymphoid tyrosine kinase), της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2) καθώς και ενεργοποίηση των STAT3 και STAT5 μεταγραφικών παραγόντων που αρχικά τουλάχιστον εξαρτάται από κυτταροκινικά σήματα [248]. Οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT3 και STAT5 επάγουν την έκφραση των TH2 κυτταροκινών και του ογκογόνου miR-155 που με τη σειρά του καταστέλλει την έκφραση του απαραίτητου για την Th1 διαφοροποίηση STAT4 μεταγραφικού παράγοντα [249]. Αυξημένη ανευρίσκεται κι η έκφραση του SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 3), που φαίνεται να προστατεύει τα κακοήθη κύτταρα από την επαγόμενη από την IFN- $\gamma$  αναστολή της ανάπτυξής τους, γεγονός που δυνητικά συνιστά και κλινικό πρόβλημα, δεδομένης της χρήσης της ιντερφερόνης στη θεραπευτική αντιμετώπιση της πάθησης. Ακόμα, μέσω έκφρασης του FOXP3 (Treg φαινότυπος) και του CTLA-4 είναι σε θέση να ελαττώσουν την κυτταροτοξική δράση των φυσιολογικών ανοσιακών κυττάρων. Παρομοίως η επαγόμενη από το STAT3 υπερέκφραση των ανοσοκατασταλτικών IL-10 και TGF $\beta$ , καθώς και η αλληλεπίδραση του PD-1 (programmed death protein 1) και του συνδέτη του PD-L1 που ενέχεται στη επαγωγή και διατήρηση περιφερικής T-κυτταρικής ανοχής, παριστούν δυο ακόμα μηχανισμούς ανοσιακής διαφυγής. Τέλος, η διατήρηση των δενδριτικών κυττάρων σε ανώριμη κατάσταση μέσω της έκκρισης των ρυθμιστικών κυτταροκινών αποτελεί πλέον έκδηλο επιβίωσης για τον εκτρεπόμενο κλώνο που σταδιακά θα αντικαταστήσει τους φυσιολογικούς T-κυτταρικούς πληθυσμούς, επάγοντας ένα status ανοσοανεπάρκειας [243,248].

Με άλλα λόγια, η τροποποίηση της ανοσιακής απάντησης έναντι του λεμφωματικού κλώνου αναγνωρίζεται ως βασικός μοχλός για την πρόοδο της νόσου. Συνοπτικά, σε αρχικά στάδια και σταθερή νόσο, τα δενδριτικά κύτταρα παράγουν IFN $\alpha$ , τα μη λεμφωματικά T- κύτταρα TH1 κυτταροκίνες και τα CD8 T κύτταρα κοκκοένζυμα, επιτυγχάνοντας την κυτταροτοξικότητα έναντι των κακοήθων κυττάρων και τη διαμόρφωση ενός εχθρικού για τον κλώνο περιβάλλοντος που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση του χωρίς όμως να τον εξαλείφει, διατηρώντας ένα στάδιο ισορροπίας. Όσο τα κακοήθη κύτταρα συσσωρεύουν γενετικές αλλαγές, ξεκινούν να εκφράζουν μια σειρά ανοσοτροποποιητικών μορίων και κυτταροκινών,

με αποτέλεσμα να καταστέλλουν τον ανοσολογικό έλεγχο και να επιτυγχάνουν προνομιακές ανοσολογικές συνθήκες για τον όγκο (στάδιο ανοσολογικής υπεροχής του όγκου). Τα κακοήθη T κύτταρα αποδεδμεύονται έτσι από την καταπιεστική ανοσιακή επιτήρηση, πολλαπλασιάζονται κι επάγουν τελικά πλήρη ανοσοκαταστολή (Εικόνα 18) [243].



**Εικόνα 18:** Σχηματική αναπαράσταση της μετάβασης από το στάδιο ισορροπίας στο στάδιο ανοσολογικής υπεροχής του όγκου. Στο στάδιο ισορροπίας (1) τα δενδριτικά και φυσιολογικά T-λεμφοκύτταρα μέσω κυτταροκινών και κυτταροτοξικότητας ελέγχουν τον κακοήθη κλώνο. Στο στάδιο ανοσιακής υπεροχής (2) τα ανοσοτροποποιητικά μόρια που εκκρίνει ο όγκος επιτρέπουν την ανοσολογική διαφυγή τους, πολλαπλασιασμό και επέκτασή του. (Κίτρινο: δενδριτικά κύτταρα, γαλάζιο: μη κακοήθη T κύτταρα, κόκκινο: κακοήθη T κύτταρα) [243].

Μια ακόμα σημαντική παθογενετική πτυχή αφορά τη μετανάστευση και παραμονή ή μη των T-κυττάρων στο δέρμα. Υποστηρίζεται ότι η MF και το SS προέρχονται από διαφορετικά υποσύνολα T-κυττάρων μνήμης με διαφορετική κινητική συμπεριφορά: στην MF προεξάρχουν μη κυκλοφορούντα εκτελεστικά T-κύτταρα μνήμης, ενώ στο SS κεντρικά T-κύτταρα μνήμης, ικανά προς μετακίνηση μεταξύ του δέρματος, των λεμφαδένων και του αίματος [197].

Η εγκατάσταση στο δέρμα (skin homing), φαίνεται να διαμεσολαβείται από την έκφραση διαφόρων παραγόντων προσκόλλησης και χημειοκινών από κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος (ενδοθηλιακά κύτταρα, κύτταρα Langerhans, κερατινοκύτταρα,

δερματικοί ινοβλάστες). Δερματικά T-κύτταρα που απομονώνονται από ασθενείς με CTCL έχει δειχθεί να εκφράζουν το δερματικό λεμφοκυτταρικό αντιγόνο (CLA) και τους υποδοχείς των χημειοκινών CCR4 και CCR10 που αλληλεπιδρούν με τους αντίστοιχους συνδέτες τους σε δερμίδα και επιδερμίδα. Σε αρχικά στάδια, οι χημειοκίνες CXCL9/CXCL10 που εκφράζονται από επιδερμικά κερατινοκύτταρα και ινοβλάστες της δερμίδος επιστρατεύουν χημειοτακτικά τα CXCR3-θετικά T κύτταρα. Ο υποδοχέας CXCR3 ανευρίσκεται κυρίως σε Th1 κύτταρα, σε αντίθεση με τα Th2 κύτταρα όπου υπερέχει η έκφραση των CCR3 και CCR4. Οι συνδέτες του CXCR3 προσελκύουν έτσι Th1 κύτταρα, αλλά ταυτόχρονα εμποδίζουν και τη μετανάστευση των Th2 κυττάρων σε απάντηση προς τους συνδέτες του CCR3 επιτείνοντας την Th1 πόλωση των αρχικών σταδίων. Κατά την πρόοδο όμως της νόσου, τα κύτταρα Langerhans και οι ινοβλάστες εκφράζοντας το CCL17, προσελκύουν CCR4 θετικά Th2 κύτταρα. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι στο στάδιο των όγκων της MF, όπως και στο σύνδρομο Sézary, η έκφραση του CCR7 στα λεμφωματικά κύτταρα συνδέεται με απώλεια του επιδερμοτροπισμού και πρόοδο νόσου με εξωδερματική συμμετοχή [248,250].

Τέλος, ο ρόλος των μακροφάγων και μαστοκυττάρων του μικροπεριβάλλοντος, ο αριθμός των οποίων αυξάνεται στις βλάβες προϊόντος του σταδίου, δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί [248].

### **4.3 Γενετικές ανωμαλίες στα CTCLs –Μοριακά ευρήματα**

Το γενωμικό τοπίο στα CTCLs είναι αρκετά πολύπλοκο και όχι πλήρως κατανοητό, ωστόσο η διαλεύκανσή του μπορεί να παρέχει σημαντική αρωγή τόσο στην πληρέστερη κατανόηση της παθογένειας της νόσου όσο και στην οριοθέτηση θεραπευτικών στόχων [197,251,252].

Τα CTCLs επιδεικνύουν συχνές ελλείψεις στις 10q και 17p περιοχές, διπλασιασμούς της 8q (που περιλαμβάνει το γονίδιο MYC) και 17q περιοχής, καθώς και διαγραφές των TP53 και CDKN2A. Τα γονίδια που εμπλέκονται σε μεταβολές αριθμού αντιγράφων (CNVs: copy number variations) συγκεκριμένων γενωμικών τμημάτων δεν έχουν επαρκώς χαρακτηρησθεί, ενώ σημειακές μεταλλάξεις έχουν αναγνωρισθεί σε γονίδια όπως τα CDKN2A, CDKN2B, DLEU2, KDM6A, TP53, TP63, VAV1, ARID1A, CTCF και DNMT3A [251,252]. Όπως είναι αναμενόμενο από τη λειτουργική, παθογενετική και κλινική τους ετερογένεια, η MF και το SS διαφέρουν αρκετά ως προς η γενωμική τους υπογραφή.

Έτσι, τα πιο συχνά γενωμικά ευρήματα στην MF αφορούν μεγάλες δομικές μεταβολές που δίνουν γένεση σε ένα σύνθετο σύνολο χρωμοσωμικών αναδιατάξεων (διπλασιασμός 7q36, 7q21-7q22, απώλεια 5q13, 9p21). Μεταξύ των γονιδίων που συνηθέστερα αναδιατάσσονται περιλαμβάνονται τα *ARHGAP26*, *ATXN1*, *CLEC16A*, *ELF1*, *EYS*, *RBPJ*, *RPS6KA3*, *SLC24A2*, και *SSH2*, χωρίς να αναγνωρίζεται συμμετοχή αυτών σε κάποιο κοινό λειτουργικό μονοπάτι. Οι διαμεταθέσεις έχουν συχνά ως αποτέλεσμα τη διαγραφή ογκοκατασταλτικών γονιδίων (*ARID1A*, *CDKN2A/B*, *PTPRC*, και *STK11*) με δυσμενές αντίκτυπο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, τη διατήρηση της δομής της χρωματίνης και τη φυσιολογική λειτουργία της PI3K οδού. Τέλος, η διαγραφή JAK-STAT αναστολέων, όπως οι *HNRNPK* και *SOCS1*, οδηγεί σε υπερδραστηριότητα του JAK-STAT μονοπατιού [252].

Στο σύνδρομο Sézary, παρατηρείται διαφορετικό πρότυπο χρωμοσωμικών ανωμαλιών με συχνή διαταραχή των γονιδίων που σχετίζονται με επιγενετικές μεταβολές, τον κυτταρικό κύκλο και την εξαρτώμενη από τον TCR σηματοδότηση. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *PLCG1* ανοδικά του συμπλόκου CBM που περιγράφηκε ανωτέρω (εικόνα 10) δεν είναι σπάνιες, όπως και γενετικές ανωμαλίες που προκαλούν απώλεια της λειτουργίας πρωτεϊνών του επιγενετικού μηχανισμού (οικογένεια ARID/SMARC, μεθυλτρανσφεράσες των ιστονών όπως MLLs και SETD1A/B, απομεθυλάση KDM6B, μεθυλτρανσφεράσες του DNA). Διάφορες CNVs έχουν περιγραφεί που οδηγούν είτε σε απώλεια γονιδίων (*ARID1A*, *DNMT3A*, *A20/TNFAIP3*, *CAAP*, *CDKN2A-CDKN2B*, *PTEN*, *FAS*, *ZEB1*, *NFKB2*, *ATM*, *USP28*, *RBI*, *NCOR1*, *TP53*, *E2A*) είτε σε πολλαπλασιασμό γονιδίων (*TOX*, *MYC*, *PRKCQ*, *STAT5B*). Μεταξύ των συχνότερα υφιστάμενων σημειακές μεταλλάξεις γενετικών τόπων περιλαμβάνονται οι *ATM*, *CARD11*, *DNMT3A*, *KMT2C*, *MLL2*, *JAK3*, *TET1*, *TET2*, *SOCS7*, *STAT3*, *STAT5A*, *STAT5B* και *POT1*. Ακόμα αναγνωρίζονται διαταραχές στην έκφραση miRNAs, όπως η προαναφερθείσα υπερέκφραση του miRNA155, με τις γνωστές προφλεγμονώδεις και προλεμφοματικές του δράσεις δια παρεμβολής στο STAT μονοπάτι, αλλά και η υποέκφραση άλλων miRNAs (π.χ. miR342) που μπορεί να εμπλέκεται στην αναστολή της απόπτωσης. Σε αναλογία με την MF και στο SS η σηματοδοτική οδός JAK-STAT φαίνεται να υπερλειτουργεί, αλλά στο SS αυτό οφείλεται σε άμεσες ενεργοποιητικές μεταλλάξεις (*JAK1*, *JAK3*, *STAT3* και *STAT5B*) και όχι σε απώλεια αναστολέων όπως στην MF [252].

Συνοψίζοντας, μια πληθώρα σωματικών γενετικών μεταβολών που επηρεάζει τη φυσιολογική σηματοδότηση, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την εφαρμογή κατάλληλων επιγενετικών τροποποιήσεων και την απόπτωση συσσωρεύονται σταδιακά στο λεμφωματικό κλώνο και οδηγούν την πρόοδο και εξάπλωση της νόσου. Η κατά τα φαινόμενα καθοριστική εμπλοκή του JAK-STAT μονοπατιού στην παθογένεση επιβάλλει την ενδελεχέστερη μελέτη του μονοπατιού στα πλαίσια της νόσου, που δυνητικά θα επιτρέψει μελλοντικά και την αξιοποίησή του ως θεραπευτικό στόχο [197,249,251,252].

#### **4.4 Βιταμίνη D και CTCLs**

Η βιταμίνη D, πρόδρομο μόριο μιας ισχυρής στεροειδούς ορμόνης, πέρα από την παραδοσιακά αποδιδόμενη δράση της στην ομοιοστασία του ασβεστίου και τον οστικό μεταβολισμό, τα τελευταία χρόνια συγκεντρώνει την ερευνητική προσοχή ως προς την εμπλοκή της σε ανοσιακές διεργασίες και το ρόλο της στην καρκινογένεση. Δεδομένης άλλωστε και της σύνθεσής της στο δέρμα υπό την επίδραση του ηλιακού φωτός, η θέση της ειδικά όσον αφορά τη δερματική καρκινογένεση συνιστά ελκυστικό πεδίο μελέτης [253].

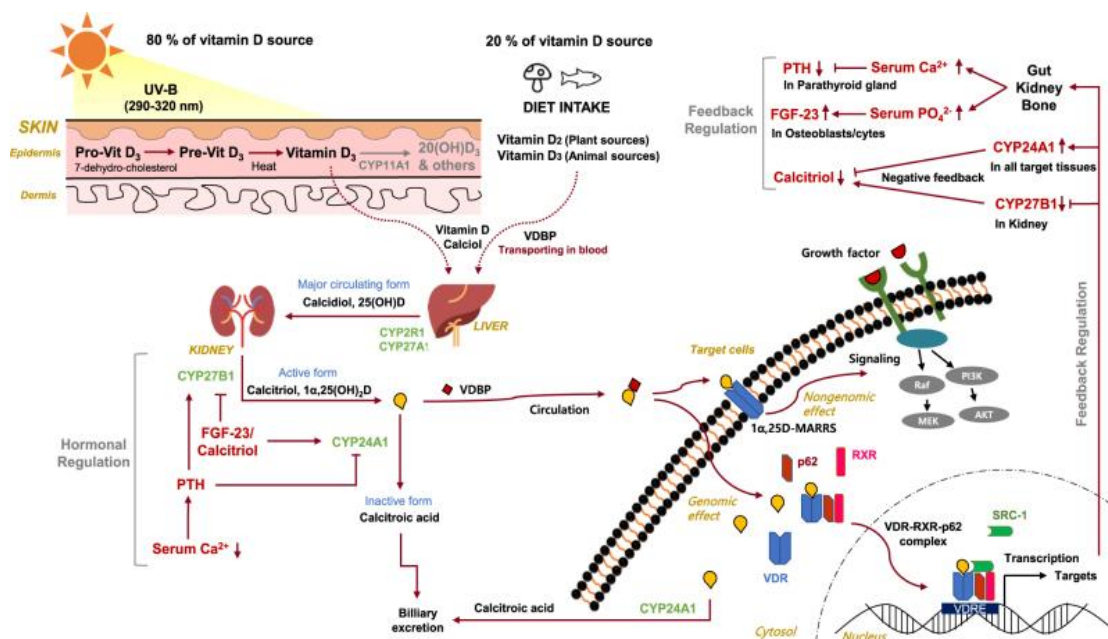
##### **4.4.1 Μεταβολισμός και ρύθμιση βιταμίνης D**

Από βιοχημικής άποψης, αναγνωρίζονται δύο κύριες ισομορφές της βιταμίνης, η βιταμίνη D<sub>2</sub> (εργοκαλσιφερόλη) και η βιταμίνη D<sub>3</sub> (χοληκαλσιφερόλη) [253-255]. Η βιταμίνη D<sub>2</sub> συντίθεται από την εργοστερόλη υπό την επίδραση της UVB ακτινοβολίας σε φυτά και μύκητες και μπορεί να προσληφθεί διαιτητικά με την κατανάλωση φυτικών τροφίμων και ιδίως άγριων ή αποξηραμένων μανιταριών [255]. Αντίθετα η βιταμίνη D<sub>3</sub> συντίθεται από την 7-δευδροχοληστερόλη στην ανθρώπινη επιδερμίδα κατά την έκθεση στη UVB ακτινοβολία, αλλά μπορεί επίσης να παραληφθεί διαιτητικά από ζωικές τροφές, με μεγάλη συγκέντρωση στο μωρουνέλαιο. Η μοναδική ιδιότητα της βιταμίνης να παράγεται τόσο στο δέρμα όσο και να παραλαμβάνεται από τις τροφές αποσκοπεί στη διασφάλιση της επάρκειας στον οργανισμό, με τη δερματική σύνθεση να παριστά την κύρια οδό. Ωστόσο σε χώρες με χαμηλά επίπεδα ηλιοφάνειας η διατητική πρόσληψη είναι η κύρια πηγή και κατά περίπτωση τρόφιμα και ιδιαιτέρως γαλακτομικά παράγωγα μπορεί να εμπλουτίζονται προς το σκοπό τούτο στην εν λόγω βιταμίνη [255].

Ανεξαρτήτως προέλευσης, η βιταμίνη D προσδένεται στη δεσμευτική της πρωτεΐνη (VDBP: Vitamin D-Binding Protein) και δια της κυκλοφορίας μεταφέρεται στο ήπαρ, όπου μεταβολίζεται υπό της υδροξυλάσης της βιταμίνης D (CYP2R1 και CYP27A1) σε 25(OH)D (καλσιδιόλη), την κύρια μορφή στον ορό. Η καλσιδιόλη υφίσταται εν συνεχεία περαιτέρω υδροξυλίωση από την 25(OH)D 1 $\alpha$ -υδροξυλάση (CYP27B1) στο εγγύς σωληνάριο του νεφρού προς 1 $\alpha$ ,25-διυδροξυβιταμίνη D [1 $\alpha$ ,25(OH)2D, καλσιτριόλη], που αποτελεί το πλέον βιολογικά δραστικό μεταβολικό παράγωγο και με τη συνδρομή της VDBP αποδίδεται δια της κυκλοφορίας στους ιστούς-στόχους. Τα επίπεδα τόσο της καλσιδιόλης όσο και της καλσιτριόλης ελέγχονται στενά από την 25(OH)D 24-υδροξυλάση (CYP24A1), μέσω απενεργοποιητικής υδροξυλίωσης στις θέσεις C-24 και C-23, που παράγει το βιολογικά ανενεργό καλσιτροϊκό οξύ το οποίο και αποβάλλεται στη χολή.

Στους ιστούς στόχους η καλσιτριόλη προσδένεται στον υποδοχέα της (VDR: Vitamin D receptor), ο οποίος διαμεσολαβεί μια σειρά δράσεων τόσο γενωμικής όσο και μη γενωμικής ρύθμισης διαφόρων καθοδικών στόχων. Στη γενωμική οδό, η καλσιτριόλη προσδενόμενη στον κυτταροπλασματικό VDR, επάγει τη φωσφορυλίωσή του, τον ετεροδιμερισμό του με τον υποδοχέα ρετινοειδών (retinoid-X receptor-RXR), και τη μετακίνηση του συμπλόκου στον πυρήνα, όπου η σύνδεση με το VDRE (vitamin D response element) στον υποκινητή των γονιδίων στόχων εξασφαλίζει την κατάλληλη μεταγραφική τους ρύθμιση. Στη μη γενωμική οδό, η σύνδεση καλσιτριόλης-VDR στη μεμβράνη πυροδοτεί ταχείες αλλαγές σε σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό των MAPK κινασών [253].

Η ρύθμιση της βιταμίνης D επιτυγχάνεται στο επίπεδο της υδροξυλίωσης μέσω τροποποίησης της έκφρασης των εμπλεκόμενων ηπατικών και νεφρικών υδροξυλασών. Ειδικότερα, η παραθορμόνη εκκρινόμενη από τους παραθυρεοειδείς αδένες σε απόκριση σε χαμηλά επίπεδα ασβεστίου, επάγει τη νεφρική έκφραση του CYP27B και παράλληλα επιταχύνει την αποδόμηση του CYP24A mRNA, με συνέπεια την αύξηση της καλσιτριόλης και επομένως του ασβεστίου στον ορό. Αντιθέτως, ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF-23), ο οποίος παράγεται από οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα παρουσία υψηλών επιπέδων φωσφόρου και καλσιτριόλης στον ορό, δύναται να αναστέλλει την έκφραση του CYP27B1 και να επάγει αυτή του CYP24A1. Τέλος, η ίδια η καλσιτριόλη στα πλαίσια αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης, ενισχύει τη μεταγραφή του γονιδίου CYP24A μέσω των δύο VDRE που αυτό φέρει στην περιοχή του υποκινητή του (εικόνα 19) [253].



Εικόνα 19: Μεταβολισμός και ρύθμιση της βιταμίνης D [253].

#### 4.4.2 Δράσεις βιταμίνης D- Αντινεοπλασματικές ιδιότητες

Η κύρια δράση της καλσιτριόλης αφορά στη βελτιστοποίηση της εντερικής απορρόφησης του ασβεστίου και δευτερευόντως στην αύξηση της νεφρικής επαναπορρόφησης του και της κινητοποίησής του από τον οστίτη ιστό. Η διακυτταρική μεταφορά του ασβεστίου από τον εντερικό αυλό στην κυκλοφορία, σε αντίθεση με την παθητική παρακυτταρική μεταφορά, είναι μια διεργασία ενεργητική και αυστηρώς ρυθμιζόμενη. Σε αυτό το πλαίσιο, αναγνωρίζονται αρκετές βιταμίνη-D-εξαρτώμενες πρωτεΐνες μεταφοράς στα εντεροκύτταρα, όπως ο διάυλος ασβεστίου TRPV6 (Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6) στην κορυφαία πλευρά ή οι πρωτεΐνες ανταλλαγής κατιόντων PMCA1b και NCX1, στη βασική πλευρά του κυττάρου. Η βιταμίνη D είναι έτσι απαραίτητη για την διαιτητική πρόσληψη του ασβεστίου, η οποία απουσία επαρκών ποσοτήτων καλσιτριόλης δεν ξεπερνά το 10%-15% και μπορεί να οδηγήσει σε κλινική εικόνα οστεομαλακίας ή ραχίτιδος στα παιδιά [256].

Ωστόσο, πέραν του παραδοσιακού αυτού ρόλου της καλσιτριόλης στην ομοιοστασία του ασβεστίου, ένα μεγάλο πλήθος ερευνητικών δεδομένων συντείνει προς την αναγνώριση και άλλων σημαντικών δράσεων της ορμόνης σε ποικίλα συστήματα, συμπεριλαμβανομένων του καρδιαγγειακού και ανοσοποιητικού. Επιδημιολογικές και εργαστηριακές μελέτες, με χρήση και ζωικών μοντέλων, έχουν έτσι προτείνει



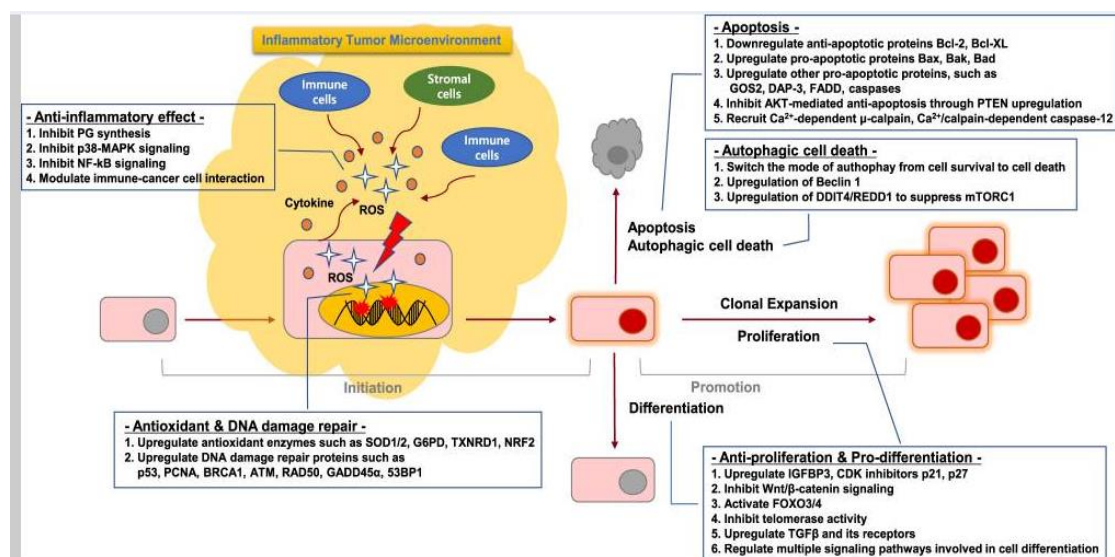
εμπλοκή της καλσιτριόλης στην παθογένεση λοιμώξεων (π.χ. φυματίωση), αυτοάνοσων νόσων (διαβήτης, πολλαπλή σκλήρυνση, ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, ρευματοειδής αρθρίτις κ.ά), της υπέρτασης καθώς και διαφόρων όγκων (πίνακας 18)[253,254,256,257].

Πάθηση	Ισχύς δεδομένων
Οστεοπόρωση	+++
Διαβήτης τύπου 1	+
Καρκίνος	+++
Αυτοάνοσες νόσοι	+
Υπέρταση	++
Περιοδοντική νόσος	+++
Ευαλωτότητα/φτωχή άμυνα απέναντι σε λοιμώξεις	+++
Οστεοαρθρίτιδα	+

**Πίνακας 18:** Παθήσεις των οποίων η εκδήλωση ή η πρόοδος συσχετίζεται επιδημιολογικά με την ανεπάρκεια της βιταμίνης D(+++: ισχυρά δεδομένα που περιλαμβάνουν μία ή περισσότερες τυχαιοποιημένες μελέτες, ++: ισχυρές και σταθερές επιδημιολογικές συσχετίσεις χωρίς στοιχεία από τυχαιοποιημένες μελέτες, +: λιγότερο ισχυρά δεδομένα που υποδηλώνουν κάποια συσχέτιση) [254]

Ειδικά όσον αφορά την ογκογένεση, η καλσιτριόλη προτείνεται ότι ενέχεται σε όλα τα στάδια από την έναρξη της νόσου, την αλληλεπίδραση με το μικροπεριβάλλον έως την επέκταση και τη μετάσταση, μετέχοντας σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την αυτοφαγία, την αγγειογένεση και τη φλεγμονή [253]. Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της φαίνεται ότι εξυπηρετούνται από διάφορες οδούς, όπως διά της αναστολής της κυκλοξυγενάσης-2 και των προσταγλανδινών, της αρνητικής ρύθμισης των σηματοδοτικών μονοπατιών του NF-kb και των MAP κινασών και της ανοσιακής αλληλεπίδρασης καρκινικών κυττάρων και μικροπεριβάλλοντος. Ακόμα η καλσιτριόλη δύναται να προστατέψει την ακεραιότητα του DNA τόσο μέσω αύξησης των αντιοξειδωτικών ενζύμων όσο και των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA. Παράλληλα, οι ανασταλτικές για τον πολλαπλασιασμό και ευνοικές για τη διαφοροποίηση του κυττάρου ιδιότητες της βιταμίνης D έχουν προφανή θετικά αποτελέσματα στον έλεγχο ενός νεοπλασματικού πληθυσμού, όπως άλλωστε και η ικανότητα της να παρεμβαίνει στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μέσω

κατάλληλης ρύθμισης της ισορροπίας προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και σημάτων σχετιζόμενων με την αυτοφαγία (εικόνα 20) [253].



**Εικόνα 20:** Προτεινόμενες αντινεοπλασματικές δράσεις της βιταμίνης D, μέσω παρεμβολής στη φλεγμονή, την επιδιόρθωση του DNA, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και την αυτοφαγία [253].

Όμως, παρά τα παραπάνω ενδιαφέροντα μοριακά δεδομένα σχετικά με την αντινεοπλασματική δράση της βιταμίνης D, στοιχεία από μεγάλης κλίμακας τυχαιοποιημένες μελέτες οι οποίες να εξετάζουν τη σχέση μέτριων ή υψηλών δόσεων θεραπείας αναπλήρωσης με πρωτογενές καταληκτικό σημείο την εμφάνιση όγκου είναι σπάνιες στη βιβλιογραφία [258]. Μεταanalύσεις μικρότερων τυχαιοποιημένων μελετών υποδεικνύουν ισχυρότερη σύνδεση της καλσιτριόλης με τη θνητότητα του καρκίνου, παρά με την εμφάνισή του [259], ενώ η αμερικάνικη ομάδα εργασίας για τις υπηρεσίες πρόληψης κατέληξε ότι τα υπάρχοντα στοιχεία δεν επαρκούν για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της λήψης βιταμίνης D για την πρόληψη της καρκινογένεσης [260]. Σημαντική προσθήκη στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, υπήρξε μια μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη στις ΗΠΑ, στην οποία μετείχαν 25.871 άτομα με διάμεση παρακολούθηση 5,3 ετών και όπου η ομάδα που ελάμβανε βιταμίνη D δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην εμφάνιση διεισδυτικών όγκων σε σχέση με την ομάδα που ελάμβανε placebo, με μια ανευρεθείσα κατά την post-hoc ανάλυση πιθανή προστασία όσο αφορά τον συνολικό αριθμό θανάτων από καρκίνο [258]. Περαιτέρω μελέτες με διαφορετικές δοσολογίες και σε διαφορετικούς πληθυσμούς

μπορεί μελλοντικά να βοηθήσουν στον καθορισμό της θέσης της βιταμίνης D σε παρεμβάσεις ογκολογικής πρόληψης ή θεραπείας.

#### **4.4.3 Δράση της βιταμίνης D επί των φυσιολογικών T λεμφοκυττάρων**

Τα T-λεμφοκύτταρα συνιστούν άμεσους στόχους της βιταμίνης D, αλλά ρυθμίζονται εξ αυτής και κατά τρόπο έμμεσο, μέσω της δράσης της στα δενδριτικά κύτταρα και B λεμφοκύτταρα [261]. Τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα VDR σε υψηλά επίπεδα που φθάνουν στο μέγιστο 48 ώρες μετά την ενεργοποίηση. Αντίστοιχη αύξηση παρατηρείται και στην έκφραση του CYP27B1, ενώ μετά από παρατεταμένη και επαναλαμβανόμενη έκθεση σε καλσιτριόλη σημειώνεται και μετρίου βαθμού αύξηση στην έκφραση του CYP24A1 [261,262]. Με άλλα λόγια τα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα είναι σε θέση τόσο να μετατρέψουν την 25(OH)D3 σε καλσιτριόλη, όσο και να απενεργοποιήσουν την τελευταία υδροξυλιώνοντάς την σε 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D3, ενώ εκφράζουν και τον υποδοχέα που θα μεσολαβήσει τις δράσεις της [261].

Οι διάφοροι υποπληθυσμοί T-λεμφοκυττάρων φαίνεται να απαντούν διαφορετικά στην επίδραση της καλσιτριόλης. Έτσι τα CD45RO<sup>+</sup>, όχι όμως και τα CD45RA<sup>+</sup>, T-κύτταρα ελαττώνουν το ρυθμό του πολλαπλασιασμού τους ενώ αμφότερα αναστέλλουν την παραγωγή IFN- $\gamma$  και IL-2 [263]. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η έκθεση σε καλσιτριόλη ελαττώνει την έκκριση IFN- $\gamma$  και IL-10 στα T-κύτταρα κατά την ενεργοποίησή τους ή 2 μέρες μετά, οπότε και μεγιστοποιείται η παρουσία του VDR, επίδραση που για να διατηρηθεί σε μακροχρόνια καλλιέργεια απαιτεί επαναλαμβανόμενη ανά 48 ώρες έκθεση των κυττάρων σε καλσιτριόλη [262]. Ο VDR αναφέρεται ότι συμμετέχει στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού και της σύνθεσης κυτταροκινών στα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα, με knock-out του υποδοχέα να σχετίζεται με αυξημένο πολλαπλασιασμό και παραγωγή IFN- $\gamma$  και IL-17 [264]. Αντιστοίχως τα CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-κύτταρα παρουσία καλσιτριόλης μειώνουν την έκκριση των προφλεγμονοδών μορίων IFN- $\gamma$ , IL-17 και IL-21 και αυξάνουν την έκφραση των CTLA-4, FoxP3 και IL-10, αλλά δε φαίνεται να διαφοροποιούν σημαντικά τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους. Υπό την ταυτόχρονη επίδραση όμως της καλσιτριόλης και της IL-2, τα κύτταρα αυτά επέδειξαν ικανότητα ανάλογη αυτής των ρυθμιστικών T-κυττάρων στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των παρακείμενων CD4<sup>+</sup> T κυττάρων [265]. Καθώς φαίνεται, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την καλύτερη κατανόηση των δράσεων της βιταμίνης D στα

φυσιολογικά T-λεμφοκύτταρα, κάτι που πιθανώς θα βοηθήσει στη διαλεύκανση του ρόλου της- άμεσου και έμμεσου (δια του μικροπεριβάλλοντος)- και επί των λεμφωματικών πληθυσμών.

#### **4.4.4 Βιταμίνη D και δερματική καρκινογένεση**

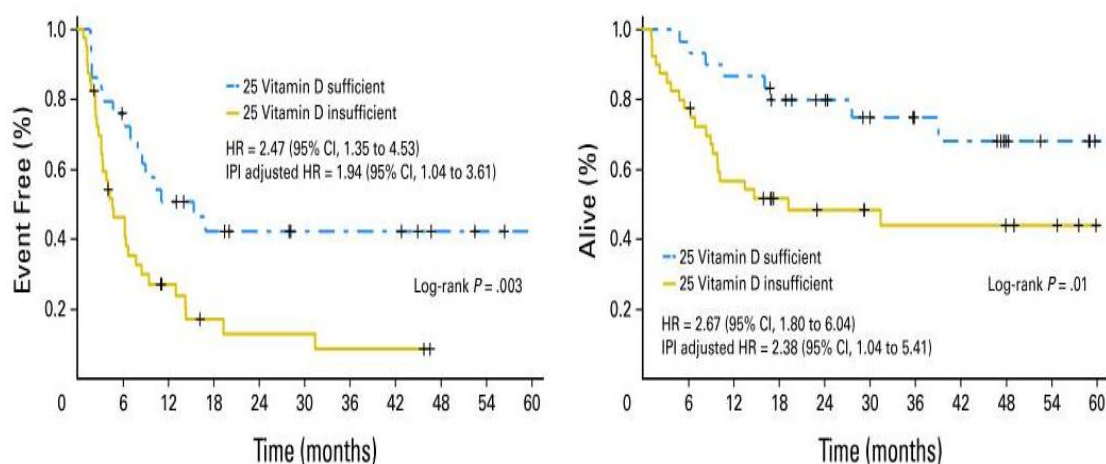
Όπως είναι αναμενόμενο, δεδομένης της δερματικής της σύνθεσης και των πλειοτρόπων αντινεοπλασματικών και ανοσοτροποποιητικών δράσεων της, η βιταμίνη D και η εμπλοκή της στην ανάπτυξη δερματικών όγκων, συγκεντρώνει τελευταία ερευνητικό ενδιαφέρον.

Έτσι, σε γενικές γραμμές μπορεί να λεχθεί πως η βιταμίνη D πιθανώς επιδεικνύει κάποιο ρόλο όσον αφορά την πρόληψη του μελανώματος και των λοιπών δερματικών καρκίνων (nonmelanoma skin cancer-NMSC), με τη σχετική συνεισφορά της διαίτας, των θεραπειών αναπλήρωσης και της δερματικής σύνθεσης να απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Άλλωστε τα κύρια στοιχεία που υποστηρίζουν μια τέτοια υπόθεση προέρχονται από μελέτες *in vitro* ή σε ζωικά μοντέλα, ενώ οι επιδημιολογικές μελέτες στον άνθρωπο συχνά αναφέρουν αντικρουόμενα αποτελέσματα, που ίσως αντικατοπτρίζουν τη δυσχέρεια διάκρισης του θεμιτού επιπέδου ηλιακής έκθεσης που επιτρέπει μεν την επάρκεια της βιταμίνης D, αλλά δεν επιβαρύνει το δέρμα με την καρκινογόνο δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας [266].

Η ρυθμιστική δράση της βιταμίνης D επί του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων, καθώς και οι φωτοπροστατευτικές της ιδιότητες μέσω αύξησης έκφρασης επιδιορθωτικών ενζύμων σε αυτά, έχουν τεκμηριωθεί *in vitro*. Τα κύτταρα των βασικοκυτταρικών και επιθηλιακών καρκίνων εκφράζουν και αυτά τον VDR του οποίου η απουσία σε knock-out ποντίκια που εκτίθενται σε καρκινογόνους χημικούς παράγοντες ή ακτινοβολία, συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης των δύο αυτών νόσων. Η 1,25(OH)<sub>2</sub>D αναστέλει την ανάπτυξη των κερατινοκυτταρικών καρκινωμάτων *in vitro*, αλλά τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών δεν έχουν παράξει σταθερά αποτελέσματα, ικανά να επιβεβαιώσουν και κλινικά την πιθανή προληπτική αξία των επαρκών επιπέδων καλσιτριόλης σε αυτό το κλινικό πλαίσιο [266].

Ανάλογη είναι η ερευνητική συγκομιδή και στο πεδίο του μελανώματος. Και σε αυτή την περίπτωση τα ευρήματα σε εργαστηριακό επίπεδο είναι ενθαρρυντικά: η έκφραση του VDR τεκμηριώνεται σε καλλιέργειες κυττάρων και πρωτογενή μελανωματικό ιστό, περιγράφεται δράση τη καλσιτριόλης κατασταλτική για τον πολλαπλασιασμό,

την αγγειογένεση και τη μετανάστευση των κακοηθών κυττάρων, ενώ γενετικοί πολυμορφισμοί του VDR αναφέρονται ως προδιαθεσικοί για την εκδήλωση της νόσου. Ωστόσο κι εδώ οι ανάλογες επιδημιολογικές μελέτες αδυνατούν κατά τρόπο σταθερό να επαληθεύσουν σε κλινικό επίπεδο την πιθανολογούμενη προστατευτική δράση της βιταμίνης D στον κίνδυνο εμφάνισης ή υποτροπής του μελάνωματος [266]. Ειδικά για τα CTCLs τα δεδομένα είναι αρκετά περιορισμένα. Σε μελέτη 311 ασθενών με CTCL, η συγκέντρωση της βιταμίνης D στον ορό βρέθηκε ανεπαρκής στο 77%, σε ποσοστά συγκρίσιμα με άλλους καρκίνους. Μάλιστα, η φαρμακευτική διόρθωση της ανεπάρκειας δε φάνηκε να επηρεάζει την απόκριση στη θεραπεία [214]. Από την άλλη πλευρά μελέτη με 983 νεοδιαγνωσθέντες ασθενείς με NHL απεκάλυψε χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D στο 44% αυτών, κάτι που μάλιστα συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση ελεύθερη συμβαμάτων και ολική επιβίωση στις υποομάδες των DLBCL και T-λεμφωμάτων (70 ασθενείς, εικόνα 21) [267]. Τέτοιες συσχετίσεις έχουν άλλωστε βρεθεί και για άλλες αιματολογικές κακοήθειες, όπως για τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και το οζώδες λέμφωμα, ενώ η καλύτερη πορεία των DLBCL ασθενών με επάρκεια βιταμίνης κατά τη θεραπεία με ριτουξιμάβη εγείρει εύλογες θεραπευτικές σκέψεις περί της αναγκαιότητας φαρμακευτικής αναπλήρωσης σε ευρισκόμενους υπό θεραπεία αιματολογικούς ασθενείς [261].



**Εικόνα 21:** Καμπύλες Kaplan-Meier για την έλλειψη βιταμίνης D και την επιβίωση ελεύθερη συμβαμάτων και την ολική επιβίωση σε 70 ασθενείς με T-λέμφωμα (HR: Hazard Ratio, IPI: International Prognostic Index) [267]

Σε κυτταρικό τώρα επίπεδο, αξίζει να αναφερθεί ότι τα λεμφωματικά κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα VDR, όπως δείχθηκε τόσο σε κύτταρα ασθενών όσο και στις CTCL κυτταρικές σειρές MyLa, HuT 78, HH και SeAx. Ακόμα, η βιταμίνη D σε συγκέντρωση 100nmol/l μόνη και σε συνδυασμό με becharotene φάνηκε να επάγει απόπτωση στα λεμφωματικά κύτταρα, φαινόμενο αρκετά ασθενέστερο όταν η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση μειωνόταν σε 33 nmol/l, σε επίπεδα δηλαδή που προσωμοιάζουν ανεπάρκεια. Τέλος, αν και αφ'εαυτής δεν ήταν ικανή να επιβραδύνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων της σειράς MyLa, η βιταμίνη D σε συνδυασμό με becharotene ήταν σε θέση να το επιτύχει και μάλιστα αποτελεσματικότερα απ' ό,τι το becharotene μόνο του [268]. Μια τέτοια παρατήρηση θα μπορούσε να έχει και κλινικές προεκτάσεις δεδομένης της χρήσης του becharotene στην αντιμετώπιση των CTCL. Η αξία της αναπλήρωσης της βιταμίνης D σε αυτή την υποομάδα ασθενών χρήζει σαφώς περαιτέρω διερεύνησης, ως ένας σχετικά εύκολος και ασφαλής τρόπος πιθανής βελτίωσης της θεραπευτικής έκβασης [261,268]

#### **4.4.5 Ανεπάρκεια βιταμίνης D – Εργαστηριακή διάγνωση, επίπτωση, κλινικές συστάσεις**

Ο πλέον διαδεδομένος βιοδείκτης για την εκτίμηση της επάρκειας της βιταμίνης D είναι η μέτρηση της 25-υδροξυ-βιταμίνης D στον ορό, η οποία αντανακλά τόσο τη δερματική σύνθεση όσο και τη διατροφική πρόσληψη και συσχετίζεται αφενός με την ενεργή μορφή της βιταμίνης, αφετέρου με τα επίπεδα της παραθορμόνης στον ορό. Από εργαστηριακής άποψης η μέτρησή της 25(OH)D προτιμάται σε σχέση με αυτήν της 1.25.(OH)<sub>2</sub>D, καθώς η πρώτη εμφανίζει μεγαλύτερη διάρκεια ημίσειας ζωής (2-3 εβδομάδες έναντι 15 ωρών αντίστοιχα) και υψηλότερες συγκεντρώσεις στον ορό (25-200 nmol/L έναντι 50-150 pmol/L). Άλλωστε στις περισσότερες περιπτώσεις έλλειψης της βιταμίνης D, τα επίπεδα της 1.25.(OH)<sub>2</sub>D είναι εντός των φυσιολογικών ορίων, λόγω των επιδρώντων ομοιοστατικών μηχανισμών. Σε ειδικές κλινικές περιπτώσεις, όπου κάποια διαταραχή του μεταβολισμού της βιταμίνης D επηρεάζει μεν την παραγωγή της 1α,25(OH)<sub>2</sub>D, αλλά δεν αντικατοπτρίζεται σε μεταβολές στα επίπεδα της 25(OH)D, ο προσδιορισμός της 1.25.(OH)<sub>2</sub>D έχει διαγνωστικό νόημα. Τέτοιες περιπτώσεις, αφορούν συνηθέστερα ανεπάρκεια της 1α υδροξυλάσης, με κύρια αιτία τη νεφρική ανεπάρκεια, περιπτώσεις εξωνεφρικής παραγωγής 25 (OH)<sub>2</sub>D που εκδηλώνονται με υπερασβαστιαμία, όπως επί κοκκιωματώδων νόσων, καθώς

και σπανιότερες γενετικές παθήσεις, όπως σύνδρομα μεταλλάξεων του VDR με μειωμένη ή απύσχα απαντητικότητα προς την 1.25.(OH)<sub>2</sub>D και γενετικά υποφωσφοραιμικά σύνδρομα. Η συνήθης μέθοδος προσδιορισμού και των δύο μορφών της βιταμίνης D, είναι η εφαρμογή ανταγωνιστικών ανοσοχημικών τεχνικών χημειοφωταύγειας, με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και την υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) να περιορίζονται προς το παρόν κυρίως σε ερευνητικές εφαρμογές [269].

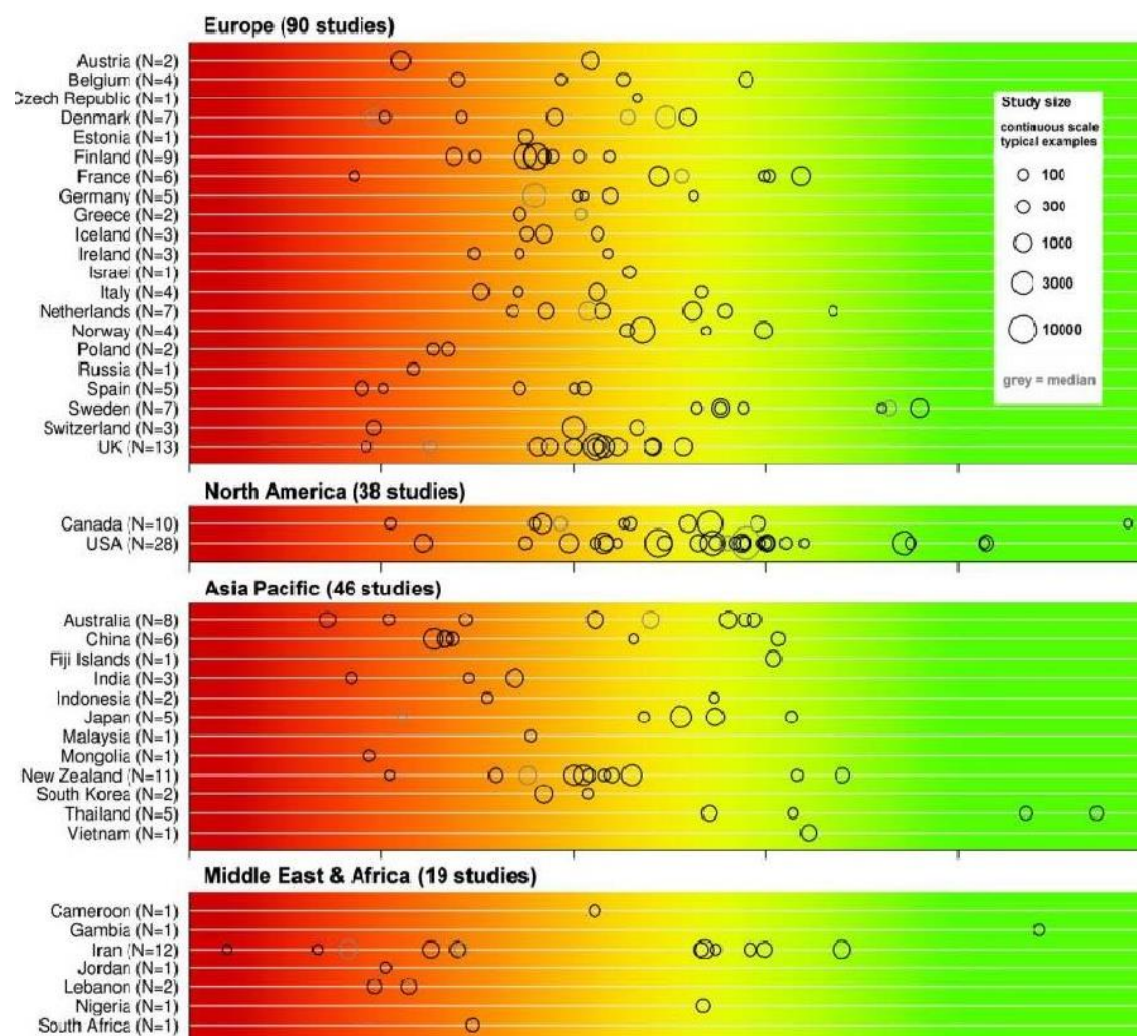
Θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν ότι τα επίπεδα της βιταμίνης D στον ορό επηρεάζονται από μια σειρά δημογραφικών και περιβαλλοντικών μεταβλητών. Έτσι το γεωγραφικό πλάτος, η εποχή του έτους, οι συνήθειες ένδυσης και ηλιοπροστασίας, ο τύπος της εργασίας (υπαίθρια ή μη), η φυλή (χρώμα δέρματος) επηρεάζουν σημαντικά την έκθεση στη UVB ακτινοβολία και κατά συνέπεια τη σύνθεση της βιταμίνης στο δέρμα. Ακόμα, ο δείκτης μάζας σώματος, η ηλικία και το φύλο φαίνεται επίσης να επιδρούν επί της συγκέντρωσης της βιταμίνης D στον ορό, με την παχυσαρκία, την προχωρημένη ηλικία και το γυναικείο φύλο να συσχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα. Τέλος, γενετικοί παράγοντες έχουν αναγνωρισθεί, ωστόσο η σχετική συνεισφορά τους στον καθορισμό των επιπέδων της βιταμίνης D είναι μικρή. Επιβάλλεται φυσικά να αναφερθεί εκ νέου και η σημαντική συμβολή των διατητικών συνηθειών και της κατανάλωσης εμπλουτισμένων τροφίμων στην επίτευξη επάρκειας [269].

Όσον αφορά τα επιθυμητά επίπεδα της βιταμίνης D, δεν υπάρχει σήμερα ομοφωνία για τα ιδανικά επίπεδα της σε σχέση με την επίδρασή της στη σκελετική υγεία. Δύο απόψεις κυριαρχούν στη διεθνή βιβλιογραφία, αυτή του Institute of Medicine (IOM) [270] των ΗΠΑ, το οποίο συστήνει ως κατώτερο φυσιολογικό όριο τα 20 ng/ml ή 50 nmol/l (1 ng/ml 25(OH)D = 2.5 nmol/l) και εκείνη της ενδοκρινολογικής εταιρείας των ΗΠΑ [271], η οποία συνιστά τα 30 ng/ml (Πίνακας 19) [269].

Επίπεδα βιταμίνης D	Όρια IOM,WHO,EFSA	Όρια Ενδοκρινολογικής Εταιρείας των ΗΠΑ
Μεγάλη έλλειψη		< 10
Έλλειψη	< 10	<20
Ανεπάρκεια	10-20	20-30
Επάρκεια	20-40	30-50
Τοξικότητα	>100	>100

**Πίνακας 19:** Κατηγορίες των επιπέδων της βιταμίνης D, 25(OH)D σε ng/ml. (IOM: Institute of Medicine (USA), WHO: World Health Organization, EFSA: European Food Safety Authority) [269]

Η έλλειψη ομοφωνίας για τα φυσιολογικά όρια της βιταμίνης D, σε συνδυασμό με την ανομοιογένεια στις χρησιμοποιούμενες τεχνικές μέτρησης, καθιστούν δυσχερή και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων διαφόρων επιδημιολογικών μελετών παρατήρησης που έχουν διεξαχθεί για την αξιολόγηση της έκτασης του προβλήματος της ένδειας βιταμίνης D σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές (εικόνα 22) [255,269].



**Εικόνα 22:** Επιδημιολογικές μελέτες καθορισμού των μέσων/διάμεσων επιπέδων βιταμίνης D σε διάφορες χώρες. (κόκκινο:μεγάλη έλλειψη, πορτοκαλί: έλλειψη, κίτρινο: ανεπάρκεια,πράσινο: επάρκεια, μύρροι κύκλοι: μέσες τιμές, γκρι κύκλοι: διάμεσες τιμές, μέγεθος κύκλων: αριθμός συμμετεχόντων) [255]

Ωστόσο, ιδιαίτως άξια λόγου είναι μεγάλη μελέτη στις ΗΠΑ (National Health and Nutrition Examination Survey-NHANES), όπου σε 15.652 συμμετέχοντες >1 έτους καταγράφηκε μέση συγκέντρωση 25(OH)D 58.3 nmol/L (μαύρη φυλή:46.6 nmol/L, λευκή φυλή:75.2 nmol/L) μέσω υγρής χρωματογραφίας (LC-MS/MS). Το 36.8% του μελετούμενου πληθυσμού είχε συγκέντρωση κάτω από 50 nmol/L (20 ng/ml) [272].



Αντίστοιχα δεδομένα από την Ευρώπη, αντανακλούν παρόμοια προβλήματα ένδειας. Η χρήση προτυποποιημένων μετρήσεων με βάση το VDSP (Vitamin D Standardisation Program) από 18 μελέτες στην ευρωπαϊκή ένωση (συμπεριλαμβανομένων 2 ελληνικών), έδειξε ότι το 17,7% των 55.844 συμμετεχόντων είχε επίπεδα βιταμίνης D <30nmol/L κατά τους χειμερινούς μήνες, ενώ το 40,4% εμφάνιζε επίπεδα <50 nmol/L (20ng/ml) [273]. Προκαλεί ωστόσο εντύπωση ότι οι ευρισκόμενες σε υψηλότερο γεωγραφικό πλάτος Βορειοευρωπαϊκές χώρες, παρουσιάζουν υψηλότερα μέσα επίπεδα βιταμίνης D στο γενικό πληθυσμό σε σχέση με τις νοτιοευρωπαϊκές, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται ως “Μεσογειακό παράδοξο” και πολλαπλές εξηγήσεις έχουν προταθεί για την αιτιολόγησή του. Έτσι, ο εμπλουτισμός των τροφίμων και η αυξημένη κατανάλωση λιπαρών ψαριών σε συνδυασμό με τον κατά κανόνα ανοιχτόχρωμο τύπο δέρματος των βορειότερων Ευρωπαίων φαίνεται να παριστούν προστατευτικούς παράγοντες. Αντιθέτως, το σκούρο δέρμα, η αποφυγή έκθεσης στον ήλιο τις μεσημβρινές ώρες (όταν η UVB ακτινοβολία μεγιστοποιείται) λόγω υψηλών θερμοκρασιών και τακτικών πρόληψης του δερματικού καρκίνου, καθώς και η μικρότερη διαιτητική πρόσληψη είναι οι παράγοντες εκείνοι που δικαιολογούν τη φαινομενικά μη αναμενόμενη λόγω κλιματικών συνθηκών αυξημένη επίπτωση ανεπάρκειας της βιταμίνης D στον ευρωπαϊκό νότο [269].

Οι κλινικές κατευθυντήριες οδηγίες για το έλεγχο και αντιμετώπιση της έλλειψης βιταμίνης D στη χώρα μας, αναφέρουν ότι η μέτρηση της θα πρέπει να αποφεύγεται στο γενικό πληθυσμό και να εφαρμόζεται μόνο επί ενδείξεων (ραχίτιδα, οστεομαλακία, οστεοπόρωση, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, ηπατική ανεπάρκεια, σύνδρομο δυσαπορρόφησης, λεμφώματα, κοκκιωματώδεις νόσοι, παχυσαρκία, εγκυμοσύνη-θηλασμός, ιστορικό πτώσεων και καταγμάτων χαμηλής βίας σε ηλικιωμένους). Συγκεντρώσεις βιταμίνης D > 20 ng/ml ( > 50 nmol/L) θεωρούνται φυσιολογικές. Σε ασθενείς με οστεοπόρωση και άλλες ειδικές περιπτώσεις μπορεί να επιδιώκονται συγκεντρώσεις >30 ng/ml (>75 nmol/L). Για την επίτευξη και διατήρηση επαρκών θεραπευτικών συγκεντρώσεων 25(OH)D, με βάση τα διαθέσιμα σκευάσματα στην Ελληνική επικράτεια, προτείνεται η χορήγηση χοληκαλσιφερόλης. Η χορήγηση αλφακαλσιδιόλης ή καλσιτριόλης, συνιστώνται μόνον σε ειδικές περιπτώσεις, όπως σε χρόνια νεφρική νόσο, υποπαραθυρεοειδισμό και ανθεκτικές ραχίτιδες. Επί επιπέδων βιταμίνης D <10ng/ml συνιστάται δόση εφόδου 25000 – 60000 IU εβδομαδιαίως ή 4000 – 8000 IU ημερησίως, για 8-12 εβδομάδες,

ακολουθούμενη από ημερήσιες δόσεις συντήρησης, με θεραπευτικό στόχο τα 20 – 50 ng/ml (50-125 nmol/L), που εξατομικεύεται ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες κάθε περίπτωσης. Σε ασθενείς με συγκεντρώσεις 25(OH)D 10 - 20 ng/mL συνιστάται εξ' αρχής ημερήσια χορήγηση 800 – 1000 IU. Προτείνεται νέα μέτρηση 25(OH)D μετά από 3 μήνες και τροποποίηση της δόσης εφόσον είναι απαραίτητο. Μετά την επίτευξη του θεραπευτικού στόχου, συνιστάται επανεκτίμηση μετά από ένα έτος, ή νωρίτερα εφόσον υπάρχουν σαφείς κλινικές ή εργαστηριακές ενδείξεις [269].

## **Κεφάλαιο 5: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ ΣΤΑ MALT ΚΑΙ T-ΔΕΡΜΑΤΙΚΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ**

Η λεμφωματογένεση, κατά τη σύγχρονη θεώρησή της, συνιστά μια περίπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία, η οποία απορρέει από τη σύμπραξη ενός επιβαρυντικού γενετικού υποβάθρου με περιβαλλοντικούς και λοιμώδεις παράγοντες κινδύνου. Έως σήμερα πλήθος ερευνητικών και επιδημιολογικών δεδομένων καταδεικνύουν ότι η γενετική προδιάθεση καταλαμβάνει σημαντική θέση στην αιτιοπαθογένεια των αιματολογικών κακοηθειών γενικά και των NHL ειδικότερα [274,275].

Πράγματι, μελέτες διδύμων, υποδεικνύουν κάποιου βαθμού γενετική προδιάθεση σε β-λεμφοεπιδερματικές νόσους. Έτσι, σε 44.788 ζεύγη διδύμων στην Σκανδιναβία, η κληρονομησιμότητα (heritability) για CLL υπολογίστηκε στο 21% (95% CI, 0-0.54). Σε αντίστοιχη μελέτη σε λεμφώματα, ο κίνδυνος για HL ήταν εκατό φορές και για NHL 23 φορές μεγαλύτερος σε μονοζυγωτικούς διδύμους ασθενών, ενώ οι διζυγωτικοί δίδυμοι επιδείκνυαν 14 φορές υψηλότερο κίνδυνο νόσησης με NHL και ταυτόσημο κίνδυνο εμφάνισης HL σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, επισημαίνοντας ισχυρότερο ρόλο του κοινού περιβάλλοντος στην περίπτωση των NHL. Σημαντικά στοιχεία προκύπτουν άλλωστε και από μελέτες ασθενών-μαρτύρων, κοόρτες και μητρώα (registries) ασθενών. Συγκεκριμένα, σε μεγάλη μελέτη 17.471 ασθενών με NHL και 23.096 μαρτύρων (International Lymphoma Epidemiology Consortium) ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης NHL σε πρώτου βαθμού συγγενείς των πασχόντων υπολογίστηκε στο 1,8 (OR:1.8, 95% CI, 1.5-2.1), ενώ στατιστικά σημαντικός κίνδυνος αναγνωρίστηκε και για συγγενείς ασθενών με HL (OR :1.7, 95% CI, 1.2-2.3) και λευχαιμία (OR : 1.5, 95% CI, 1.3-1.8), υποδεικνύοντας κοινούς γενετικούς καθοριστές μεταξύ των διαφόρων αιματολογικών κακοηθειών. Ειδικά για το

λέμφωμα οριακής ζώνης ο σχετικός κίνδυνος ανέρχεται στο 1,7 παρουσία συγγενούς 1ου βαθμού με NHL, εύρημα που παραμένει αναλλοίωτο όταν συνυπολογισθεί η επίδραση γνωστών παραγόντων κινδύνου, επισημαίνοντας σχετική υπεροχή της γενετικής συνιστώσας έναντι του περιβάλλοντος [22]. Ίσος με 1,7 (0.9-3.1) υπολογίσθηκε και ο σχετικός κίνδυνος για εμφάνιση περιφερικού T-λεμφώματος. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από προοπτική κοόρτη παρατήρησης σε πάνω από 120.000 δασκάλους στην Καλιφόρνια, η οποία ανέδειξε σχετικό κίνδυνο 1.74 (relative risk [RR] =1.74; 95% CI, 1.16-2.60) για B-NHL, κάτι που επιβεβαιώθηκε και σε πληθυσμιακές μελέτες στην Utah ( RR = 1.68; 95% CI, 1.04-2.48) και στην Σκανδιναβία (RR=1.7, 95% CI, 1.4-2.2) [276,277]. Αξίζει να σημειωθεί πως από τα μητρώα ασθενών προκύπτει και μια ειδική ανά υπότυπο NHL γενετική προδιάθεση. Έτσι πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με DLBCL φέρουν 9.8 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης DLBCL, αλλά ο κίνδυνος τους για εμφάνιση FL δε διαφέρει από αυτόν του γενικού πληθυσμού. Αντίστοιχα το οικογενειακό ιστορικό FL τετραπλασιάζει την πιθανότητα νόσησης από FL αλλά δεν επηρεάζει τον κίνδυνο εκδήλωσης DLBCL[278]. Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα από τις μέχρι στιγμής μελέτες συγκλίνουν προς την ανάδειξη γενετικής προδιάθεσης σε NHL και τα ευρήματά τους βρίσκονται σε συμφωνία παρά τις εγγενείς μεθοδολογικές αδυναμίες του κάθε τύπου μελέτης (πίνακας 20)[274]. Περαιτέρω στοιχεία χρειάζονται για τον καθορισμό του γενετικού κινδύνου για κάθε υπότυπο NHL, καθώς και για την διάκριση του από τον κίνδυνο που πιθανώς προσδίδουν οι κοινές περιβαλλοντικές συνθήκες που επίσης επιδρούν στα μέλη της ίδιας οικογένειας.

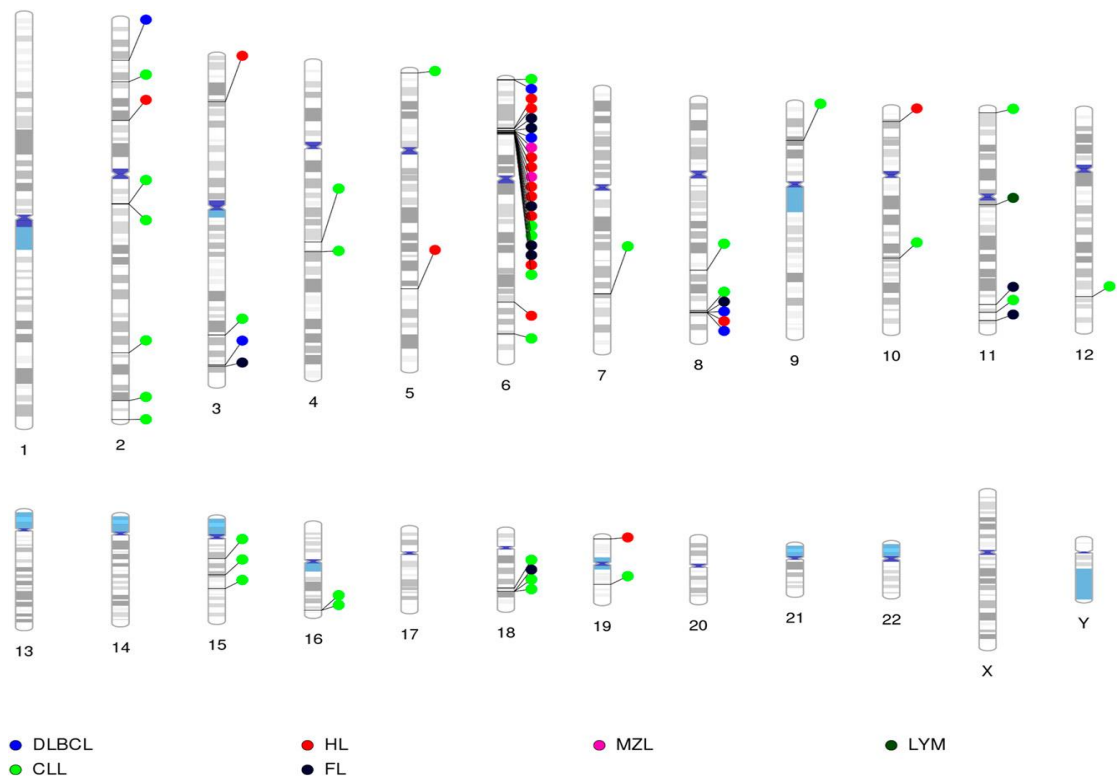
Κίνδυνος επί οικογενειακού ιστορικού σε α' βαθμού συγγενή

Νόσος	Τύπος μελέτης	NHL	HL	CLL	DLBCL	FL
NHL	Ασθενών-Μαρτύρων	1.8 (1.5-2.1)	1.7 (1.2-2.3)	1.5 (1.3-3.8)	-	-
	Μητρώο	1.7 (1.4-2.2)	1.4 (1.0-2.0)	1.3 (0.9-1.9)	-	-
CLL	Ασθενών-Μαρτύρων	1.9 (1.4-2.6)	1.3 (0.6-2.6)	2.4 (1.9-3.1)	-	-
	Μητρώο	1.9 (1.5-2.3)	1.5 (1.0-2.3)	8.5 (6.1-12)	1.0 (0.4-2.5)	1.6 (0.9-2.8)
HL	Ασθενών-Μαρτύρων	3.3 (1.3-8.0)	3.3 (0.5-22)	6.3 (1.3-30)	-	-
	Μητρώο	1.3 (0.9-1.8)	3.1 (1.8-5.3)	2.1 (1.2-3.8)	2.0 (1.1-4.0)	1.4 (p>0.05)
DLBCL	Ασθενών-Μαρτύρων	1.8 (1.5-2.3)	2.1 (1.4-3.2)	1.2 (0.9-1.5)	-	-
	Μητρώο	-	2.4 (p<0.05)	-	9.8 (3.1-31)	-
FL	Ασθενών-Μαρτύρων	2.0 (0.9-2.4)	1.5 (0.9-2.4)	1.0 (0.7-1.3)	-	-
	Μητρώο	-	1.4 (p>0.05)	1.8 (1.0-3.3)	-	4.0 (1.6-9.5)
MZL	Ασθενών-Μαρτύρων	1.7 (1.1-2.5)	2.7 (1.4-5.5)	1.7 (1.2-2.4)	-	-
PTCL	Ασθενών-Μαρτύρων	1.7 (0.9-3.1)	0.9 (0.1-4.4)	1.8 (1.1-3.1)	-	-

**Πίνακας 20:** Κίνδυνος (OR σε μελέτες ασθενών-μαρτύρων, RR σε μητρώα) και 95% όρια εμπιστοσύνης για την εκδήλωση νόσου επί οικογενειακού ιστορικού αιματολογικής κακοήθειας σε α' βαθμού συγγενή [274].

Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι παρά την επιδημιολογική διαπίστωση της γενετικής προδιάθεσης, η επακριβής αποσαφήνιση των υποκείμενων μηχανισμών δεν συνιστά εύκολο έργο. Δεν πρέπει να λησμονείται ότι υπό το γενικό όρο NHL ομαδοποιούνται πλήθος διαφορετικών φαινοτύπων που, όπως φαίνεται και από τα ευρήματα της μελέτης των μητρώων, δεν είναι απαραίτητο ότι μοιράζονται και κοινή γενετική βάση, αλλά και από την άλλη πλευρά οι ίδιοι γενετικοί τόποι μπορεί να εμπλέκονται σε ένα φάσμα διαφορετικών αιματολογικών (και μη) εκδήλωσεων. Στην αιτοπαθογένεια των NHL δε φαίνεται να συμμετέχουν γόνιμοι με υψηλή διεισδυτικότητα, αλλά ως πιθανότερη προτείνεται η συμμετοχή περισσότερων και συνηθέστερων γενετικών πολυμορφισμών (MAF>5%) που εξασκούν μεν μικρότερη επίδραση στον κίνδυνο λεμφωματογένεσης, αλλά σε συνδυασμό μεταξύ τους και με περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην εκδήλωση της νόσου (common variant-common disease hypothesis) [274,275].

Η αναζήτηση των κοινών αυτών γενετικών καθοριστών έχει απασχολήσει ένα μεγάλο αριθμό ερευνών. Μελέτες υποψήφιων γονιδίων αλλά και GWAS (Genome Wide Association Studies) έχουν μέχρι στιγμής στοιχειοθετήσει την εμπλοκή στην εκδήλωση των λεμφουπερπλαστικών νόσων πολλών γενετικών τόπων που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA, στη φυσική ανοσία και το σύστημα των κυτταροκινών, των χημειοκινών και των υποδοχέων τους, στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες και στο σύστημα HLA (εικόνα 23).[274]



**Εικόνα 23:** Γενετικές θέσεις κινδύνου για NHL, αναλόγως υποτύπου, οι οποίες έχουν αναδειχθεί από αναλύσεις GWAS. [274]

Ειδικά για το MZL, πρόσφατη GWAS με συνολικό δείγμα 1281 ασθενών και 7127 μαρτύρων ευρωπαϊκής καταγωγής προσδιόρισε δύο σημειακούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με τη νόσο. Αμφότεροι εδράζονται σε γονίδια του συμπλέγματος HLA στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 και σε πολυπαραγοντικό μοντέλο διατήρησαν τη στατιστικά σημαντική συσχέτισή τους με την πάθηση, γεγονός που συνηγορεί προς την ανεξαρτησία των δύο υποψήφιων γενετικών τόπων. Σημαντική είναι και η παρατήρηση ότι δεν σημειώθηκε ετερογένεια στα αποτελέσματα όταν αυτά κατηγοριοποιήθηκαν σε MALT και μη MALT περιπτώσεις [279].

Ο πρώτος SNP (rs9461741) που έφτασε σε επίπεδα genome-wide στατιστικής σημαντικότητας (P:3.95\_10\_15, odds ratio OR:2.66, CI:2.08–3.39) εντοπίζεται σε εσώνιο μεταξύ των εξωνίων 2 και 3 του BTNL2 γονιδίου (butyrophilin-like 2) στην περιοχή 6p21.32 (HLA class II). Το γονίδιο BTNL2 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο λεμφικό ιστό και παρουσιάζει σημαντική ομολογία προς το συνδιεγερτικό μόριο B7, που εκκινεί τη λεμφοκυτταρική ενεργοποίηση κατά την αντιγονική παρουσίαση. Με βάση τα διαθέσιμα ερευνητικά δεδομένα πιθανολογείται ότι το BTNL2 δρα ως ένας αρνητικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων και της

παραγωγής κυτταροκινών, αμβλύνοντας την T-κυτταρική απόκριση. Λόγω της μη στατιστικής διαφοροποίησης της επίδρασης του rs9461741 από το HLA-DRB1\*01:02 στην εν λόγω μελέτη, δεν αποκλείεται η παρατηρούμενη συσχέτιση να οφείλεται στο HLA-DRB1, το οποίο άλλωστε έχει δείχθει να σχετίζεται με πλήθος αυτοάνοσων παθήσεων συμπεριλαμβανομένης της ρευματοειδούς αρθρίτιδος, του συνδρόμου Sjogren και της εκλεκτικής έλλειψης IgA [279].

Ο δεύτερος SNP, rs2922994 (με επίπεδα σημαντικότητας P:2.43\_10\_9, OR:1.64, CI:1.39–1.92), εντοπίζεται 11 kb ανοδικά του HLA-B, ενός μορίου που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσολογικό σύστημα συμμετέχοντας στην παρουσίαση ενδογενών πεπτιδίων. Σε μεγάλη ανισορροπία σύνδεσης με τον rs2922994 βρίσκεται έτερος πολυμορφισμός, ο rs7750641 ο οποίος επίσης επέδειξε συσχέτιση με τον κίνδυνο MZL. Πρόκειται για παρανοηματική μετάλλαξη στο μεταγραφικό παράγοντα TCF19, ο οποίος κωδικοποιεί μια συνδεόμενη με το DNA πρωτεΐνη που συμμετέχει στη μεταγραφή γονιδίων κατά τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου και επιδεικνύει ισχυρή έκφραση στα βλαστικά κέντρα και στα προ-B κύτταρα [279].

Εκτός της GWAS προσέγγισης, έχουν διενεργηθεί αρκετές απόπειρες συσχέτισης συγκεκριμένων υποψήφιων γονιδίων με το MALT λέμφωμα. Τα γονίδια αυτά επιλέγονται με βάση τη συμμετοχή τους σε μονοπάτια που ενοχοποιούνται στη λεμφωματογένεση ή την καρκινογένεση εν γένει, ενώ πολλά από αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσική ή ειδική ανοσία. Ο γενικός σχεδιασμός των μελετών αυτών αφορά τη σύγκριση της συχνότητας ενός συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε ασθενείς και σε μάρτυρες είτε καθόλα υγιείς είτε με διαπιστωμένη λοίμωξη από το ελικοβακτηριδίο του πυλωρού. Λόγω της ετερογένειας των μελετούμενων δειγμάτων, αλλά και της γενετικής διακύμανσης μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, δεν λείπουν οι περιπτώσεις αποκλίνοντων ή και αντικρουόμενων αποτελεσμάτων συσχέτισης [274,275].

Έτσι, οι Rollinson και συνεργάτες το 2003 σε μελέτη 66 ασθενών και 163 υγιών μαρτύρων διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση του GSTT-1 null πολυμορφισμού (OR:9,51) και του IL1RN 2/2 (OR: 5,51) με την εκδήλωση MALT λεμφώματος [280]. Τα αποτελέσματά τους για το GSTT-1 επιβεβαιώθηκαν από τον Wu et al. το 2004 σε 75 ασθενείς ασιατικής καταγωγής με αρκετά χαμηλότερο ωστόσο σχετικό κίνδυνο (OR:1,8), που αποδίδεται στη διαφορετική φυλετική σύσταση του δείγματος [281]. Ο πολυμορφισμός GSTT-1 Null αναφέρεται στην

απουσία και των δύο αλληλίων που κωδικοποιούν την τρανσφεράση της γλουταθειόνης-S T1, ενός ενζύμου που συμμετέχει στο μεταβολισμό πιθανών καρκινογόνων ουσιών και την εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου και έχει βρεθεί να σχετίζεται με άλλες κακοήθειες. Αντίθετη τύχη είχε η δεύτερη συσχέτιση (IL1RN 2/2), η οποία απορρίφθηκε τόσο από τον Wu όσο και από τον Hellmig σε μελέτη του 2004 που συνέκρινε 153 καυκάσιους ασθενείς έναντι 344 μαρτύρων με λοίμωξη από *H.pylori* [282]. Ο μελετούμενος πολυμορφισμός αφορά μια VNTR (various number tandem repeat) περιοχή του γονιδίου του αναταγωνιστή του υποδοχέα της IL1, εμφανίζει 5 αλλήλια ανάλογα με τον αριθμό επαναλήψεων (από 2 έως 6) ενός γονιδιακού τμήματος 86 βάσεων στο ιντρόνιο 2 του γονιδίου και φαίνεται να επιδρά στο βαθμό έκφρασης της πρωτεΐνης. Το βραχύτερο αλλήλιο 2 (2 επαναλήψεις) έχει συσχετισθεί με αρκετές αυτοάνοσες, φλεγμονώδεις και νεοπλασματικές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου και του γαστρικού αδενοκαρκινώματος.

Εκτεταμένης ερευνητικής προσοχής έχουν τύχει και μια σειρά άλλων σημειακών πολυμορφισμών σχετιζόμενων με την ανοσιακή απόκριση σε όλο το ευρύ της φάσμα. Ένα αρκετά μελετημένο παράδειγμα αποτελεί η περιοχή του εκκινητή του γονιδίου *TNF-a* (Tumor Necrosis Factor-a). Ο TNF-a αποτελεί κυτταροκίνη με προφλεγμονώδη δράση που ενοχοποιείται σε ποικιλία αυτοάνοσων και κακοηθών νόσων. Δεδομένης της θέωρησης που θέλει τη γαστρική λεμφωματογένεση αποτέλεσμα της ανισορροπίας στην έκκριση κυτταροκινών σε απάντηση στη χρόνια αντιγονική διέγερση, δεν μπορεί να θεωρηθεί απίθανη η εμπλοκή του TNF-a, των υποδοχέων και των ρυθμιστικών του περιοχών στην ανάπτυξη MALT λεμφώματος. Ο πολυμορφισμός 857-T (rs 1799724) βρέθηκε να προσδίδει σχετικό κίνδυνο (OR:1,8) σε ευρωπαϊκή μελέτη του 2005 [283], ενώ αντίστοιχη ασιατική είχε αντίθετα αποτελέσματα αποδίδοντάς του προστατευτικό ρόλο (OR: 0.33)[284]. Άνευ στατιστικής σημασίας βρέθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις με άλλες πολυμορφικές θέσεις στον *TNF-a* (-238 G/A, -308 G/A, -863 C/A, -1031 T/C) και στους υποδοχείς του *TNFR1* (-383 A/C) και *TNFR2* (196 G/T) σε μελέτες ασθενών-μαρτύρων [284,285]. Επέκταση ωστόσο της γενετικής ανάλυσης του Interlymph Consortium που συγκέντρωσε μεγάλο δείγμα ασθενών από κέντρα σε Ευρώπη, Αμερική και Αυστραλία κατέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του 308 A/G πολυμορφισμού με το λέμφωμα οριακής ζώνης (ανά αλλήλιο, OR = 1.35; *P*trend =



0.004), αν και λόγω της σπανιότητας του υποτύπου, υπογραμμίζεται από τους συγγραφείς η ανάγκη επικύρωσης του ευρήματος σε περαιτέρω μελέτες [286].

Στο ίδιο μήκος κύματος κινήθηκαν άλλωστε μελέτες συσχέτισης για πολυμορφισμούς στο γονίδιο της *IL-10*, χωρίς όμως αξιόλογα ευρήματα [285,287]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μια πιο πρόσφατη ερευνητική εργασία που εξέτασε 84 πολυμορφισμούς σε γονίδια που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, χημειοκίνες και τους υποδοχείς τους. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις αναδείχθηκαν για 5 SNPs (rs1179246, rs2227485, rs4913428, rs1026788 και rs7314777) στην *IL-22* με τους τέσσερεις πρώτους σε ανισορροπία σύνδεσης να προσδίδουν σχετικό κίνδυνο περί το 3, ενώ ο γονότυπος TT στο rs7314777 συνδέθηκε με OR= 9.88 (1.29–75.63) [288].

Προσπάθειες συσχέτισης έχουν πραγματοποιηθεί και για μόρια που συμμετέχουν στην T-κυτταρική απάντηση, σε αναγνώριση της σημαντικής θέσης της τελευταίας στη φυσική ιστορία των MALT. Έτσι οι Cheng et al. μελέτησαν πολυμορφισμούς στα γονίδια *CTLA4* (49 A/G, \_318 C/T, και CT60 A/G), *CD28* (IVS3\_17T/C), και *ICOS* (c.602 A/C και c.1624C/T) σε 62 ασθενείς με MALT και 250 υγιείς μάρτυρες. Ο γονότυπος *CTLA4* \_318 C/T συσχετίστηκε με χαμηλότερο κίνδυνο (OR: 0.3; p:0,022), ενώ ο *CTLA4* 49 G/G συνοδεύεται από OR:4.1 (p:0,044). Η πρωτεΐνη *CTLA4* (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) εκφράζεται κυρίως στα ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, προσδένεται στα μόρια B7 των αντογονοπαρουσιαστικών κυττάρων και λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής της T-κυτταρικής ενεργοποίησης. Άξια λόγου είναι η αναφερόμενη συσχέτιση πολυμορφισμών του γονιδίου με ευπάθεια και σε άλλους τύπους NHL, αλλά και σε αυτοάνοσες νόσους, όπως η νόσος Graves και ο διαβήτης τύπου 1 [289].

Στο πεδίο της φυσικής ανοσίας, ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη πολυμορφικών θέσεων στον υποδοχέα TLR-4 (Toll-like Receptor 4) και στις πρωτεΐνες NOD-1 και NOD-2 (nucleotide binding oligomerization domain molecules)[290-293]. Ο TLR-4 αποτελεί τον κύριο υποδοχέα λιποπολυσακχαριτών στη μεμβράνη του B-κυττάρου και φαίνεται να συνδράμει στην ενεργοποίηση του μονοπατιού του NF-kB και την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ιδιότητα που φέρουν και οι πρωτεΐνες NOD, μόρια επιφορτισμένα με την αναγνώριση παθογόνων και τη βελτιστοποίηση της αντιμικροβιακής απόκρισης [293]. Ασυμφωνία μεταξύ των διάφορων ερευνητικών ομάδων σημειώνεται για τον πολυμορφισμό *TLR4* Asp299Gly με άλλους να του προσάπτουν επιβαρυντικό [290] και άλλους προστατευτικό ρόλο [291] όσον αφορά την προδιάθεση σε MALT λέμφωμα, ενώ μελέτη των Rosentiel και

συνεργατών διαπίστωσε σημαντική συσχέτιση για το NOD2-R702W [292]. Ελληνική μελέτη δεν κατέληξε σε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα για κανένα από τους εξετασθέντες πολυμορφισμούς στα δύο αυτά γονίδια, αλλά διαπίστωσε έναν επιβαρυντικό ρόλο (OR=2,44 p=0,042) για τον πολυμορφισμό -159C στον συνυποδοχέα του TLR-4, CD14 [293].

Όσον αφορά τα T λεμφώματα, τα δεδομένα είναι εξαιρετικά περιορισμένα, καθώς μέχρι στιγμής δεν έχει πραγματοποιηθεί GWAS μελέτη και οι μελέτες διερεύνησης υποψήφιων γονιδίων είναι λίγες. Έτσι, σε 291 ασθενείς με T λέμφωμα και 300 μάρτυρες κινεζικής καταγωγής αναζητήθηκαν συσχετίσεις 8 πολυμορφισμών στα γονίδια *TNFA*, *CTLA-4* και *LTA* με την εκδήλωση νόσου, με το γονότυπο *LTA* +252AA και τον *TNF-α/LTA* απλότυπο C-G-G-A (*TNF-α* -857C, -308G, -238G και *LTA* +252A) να συνδεόνται με αυξημένο κίνδυνο (OR, 2.3; P = 0.002 και OR, 1.6; P = 0.001 αντίστοιχα). Το γονίδιο *LTA* που κωδικοποιεί για τη λυμφοτοξίνη A, τη δεύτερη κλάση παραγόντων νέκρωσης των όγκων, εδράζεται στην περιοχή 6q21.3, εμπλέκεται στην ωρίμανση, χημειοταξία και ενεργοποίηση των NK-κυττάρων και πολυμορφισμοί του φαίνεται να σχετίζονται με διάφορες κακοήθειες συμπεριλαμβανομένων και των NHL. Μολοταύτα σημειώνεται ότι στη συγκεκριμένη μελέτη, καθώς είναι αναμενόμενο από τη χώρα διεξαγωγής της, η πλειοψηφία των περιστατικών αφορούσε NK περιφερικά λεμφώματα (29,9% NK λέμφωμα ρινικού τύπου) και μόνο μια μειοψηφία ασθενών με MF (2,4%) [294]. Αντίθετα, η επέκταση της γενετικής μελέτης του Interlymph Consortium σημείωσε αυξημένο κίνδυνο (ανά αλλήλιο OR:1.44, *P*trend = 0.015) συγκεκριμένα για τον υπότυπο της MF παρουσία του γονοτύπου *LTA* 252GG [286], καλώντας για περαιτέρω διερεύνηση του πιθανού ρόλου του πολυμορφισμού. Μελέτες ασθενών μαρτύρων επικεντρωμένες στα CTCLs αναφέρονται σε μικρό αριθμό στη βιβλιογραφία. Λόγου χάρι, σε πολωνική δημοσίευση του 2016 που συνέκρινε τη συχνότητα 9 σημειακών πολυμορφισμών 7 γονιδίων σε 43 ασθενείς με T-λέμφωμα και υγιείς μάρτυρες, το πλήθος των πασχόντων έφερε διάγνωση MF (82,9%), ενώ συμμετείχαν και 7 ασθενείς με SS (16,3%). Η εν λόγω μελέτη απέδωσε επιβαρυντικό ρόλο σε δύο πολυμορφισμούς στην περιοχή του εκκινητή των γονιδίων των ιντερλευκινών IL-2 (IL-2 -330 GG, OR = 5.82, p = 0.001) και IL-13 (IL-13 -1112 TT OR = 5.67, p = 0.0024), οι οποίοι σχετίζονται με αυξημένη μεταγραφή (hypertranscription phenotype). Αντιθέτως, το αλλήλιο -308A του *TNF-α* και το -1082GG της *IL-10* δείχθηκε να υποαντιπροσωπεύονται στην ομάδα των ασθενών με CTCL (OR = 0.45, p = 0.0466

για το -308A του TNF- $\alpha$ , OR = 0.35,  $p = 0.0329$  για το -1082GG του IL-10). Σημειακοί πολυμορφισμοί που εξετάστηκαν στα γονίδια που κωδικοποιούν για τις ιντερλευκίνες 1 $\alpha$  και 8, καθώς και στο γονίδιο της ενδοθηλίνης-1 δε φάνηκε να συσχετίζονται με τη νόσο [295]. Αναφέρεται ακόμα, παλαιότερη μελέτη του 2004 με 32 ασθενείς με MF σταδίου κηλίδας, η οποία διερεύνησε σημειακούς πολυμορφισμούς στα γονίδια *IFN $\gamma$* , *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$*  και *TGF- $\beta$ 1*, χωρίς να αποδώσει στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις [296]. Τσέχικη μελέτη της ίδιας χρονιάς με 63 συμμετέχοντες ασθενείς, πρότεινε συσχέτιση της νόσου με σημειακό πολυμορφισμό στον υποκινητή του γονιδίου της *IL-6* (-596 A/G) με τους ετεροζυγώτες να επιβαρύνονται με σχετικό κίνδυνο OR = 2.64 ( $p = 0.002$ ) για εμφάνιση CTCL σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες [297]. Τέλος αξίζει να αναφερθούν πιο πρόσφατες προσπάθειες προσέγγισης της πιθανής σχέσης πολυμορφισμών του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D με το δερματικό λέμφωμα. Έτσι αιγυπτιακή [298] και τουρκική [299] μελέτη του 2016 και 2018 αντίστοιχα αναφέρουν αμφοότερες την παρουσία χαμηλότερων επιπέδων βιταμίνης D στον ορό των συμμετεχόντων ασθενών με CTCL σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, ωστόσο δε συμφωνούν στην εμπλοκή των SNPs του *VDR* γονιδίου. Έτσι ενώ η πρώτη αναγνωρίζει υψηλότερη συχνότητα του πολυμορφισμού FOKI ( $p:0.039$  για τους CC ομοζυγώτες) στους ασθενείς, η δεύτερη αποτυγχάνει στην ανεύρεση της συσχέτισης αυτής και προτείνει υπεραντιπροσώπευση του *TaqI* πολυμορφισμού μεταξύ των υγιών ( $p<0.001$ ). Αμφοότερες οι ερευνητικές ομάδες συνομολογούν την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης των γενετικών πολυμορφισμών στο *VDR* γονίδιο για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Πέραν τούτου, είναι σαφές ότι μεγαλύτερης κλίμακας γενετικές μελέτες σε διαφορετικής προέλευσης πληθυσμούς, καθώς και η επιδίωξη GWAS ανάλυσης μπορούν να προσφέρουν σημαντική πληροφόρηση πάνω στην όποια γενετική προδιάθεση για CTCL.

Συνοψίζοντας, παρά τη μεγάλη έκταση έκθεση του πληθυσμού σε περιβαλλοντικούς και λοιμογόνους παράγοντες κινδύνου λεμφωματογένεσης, όπως παραδείγματος χάρη στο ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού στην περίπτωση του γαστρικού MALT λεμφώματος, ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών προχωρά στην κλινική εμφάνιση λεμφώματος. Φαίνεται ότι μια σύνθετη και μη πλήρως κατανοητή αλληλεπίδραση μεταξύ παθογόνων, ξενιστή και περιβάλλοντος είναι εκείνη που οδηγεί τελικά στην απώλεια του ελέγχου του λεμφικού πολλαπλασιασμού και υπό αυτή την έννοια το ανοσιακό σύστημα, το σύστημα που διακρίνει μεταξύ ίδιου και

ξένου και ενορχηστρώνει την απόκριση έναντι παθογόνων αλλά και καρκινικών κυττάρων, προβάλλει ως το πιο ελκυστικό πεδίο όχι μόνο μοριακής αλλά και γενετικής έρευνας. Η διαλεύκανση του γενετικού κληροδοτήματος των ασθενών με λέμφωμα, αν και διαδικασία δύσκολη δεδομένης της διαφαινόμενης πολλαπλότητας των ενεχόμενων γενετικών τόπων, αναμένεται να συμβάλει στην αναγνώριση των πληθυσμών αυξημένου κινδύνου, στον καθορισμό της βέλτιστης και εξατομικευμένης θεραπείας και στην εξιχνίαση των μηχανισμών παθογένειας της νόσου.

### **5.1 Υπό εξέταση γονίδια και πολυμορφισμοί**

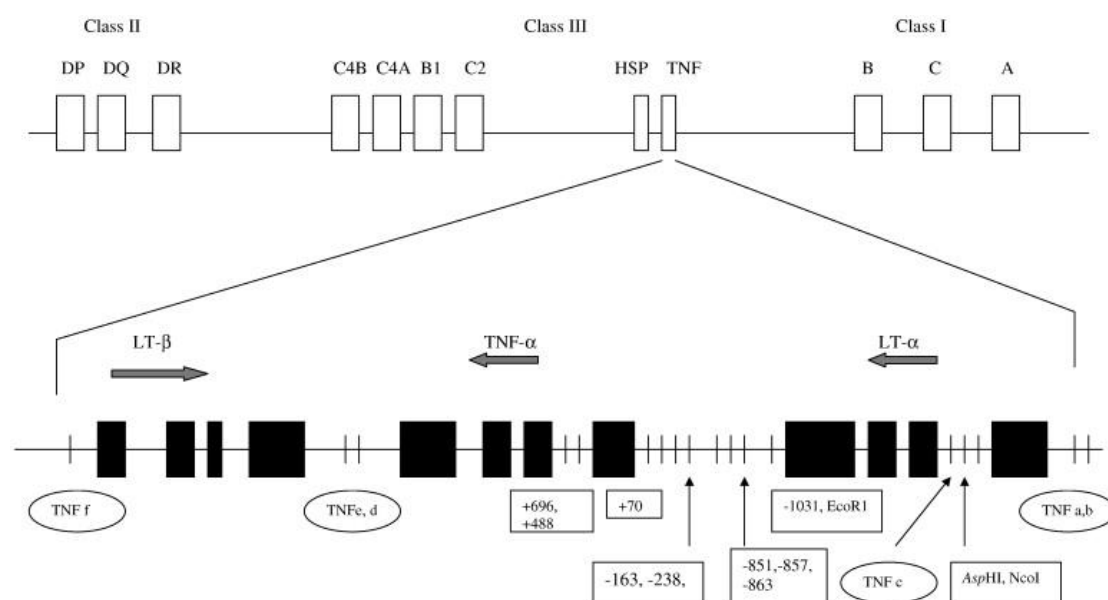
Στην ενότητα αυτή θα γίνει μια σύντομη αναφορά στα γονίδια και πολυμορφισμούς που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη και τις πιθανές λειτουργικές τους προεκτάσεις.

#### **TNF $\alpha$ 308A/G, 857 C/T**

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη, που εκκρίνεται κυρίως από τα μακροφάγα, αλλά και από μια σειρά διαφορετικών κυττάρων, υπό την επίδραση ποικίλων λοιμωδών και άλλων ερεθισμάτων. Παράγεται ως μια προσδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη πρωτεΐνη μεγέθους 26 kDa, από την οποία εν συνεχεία αποκόπτεται ένα διαλυτό ενεργό τμήμα 17 kDa με τη μεσολάβηση του ενζύμου TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme) και ασκεί τις δράσεις του μέσω των υποδοχέων του TNFR1 και TNFR2, οι οποίοι συμμετέχουν ταυτόχρονα και στη ρύθμιση των επιπέδων του. Οι βιολογικές δράσεις του TNF $\alpha$  είναι πολυσχιδείς και περίπλοκες και μπορεί να συσχετισθούν κατά περίπτωση τόσο με την προστασία από νόσο όσο και με εμφάνιση παθολογικών εκδηλώσεων. Στην οξεία φάση, η τοπική παραγωγή TNF- $\alpha$  αυξάνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης στο αγγειακό ενδοθήλιο και επιτρέπει την προσέλκυση κυττάρων της φλεγμονής στην πάσχουσα περιοχή, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί τα φαγοκύτταρα προς περιχαράκωση της φλεγμονής και αποκατάσταση της ιστικής βλάβης. Ωστόσο η συστηματική ή παρατεταμένη παραμονή του TNF $\alpha$  μπορεί να αποβεί επιζήμια, καθώς συνιστά εκδήλωση μιας απρόσφορης φλεγμονώδους απόκρισης και έχει συνδεθεί με πολλές κακοήθειες και αυτοάνοσες οντότητες [300].

Το TNF $\alpha$  γονίδιο εδράζεται στην περιοχή του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6 (εικόνα 24). Ένας μεγάλος αριθμός σημειακών πολυμορφισμών αναγνωρίζονται στο γενετικό αυτό τόπο

και ιδίως στην περιοχή του υποκινητή και κάποιοι εξ αυτών έχει προταθεί ότι μπορούν να επηρεάσουν την προδιάθεση στην εκδήλωση ασθένειας μέσω επίδρασης στο μεταγραφικό έλεγχο του γονιδίου και κατά συνέπεια τοπικής ή ακόμα και συστηματικής αύξησης των επιπέδων του. Οι SNPs λαμβάνουν την αρίθμησή τους αναλόγως της απόστασής τους από το σημείο έναρξης της μεταγραφής [- 1031 (T → C), - 863 (C → A), - 857 (C → A), - 851 (C → T), - 419 (G → C), - 376 (G → A), - 308 (G → A), - 238 (G → A), - 162 (G → A), και - 49 (G → A)] και αφορούν ως επί το πλείστον την άπω περιοχή του υποκινητή, σε αντίθεση με την εγγύς (~200 bp) η οποία φαίνεται να φέρει μικρότερη νουκλεοτιδική ετερογένεια και να περιέχει καλά συντηρημένες περιοχές που μάλιστα θεωρείται ότι συμμετέχουν στη γονιδιακή ρύθμιση του TNFα και την πρόσδεση του ενχανσοσώματος [301].



**Εικόνα 24:** Το σύμπλεγμα του TNF στο χρωμόσωμα 6 και η σχετική θέση των πολυμορφισμών [300].

Πρέπει να τονισθεί ότι οι SNPs του υποκινητή είναι πιθανό να βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης με άλλα γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, που με τη σειρά τους επηρεάζουν την ανθεκτικότητα ή ευαλωτότητα σε μια νόσο ή ακόμα και τη βαρύτητα εκδήλωσής της, ανεξάρτητα από την όποια τροποποίηση μπορεί να επιφέρουν στη μεταγραφική δραστηριότητα[301]. Μάλιστα μια τέτοια τροποποίηση δεν έχει αποδειχθεί κατά τρόπο σταθερό στις αντίστοιχες λειτουργικές μελέτες που την αναζήτησαν, με μερικές να αναφέρουν αύξηση στην έκφραση του γονιδίου παρουσία των σπάνιων αλληλίων τόσο στη θέση 308 όσο και στη θέση 857 και άλλες να την απορρίπτουν [301-305]. Όπως και άλλα

ευρήματα γενετικών μελετών, έτσι και η περίπτωση του TNF $\alpha$ , υπομνημνίσκει ότι η ανάδειξη γενετικών συσχετίσεων ενός SNP με μια νόσο, δεν αποδεικνύει απαραίτητως και υποκείμενη αιτιολογική σχέση, η οποία θα πρέπει να διευκρινισθεί με λειτουργική διερεύνηση.

Παραταύτα, οι SNPs του *TNF $\alpha$*  και ιδίως οι δύο που μελετώνται στην παρούσα εργασία, έχουν συσχετισθεί με πλήθος λοιμωδών, φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νόσων. Τα δεδομένα από το Interlymph Consortium κάνουν λόγο για συσχέτιση του 308 A/G πολυμορφισμού με το DLBCL (αλλά όχι με το FL) [306], ενώ όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω στατιστικά σημαντικά ευρήματα συσχέτισης έχουν αναφερθεί για τον 857 C/T και τα MALT λεμφώματα καθώς και για τον 308 A/G και τα CTCLs.

### **LTA 252A/G**

Ένα άλλο μέλος της οικογένειας του TNF $\alpha$  είναι και η λυμφοτοξίνη A (LTA) που κωδικοποιείται από γονίδιο που ευρίσκεται σε στενή γειτνίαση με το *TNF $\alpha$*  στην περιοχή του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (εικόνα 24). Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στα CD4<sup>+</sup> Th1 λεμφοκύτταρα, τα CD8<sup>+</sup> T λεμφοκύτταρα, τα NK κύτταρα, τα B λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα [307], εμφανίζει δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με τον TNF- $\alpha$  και ενεργεί μέσω των υποδοχέων της προάγοντας προφλεγμονώδεις δράσεις όπως η έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η αύξηση διαμεσολαβητών της φλεγμονής, όπως η C αντιδρώσα πρωτεΐνη, στη συστηματική κυκλοφορία. Ακόμα προτείνεται ότι μέσω σύνδεσης με τη λυμφοτοξίνη B και τον υποδοχέα της είναι σε θέση να διαδραματίζει ρόλο σε διάφορες διεργασίες όπως στην ανάπτυξη των λεμφικών οργάνων, την ομοιοστασία των λιπιδίων και το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Σε αυτά τα πλαίσια, πολυάριθμες μελέτες έχουν διερευνήσει τη συσχέτιση πολυμορφισμών του γονιδίου με μια σειρά παθήσεων, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η ρευματοειδής αρθρίτις, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο καρκίνος του μαστού, το έμφραγμα του μυοκαρδίου και πλήθος άλλων [307,308]. Αν και ο πολυμορφισμός LTA 252 A>G εδράζεται σε εσώνιο και σημειώνεται διχογνωμία ως προς τη λειτουργική του σημασία, πιστεύεται ότι ο γονότυπος LTA 252 G/G συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση του LTA και υψηλότερες συγκεντρώσεις δεικτών της φλεγμονής στον ορό [307,308]. Στο πεδίο των λεμφωμάτων, ιδιαίτερος άξια λόγου όπως ήδη αναφέρθηκε ήταν τα αποτελέσματα του Interlymph Consortium, που συνδέουν τον

συγκεκριμένο SNP με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης DLBCL και MF, ευρήματα που χρήζουν επιβεβαίωσης ιδίως στο πεδίο των T δερματικών λεμφωμάτων [286].

### **GSTT1/GSTM1 null**

Οι πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα με δράση τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) έχουν μελετηθεί εκτεταμένα στη βιβλιογραφία ως προδιαθεσικοί παράγοντες για συμπαγείς και αιματολογικές κακοήθειες, καθώς η δράση τους συνίσταται στην αδρανοποίηση δυνητικά καρκινογόνων ουσιών μέσω σύζευξης της γλουταθειόνης. Μερικά από τα υποστρώματα των εν λόγω ενζύμων περιλαμβάνουν παραπροϊόντα αντιδράσεων οξειδωτικού stress καθώς και καταλυτικών αντιδράσεων διαμεσολαβούμενων από το κυτόχρωμα P-450 [309]. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, μια από τις κύριες κατηγορίες περιβαλλοντικών γενοτοξικών και καρκινογόνων ουσιών είναι ένα σημαντικός στόχος των GST ενζύμων [310].

Σε γενετικό επίπεδο, δύο διαφορετικές ομάδες γονιδίων φαίνεται να κωδικοποιούν για ένζυμα με δράση τρανσφεράσης της γλουταθειόνης με την πρώτη να περιλαμβάνει 16 γονίδια κυτταροπλασματικών ενζύμων και τη δεύτερη 6 γονίδια μεμβρανικών πρωτεϊνών. Μεταξύ των διαλυτών στο κυτταρόπλασμα ενζύμων περιλαμβάνονται οχτώ διακριτές οικογένειες γονιδίων: alpha στο χρωμόσωμα 6, mu στο χρωμόσωμα 1, theta στο χρωμόσωμα 22, pi στο χρωμόσωμα 11, zeta στο χρωμόσωμα 14, sigma στο χρωμόσωμα 4, kappa και chi (ή omega) στο χρωμόσωμα 10. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον από γενετικής σκοπιάς επιδεικνύουν οι πολυμορφισμοί στα γονίδια των mu, theta και pi τρανσφερασών. Έτσι όσον αφορά την οικογένεια GSTM που απαρτίζεται από 5 συναπτά γονίδια (5'GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3') σε περιοχή 20 kb στο χρωμόσωμα 1p13.3, η προσοχή εστιάζεται κυρίως στον πολυμορφισμό GSTM-1 null, δηλαδή στην διαγραφή του γονιδίου GSTM-1 που στην ομόζυγη μορφή της οδηγεί σε πλήρη απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης. Αντίστοιχα, ο γονότυπος GSTT-1 null αναφέρεται στην ομόζυγη έλλειψη του γονιδίου GSTT-1 που φυσιολογικά εδράζεται σε απόσταση περίπου 50kb εκ του συγγενούς γονιδίου GSTT-2 στο χρωμόσωμα 22 [309]. Οι δύο αυτοί πολυμορφισμοί έχουν μελετηθεί στα πλαίσια του καρκίνου του πνεύμονα [311], του στομάχου [312], του μαστού [313], του προστάτου [314], του βασικόκυτταρικού καρκίνου δέρματος [309] και άλλων όγκων, αλλά και στο πεδίο της αιματολογίας στην οξεία μυελογενή λευχαιμία [315], στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα [316] και στα λεμφώματα [310,317,318]. Ιδίως όσον

αφορά τα τελευταία, μετανάλυση του 2013 αναγνωρίζει αυξημένο κίνδυνο για NHL παρουσία του GSTT-1 null πολυμορφισμού (OR 2.75, 95% CI 1.17-6.45;  $p = 0.02$ ), κάτι που δεν ισχύει και στην περίπτωση των HL, ενώ οι πολυμορφισμοί του GSTM-1 και GSTP-1 δε φάνηκε να επηρεάζουν τον κίνδυνο λεμφωματογένεσης [317]. Πιο πρόσφατη μετανάλυση, εξετάζουσα τη σχέση των GST πολυμορφισμών με τον κίνδυνο αιματολογικής κακοήθειας, βρήκε στατιστικά σημαντικά αυξημένο κίνδυνο λεμφώματος απουσία έκφρασης του GSTT-1 (OR: 1.79, CI 1.17-2.72,  $p:0.007$ ) με τη συσχέτιση για τα NHL να μην επιτυγχάνει στατιστική σημαντικότητα (OR: 1.43, CI:0.96-2.11,  $p:0.08$ ) [318]. Μια ενδιαφέρουσα εξήγηση σε λειτουργικό επίπεδο όσον αφορά τον πιθανό ρόλο του GSTT-1 null στη λεμφωματογένεση, προτείνεται από κινεζική μελέτη του 2014 που συμπεριέλαβε 104 ασθενείς με DLBCL και 103 με TCL καθώς και 205 υγιείς μάρτυρες και 40 μάρτυρες με καλοήγη υπερπλασία. Μετά την ανάδειξη της υπεραντιπροώπευσης του GSTT-1 γονοτύπου μεταξύ των ασθενών με λέμφωμα (OR=1.698, 95% confidence interval=1.145–2.518), οι ερευνητές έδειξαν βελτιωμένη σταθερότητα του DNA μετά τη διαμόλυνση GSTT-1 αρνητικών κυττάρων με το GSTT-1, ενώ αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και έκφραση του MYC διαπιστώθηκε σε GSTT-1 null λεμφοκύτταρα κατόπιν εκθέσεως σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες τόσο με χρήση κυτταρικών σειρών όσο και ζωικών μοντέλων [310]. Ειδικά για τα μελετούμενα στην παρούσα εργασία λεμφώματα, όπως ήδη αναφέρθηκε, συσχετίσεις έχουν αναπαραχθεί μέχρι στιγμής σε πληθυσμούς καυκάσιας [280] και ασιατικής [281] προέλευσης μεταξύ του GSTT-1 null φαινοτύπου και του MALT λεμφώματος.

## **IL1-RN**

Ο ανταγωνιστής της ιντερλευκίνης 1 IL1-RA, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *IL1-RN* αποτελεί ένα σημαντικό μέλος της οικογένειας της IL-1. Η εν λόγω οικογένεια περιλαμβάνει 11 κυτταροκίνες (και 10 υποδοχείς) με προφλεγμονώδεις ή αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση και την κατοπινή περιχαράκωση της φλεγμονώδους διεργασίας (πίνακας 21) [319].

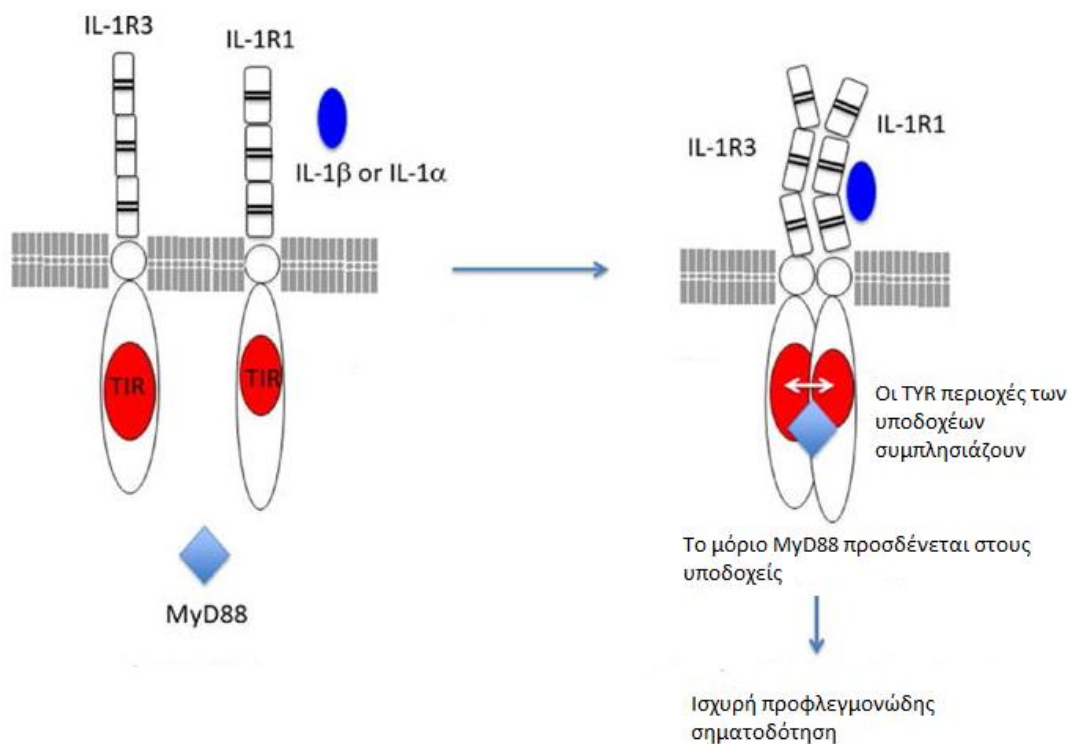


Όνομα	Συνώνυμο	Υποδοχέας	Δράση
IL-1 <sup>α</sup>	IL-1F1	IL-1R1	Προφλεγμονώδης
IL-1β	IL-1F2	IL-1R1	Προφλεγμονώδης
IL-18	IL-1F4	IL-18Rα	Προφλεγμονώδης
IL-36 <sup>α</sup>	IL-1F6	IL-36R	Προφλεγμονώδης
IL-36β	IL-1F8	IL-36R	Προφλεγμονώδης
IL-36γ	IL-1F9	IL-36R	Προφλεγμονώδης
IL-33	IL-1F11	ST2	Προφλεγμονώδης
IL-1Ra	IL-1F3	IL-1R1	Αντιφλεγμονώδης
IL-36Ra	IL-1F5		Αντιφλεγμονώδης
IL-37	IL-1F7	IL-18Rα	Αντιφλεγμονώδης
IL-38	IL-1F10	IL-36R, IL-1R1	Αντιφλεγμονώδης

**Πίνακας 21:** Κυτταροκίνες της οικογένειας της IL-1 [319]

Τα πιο καλά χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας, IL-1α και IL-1β, ασκούν έντονα προφλεγμονώδη δράση πρώτα σε τοπικό και εν συνεχεία και σε συστηματικό επίπεδο προκαλώντας και την εμφάνιση πυρετού. Παράγονται ως πρόδρομες πρωτεΐνες που εν συνεχεία υφίστανται πρωτεολυτική ενεργοποίηση. Η IL-1α αποκόπτεται από ασβεστιοεξαρτώμενες πρωτεάσες (π.χ. καλπαΐνες) αν και είναι δραστική (και μάλιστα με ιδιότητες αλαρμίνης) και στην πρόδρομη μορφή της, ενώ αντίθετα η IL-1β χρειάζεται απαραίτητα την ενζυμική δράση της κασπάσης 1 και του ινφλαμασώματος προκειμένου να αποκτήσει την τελική, ώριμη μορφή της που εν συνεχεία με εκ νέου συνδρομή του ινφλαμασώματος θα απελευθερωθεί εξωκυττάρια και θα εξασκήσει τις δράσεις της μέσω πρόσδεσης στον υποδοχέα IL-1R1. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό τριμερούς συμπλόκου μεταξύ της κυτταροκίνης, του IL-1R1 και του παρακείμενου στην κυτταρική μεμβράνη IL1-R3, στην συμπλησίαση των TIR (Toll interleukin-1 receptor) περιοχών των υποδοχέων και εν συνεχεία την επιστράτευση της πρωτεΐνης MYD88 με αποτέλεσμα τη σηματοδότηση μέσω του καταρράκτη των κινασών και την ενεργοποίηση της οδού του NF-kb (εικόνα 25). Λόγω των ισχυρών

βιολογικών δράσεων των IL-1a και IL-1b, η ρύθμιση της έκφρασής τους βρίσκεται υπό αυστηρό μεταγραφικό έλεγχο στα μακροφάγα-μονοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα, με μέλη της οικογένειας του TNF και TLRs να παριστούν ισχυρούς επαγωγείς τους [319-321].



**Εικόνα 25:** Δομικές μεταβολές του IL-1R1 κατά την πρόσδεση της IL-1 [321]

Ένας ισχυρός κατασταλτικός μηχανισμός της δράσης τους είναι η αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη IL-1Ra (IL-1 Receptor Antagonist), που ανταγωνίζεται τις IL-1a και IL-1b ως προς τη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα IL-1R1 με τον οποίο προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια, αλλά χωρίς να προκαλεί τον σχηματισμό του τριμερούς με τον IL-1R3. Εκτός του διαλυτού IL-1Ra, αναγνωρίζονται και δυο ενδοκυττάρειες ισομορφές που θεωρείται ότι απελευθερώνονται επί κυτταρικού θανάτου με σκοπό την περιχαράκωση της φλεγμονής που προκαλείται από την ιστική καταστροφή. Δηλωτικό της σημασίας του IL-1Ra είναι και το γεγονός ότι ποντίκια με έλλειψή του, εμφανίζουν θανατηφόρο αρτηρίτιδα, καταστροφική αρθρίτιδα και ψωριασικού τύπου δερματικές βλάβες, καθώς και αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης. Ακόμα παιδιά με γενετική ποσοτική ή λειτουργική ανεπάρκεια IL-1Ra, εκδηλώνουν σοβαρές τοπικές και συστηματικές φλεγμονώδεις βλάβες, όπως αγγειίτιδα και άσηπτη οστεομυελίτιδα. Άλλωστε ο ανασυνδυασμένος IL-1Ra (Anakinra) χρησιμοποιείται θεραπευτικά σε κάποιες φλεγμονώδεις παθήσεις [319-321].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον IL-1RA (IL1-RN) εμφανίζει έναν VNTR (variable number of tandem repeats) πολυμορφισμό, που αναφέρεται στην παρουσία διαφορετικού αριθμού επαναλήψεων μιας γενετικής περιοχής 86 ζευγών βάσεων στο εσώνιο 2. Αναφέρονται πέντε αλληλία, το αλληλίο 1 με 4 επαναλήψεις, το αλληλίο 2 με 2 επαναλήψεις, το αλληλίο 3 με 5 επαναλήψεις, το αλληλίο 4 με 3 επαναλήψεις και το αλληλίο 5 με 6 επαναλήψεις (πίνακας 22). Το αλληλίο 1 είναι το συχνότερο ενώ τα αλληλία 3 έως έξι είναι σπάνια στον πληθυσμό.

Αλληλίο	Αριθμός επαναλήψεων	Χαρακτηριστικά
1	4	Σύνηθες στον πληθυσμό
2	2	Παρατεταμένη φλεγμονή
3	5	Σπάνιο στον πληθυσμό
4	3	Σπάνιο στον πληθυσμό
5	6	Σπάνιο στον πληθυσμό

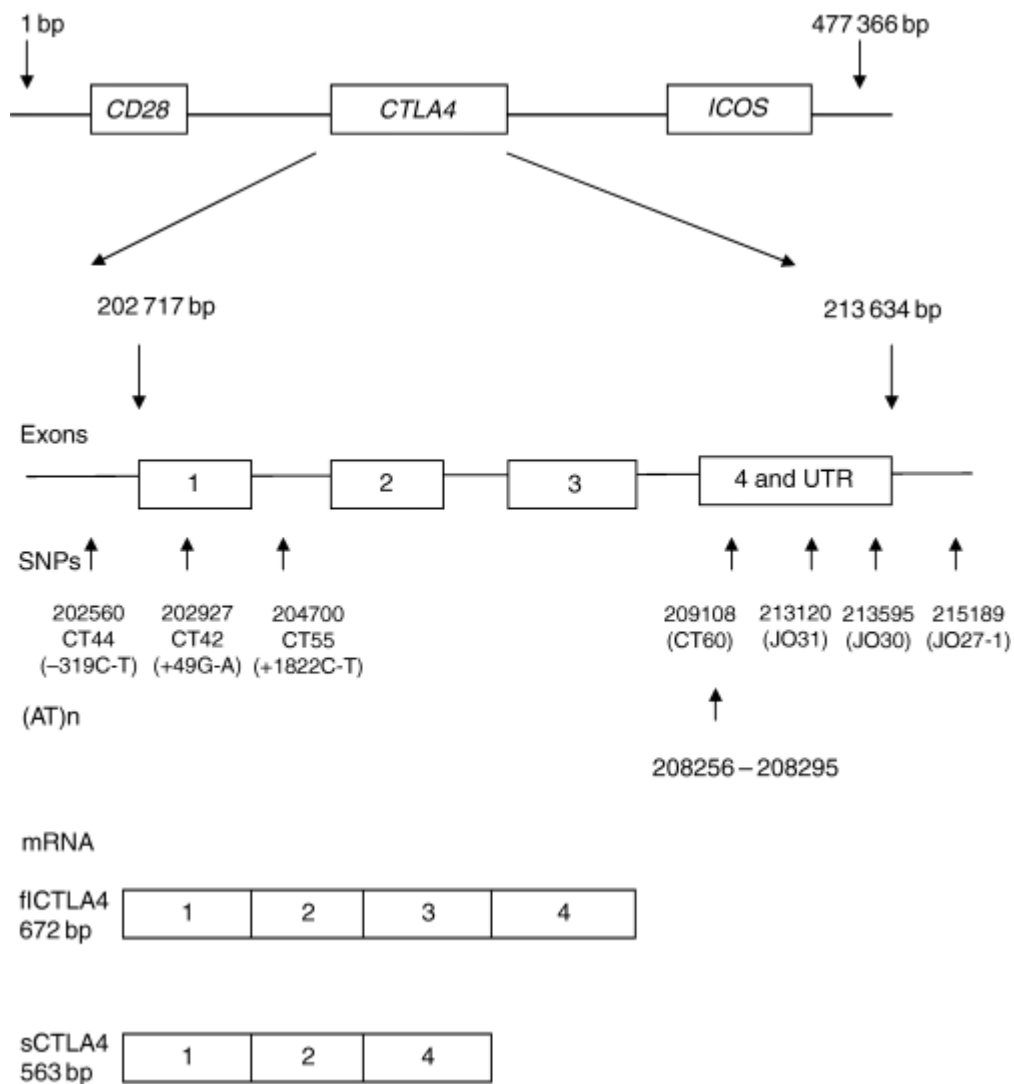
**Πίνακας 22:** Αλληλία του IL-1RN VNTR πολυμορφισμού και χαρακτηριστικά αυτών [322]

Το αλληλίο 2 έχει προταθεί ότι σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα IL-1RA και IL-1β στην κυκλοφορία και χαμηλό λόγο IL-1RA/IL-1β με αποτέλεσμα παρατεταμένη και οξυμένη φλεγμονώδη απόκριση, κάτι που καθιστά το συγκεκριμένο πολυμορφισμό ένα θελκτικό πεδίο έρευνας όσο αφορά την προδιάθεση σε αυτοάνοσες, λοιμώδεις και νεοπλασματικές νόσους [322]. Η σχέση του πολυμορφισμού με τα NHL, δεδομένης της εμπλοκής της οικογένειας της IL-1 στην ωρίμανση και πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, έχει διερευνηθεί χωρίς ιδιαίτερα ενθαρρυντικά ευρήματα [323,324]. Κάποιες μελέτες επιχείρησαν επίσης να εξετάσουν τη σχέση υψηλών επιπέδων του IL-1RA με την εμφάνιση B-NHL που δεν απεδείχθη στατιστικά σημαντική [325] ή την πρόγνωση T-NHL, όπου δείχθηκε ότι υψηλές συγκεντρώσεις IL-1RA προ θεραπείας συσχετίστηκαν με χαμηλότερο EFS σε ομάδα 68 ασθενών με πρόσφατη διάγνωση TCL [326]. Η γενετική συσχέτιση με το MALT λέμφωμα στομάχου, όπως συζητήθηκε πιο πάνω, δεν αποτελεί σταθερό εύρημα, ενώ λείπουν αντίστοιχα δεδομένα όσον αφορά τα TCL.

#### **CTLA-4**

Το CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), ένας ομοδιμερής γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας του T-κυττάρου, συνιστά ένα σημαντικό αρνητικό ρυθμιστή της T-κυτταρικής ενεργοποίησης και ένα νευραλγικό σημείο ελέγχου όσο αφορά την αποτροπή απρόσφορων ανοσιακών αποκρίσεων. Η κύρια λειτουργία του είναι η πρόσδεση των προερχόμενων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα συνδιεγερτικών σημάτων σε ανταγωνισμό με τον υποδοχέα CD28 και η ως εκ τούτου αποτροπή της υπέρμετρης T-κυτταρικής ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, μετά την παρουσίαση του αντιγόνου στον TCR, τα APCs αποδίδουν μέσω των μορίων B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86) ένα δεύτερο διεγερτικό σήμα μέσω σύνδεσης στον υποδοχέα CD28 στην επιφάνεια του T-κυττάρου. Το CTLA-4 προσδένοντας με μεγαλύτερη συγγένεια τα B7 μόρια σε σχέση με το CD28 (και πιθανώς εκκινώντας αρνητική σηματοδότηση με μη καλά καθορισμένα αγγελιοφόρα μόρια) περιορίζει την ενεργοποίηση και συντελεί στη διατήρηση της T-κυτταρικής ομοιοστασίας και της περιφερικής ανοχής [327-329].

Το γονίδιο του *CTLA-4* εδράζεται στο χρωμόσωμα 2q33 και αποτελείται από 4 εξώνια. Τα εξώνια 1 και 2 κωδικοποιούν το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα το πεπτίδιο-οδηγό και την αλληλουχία πρόσδεσης των συνδετών αντίστοιχα, ενώ τα εξώνιο 3 κωδικοποιεί για το διαμεμβρανικό τμήμα και το εξώνιο 4 για την κυτταροπλασματική ουρά της πρωτεΐνης. Μέσω διαφορετικού ματίσματος προκύπτουν 3 διαφορετικά mRNA, που δίνουν γένεση στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη, σε μια διαλυτή μορφή της (sCTLA-4) που στερείται του διαμεμβρανικού τμήματος (εξώνιο 3) και σε ένα μετάγραφο που περιλαμβάνει μόνο τα εξώνια 1 και 4 (εικόνα 26) [327-329].



**Εικόνα 26:** Θέση του γονιδίου *CTLA-4* στο χρωμόσωμα 2, δομή της γενετικής αλληλουχίας, θέση γενετικών πολυμορφισμών και δομή των mRNA μεταγράφων flCTLA4(full length CTLA-4) και sCTLA (soluble CTLA4). ICOS: inducible costimulatory molecule, UTR: untranslated region. (AT)n: πολυμορφισμός AT επαναλήψεων [329]

Το γονίδιο εκφράζεται στα T-κύτταρα κυρίως κατόπιν ενεργοποίησης και μάλιστα το mRNA του ανιχνεύεται μία ώρα μετά τη διέγερση του TCR, φθάνοντας στη μέγιστη συγκέντρωσή του 24-36 ώρες αργότερα. Η πρωτεΐνη κάνει την εμφάνισή της στην κυτταρική μεμβράνη 24-48 ώρες μετά την ενεργοποίηση, αλλά έχειδειχθεί ότι ο TCR είναι σε θέση να ανακατευθύνει την «αποθήκη» των μορίων CTLA-4 που βρίσκονται σε ενδοσώματα και λυσοσώματα εντός του κυτταροπλάσματος προς τη μεμβράνη του κυττάρου κατόπιν διέγερσης. Έτσι τα T- κύτταρα μνήμης, τα οποία διαθέτουν μια μεγάλη δεξαμενή κυτταροπλασματικού προσχηματισμένου CTLA-4 μπορούν σε απάντηση σε ένα ερέθισμα να προωθήσουν στη μεμβράνη ταχύτερα σε σχέση με τα αθώα T- κύτταρα τα μόρια CTLA-4 και να τα διατηρήσουν εκεί επί μακρότερον.

Όσον αφορά τέλος τα CD4+CD25+ ρυθμιστικά T-κύτταρα (Treg), η έκφραση της πρωτεΐνης φαίνεται να παραμένει σταθερή, ενώ έκφραση έχει ανιχνευθεί και σε άλλους πληθυσμούς κυττάρων, όπως τα B λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα, χωρίς γνωστή έως σήμερα λειτουργική σημασία [328].

Η αλληλουχία του *CTLA-4* φαίνεται να είναι καλά συντηρημένη, υποδεικνύοντας και τη σημασία του μορίου στην επίτευξη αποτελεσματικής ανοσίας. Ωστόσο πολυμορφισμοί έχουν αναγνωρισθεί (εικόνα 26) και εύλογα έχουν διερευνηθεί για τυχόν συσχετισμό τους με αυτοάνοσες και κακοήθειες νόσους. Ο SNP 49A/G εντοπίζεται στο πρώτο εξώνιο και οδηγεί στην αντικατάσταση μιας βάσεως αδενίνης από μια γουανίνη στη γενετική αλληλουχία και μιας αλανίνης από μια θρεονίνη στην πολυπεπτιδική αλυσό. Αυτή η αλλαγή προτείνεται ότι προκαλεί διαφορετική επεξεργασία της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μικρότερη μεταφορά αυτής στην κυτταρική μεμβράνη, διαφορετική ικανότητα πρόσδεσης του B7, καθώς και μικρότερη ανασταλτική επί της T-κυτταρικής ενεργοποίησης δράση [327-333].

Οι συσχετίσεις του G αλληλίου με νόσους όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η νόσος Graves, η μυασθένεια gravis, ο διαβήτης τύπου I, η πολλαπλή σκλήρυνση και άλλες αυτοάνοσες οντότητες έχουν αποδώσει μέχρι σήμερα κάποια, όχι πάντοτε σταθερά μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, αποτελέσματα [327]. Αντικρουόμενα ευρήματα έχουν προκύψει και για το A αλληλίο και κακοήθειες νόσους, όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα και του τραχήλου της μήτρας [327]. Στο γαστρικό καρκίνο τόσο το G όσο και το A αλληλίο έχουν ενοχοποιηθεί σε διαφορετικές μελέτες [331,333]. Στο πεδίο της αιματολογίας αναφορές από πληθυσμούς Καυκάσιας προέλευσης πιστοποιούν συσχέτιση του A αλληλίου με την προδιάθεση σε NHL (OR:2 ,95% CI 1·2–3·2, p=0.0043) [334] σε ομάδες ασθενών περιλαμβάνουσες διαφορετικούς υποτύπους τόσο B- όσο και T-NHL [334,335]. Αντιθέτως, όπως προαναφέρθηκε, μελέτη των Cheng και συνεργατών σε ασιατικό δείγμα αναφέρει αυξημένο κίνδυνο GMZL επί GG γονοτύπου, αν και η ίδια μελέτη σημειώνει αυξημένη πιθανότητα λοίμωξης από *H. pylori* για τους ίδιους ασθενείς [289]. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν ανιχνεύθηκε για τα T-λεμφώματα σε κινεζικό πληθυσμό [294].

## IL-22

Η IL-22, μέλος της οικογένειας της IL-10, παρά την αρχική θεώρηση ότι προέρχεται από τα Th1, εν συνεχεία δείχθηκε ότι εκκρίνεται κυρίως από τα Th17 και τα Th22 T-λεμφοκύτταρα. Εξασκεί τις δράσεις της μέσω πρόσδεσης στον ετεροδιμερή υποδοχέα της που αποτελείται από το σύμπλοκο IL-22R και IL-10Rβ ο οποίος εκφράζεται κυρίως σε επιθηλιακά κύτταρα και ως εκ τούτου παρέχει μια οδό επικοινωνίας μεταξύ των ανοσοποιητικών κυττάρων και των ιστών. Κύτταρα στόχοι της IL-22 είναι μεταξύ άλλων τα κερατινοκύτταρα, τα ηπατοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου προκαλεί μέσω του μονοπατιού του STAT3 και των Akt και MAPK κινασών την αυξημένη έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αντιμικροβιακή άμυνα, επούλωση και προστασία έναντι ιστικής καταστροφής. Δράσεις της περιλαμβάνουν την αύξηση της έκφρασης αντιμικροβιακών ουσιών, όπως το Α αμυλοειδές του ορού (SAA), η β-ντεφενσίνη, η Reg3γ, η λιποκαλίνη-2 και οι μουκίνες [336,337].

Η σχέση της IL-22 με την καρκινογένεση και λεμφωματογένεση έχει προσεγγισθεί από κάποιες μελέτες. Έτσι η IL-22 έχει δείχθει να επιτείνει τη δυνατότητα κυτταρικής διείσδυσης και το μεταστατικό δυναμικό στο γαστρικό καρκίνο [338,339], ενώ ο υποδοχέας της ευρίσκεται αυξημένος σε κύτταρα λεμφώματος του μανδύα που ανταποκρίνονται σε έκθεση στην IL-22 με οξυμένη δραστηριότητα της STAT3 οδού και αυξημένη κυτταρική ανάπτυξη [340].

Στην λοίμωξη από *H. pylori*, η έκφραση της IL-22 συσχετίζεται με αυξημένη γαστρική φλεγμονή και συνδέεται με την έκκριση καλπροτεκτίνης, λιποκαλίνης και κάποιων β-ντεφενσινών *in vitro*. Ακόμα, προτείνεται ότι η IL-22 συμμετέχει στην ενεργοποίηση της μεταλλοπρωτεϊνάσης 10 (MMP10) μέσω οδού εξαρτώμενης από την *cagA*, υποδηλώνοντας κάποια επίδραση επί της αγγειογένεσης και ιστικής επιδιόρθωσης [336]. Τα πειράματα των Zhuang και συνεργατών, που αναφέρθηκαν και πιο πάνω, περιληπτικά αναγνωρίζουν αυξημένη παρουσία Th22 κυττάρων επί λοίμωξης από *cagA*<sup>+</sup> στελέχη, προσέλκυση MDSCs εκκρίνοντων S100A8/S100A9 και καταστολή της Th1 πόλωσης [131].

Τέλος, ειδικά στο πεδίο του GMZL, η προαναφερθείσα μελέτη των Liao και συνεργατών, προτείνει ότι η IL-22 οδηγεί σε απελευθέρωση RagIIIα και λιποκαλίνης-2 από το γαστρικό βλεννογόνο και αποτελεί βιοδείκτη θετικής ανταπόκρισης στη θεραπεία εκρίζωσης [288].

Το γονίδιο της *IL-22* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q15 και οι πολυμορφισμοί του δεν έχουν επαρκώς διερευνηθεί σε σχέση με την εμφάνιση παθολογίας στον άνθρωπο. Μεταξύ των περιορισμένων αναφορών, συμπεριλαμβάνονται μελέτες που συσχετίζουν το T αλληλίο του rs1012356 και το C αλληλίο του rs1179251 με θετική απόκριση στη θεραπεία επί ηπατίτιδος C [341], το G αλληλίο του rs1179251 με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του εντέρου [342] και το A αλληλίο του rs2227473 με μειωμένη ευαλοτότητα στην προσβολή από *Mycobacterium tuberculosis* [343]. Όπως συζητήθηκε ήδη, πέντε SNPs του γονιδίου φάνηκε να αυξάνουν τον κίνδυνο γαστρικού MALT λεμφώματος σε ασθενείς ασιατικής προέλευσης [288].

### **TCF19**

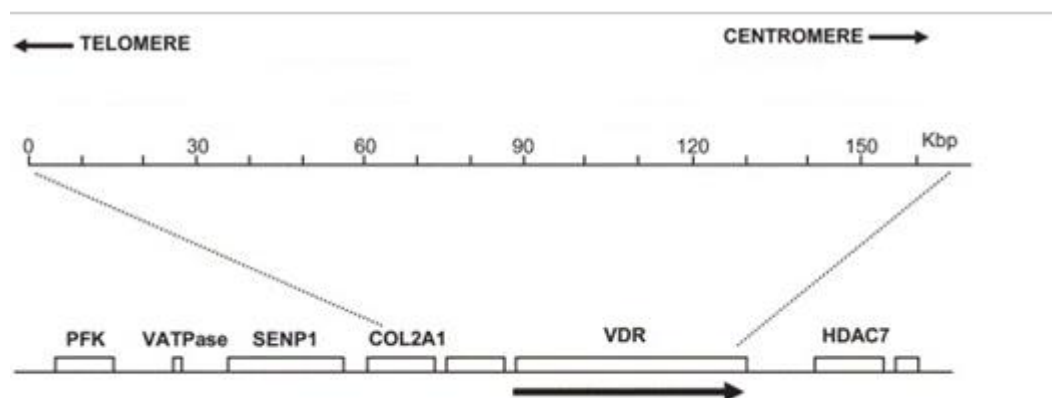
Ο TCF19 (Transcription Factor 19, παλαιότερα γνωστός ως SC1) είναι ένας αυξητικός παράγοντας που συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων απαραίτητων κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. [344]. Η έκφρασή του σημειώνεται αυξημένη στα pro-B και pre-B κύτταρα, καθώς και στα κύτταρα των βλαστικών κέντρων [345]. Ο ρόλος του παράγοντα έχει μελετηθεί όσο αφορά την συμβολή του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα β κύτταρα του παγκρέατος [346], στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα [347] και το ηπατοκυτταρικό καρκίνο [348], ενώ έχει προταθεί ότι αυξημένη έκφραση του γονιδίου επί καρκίνου παχέως εντέρου μπορεί να συσχετίζεται με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό και χειρότερη πρόγνωση [349].

Το γονίδιο του *TCF19* βρίσκεται στην περιοχή της τάξης I του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας στο χρωμόσωμα 6p21.3 και περιλαμβάνει 3 εξόνια [350]. Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου δεν έχουν ιδιαίτερος μελετηθεί στη βιβλιογραφία. Αναφέρεται ωστόσο η σύνδεση του SNP rs7750641 με αιματολογικές παραμέτρους, όπως ο απόλυτος αριθμός λευκοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και ηωσινοφίλων, η μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης και ο αιματοκρίτης [351], καθώς και η διερεύνηση της γενετικής περιοχής στα πλαίσια της γενετικής προδιάθεσης στον σακχαρώδη διαβήτη [352]. Όπως ήδη ειπώθηκε παραπάνω, η μόνη GWAS ανάλυση στο πεδίο των MZL ανέδειξε τον SNP rs7750641 του TCF19 – σε μεγάλη ανισορροπία σύνδεσης με τον rs2922994 ( $r^2=0.85$ )- ως μια πιθανή παράμετρο αυξημένου γενετικού κινδύνου ( $P=3.34 \times 10^{-8}$ ) [279].



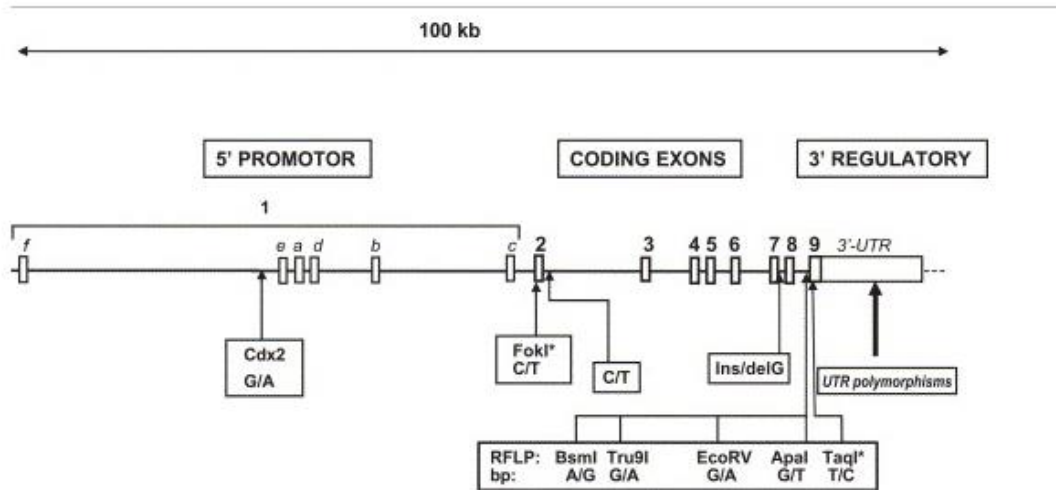
## VDR

Το γονίδιο του υποδοχέα της βιταμίνης D βρίσκεται στην 12q13 χρωμοσωμική περιοχή, καθοδικά του γονιδίου που κωδικοποιεί για το κολλαγόνο τύπου II α1 (COL2A1) (εικόνα 27). Είναι μεγάλο σε μέγεθος (λίγο πάνω από 100 kb), ενώ φέρει και έναν ευμεγέθη υποκινητή, ικανό να μεσολαβεί τη μεταγραφή πολλαπλών διαφορετικών ιστο-ειδικών μεταγράφων [353,354].



**Εικόνα 27:** Δομή του *VDR-COL2A1* γενετικού τόπου στο χρωμόσωμα 12q13.1 Το βέλος υποδεικνύει τη φορά της μεταγραφής στο VDR. PFK=phosphofructokinase; VATPase=Vacuolar ATPase; SENP1=sentrin/SUMO-specific protease; HDAC7=histone deacetylase 7 [353].

Πολύαριθμοι πολυμορφισμοί έχουν μέχρι στιγμής περιγραφεί στο *VDR* γονίδιο, τόσο σε κωδικοποιούσες περιοχές όσο και στα εσόνια, στην περιοχή του υποκινητή, αλλά και την 3' αμετάφραστη περιοχή (εικόνα 28) και έχουν συσχετισθεί, όπως είναι αναμενόμενο, με διαταραχές στο μεταβολισμό του ασβεστίου, αλλά και με διάφορες αυτοάνοσες και νεοπλασματικές παθήσεις. Η λειτουργικότητά των πολυμορφισμών, η επίδραση που μπορεί δηλαδή να έχουν επί της παραγωγής, σταθερότητας, ακεραιότητας και φυσιολογικής λειτουργίας του παραγόμενου mRNA μεταγράφου και της πρωτεΐνης έχει τύχει διερεύνησης σε διαφορετικά μοντέλα και κυτταρικές σειρές χωρίς πάντοτε σταθερά αποτελέσματα, ενώ η πιθανότητα ανισορροπίας σύνδεσης με άλλους πράγματι λειτουργικούς και αιτιολογικά υπόλογους πολυμορφισμούς δεν είναι απίθανη. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι σε μελέτες σύνδεσης SNPs είναι οι TaqI, BsmI, ApaI και FokI που λαμβάνουν τις ονομασίες τους από τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την γονοτύπωσή τους με RFLP τεχνικές [353,354].



**Εικόνα 28:** Θέση των πολυμορφισμών επί του VDR γονιδίου. Με αστερίσκο σημειώνονται οι πολυμορφισμοί σε κωδικοποιούσες περιοχές [353].

Ο FokI πολυμορφισμός εντοπίζεται εγγύτερα προς το 5' άκρο στο εξόνιο 2 και αφορά την αντικατάσταση μιας θυμίνης από μια κυτοσίνη που οδηγεί στην απαλοιφή μιας ATG θέσης έναρξης της μεταγραφής, με αποτέλεσμα η μεταγραφή να ξεκινά από έτερη θέση σε απόσταση εννέα βάσεων. Με αυτό τον τρόπο προκύπτει πρωτεΐνη 424 αμινοξέων (M4 πρωτεΐνη) - αντί για πρωτεΐνη 427 αμινοξέων (M1 πρωτεΐνη)- η οποία έχει βρεθεί να επιδεικνύει μεγαλύτερη μεταγραφική ενεργοποίηση. Αντίθετα, οι υπόλοιποι τρεις SNPs βρίσκονται προς το 3' άκρο του γονιδίου στο εσώνιο 8 (BsmI, ApaI) και στο εξόνιο 8 (TaqI) και δεν έχει φανεί μέχρι στιγμής να επιφέρουν *per se* λειτουργικές αλλαγές στην πρωτεΐνη ή το μετάγραφο. Επιδεικνύουν ωστόσο ανισορροπία σύνδεσης (διαφορετικής ισχύος σε διαφορετικούς πληθυσμούς) με πολυμορφισμούς στην 3' αμετάφραστη περιοχή, που ως γνωστό μπορεί να επιδρούν στη σταθερότητα του προκύπτοντος mRNA. Προτείνεται έτσι ότι κάποιοι απλότυποι πιθανώς συνδέονται με υψηλότερη παρουσία mRNA μεταγράφων, αν και η διαπίστωση αυτή δεν συνιστά σταθερό εύρημα [353,354]

Οι VDR πολυμορφισμοί έχουν μελετηθεί στο πλαίσιο πολλών νοσημάτων ανοσολογικής και κακοήθους αρχής [355,356]. Συγκεκριμένα όσον αφορά τα αιματολογικά νοσήματα, αναφορές συνδέουν τον TaqI πολυμορφισμό με επίτευξη πλήρους ύφεσης στην οξεία μυελογενή λευχαιμία [357], το FokI πολυμορφισμό με την προδιάθεση σε χρόνια μυελογενή και λεμφογενή λευχαιμία [358,359] και τα T και C αλληλία του FokI και TaqI αντίστοιχα με την ανάπτυξη πολλαπλού μυελώματος [360]. Σαφώς τέτοιες προκαταρκτικές συσχετίσεις θα πρέπει να

επαληθευθούν σε μεγαλύτερα δείγματα και διαφορετικούς πληθυσμούς προτού εξαχθούν συμπεράσματα [355,361]. Στο πεδίο των λεμφωμάτων, υψηλή έκφραση του VDR υποδοχέα σε ιστούς εγκλεισμένους σε παραφίνη βρέθηκε σε αναδρομική μελέτη στο 80% των μελετηθέντων HL (αλλά μόλις στο 17% των περιληφθέντων B-NHL) [362], ωστόσο μελέτη σε παιδιατρικό πληθυσμό με HL δεν ανέδειξε κάποια συσχέτιση των SNPs του VDR με το HL [363]. Αναφορά από την Αυστραλία που εξέτασε τους FokI, BsmI και TaqI πολυμορφισμούς σε 584 ασθενείς με NHL και 518 υγιείς μάρτυρες βρήκε συσχέτιση των δύο τελευταίων με το DLBCL, ενώ ο FokI γονότυπος συνδέθηκε με αυξημένο κίνδυνο T-NHL σε εξαιρετικά περιορισμένο ωστόσο δείγμα (16 ασθενείς) [364]. Μια σημαντική ερευνητική προσέγγιση αφορά την προσπάθεια συνδυαστικής συσχέτισης των πολυμορφισμών του VDR και της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία με τον προκύπτοντα κίνδυνο νόσησης από NHL. Παραδείγματος χάριν, μελέτη που περιέλαβε 2.448 ασθενείς με NHL και 1.981 μάρτυρες από τη Δανία και τη Σουηδία μεταξύ 1999 και 2002, ενώ δεν διαπίστωσε επίδραση των πολυμορφισμών στο συνολικό κίνδυνο εκδήλωσης NHL παρά μόνο κάποιες ενδείξεις θετικής συσχέτισης του rs4760655 στην περιοχή του υποκινητή με το οζώδες λέμφωμα, σημείωσε μολοταύτα πως ο TaqI SNP μετέβαλε τη σχέση μεταξύ της έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία και της πιθανότητας εμφάνισης T-NHL. Έτσι, ενώ η αυξημένη έκθεση σε UV ακτινοβολία μείωνε τον κίνδυνο T-NHL στους TT ομοζυγώτες, αυξημένος κίνδυνος παρατηρήθηκε στους CC ομοζυγώτες [365]. Έτερη μελέτη στον ίδιο πολυμορφισμό συμπέρανε ότι οι CC ομοζυγώτες με <7 ώρες/ εβδομάδα έκθεσης στον ήλιο βρίσκονταν σε μεγαλύτερο κίνδυνο λεμφωματογένεσης σε σχέση με τους TT ομοζυγώτες, ιδίως δε όσον αφορά το οζώδες λέμφωμα, ενώ η αύξηση στην ηλιακή έκθεση φάνηκε να εξισώνει τον κίνδυνο [366]. Αντιστοίχως, η επίδραση της έκθεσης στον ήλιο σε ηλικία 13-21 ετών επί της πιθανότητας εμφάνισης NHL δείχθηκε να μεταβάλλεται ανάλογα με τον γονότυπο τριών πολυμορφισμών (rs886441, rs3819545 και rs2239186) στο VDR γονίδιο σε δείγμα 1009 ασθενών (με κύριους όμως υπότυπους τους CLL/SLL, FL και DLBCL) [367]. Τέλος, όπως ήδη έχει ειπωθεί δύο μελέτες έχουν μέχρι στιγμής εξετάσει VDR πολυμορφισμούς στο πλαίσιο των T-δερματικών λεμφωμάτων, χωρίς συμφωνία στα ευρήματά τους.

## Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

α) Η γονοτύπωση των σημειακών πολυμορφισμών:

- 308A/G (rs1800629) και 857C/T (rs1799724) στο γονίδιο *TNFA*
- 49A/G (rs231775) στο γονίδιο *CTLA4*
- 252A/G (rs909253) στο γονίδιο *LTA*
- rs7314777 στο γονίδιο *IL22*
- rs7750641 στο γονίδιο *TCF19*
- του πολυμορφισμού VNTR στο γονίδιο *IL1RN*
- καθώς και των πολυμορφισμών που αφορούν έλλειψη των γονιδίων *GSTT1, GSTM1*

σε κλινικά δείγματα ασθενών με MALT λεμφώματα και υγιών μαρτύρων

β) Η γονοτύπωση των σημειακών πολυμορφισμών:

- 308A/G (rs1800629) και 857C/T (rs1799724) στο γονίδιο *TNFA*
- 49A/G (rs231775) στο γονίδιο *CTLA4*
- 252A/G (rs909253) στο γονίδιο *LTA*
- TaqI (rs731236) στο γονίδιο *VDR*
- ApaI (rs7975232) στο γονίδιο *VDR*
- BsmI (rs1544410) στο γονίδιο *VDR*
- FokI (rs2228570) στο γονίδιο *VDR*
- του πολυμορφισμού VNTR στο γονίδιο *IL1RN*
- καθώς και των πολυμορφισμών που αφορούν έλλειψη των γονιδίων *GSTT1, GSTM1*

σε κλινικά δείγματα ασθενών με T δερματικά λεμφώματα και υγιών μαρτύρων

γ) Η μέτρηση των επιπέδων 25(OH)βιταμίνης D σε κλινικά δείγματα ασθενών με T δερματικά λεμφώματα και υγιών μαρτύρων

δ) Η καταγραφή δημογραφικών και κλινικών δεδομένων των συμμετεχόντων ασθενών και υγιών μαρτύρων

ε) Η αξιολόγηση της συμβολής των παραπάνω πολυμορφισμών στην προδιάθεση για εκδήλωση MALT λεμφώματος και T-δερματικών λεμφωμάτων στον ελληνικό πληθυσμό και η συσχέτιση τους με κλινικά δεδομένα των ασθενών

ζ) Η συσχέτιση των επιπέδων της βιταμίνης D στον ορό με τα T- δερματικά λεμφώματα, τους πολυμορφισμούς του VDR γονιδίου και κλινικές μεταβλητές

## **B. Πειραματικό μέρος**

### **Κεφάλαιο 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **6.1 Ασθενείς- Μάρτυρες- Κλινικά δείγματα**

Για το σκέλος της μελέτης που αφορά το MALT λέμφωμα, μελετήθηκαν 83 ασθενείς με MALT λέμφωμα και 60 υγιείς εθελοντές της ίδιας ηλικιακής κατανομής, ενώ για τα T- λεμφώματα συμπεριλήφθηκαν 58 ασθενείς με T- δερματικό λέμφωμα και συνολικά 87 υγιείς εθελοντές. Στο σύνολο των συμμετεχόντων ελήφθη δείγμα ολικού αίματος, κλινικό ιστορικό και κατεγράφησαν δημογραφικά δεδομένα. Ακόμα, σε υποσύνολο 40 ασθενών με T-δερματικό λέμφωμα και 40 υγιών μαρτύρων οι οποίοι δεν ελάμβαναν από του στόματος βιταμίνη D, δεν βρίσκονταν σε περίοδο κύησης ή γαλουχίας και δεν είχαν υποβληθεί σε PUVA/NUVB το τελευταίο έτος ελήφθη δείγμα ορού προς μέτρηση των επιπέδων της βιταμίνης D. Τα δείγματα συνελέγησαν στα εξωτερικά ιατρεία του Γενικού νοσοκομείου «Λαϊκό» την περίοδο 2016-2019 κατόπιν ενημέρωσης και συγκατάθεσης των ασθενών και υγιών αιμοδοτών. Οι αιμοληψίες για τη μέτρηση της βιταμίνης D πραγματοποιήθηκαν εξ ολοκλήρου κατά τους μήνες Οκτώβριο έως Μάρτιο, λόγω της γνωστής σημειούμενης εποχικής διακύμανσης. Τα δείγματα ολικού αίματος συντηρούνταν στους -20°C έως την απομόνωση DNA όταν αυτή δεν ήταν άμεσα δυνατή, ενώ ο ορός των ασθενών αποχωριζόταν το αργότερο έως 45 λεπτά μετά την αιμοληψία και υποβαλλόταν σε αυθημερόν μέτρηση των επιπέδων της βιταμίνης D.

## 6.2 Μέθοδοι

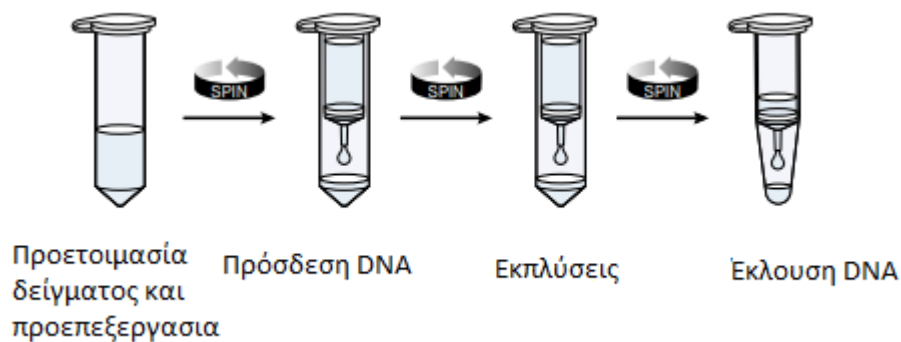
### Απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα με στήλες

- Εισαγωγή

Η απομόνωση γενωμικού DNA από ολικό αίμα με τη χρήση προκατασκευασμένων αντιδραστηρίων (kit) απομόνωσης που βασίζονται σε στήλες συνιστά μια απλή και ταχεία διαδικασία που εμπίπτει στις μεθόδους απομόνωσης DNA στερεής φάσης. Η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων ολικού αίματος που έχει φυλαχθεί σε αντιπηκτικό με κιτρικά, ηπαρίνη ή και EDTA και από ποικιλία ιστών με ταχύτητα και αξιοπιστία ανώτερη μεθόδων υγρής φάσης. Η δυνατότητα χρήσης πιάτων 96 πηγαδιών, αλλά και αυτοματοποιημένων πλαρφορμών επιτρέπει την εφαρμογή σε μεγάλους αριθμούς κλινικών δειγμάτων [369-371].

- Αρχή της μεθόδου

Η απομόνωση DNA από ολικό αίμα με τη χρήση των στηλών φυγοκέντρησης Purelink Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific, USA), βασίζεται στην ειδική σύνθεση της μεμβράνης της στήλης, που εμπεριέχει οξείδιο του πυριτίου (silica gel). Το οξείδιο του πυριτίου μπορεί να προσδέσει το DNA κατά αντιστρεπτό τρόπο ανάλογα με την ιονική σύνθεση του περιβάλλοντος. Μετά την κυτταρική λύση και αποδόμηση των πρωτεϊνών, το DNA κατακρημνίζεται με την προσθήκη αλκοόλης. Κατόπιν το διάλυμα διηθείται δια μέσου της μεμβράνης της στήλης με την εφαρμογή φυγοκέντρησης και το DNA κατακρατείται από το οξείδιο του πυριτίου, ενώ οι πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις διαπερνούν τη στήλη. Το προσδεδεμένο DNA εκπλένεται και τέλος εκλούεται με χαμηλής ιονικής ισχύος διάλυμα ή με νερό ελεύθερο νουκλεάσης. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτει με ικανοποιητική απόδοση DNA προς χρησιμοποίηση στην PCR ή άλλες ενζυματικές αντιδράσεις [369-371].



**Εικόνα 29:** Στάδια απομόνωσης γενωμικού DNA με τη μέθοδο των στηλών.

- Εξοπλισμός και αντιδραστήρια
  - Στήλες Purelink Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific, USA)
  - Πρωτεϊνάση K
  - RNάση A
  - Ρυθμιστικό διάλυμα Lysis/Binding Buffer
  - Ρυθμιστικό διάλυμα Wash Buffer 1
  - Ρυθμιστικό διάλυμα Wash Buffer 2
  - Ρυθμιστικό διάλυμα Elution Buffer
  - Αιθανόλη απόλυτη
  - Σωληνάρια φυγοκέντρωσης 1,5 ml
  - Ακρορύγχη με φίλτρο
  - Φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια των 1,5 ml
  - Πιπέτες
  
- Πειραματική διαδικασία
  1. Στον πυθμένα ενός σωληναρίου eppendorf των 1,5 ml τοποθετούμε 200 μl ολικού αίματος
  2. Προσθέτουμε 20 μl Πρωτεϊνάση K
  3. Προσθέτουμε 20μl RNάση A, αναδεύουμε με vortex και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
  4. Προσθέτουμε 200 μl ρυθμιστικό διάλυμα Lysis/Binding Buffer και αναδεύουμε έντονα για 15 sec.

5. Επωάζουμε στους 55° για 10 min.
6. Φυγοκεντρούμε πολύ σύντομα για να απομακρυνθούν τα σταγονίδια από το καπάκι του σωληναρίου.
7. Προσθέτουμε 200 μl απόλυτη αιθανόλη (αφού το περιεχόμενο του σωληναρίου κρυώσει) και αναδεύουμε έντονα για 15 sec. Φυγοκεντρούμε πάλι πολύ σύντομα.
8. Μεταφέρουμε προσεκτικά το προηγούμενο (στάδιο 7) μείγμα σε μια στήλη, η οποία είναι τοποθετημένη πάνω σε ένα σωληνάριο των 2 ml, χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνουμε το καπάκι της στήλης και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 10.000 x g. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml (παρέχεται από το kit) και πετάμε το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
9. Ανοίγουμε προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προσθέτουμε 500 μl ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας Wash Buffer 1 χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε για 1 min στα 10.000 x g. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο των 2 ml και πετάμε το σωληνάριο που περιέχει το υγρό.
10. Ανοίγουμε προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προσθέτουμε 500 μl αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας Wash Buffer 2 χωρίς να υγρανθεί το χείλος της στήλης. Κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε για 3 min σε ταχύτητα 10.000 x g.
11. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωληνάριο eppendorf των 1,5 ml και πετάμε το σωληνάριο με το υγρό που περιέχει. Ανοίγουμε προσεκτικά το καπάκι της στήλης και προσθέτουμε 200 μl elution buffer. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκεντρούμε για 1 min στη μέγιστη ταχύτητα και το DNA που παραλαμβάνεται στο σωληνάριο φυλάσσεται στους -20° C.



### **Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωθέντος DNA έγινε με το βιοφωτόμετρο Eppendorf 6131, με βάση τη μέτρηση της απορρόφησης UV ακτινοβολίας από το εξετασθέν δείγμα.

Πιο συγκεκριμένα, τα νουκλειικά οξέα επιδεικνύουν μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 260nm. Η απορρόφηση ενός δείγματος συσχετίζεται με βάση καμπύλη βαθμονόμησης με την συγκέντρωση των νουκλεϊνικών οξέων στο δείγμα, ενώ ο λόγος απορρόφησης 260/280 αντανακλά την καθαρότητα του απομονωθέντος DNA, τη συγκέντρωση με άλλα λόγια πρωτεϊνών και άλλων μη επιθυμητών μορίων στο δείγμα. Η επαρκής συγκέντρωση και καθαρότητα του απομονωθέντος γενωμικού DNA στο εκάστοτε δείγμα είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς διασφαλίζει την ακρίβεια και αξιοπιστία των ακολούθως διενεργούμενων μοριακών εφαρμογών [369-371].

### **Μέθοδοι γονοτύπωσης**

Μεταξύ των μελετηθέντων πολυμορφισμών ο IL1RN VNTR και οι GSTM1/GSTT1 null πολυμορφισμοί γονοτυπώθηκαν με PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτική αгарόζη, ενώ οι λοιποί πολυμορφισμοί προσδιορήθηκαν με τη μέθοδο της PCR-RFLP. Λόγω του μεγάλου αριθμού μελετηθέντων πολυμορφισμών στην παρούσα μελέτη, κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούν ακολούθως οι γενικές αρχές των μεθόδων γονοτύπωσης και εν συνεχεία να παρουσιασθούν τα επι μέρους πρωτόκολλα γονοτύπωσης για έκαστο εκ των πολυμορφισμών αυτών.

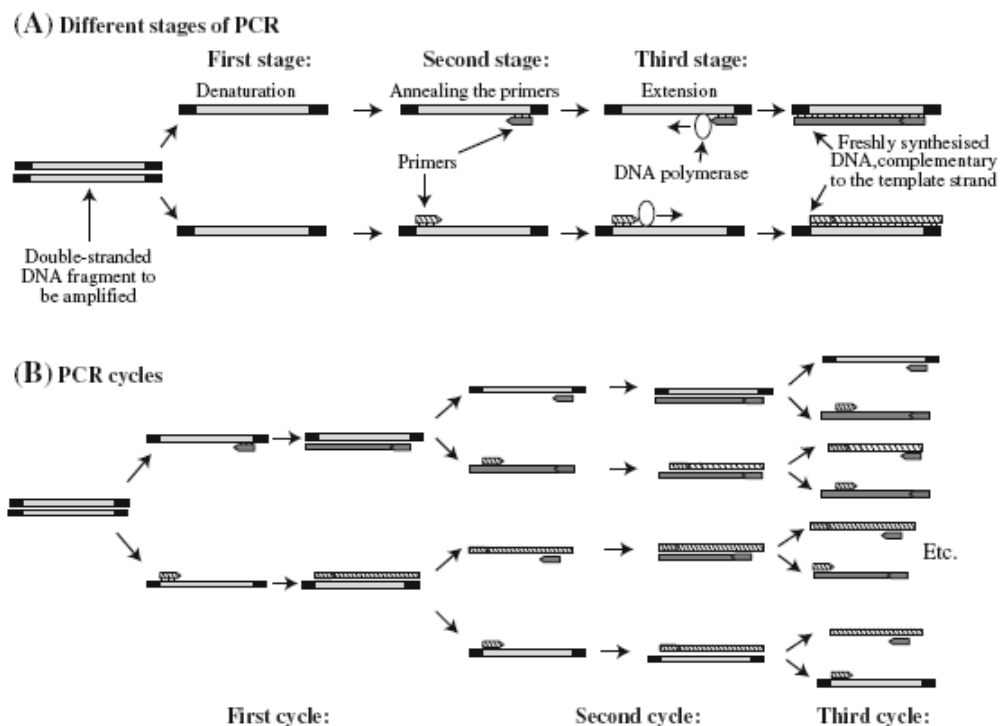
### **Αρχές μεθόδων γονοτύπωσης**

#### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Για την εφαρμογή μεθόδων γονοτύπωσης πολυμορφισμών, απαραίτητη είναι αρχικά η ενίσχυση της εκάστοτε αλληλουχίας στόχου μέσω της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Η PCR πραγματοποιείται με στόχο τον πολλαπλασιασμό ορισμένης αλληλουχίας ενός υποστρώματος γενωμικού DNA. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι απαραίτητοι δύο ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που οριοθετούν την προς ενίσχυση περιοχή, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs-deoxy nucleotide triphosphates),

μια θερμοανθεκτική πολυμεράση και ιόντα μαγνησίου. Η PCR πραγματοποιείται με διαδοχικές αλλαγές της θερμοκρασίας (θερμικούς κύκλους). Αρχικά εφαρμόζεται υψηλή θερμοκρασία για το διαχωρισμό των δίκλωνων μορίων (denaturation-melting), στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώνεται ώστε να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές στις συμπληρωματικές του αλληλουχίες (annealing) και τελικά η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 72°C, την ιδανική θερμοκρασία για την αντιγραφή από τη χρησιμοποιούμενη πολυμεράση (extension-elongation). Η θερμοκρασία και η διάρκεια της αποδιάταξης (denaturation) εξαρτάται από το μήκος και την αλληλουχία του υποστρώματος, καθώς και από το όργανο και τα σωληνάρια που χρησιμοποιούνται, ενώ η θερμοκρασία του υβριδισμού (annealing) πρέπει να είναι λίγους βαθμούς χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης των δύο εκκινητών (οι οποίοι σχεδιάζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης), έτσι ώστε να σχηματίζονται σταθερά σύμπλοκα εκκινητών- αλληλουχιών στόχων αλλά όχι άλλα μη ειδικά σύμπλοκα. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης (θερμοκρασία, διάρκεια σταδίων, αριθμός κύκλων, συγκέντρωση εκκινητών, μαγνησίου, dNTPS, πολυμεράσης) συμβάλλει στην επίτευξη ισχυρής και ειδικής ενίσχυσης της περιοχής στόχου [368-371].



**Εικόνα 30:** Αρχή της μεθόδου PCR. Α) Τα τρία στάδια ενός κύκλου PCR Β) Πολλαπλασιασμός της επιλεγμένης αλληλουχίας σε διαδοχικούς κύκλους PCR [368,369,371]

Για την παρούσα μελέτη, οι αντιδράσεις PCR έγιναν με το όργανο T100 Thermal Cycler (Biorad, ΗΠΑ). Η μονάδα αυτή διαθέτει υποδοχείς για σωληνάρια των 0,2 ml και μπορεί να υποβάλλει τα δείγματα σε κύκλους αλλαγής θερμοκρασίας μεταξύ των 4 και 100°C με ρυθμό αλλαγής της θερμοκρασίας 2,5°/sec. Είναι εξοπλισμένη με θερμαινόμενο κάλυμμα που προλαμβάνει την εξάτμιση των δειγμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες. Μετά την ενίσχυση, τα δείγματα υποβάλλονταν σε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης με σκοπό την επιβεβαίωση παρουσίας προϊόντος σωστού μεγέθους, χωρίς μη ειδικά προϊόντα.

### **PCR-RFLP**

Για τη γονοτύπωση της πλειοψηφίας εκ των μελετηθέντων πολυμορφισμών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism). Η μέθοδος PCR-RFLP αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια:

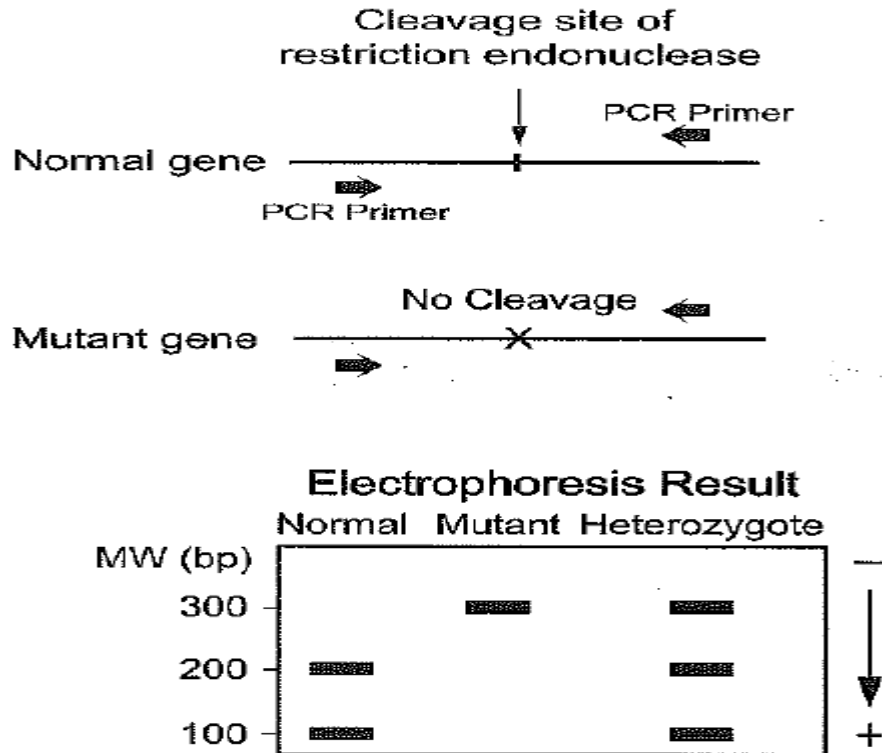
- την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου με συμβατική PCR
- την πέψη των PCR προϊόντων με ειδικό ένζυμο περιορισμού και
- την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης [369-371].

### **Αρχή της μεθόδου**

Η μέθοδος PCR-RFLP χρησιμοποιείται για τη γονοτύπωση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων και βασίζεται στην ιδιότητα των περιοριστικών ενζύμων να πέπτουν το DNA αφού αναγνωρίσουν την ειδική για κάθε ένζυμο αλληλουχία. Τα περιοριστικά ένζυμα ή περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που πέπτουν το δίκλωνο ή μονόκλωνο DNA σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία αναγνώρισης που ονομάζεται αλληλουχία πέψης (restriction site). Τέτοια ένζυμα ανευρίσκονται σε βακτήρια και αρχαία και θεωρείται ότι συνιστούν αμυντικό μηχανισμό έναντι σε ιούς. Τα ένζυμα αναγνωρίζουν ειδικά το ξένο DNA, φειδόμενα το DNA του βακτηρίου που προστατεύεται μέσω μεθυλίωσης.

Όσον αφορά τη χρησιμοποίηση των ενζύμων αυτών στη διάγνωση γνωστών σημειακών μεταλλάξεων, η διαδικασία έχει ως εξής: Αρχικά, περιοχή του γενετικού τόπου που εμπεριέχει την υπό εξέταση σημειακή μετάλλαξη ενισχύεται με τη μέθοδο

PCR. Τα PCR προϊόντα επωάζονται στη συνέχεια με περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίζει τη θέση της μετάλλαξης. Η πέψη του μορίου του DNA εξαρτάται με άλλα λόγια από την ταυτότητα της νουκλεοτιδικής βάσης που βρίσκεται στη θέση αυτή. Αν λόγω χάριν η μετάλλαξη μεταβάλλει την αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου, τότε το μόριο που φέρει τη μετάλλαξη δε θα κοπεί. Αντίθετα το φυσιολογικό μόριο DNA, όπου η αλληλουχία αναγνώρισης είναι ακέραιη, θα κοπεί σε δύο μικρότερα τμήματα. Στην περίπτωση της ετεροζυγωτίας θα προκύψει ένα ακέραιο μόριο DNA που θα φέρει τη μετάλλαξη και δύο μικρότερα τμήματα από την πέψη του φυσιολογικού αλληλίου. Με την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης και το διαχωρισμό τους ανάλογα με το μοριακό τους βάρος προσδιορίζεται εύκολα αν το δείγμα ανήκει σε ομοζυγώτη, ετεροζυγώτη ή φυσιολογικό για τη μετάλλαξη άτομο. Ο ομοζυγώτης μεταλλαγμένος θα φέρει μια ζώνη μεγάλου μοριακού βάρους ίσου με το μοριακό βάρος της ενισχυθείσας αλληλουχίας. Ο ομοζυγώτης φυσιολογικός θα εμφανίζει δύο ζώνες που αντιστοιχούν στα τμήματα που προκύπτουν από την πέψη του DNA και ο ετεροζυγώτης τρεις ζώνες που αντιστοιχούν στο ακέραιο μόριο DNA και στα δύο τμήματα που προκύπτουν από την ενζυμική πέψη (εικόνα 31) [369-371]



**Εικόνα 31:** Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου PCR-RFLP. Το γονίδιο που μελετάται ενισχύεται με κατάλληλους εκκινητές και στη συνέχεια επωάζεται με επιλεγμένη περιοριστική ενδονουκλεάση, η οποία αναγνωρίζει αλληλουχία που περιλαμβάνει την εξεταζόμενη πολυμορφική θέση. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα το φυσιολογικό γονίδιο αναγνωρίζεται και «κόβεται» από το ένζυμο, ενώ η μετάλλαξη διαταράσσει την αλληλουχία αναγνώρισης και δεν επιτρέπει την πέψη. Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης που ακολουθεί ο ομοζυγώτης φυσιολογικός φέρει δύο ζώνες που προκύπτουν από την πέψη του PCR προϊόντος σε δύο τμήματα, ο ομοζυγώτης μεταλλαγμένος φέρει μία ζώνη που αντιστοιχεί στο άπεπτο PCR προϊόν και ο ετεροζυγώτης φέρει τρεις ζώνες, μία στο μέγεθος του άπεπτου PCR προϊόντος και 2 στο μέγεθος των 2 τμημάτων που προκύπτουν από την ενζυμική πέψη του PCR προϊόντος [369-371]

## Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

### Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση είναι η πιο κοινή τεχνική ανάλυσης νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την απομόνωση τμημάτων DNA που συντίθενται κατά την PCR. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τόσο το DNA όσο και το RNA είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH λόγω των φωσφορικών ομάδων τους και κατά συνέπεια θα μετακινηθούν προς την άνοδο (το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο) όταν εφαρμοσθεί ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαχωρισμός των νουκλεϊκών οξέων επιτυγχάνεται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος όταν αυτά

ηλεκτροφορηθούν σε γέλη πολυμερούς. Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους. Έτσι, τα μικρότερα μόρια DNA μετακινούνται στην πηκτή πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα. Επειδή η πηκτή εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων, τα μόρια διαφορετικού μεγέθους διαχωρίζονται σε «ζώνες». Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιείται σε κάθε εφαρμογή εκφράζεται σε %w/v και εξαρτάται από την ικανότητα διάκρισης (resolution) που επιδιώκεται. Η πηκτή αγαρόζης είναι διαπερατή για χρωστικές, όπως το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο έχει τη δυνατότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα και να σχηματίζει φθορίζον σύμπλοκο με το DNA, καθιστώντας ορατές τις ζώνες των διαχωρισμένων μορίων [369-371].

### **Πειραματική πορεία**

Για το διαχωρισμό των προϊόντων της PCR και των προϊόντων της ενζυματικής πέψης έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης παρασκευασμένης με την απαραίτητη κατά περίπτωση αναλογία αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5X (0,5X: διάλυμα αραιωμένο κατά 0,5 φορές) (2M Tris, 1M βορικό οξύ, 50 mM EDTA), ώστε να επιτευχθεί η ζητούμενη ικανότητα διάκρισης. Κατόπιν θερμάνσεως προστίθενται βρωμιούχο αιθίδιο. Κατάλληλος όγκος δείγματος (5-10  $\mu$ l) αναμιγνύεται με διάλυμα πλήρωσης (gel-loading buffer) [5ml γλυκερόλης, 1 mL κυανού της βρωμοφαινόλης 10%, 1 mL κυανού του ξυλενίου 10%, 250  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα TBE 40X (40X: διάλυμα συμπυκνωμένο κατά 40 φορές) και 2,75 mL H<sub>2</sub>O] σε αναλογία 5:1. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE 0,5X, υπό σταθερή τάση 100V για 30 λεπτά. Παράλληλα με τα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση του δείκτη μοριακών βαρών DNA (Generuler 100bp DNA Ladder, Thermo Fisher), για τον προσδιορισμό του μεγέθους των PCR προϊόντων. Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους κύματος 312 nm λόγω της εκπομπής ακτινοβολίας φθορισμού από το προσδεδεμένο στο DNA βρωμιούχο αιθίδιο.

### 6.3 Πρωτόκολλα γονοτύπωσης των υπό μελέτη πολυμορφισμών

#### 6.3.1. Μέθοδος για τον πολυμορφισμό 308A/G στο γονίδιο *TNF $\alpha$*

Ο πολυμορφισμός rs1800629 (*TNF $\alpha$*  308A/G) που εξετάστηκε στο γονίδιο *TNF- $\alpha$*  αφορά μια αλλαγή G→A. Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε περιοχή 107 bp ανοδικά του γονιδίου *TNF- $\alpha$*  στη χρωμοσωμική περιοχή 6p21.33. (GenBank accession number: NG\_012010.1) με τη χρήση εκκινητών (Invitrogen, ΗΠΑ) αλληλουχίας που φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα.

<b>Πρόσθιος εκκινητής, 308F</b>	5' AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT 3'
<b>Ανάστροφος εκκινητής, 308R</b>	5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'

**Πίνακας 23:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του *TNF $\alpha$*

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου Minotech Taq (Minotech, Ελλάδα), του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος και του μαγνησίου που παρέχεται με το kit. Το πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25μl είχε ως εξής (πίνακας 24):

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Αρχική Συγκέντρωση</b>	<b>Προστιθέμενος όγκος (μL)</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
H <sub>2</sub> O	-	17,25	-
Buffer (Minotech)	10X	2,5	1X
MgCl (Minotech)	25mM	1,5	1,5mM
dNTPs (Thermofisher)	10mM	0,5	200μM
Πρόσθιος εκκινητής, 308F	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής, 308R	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL
Minotech	5 U/μL	0,25	1,25 U/μL

Πολυμεράση			
Δείγμα DNA		2	

**Πίνακας 24:** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος μεγέθους 108bp του *TNF $\alpha$* .

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	60°C	30 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 25:** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *TNF $\alpha$* .

Η παρουσία σωστού μεγέθους προϊόντος επιβεβαιώνεται μετά την PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%.

Τα προϊόντα της PCR επιάζονται κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση NcoI (10.000U/mL, NEB). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το μικρόβιο *Nocardia corallina* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο από το kit Buffer NEBuffer 3.1 [50 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 100 mg/ml BSA)]. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:



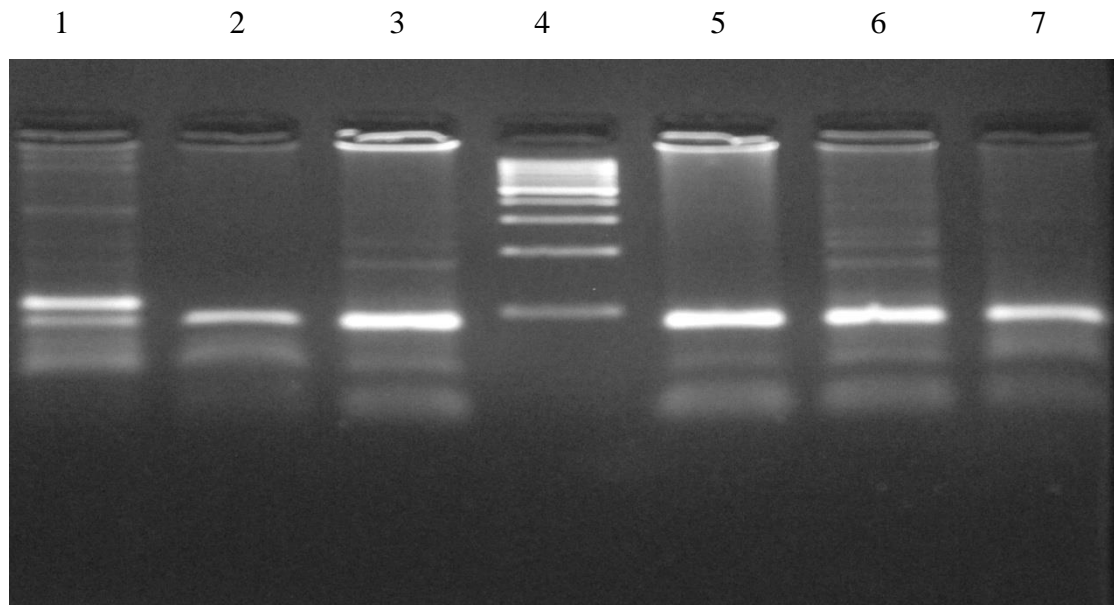


Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15  $\mu\text{L}$ , το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος ( $\mu\text{L}$ )	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο NcoI	10000 U/mL	0,5 $\mu\text{l}$	5U
NEBBuffer 3.1	10X	1,5 $\mu\text{L}$	1X
PCR προϊόν	-	7 $\mu\text{L}$	-
H <sub>2</sub> O		6 $\mu\text{L}$	

**Πίνακας 26:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονιδιακού τμήματος του TNF308A/G.

Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 4% (εικόνα 32). Σε περίπτωση παρουσίας του A αλληλίου σε ομόζυγη κατάσταση το ένζυμο δεν αναγνωρίζει τη θέση περιορισμού και το PCR προϊόν παραμένει άκοπο σε μέγεθος 107 bp (μία ζώνη στην ηλεκτροφόρηση), ενώ στη περίπτωση παρουσίας του G αλληλίου αποκόπτεται το PCR προϊόν σε δύο κομμάτια (87 και 20 bp, θέσεις 2,3,5,6,7 στην εικόνα 32). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανευρίσκονται 3 ζώνες στην ηλεκτροφόρηση (107, 87, 20 bp, π.χ. θέση 1 στην εικόνα 32).



**Εικόνα 32:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 4% για την ανάλυση του πολυμορφισμού TNFα 308 (στην θέση 4 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp). Στη θέση 1 παρατηρείται AG ετεροζυγώτης για τον πολυμορφισμό ενώ στις υπόλοιπες GG ομοζυγώτες.

### 6.3.2 Μέθοδος για τον πολυμορφισμό 857 C/T στο γονίδιο TNFα

Ο πολυμορφισμός rs1799724 (857C/T) που εξετάστηκε στο γονίδιο *TNF-α* αφορά μια αλλαγή C→T. Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε περιοχή ανοδικά του γονιδίου TNF-α μήκους 131 bp στη χρωμοσωμική περιοχή 6p21.33. (GenBank accession number: NG\_012010.1) με τη χρήση εκκινητών (Invitrogen, ΗΠΑ) με αλληλουχία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Ο πρόσθιος εκκινητής εισάγει ένα G νουκλεοτίδιο στη θέση 31574700 ώστε να δημιουργηθεί θέση αναγνώρισης για το περιοριστικό ένζυμο HincII.

<b>Πρόσθιος εκκινητής, 857F</b>	5'-AAGTCGAGTATGGGGACCCCCC <b>G</b> TTAA-3'
<b>Ανάστροφος εκκινητής, 857R</b>	5'-CCCCAGTGTGTGGCCATATCTTCTT-3'

**Πίνακας 27:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος ανοδικά του *TNFα*. Με κόκκινο χρώμα υπογραμμίζεται το G νουκλεοτίδιο που εισάγεται με την PCR.

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου Minotech Taq (Minotech, Ελλάδα), του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος και του μαγνησίου που παρέχεται με το kit. Το πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25μl είχε ως εξής (πίνακας 28):

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	-	17,25	-
Buffer (Minotech)	10X	2,5	1X
MgCl (Minotech)	25mM	1,5	1,5Mm
dNTPs (Thermofisher)	10mM	0,5	200μM
Πρόσθιος εκκινητής, 857F	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής, 857R	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL
Minotech Πολυμεράση	5 U/μL	0,25	1,25 U/μL
Δείγμα DNA		2	

**Πίνακας 28 :** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος μεγέθους 131bp ανοδικά του TNFa.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	55°C	30 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 29:** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος ανοδικά του TNFa.

Η παρουσία σωστού μεγέθους προϊόντος επιβεβαιώνεται μετά την PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%.

Τα προϊόντα της PCR επωάζονται κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση HincII (10.000U/mL, NEB). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το μικρόβιο *Haemophilus influenzae* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο από το kit Buffer NEBuffer 3.1 [50 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 100 mg/ml BSA]. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:



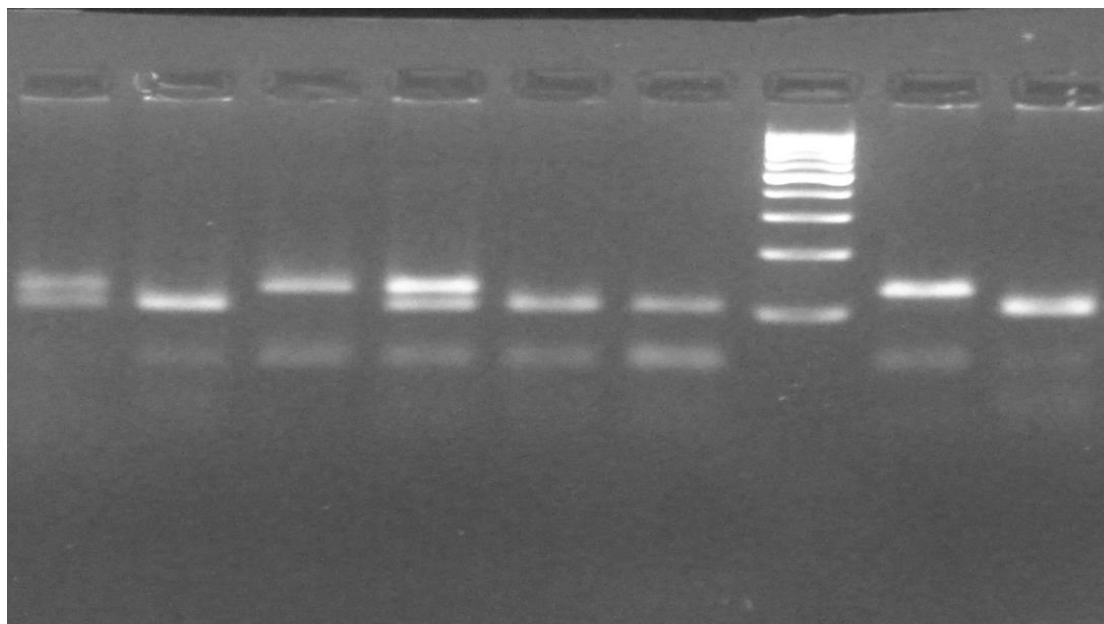
Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 μL, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο HincII	10000 U/mL	0,5 μl	5U
NEBBuffer 3.1	10X	1,5 μL	1X
PCR προϊόν	-	7 μL	-
H <sub>2</sub> O		6 μL	

**Πίνακας 30:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονιδιακού τμήματος του TNFα.

Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 4% (εικόνα 33). Σε περίπτωση παρουσίας του πολυμορφισμού σε ομόζυγη κατάσταση το ένζυμο δεν αναγνωρίζει τη θέση περιορισμού και το PCR προϊόν παραμένει άκοπο σε μέγεθος 131 bp (θέσεις 3 και 8 στην εικόνα 33), ενώ στη περίπτωση απουσίας του πολυμορφισμού αποκόπτει το PCR προϊόν σε δύο κομμάτια (106 και 25 bp, θέσεις 2,5,6,9 στην εικόνα 33). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν τρία προϊόντα μετά την πέψη μεγέθους 131, 106, 25 bp (π.χ. θέσεις 1 και 4 στην εικόνα 33).

1      2      3      4      5      6      7      8      9



**Εικόνα 33:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 4% για την ανάλυση του πολυμορφισμού TNFα 857 (στην θέση 7 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp). Στις θέσεις 1,4 παρατηρούνται CT ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό, στις θέσεις 2,5,6,9 CC ομοζυγώτες και στις θέσεις 3,8 TT ομοζυγώτες.

### 6.3.3. Μέθοδος για τον πολυμορφισμό 252A>G (rs909253) στο γονίδιο *LTA*

Ο πολυμορφισμός rs909253 (252A/G) που εξετάστηκε στο γονίδιο *LTA* αφορά μια αλλαγή A→G. Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε περιοχή του γονιδίου *LTA* μήκους 779 bp στη χρωμοσωμική περιοχή 6p21.33. (GenBank accession number: NG\_012010.1) με τη χρήση εκκινητών (Invitrogen, ΗΠΑ) με αλληλουχία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .

<b>Πρόσθιος εκκινητής, LTAF</b>	5-CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA-3
<b>Ανάστροφος εκκινητής, LTAR</b>	5- GGGGTGGATGCTTGGGTTC-3

**Πίνακας 31:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του *LTA*.

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου DreamTaq (Thermofisher scientific, ΗΠΑ) και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται με το kit με πρωτόκολο:

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Αρχική Συγκέντρωση</b>	<b>Προστιθέμενος όγκος (μL)</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
H <sub>2</sub> O	-	18,75	-
Buffer (Thermofisher)	10X	2,5	1X
dNTPs (Thermofisher)	10mM	0,5	200μM
Πρόσθιος εκκινητής, LTAF	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/MI
Ανάστροφος εκκινητής, LTAR	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/MI
Dreamtaq Πολυμεράση	5 U/μL	0,25	1,25 U/MI
Δείγμα DNA		2	

**Πίνακας 32 :** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος μεγέθους 779bp στο γονίδιο *LTA*.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	65°C	45 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	60 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 33:** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *LTA*.

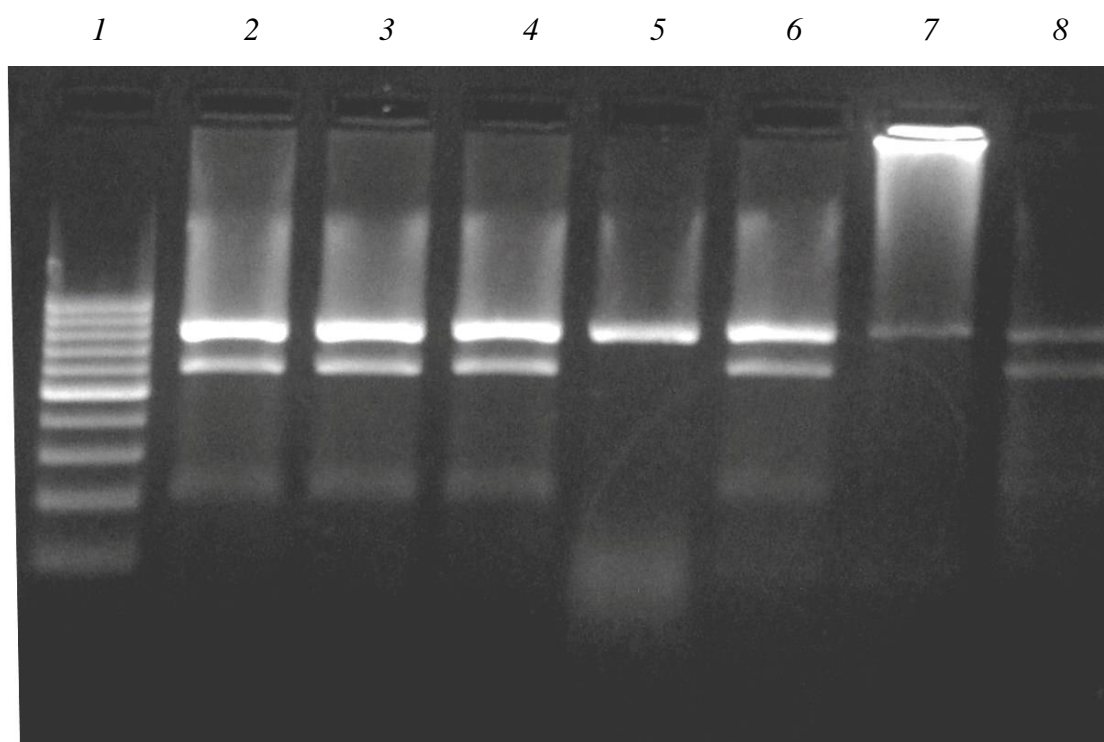
Η παρουσία σωστού μεγέθους προϊόντος επιβεβαιώνεται μετά την PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%.

Τα προϊόντα της PCR επώάζονται κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση NcoI (10.000U/mL, NEB), που περιγράφηκε παραπάνω. Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15  $\mu$ L, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος ( $\mu$ L)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο NcoI	10000 U/mL	0,5 $\mu$ l	5U
NEBBuffer 3.1	10X	1,5 $\mu$ L	1X
PCR προϊόν	-	7 $\mu$ L	-
H <sub>2</sub> O		6 $\mu$ l	

**Πίνακας 34:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονιδιακού τμήματος του *LTA*.

Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 2% (εικόνα 34). Σε περίπτωση παρουσίας του A για την πολυμορφική θέση αλληλίου σε ομόζυγη κατάσταση το ένζυμο δεν αναγνωρίζει τη θέση περιορισμού και το PCR προϊόν παραμένει άκοπο σε μέγεθος 779 bp (μία ζώνη στην ηλεκτροφόρηση, θέσεις 5 και 7 στην εικόνα 34), ενώ στη περίπτωση παρουσίας του G για την πολυμορφική θέση αλληλίου αποκόπτει το PCR προϊόν σε δύο κομμάτια (201 και 578 bp). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανευρίσκονται 3 ζώνες στην ηλεκτροφόρηση (779, 578, 201 bp, π.χ. θέσεις 2,3,4,6 και 8 στην εικόνα 34).



**Εικόνα 34:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% για την ανάλυση του πολυμορφισμού LTA 252A>G (στην θέση 1 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp). Στις θέσεις 2,3,4,6 και 8 παρατηρούνται AG ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό και στις θέσεις 5 και 7 AA ομοζυγώτες.

#### **6.3.4.Μέθοδος για τον πολυμορφισμό CTLA-4 49 A/G (rs231775) στο γονίδιο CTLA-4**

Ο πολυμορφισμός rs231775 (49 A/G) που εξετάσθηκε στο γονίδιο CTLA-4 αφορά μια αλλαγή A→G. Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε περιοχή του γονιδίου CTLA-4 μήκους 162 bp στη χρωμοσωμική περιοχή 2q33.2. (GenBank accession number: NC\_000002.12) με τη χρήση εκκινητών (Invitrogen,ΗΠΑ) με αλληλουχία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .



<b>Πρόσθιος εκκινητής, CTLA-F</b>	5'-GCT CTA CTT CCT GAA GAC CT-3'
<b>Ανάστροφος εκκινητής, CTLA-R</b>	5'-AGT CTC ACT CAC CTT TGC AG-3'

**Πίνακας 35:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του *CTLA-4*.

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου DreamTaq (Thermofisher scientific, ΗΠΑ) και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται με το kit. Το πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25μl είχε ως εξής (πίνακας 36):

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Αρχική Συγκέντρωση</b>	<b>Προστιθέμενος όγκος (μL)</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
H <sub>2</sub> O	-	18,75	-
Buffer (Thermofisher)	10X	2,5	1X
dNTPs (Thermofisher)	10mM	0,5	200μM
Πρόσθιος εκκινητής, CTLA-F	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/MI
Ανάστροφος εκκινητής, CTLA-R	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/MI
Dreamtaq Πολυμεράση	5 U/MI	0,25	1,25 U/MI
Δείγμα DNA		2	

**Πίνακας 36:** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος μεγέθους 162 bp στο γονίδιο *CTLA-4*.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	57°C	45 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 37:** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *CTLA-4*.

Η παρουσία σωστού μεγέθους προϊόντος επιβεβαιώνεται μετά την PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%.

Τα προϊόντα της PCR επωάζονται κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση BbVI (2.000U/mL, NEB). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το μικρόβιο *Bacillus brevis* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο από το kit Buffer Cutsmart [50mM potassium acetate, 20 mM tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 100 μg/ml BSA, pH: 7,9 στους 25C]. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:



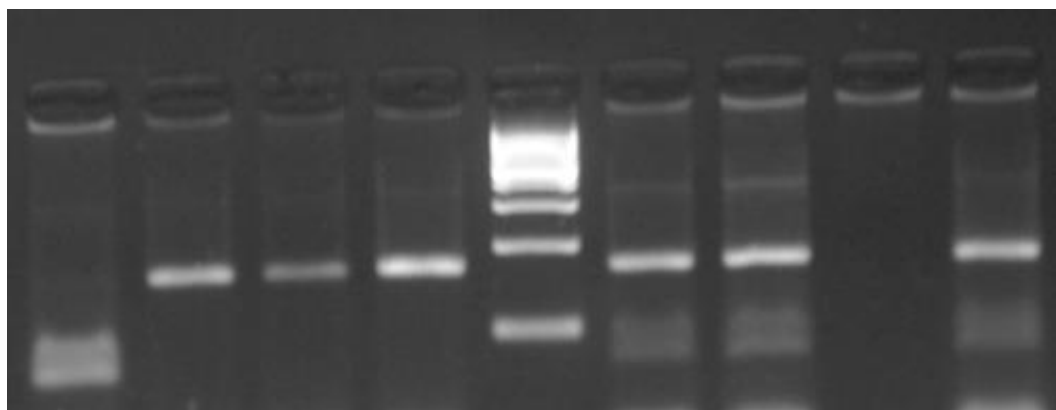
Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 μL, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο BbvI	2000 U/mL	2,5 μl	5U
NEBBuffer Cutsmart	10X	1,5 μL	1X
PCR προϊόν	-	6 μL	-
H <sub>2</sub> O		5 μL	

**Πίνακας 38:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονιδιακού τμήματος του *CTLA-4*.

Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 3% (εικόνα 35). Σε περίπτωση παρουσίας του A για την πολυμορφική θέση αλληλίου σε ομόζυγη κατάσταση το ένζυμο δεν αναγνωρίζει τη θέση περιορισμού και το PCR προϊόν παραμένει άκοπο σε μέγεθος 162 bp (μία ζώνη στην ηλεκτροφόρηση, θέσεις 2,3 και 4 στην εικόνα 35), ενώ στη περίπτωση παρουσίας του G για την πολυμορφική θέση αλληλίου αποκόπτεται το PCR προϊόν σε δύο κομμάτια (88 και 74 bp, θέση 1 στην εικόνα 35). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανευρίσκονται 3 ζώνες στην ηλεκτροφόρηση (162, 88, 74 bp, π.χ. θέσεις 6,7,9 στην εικόνα 35).

**1      2      3      4      5      6      7      8      9**



**Εικόνα 35:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% για την ανάλυση του πολυμορφισμού CTLA 49A/G (στην θέση 5 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp και στη θέση 8 αρνητικός μάρτυρας). Στη θέση 1 παρατηρείται GG ομοζυγώτης, στις θέσεις 6,7 και 9 παρατηρούνται AG ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό και στις θέσεις 2,3 και 4 AA ομοζυγώτες.

### 6.3.5. Μέθοδος για τον πολυμορφισμό rs7314777 στο γονίδιο *IL-22*

Ο πολυμορφισμός rs7314777 που εξετάστηκε στο γονίδιο *IL-22* αφορά μια αλλαγή C→T. Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης αναπτύχθηκε νέα μεθοδολογία RFLP, με τη βοήθεια των διαδουκτωακών προγραμμάτων Primer3 (σχεδιασμός εκκινητών), Primer Blast (έλεγχος ειδικότητας των σχεδιασθέντων εκκινητών) και NEB2 (επιλογή κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου). Η μέθοδος περιλαμβάνει ενίσχυση περιοχής του γονιδίου *IL-22* μήκους 615 bp στη χρωμοσωμική περιοχή 12q15. (GenBank accession number: NC\_000012.11) με τη χρήση εκκινητών (Invitrogen, ΗΠΑ) με αλληλουχία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .

<b>Πρόσθιος εκκινητής, IL22-F</b>	5'CCCTGATGGACCAAGCATCA-3'
<b>Ανάστροφος εκκινητής, IL22-R</b>	5'-TCTTCATCTGCGGTGGCTTT-3'

**Πίνακας 39:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του γονιδίου της *IL-22*.

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου DreamTaq (Thermofisher scientific, ΗΠΑ) και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται με το kit. Το πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25μl είχε ως εξής (πίνακας 40):

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Αρχική Συγκέντρωση</b>	<b>Προστιθέμενος όγκος (μL)</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
H <sub>2</sub> O	-	18,75	-
Buffer (Thermofisher)	10X	2,5	1X
dNTPs (Thermofisher)	10mM	0,5	200μM
Πρόσθιος εκκινητής, IL22-F	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής, IL22-R	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL

DreamTaq Πολυμεράση	5 U/μL	0,25	1,25 U/μL
Δείγμα DNA		2	

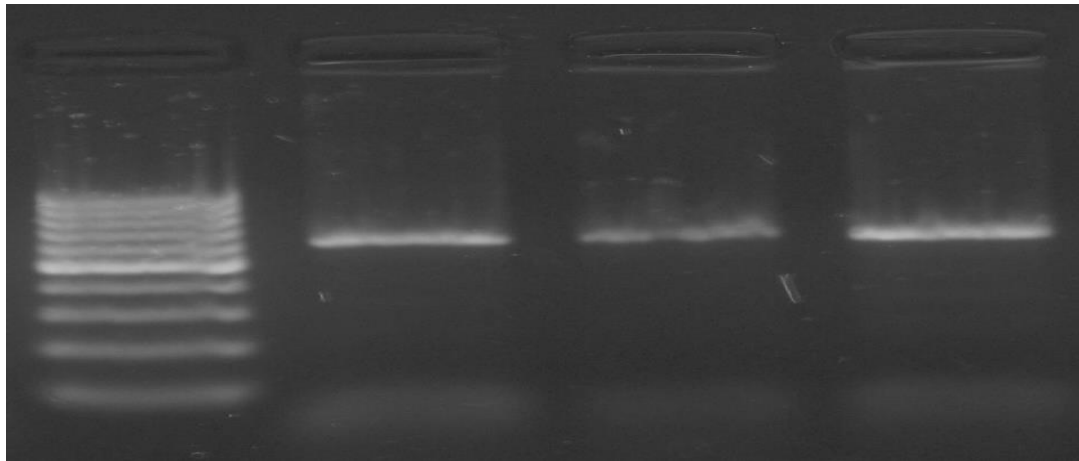
**Πίνακας 40:** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος μεγέθους 615bp της *IL-22*.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που επιλέχθηκε, κατόπιν πειραμάτων βελτιστοποίησης των συνθηκών προς επίτευξη ικανοποιητικής και ειδικής ενίσχυσης, φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επανάληψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	57°C	30 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 41:** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος της *IL-22*.

Η παρουσία σωστού μεγέθους προϊόντος επιβεβαιώνεται μετά την PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% (εικόνα 36).



**Εικόνα 36:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2% του PCR προϊόντος 615 bp για τον πολυμορφισμό rs7314777 (στην θέση 1 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100 bp).

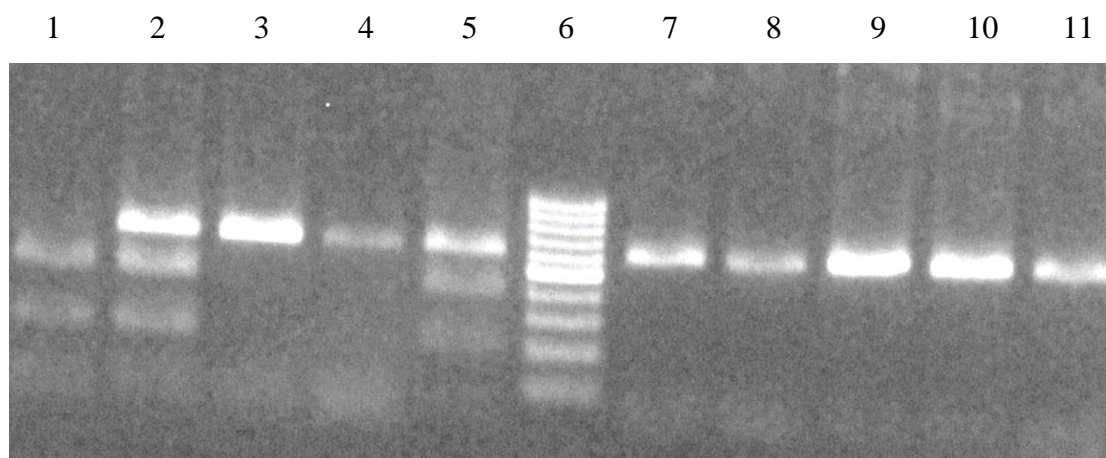
Τα προϊόντα της PCR επωάζονται κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση BBVI (2.000U/mL, NEB), που περιγράφηκε παραπάνω. Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15  $\mu$ L, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος ( $\mu$ L)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο BBVI	2000 U/mL	2,5 $\mu$ l	5U
NEBBuffer Cutsmart	10X	1,5 $\mu$ L	1X
PCR προϊόν	-	6 $\mu$ L	-
H <sub>2</sub> O		5 $\mu$ L	

**Πίνακας 42:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονιδιακού τμήματος της IL-22.

Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης 2% (εικόνα 37). Σε περίπτωση παρουσίας του πολυμορφισμού σε ομόζυγη κατάσταση (CC) το ένζυμο αναγνωρίζει τη θέση περιορισμού και το PCR προϊόν αποκόπτεται σε δύο τμήματα μήκους 402 και 213 bp (θέση 1 στην εικόνα 37), ενώ στη περίπτωση απουσίας του πολυμορφισμού (TT) το PCR προϊόν παραμένει άκοπο (615 bp, θέσεις

3,4,7,8,9,10,11 στην εικόνα 37). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν τρία προϊόντα μετά την πέψη μεγέθους 615, 402, 213 bp (π.χ. θέσεις 2,5 στην εικόνα 37).



**Εικόνα 37:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 2% για την ανάλυση του πολυμορφισμού στο γονίδιο *IL-22* (στην θέση 6 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp). Στις θέσεις 2 και 5 παρατηρούνται CT ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό, στις θέσεις 3,4,7,8,9,10 και 11 TT ομοζυγώτες και στη θέση 1 CC ομοζυγώτης.

### 6.3.6. Μέθοδος για τον πολυμορφισμό rs7750641 στο γονίδιο *TCF-19*

Ο πολυμορφισμός rs7750641 που εξετάστηκε στο γονίδιο *TCF-19* αφορά μια αλλαγή C→T. Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης αναπτύχθηκε νέα μεθοδολογία RFLP, με τη βοήθεια των διαδουκτυακών προγραμμάτων Primer3 (σχεδιασμός εκκινητών), Primer Blast (έλεγχος ειδικότητας των σχεδιασθέντων εκκινητών) και NEB2 (επιλογή κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου). Η μέθοδος περιλαμβάνει ενίσχυση περιοχής του γονιδίου *TCF-19* μήκους 661 bp στο χρωμόσωμα 6 (GenBank accession number: NC\_000006.12) με τη χρήση εκκινητών (Invitrogen, ΗΠΑ) με αλληλουχία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .

<b>Πρόσθιος εκκινητής, TCF19-F</b>	5'-GGCAGGGATCCTTTGTAGGAA-3'
<b>Ανάστροφος εκκινητής, TCF19-R</b>	5'-TTTCCTCCGATTGCGTTGTG-3'

**Πίνακας 43:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του γονιδίου του *TCF-19*.

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου DreamTaq (Thermofisher scientific, ΗΠΑ) και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται με το kit. Το πρωτόκολο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25μl είχε ως εξής (πίνακας 44):

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	-	18,75	-
Buffer (Thermofisher)	10X	2,5	1X
dNTPs (Thermofisher)	10mM	0,5	200μM
Πρόσθιος εκκινητής, TCF-F	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής, TCF-R	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL
DreamTaq Πολυμεράση	5 U/μL	0,25	1,25 U/rxn
Δείγμα DNA		2	

**Πίνακας 44:** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος μεγέθους 661bp του *TCF-19*.

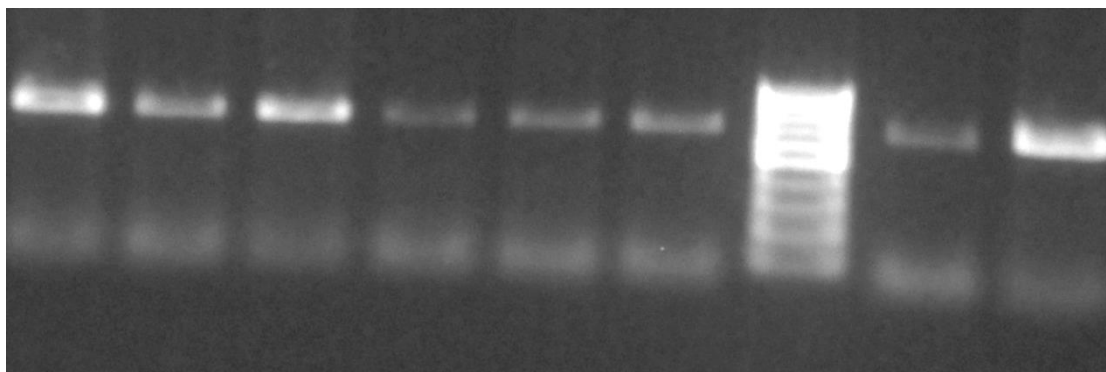
Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που επιλέχθηκε, κατόπιν πειραμάτων βελτιστοποίησης των συνθηκών προς επίτευξη ικανοποιητικής και ειδικής ενίσχυσης, φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:



Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	53°C	30 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 45:** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *TCF-19*.

Η παρουσία σωστού μεγέθους προϊόντος επιβεβαιώνεται μετά την PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2%.



**Εικόνα 38:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2% του PCR προϊόντος 661 bp για τον πολυμορφισμό rs7750641 (στην θέση 8 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100 bp).

Τα προϊόντα της PCR επιάζονται κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση *ApaI* (50.000U/mL, NEB). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το μικρόβιο *Acetobacter pasteurianus* sub. *pasteurianus* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 25°C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο από το kit Buffer Cutsmart [50mM potassium acetate, 20 mM tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 100 µg/ml BSA, pH: 7,9 στους 25C). Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:

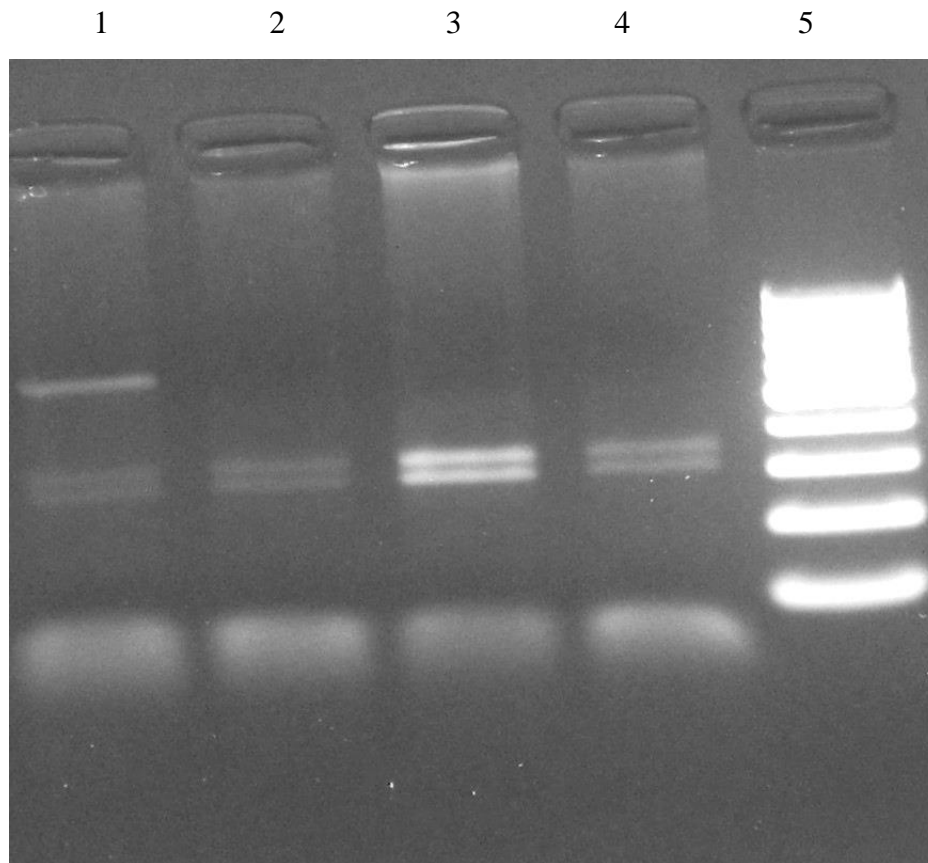


Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 25°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 μL, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο ApaI	50.000 U/mL	0,1 μl	5U
Buffer Cutsmart	10X	1,5 μL	1X
PCR προϊόν	-	8 μL	-
H2O		5,4 μL	

**Πίνακας 46:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονιδιακού τμήματος του *TCF-19*.

Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% (εικόνα 39). Σε περίπτωση παρουσίας ομοζυγωτίας για το WT C αλλήλιο (C/C) το ένζυμο αναγνωρίζει τη θέση περιορισμού και το PCR προϊόν αποκόπτεται σε δύο τμήματα μήκους 308 και 353 bp (θέσεις 2,3,4 στην εικόνα 39), ενώ στη περίπτωση παρουσίας του πολυμορφισμού σε ομόζυγη κατάσταση (T/T) το PCR προϊόν παραμένει άκοπο. Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας προκύπτουν τρία προϊόντα μετά την πέψη μεγέθους 661, 353, 308 bp (π.χ. θέση 1 στην εικόνα 39).



**Εικόνα 39:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2% για την ανάλυση του πολυμορφισμού στο γονίδιο *TCF-19* (στην θέση 5 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp). Στη θέση 1 παρατηρείται C/T ετεροζυγώτης για τον πολυμορφισμό και στις θέσεις 2,3 και 4 C/C ομοζυγώτες.

### 6.3.7. Μέθοδος για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων *GSTT1* και *GSTM1*

Οι πολυμορφισμοί που εξετάστηκαν στα γονίδια *GSTT1* και *GSTM1* αφορούν διαγραφή των γονιδιακών αυτών τόπων στις χρωμοσωμικές περιοχές 22q11.23 και 1p13.3 αντίστοιχα. Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης πραγματοποιείται πολυπλεκτική PCR με στόχο την ταυτόχρονη ενίσχυση περιοχής 480 bp του γονιδίου *GSTT1*, περιοχής 273 bp του γονιδίου *GSTM1*, καθώς και περιοχής 100 bp του γονιδίου  $\beta$ -globin στο χρωμόσωμα 11, η τελευταία ως εσωτερικός δείκτης ελέγχου της επιτυχούς ενίσχυσης (internal control). Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου PlatinumTaq (Thermofisher scientific, ΗΠΑ) και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος και μαγνησίου που παρέχεται με το kit. Η αλληλουχία των χρησιμοποιούμενων εκκινητών, το πρωτόκολο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 50μl και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα περιγράφονται στους ακόλουθους πίνακες:

Πρόσθιος εκκινητής, GSTT1-F	5'-TTCCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'
Ανάστροφος εκκινητής, GSTT1-R	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
Πρόσθιος εκκινητής, GSTM1-F	5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3'
Ανάστροφος εκκινητής, GSTM1-R	5'CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'
Πρόσθιος εκκινητής, bG-F	5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'
Ανάστροφος εκκινητής, bG-R	5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'

**Πίνακας 47:** Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση με πολυπλεκτική PCR των γονιδιακών τμημάτων μεγέθους 480bp, 273bp και 100bp των γονιδίων *GSTT1*, *GSTM1* και *β-globulin* αντίστοιχα.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	-	30,7	-
Buffer (Thermofisher)	10X	5	1X
MgCl (Thermofisher)	50mM	3	3mM
dNTPs (Thermofisher)	10mM	1	200μM
Πρόσθιος εκκινητής, GSTT1-F	20 pmol/μL	1	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής, GSTT1-R	20 pmol/μL	1	0,4 pmol/μL

Πρόσθιος εκκινητής, GSTM1-F	20 pmol/μL	1	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής, GSTM1-R	20 pmol/μL	1	0,4 pmol/μL
Πρόσθιος εκκινητής, bG-F	20 pmol/μL	1	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής, bG-R	20 pmol/μL	1	0,4 pmol/μL
PlatinumTaq Πολυμεράση	10 U/μL	0,3	3 U/rxn
Δείγμα DNA		4	

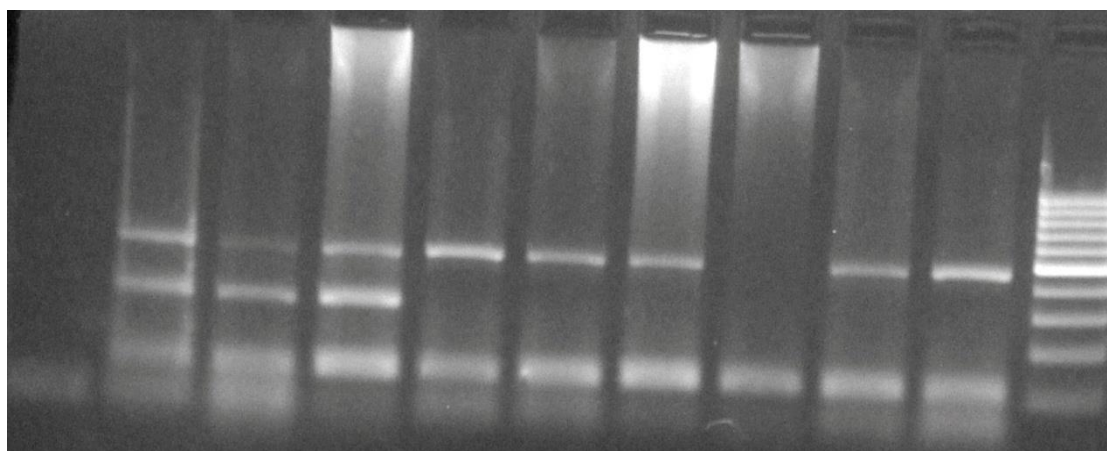
**Πίνακας 48:** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με πολυπλεκτική PCR των γονιδιακών τμημάτων μεγέθους 480bp, 273bp και 100bp των γονιδίων *GSTT1*, *GSTM1* και *β-globulin* αντίστοιχα.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	7 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	40 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	59°C	45 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	90 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 49 :** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με πολυπλεκτική PCR των γονιδιακών τμημάτων μεγέθους 480bp, 273bp και 100bp των γονιδίων *GSTT1*, *GSTM1* και *β-globulin* αντίστοιχα.

Μετά την ενίσχυση τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορούνταν σε γέλη αгарόζης 2% ώστε να ελεγχθεί η παρουσία ή απουσία των γονιδίων *GSTT1* και *GSTM1*. Όπως είναι προφανές, δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ ασθενών με ένα ή δύο αντίγραφα των γονιδίων αυτών, παρά μόνο η ανάδειξη των ομοζυγωτών για τη γονιδιακή διαγραφή, εκείνων δηλαδή που δε φέρουν κανένα αντίγραφο του γονιδίου και ως εκ τούτου δε θα εμφανίσουν κανένα προϊόν στην αντίδραση ενίσχυσης. Έτσι ασθενείς χωρίς μπάντα σε μέγεθος 480bp καταγράφονταν ως ομοζυγώτες για την έλλειψη του *GSTT1* και ασθενείς χωρίς μπάντα σε μέγεθος 273bp καταγράφονταν ως ομοζυγώτες για την έλλειψη του *GSTM1*. Προκειμένου να μην παρερμηνευτεί πιθανή αποτυχία της PCR ως γονιδιακή έλλειψη, περιλαμβάνεται στην πολυπλεκτική αντίδραση και ενίσχυση του γονιδίου της β-σφαιρίνης που ενέχει θέση εσωτερικού μάρτυρα. Έτσι σε όλες τις περιπτώσεις επιτυχούς ενίσχυσης αναμένεται κατά την ηλεκτροφόρηση μπάντα μεγέθους 100bp (εικόνα 40).

1            2            3            4            5            6            7            8            9            10            11



**Εικόνα 40:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 2% για την ανάλυση του πολυμορφισμού στα γονίδια *GSTT1* και *GSTM1* (στην θέση 11 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp και στη θέση 1 αρνητικός μάρτυρας). Στις θέσεις 5,6,7,8,9,10 παρατηρούνται ομοζυγώτες για την έλλειψη του *GSTM1* γονιδίου (απουσία μπάντας 273 bp) και στη θέση 8 ομοζυγώτης για την έλλειψη του *GSTT1* γονιδίου (απουσία μπάντας 480 bp). Σε όλα τα δείγματα παρατηρείται η μπάντα μεγέθους 100bp που αντιστοιχεί στο γονίδιο-εσωτερικό μάρτυρα της β-σφαιρίνης.

### 6.3.8. Μέθοδος για τον VNTR πολυμορφισμό στο γονίδιο *IL1RN*

Ο πολυμορφισμός που εξετάστηκε στο γονίδιο *IL1RN* αφορά την παρουσία διαφορετικού αριθμού αλληλόμορφων επαναλήψεων μιας αλληλουχίας 86bp εντός του δεύτερου εσωνίου του γονιδίου (VNTR: Various Number Tandem Repeats). Προς τον σκοπό αυτό ενισχύθηκε περιοχή του γονιδίου *IL1RN* στη χρωμοσωμική περιοχή 2q14.1 με τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον πίνακα 51. Ανάλογα με τον αριθμό των επαναλήψεων, το μέγεθος του ενισχυόμενου γονιδιακού τμήματος διαφέρει. Συγκεκριμένα αναγνωρίζονται τα εξής πιθανά αλλήλια: Το αλλήλιο 1 που περιλαμβάνει τέσσερις επαναλήψεις και αποδίδει προϊόν 410bp, το αλλήλιο 2 με δύο επαναλήψεις και μέγεθος 240bp, το αλλήλιο 3 με πέντε επαναλήψεις και μέγεθος 500bp, το αλλήλιο 4 με τρεις επαναλήψεις και μέγεθος 325 bp και το αλλήλιο 5 με έξι επαναλήψεις και μέγεθος 595bp (πίνακας 50). Για τη στατιστική ανάλυση και λόγω της μικρής συχνότητας των αλληλίων 3,4 και 5 οι γονότυποι κατηγοριοποιήθηκαν σε *IL1RN2*, όταν υπάρχει ένα τουλάχιστον αλλήλιο 2 και μη *IL1RN2*, όταν ο εξεταζόμενος δε φέρει κανένα αλλήλιο 2.

Αλλήλιο	Αριθμός επαναλήψεων	Μέγεθος προϊόντος	Στατιστική ανάλυση
1	4	410	Μη <i>IL1RN2</i>
2	2	240	<i>IL1RN2</i>
3	5	500	Μη <i>IL1RN2</i>
4	3	325	Μη <i>IL1RN2</i>
5	6	595	Μη <i>IL1RN2</i>

**Πίνακας 50:** Ονομασία αλληλίων ανάλογα με τον αριθμό επαναλήψεων της αλληλουχίας των 86 bp στο εσώνιο 2 του γονιδίου *IL1RN*.

<b>Πρόσθιος εκκινητής, <i>IL1RN-F</i></b>	5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3'
<b>Ανάστροφος εκκινητής, <i>IL1RN-R</i></b>	5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'

**Πίνακας 51:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του γονιδίου του *IL1RN*.

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου DreamTaq (Thermofisher scientific, ΗΠΑ) και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται με το kit. Το πρωτόκολο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25μl είχε ως εξής (πίνακας 52):

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	-	18,75	-
Buffer (Thermofisher)	10X	2,5	1X
dNTPs (Thermofisher)	10mM	0,5	200μM
Πρόσθιος εκκινητής, IL1RN-F	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL
Ανάστροφος εκκινητής, IL1RN-R	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/μL
DreamTaq Πολυμεράση	5 U/μL	0,25	1,25 U/rxn
Δείγμα DNA		2	

**Πίνακας 52 :** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *IL1RN*.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

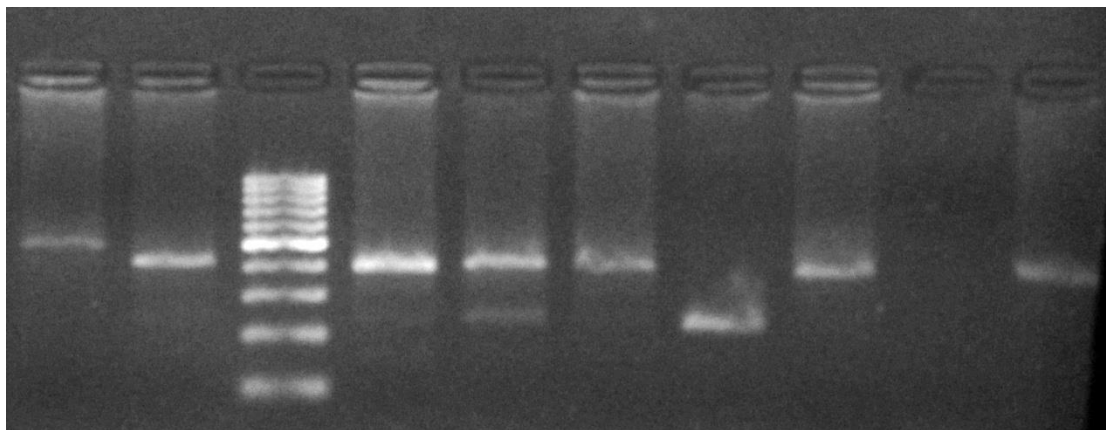


Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	60°C	45 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 53:** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *ILIRN*.

Μετά την PCR ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2%, όπου με τη βοήθεια δείκτη μοριακού βάρους διαπιστώνεται το μέγεθος του PCR προϊόντος και εμμέσως ο αριθμός των επαναλήψεων της μελετούμενης αλληλουχίας.

1      2      3      4      5      6      7      8      9      10



**Εικόνα 41:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2% για την ανάλυση του VNTR πολυμορφισμού στο γονίδιο *ILIRN* (στην θέση 3 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp και στη θέση 9 αρνητικός μάρτυρας). Στις θέσεις 2,4,6,8 και 10 παρατηρούνται ομοζυγώτες για το αλληλίο 1 (4 επαναλήψεις, 410bp), στη θέση 7 ομοζυγώτης για το αλληλίο 2 (2 επαναλήψεις, 240 bp) και στη θέση 5 ετεροζυγώτης με παρουσία ενός αλληλίου 1 και ενός αλληλίου 2. Στη θέση 1 σημειώνεται ένας σπάνιος γονότυπος ομοζυγωτίας για το αλληλίο 3 (5 επαναλήψεις, 500 bp).

### 6.3.9. Μέθοδος για τον πολυμορφισμό FOK I (rs2228570) στο γονίδιο VDR

Ο πολυμορφισμός FOK I (rs2228570) που εξετάστηκε στο γονίδιο VDR αφορά μια αλλαγή C→T. Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε περιοχή του γονιδίου VDR μήκους 267 bp στη χρωμοσωμική περιοχή 12q13.11. (GenBank accession number: NC\_000012.12) με τη χρήση εκκινητών (Invitrogen, ΗΠΑ) με αλληλουχία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .

<b>Πρόσθιος εκκινητής, FOK-F</b>	5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCT-3'
<b>Ανάστροφος εκκινητής, FOK-R</b>	5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'

**Πίνακας 54:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του VDR.

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου DreamTaq (Thermofisher scientific, ΗΠΑ) και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται με το kit. Το πρωτόκολο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25μl είχε ως εξής (πίνακας 55):

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Αρχική Συγκέντρωση</b>	<b>Προστιθέμενος όγκος (μL)</b>	<b>Τελική συγκέντρωση</b>
H <sub>2</sub> O	-	18,75	-
Buffer (Thermofisher)	10X	2,5	1X
dNTPs (Thermofisher)	10mM	0,5	200μM
Πρόσθιος εκκινητής, FOK-F	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/MI
Ανάστροφος εκκινητής, FOK-R	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/MI
Dreamtaq Πολυμεράση	5 U/MI	0,25	1,25 U/MI

Δείγμα DNA		2	
------------	--	---	--

**Πίνακας 55 :** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος μεγέθους 267 bp στο γονίδιο *VDR*.

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επανάληψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	63°C	45 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 56 :** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *VDR*.

Η παρουσία σωστού μεγέθους προϊόντος επιβεβαιώνεται μετά την PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%. Τα προϊόντα της PCR επωάζονται κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση FOKI (5.000U/mL, NEB). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το μικρόβιο *Flavobacterium okeanoikoites* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 37°C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο από το kit Buffer Cutsmart [50mM potassium acetate, 20 mM tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 100 µg/ml BSA, pH: 7,9 στους 25C)]. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:

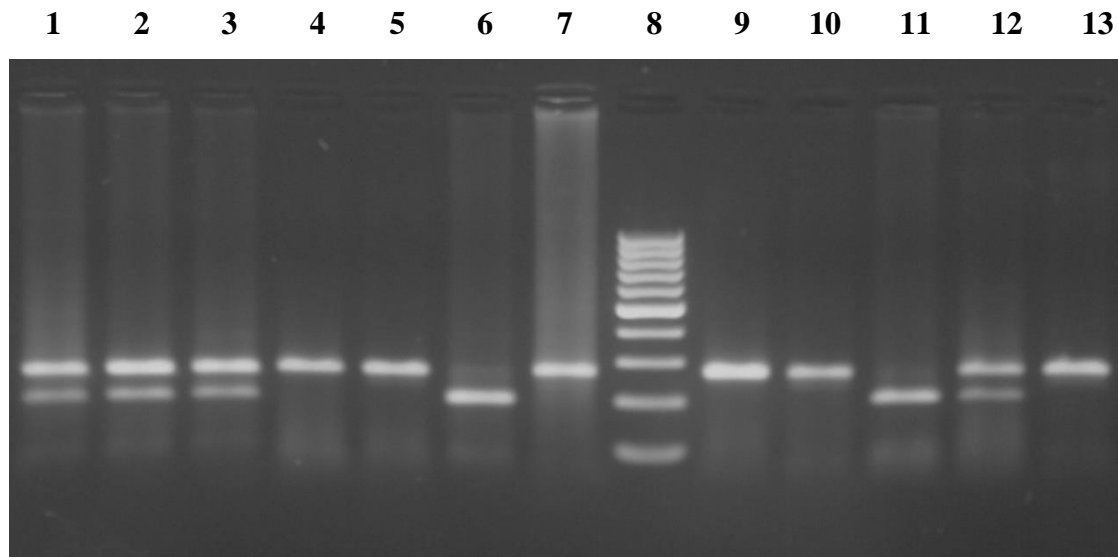


Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 µL, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο FokI	5000 U/MI	1 μl	5U
NEBBuffer Cutsmart	10X	1,5 μL	1X
PCR προϊόν	-	6 μL	-
H <sub>2</sub> O		6,5 μL	

**Πίνακας 57:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονιδιακού τμήματος του *VDR*.

Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% (εικόνα 42). Σε περίπτωση παρουσίας του C για την πολυμορφική θέση αλληλίου σε ομόζυγη κατάσταση το ένζυμο δεν αναγνωρίζει τη θέση περιορισμού και το PCR προϊόν παραμένει άκοπο σε μέγεθος 267 bp (μία ζώνη στην ηλεκτροφόρηση, θέσεις 4,5,7,9,10 και 13 στην εικόνα 42), ενώ στη περίπτωση παρουσίας του T για την πολυμορφική θέση αλληλίου αποκόπτει το PCR προϊόν σε δύο κομμάτια (197 και 70 bp, θέσεις 6 και 11 στην εικόνα 42). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανευρίσκονται 3 ζώνες στην ηλεκτροφόρηση (267, 197, 70 bp, π.χ. θέσεις 1,2,3 και 12 στην εικόνα 42).



**Εικόνα 42:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2% για την ανάλυση του πολυμορφισμού FOKI (στην θέση 8 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp). Στις θέσεις 4,5,7,9,10,13 παρατηρούνται CC ομοζυγώτες, στις θέσεις 1,2,3 και 12 παρατηρούνται CT ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό και στις θέσεις 6 και 11 TT ομοζυγώτες.

### 6.3.10. Μέθοδος για τον πολυμορφισμό BsmI (rs1544410) στο γονίδιο VDR

Ο πολυμορφισμός BsmI (rs1544410) που εξετάστηκε στο γονίδιο VDR αφορά μια αλλαγή A→G. Για τις ανάγκες της γονοτύπωσης ενισχύθηκε περιοχή του γονιδίου VDR μήκους 825 bp στη χρωμοσωμική περιοχή 12q13.11. (GenBank accession number: NC\_000012.12) με τη χρήση εκκινητών (Invitrogen, ΗΠΑ) με αλληλουχία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .

<b>Πρόσθιος εκκινητής, BSM-F</b>	5'CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3'
<b>Ανάστροφος εκκινητής, BSM-R</b>	5'- AAC CAG CG GAA GAG GTC AAG GG-3'

**Πίνακας 58:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του VDR.

Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου DreamTaq (Thermofisher scientific, ΗΠΑ) και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται με το kit. Το πρωτόκολλο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 25μl και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα είχαν ως εξής (πίνακες 59 και 60):

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	-	18,75	-
Buffer (Thermofisher)	10X	2,5	1X
dNTPs (Thermofisher)	10Mm	0,5	200Mμ
Πρόσθιος εκκινητής,BSM-F	20 pmol/MI	0,5	0,4 pmol/MI
Ανάστροφος εκκινητής,BSM-R	20 pmol/μL	0,5	0,4 pmol/MI
Dreamtaq Πολυμεράση	5 U/MI	0,25	1,25 U/MI
Δείγμα DNA		2	

**Πίνακας 59:** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος μεγέθους 825 bp στο γονίδιο *VDR*.

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	63°C	45 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 60:** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *VDR*.

Η παρουσία σωστού μεγέθους προϊόντος επιβεβαιώνεται μετά την PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%. Τα προϊόντα της PCR επωάζονται κατόπιν με την περιοριστική ενδονουκλεάση BSMI (5.000U/mL,NEB). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το μικρόβιο *Bacillus stearotherophilus* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 65°C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο από το kit Buffer Cutsmart [50mM potassium acetate,20 mM tris-acetate,10 mM magnesium acetate, 100 µg/ml BSA, pH: 7,9 στους 25C)]. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:



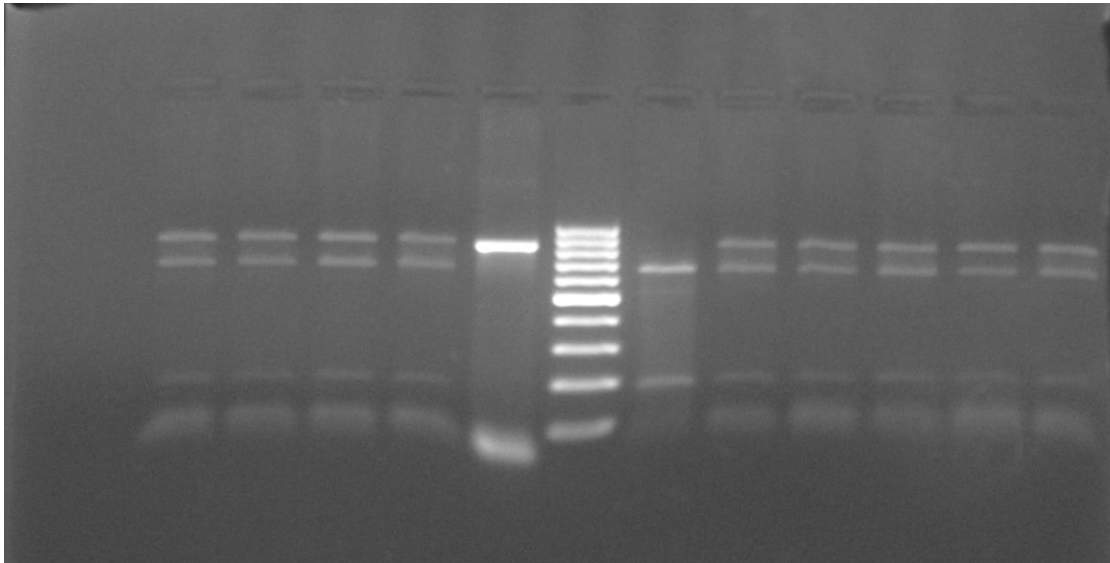
Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 µL, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (µL)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο BSMI	10.000 U/MI	0,5 µl	5U
NEBBuffer Cutsmart	10X	1,5 µL	1X
PCR προϊόν	-	5 µL	-
H <sub>2</sub> O		8 µL	

**Πίνακας 61:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονιδιακού τμήματος του *VDR*.

Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% (εικόνα 43). Σε περίπτωση παρουσίας του A για την πολυμορφική θέση αλληλίου σε ομόζυγη κατάσταση το ένζυμο δεν αναγνωρίζει τη θέση περιορισμού και το PCR προϊόν παραμένει άκοπο σε μέγεθος 825 bp (μία ζώνη στην ηλεκτροφόρηση, θέση 5 στην εικόνα 43), ενώ στη περίπτωση παρουσίας του G για την πολυμορφική θέση αλληλίου αποκόπτει το PCR προϊόν σε δύο κομμάτια (650 και 175 bp, θέση 7 στην εικόνα 43). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανευρίσκονται 3 ζώνες στην ηλεκτροφόρηση (825, 650, 175 bp, π.χ. θέσεις 1-4 και 8-12 στην εικόνα 43).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



**Εικόνα 43:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% για την ανάλυση του πολυμορφισμού BsmI (στην θέση 6 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp). Στη θέση 5 παρατηρείται AA ομοζυγώτης, στις θέσεις 1,2,3,4,8,9,10,11 και 12 παρατηρούνται AG ετεροζυγώτες για τον πολυμορφισμό και στη θέση 7 GG ομοζυγώτης.

### 6.3.11. Μέθοδοι για τον πολυμορφισμό *ApaI* (rs7975232) και τον πολυμορφισμό *TaqI* (rs731236) στο γονίδιο *VDR*

Ο πολυμορφισμός *ApaI* (rs7975232) που εξετάστηκε στο γονίδιο *VDR* αφορά μια αλλαγή A→G ,ενώ ο πολυμορφισμός *TaqI* (rs731236) μια αλλαγή C→T. Για τις ανάγκες τις γονοτύπωσης και των δύο αυτών σημειακών πολυμορφισμών ενισχύθηκε η ίδια περιοχή του γονιδίου *VDR* μήκους 745 bp στη χρωμοσωμική περιοχή 12q13.11. (GenBank accession number: NC\_000012.12). Έτσι το προϊόν την PCR με το πρωτόκολλο που περιγράφεται κατωτέρω διαιρείτο και χρησιμοποιείτο για δύο αντιδράσεις με δυο διαφορετικές περιοριστικές ενδονουκλεάσες, βάσει των οποίων αποδιδόταν ο γονότυπος για τους δύο SNPs. Οι εκκινητές (Invitrogen,ΗΠΑ) που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την αλληλουχία που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα .

<b>Πρόσθιος εκκινητής, APA-F</b>	5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3'
<b>Ανάστροφος εκκινητής, APA-R</b>	5'- GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC-3'

**Πίνακας 62:** Αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδιακού τμήματος του *VDR*.



Η PCR έγινε με τη χρήση του ενζύμου DreamTaq (Thermofisher scientific, ΗΠΑ) και του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος που παρέχεται με το kit. Το πρωτόκολο της PCR αντίδρασης σε τελικό όγκο 50μl είχε ως εξής (πίνακας 63):

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
H <sub>2</sub> O	-	37,5	-
Buffer (Thermofisher)	10X	5	1X
dNTPs (Thermofisher)	10Mm	1	200Mμ
Πρόσθιος εκκινητής, APA-F	20 pmol/MI	1	0,4 pmol/MI
Ανάστροφος εκκινητής, APA-R	20 pmol/MI	1	0,4 pmol/MI
Dreamtaq Πολυμεράση	5 U/MI	0,5	1,25 U/MI
Δείγμα DNA		4	

**Πίνακας 63:** Πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος μεγέθους 745 bp στο γονίδιο *VDR* .

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Επαναλήψεις
Αρχικός διαχωρισμός των κλώνων DNA	94°C	4 min	-
Διαχωρισμός των κλώνων του DNA	94°C	45 sec	35 κύκλοι
Υβριδισμός των εκκινητών στο DNA	69°C	45 sec	
Επέκταση των εκκινητών	72°C	45 sec	
Τελικό στάδιο επέκτασης	72°C	7 min	-

**Πίνακας 64:** Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε για την ενίσχυση με συμβατική PCR του γονιδιακού τμήματος του *VDR*.

Η παρουσία σωστού μεγέθους προϊόντος επιβεβαιώνεται μετά την PCR με ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2%. Για το *ApaI* πολυμορφισμό, τα προϊόντα της PCR επωάζονται με την περιοριστική ενδονουκλεάση *ApaI* (50.000U/mL, NEB). Όπως προαναφέρθηκε, το ένζυμο αυτό προέρχεται από το μικρόβιο *Acetobacter pasteurianus* sub. *pasteurianus* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 25°C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο από το kit Buffer Cutsmart [50mM potassium acetate, 20 mM tris-acetate, 10 mM magnesium acetate, 100 μg/ml BSA, pH: 7,9 στους 25°C]. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:



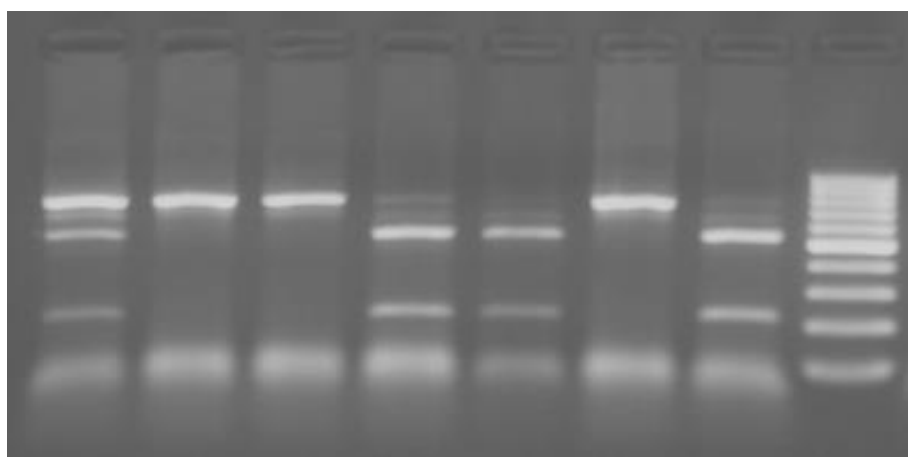
Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 25°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 μL, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο ApaI	50.000 U/mL	0,1 μl	5U
Buffer Cutsmart	10X	1,5 μL	1X
PCR προϊόν	-	7 μL	-
H2O		6,4 μL	

**Πίνακας 65:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονιδιακού τμήματος του *VDR*.

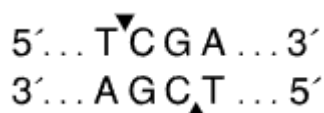
Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% (εικόνα 44). Σε περίπτωση παρουσίας του A για την πολυμορφική θέση αλληλίου σε ομόζυγη κατάσταση το ένζυμο δεν αναγνωρίζει τη θέση περιορισμού και το PCR προϊόν παραμένει άκοπο σε μέγεθος 745 bp (μία ζώνη στην ηλεκτροφόρηση, θέση 2,3 και 6 στην εικόνα 44), ενώ στη περίπτωση παρουσίας του G για την πολυμορφική θέση αλληλίου αποκόπτεται το PCR προϊόν σε δύο κομμάτια (528 και 217 bp, θέση 4,5 και 7 στην εικόνα 44). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανευρίσκονται 3 ζώνες στην ηλεκτροφόρηση (745, 528, 217 bp, π.χ. θέση 1 στην εικόνα 44).

1      2      3      4      5      6      7      8



**Εικόνα 44:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 2% για την ανάλυση του πολυμορφισμού ApaI (στην θέση 8 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp). Στις θέσεις 2,3 και 6 παρατηρείται AA ομοζυγώτης, στη θέση 1 παρατηρείται AG ετεροζυγώτης για τον πολυμορφισμό και στη θέση 4,5 και 7 GG ομοζυγώτες.

Για το TaqI πολυμορφισμό, τα προϊόντα της PCR επωάζονται με την περιοριστική ενδονουκλεάση TaqI (20.000U/mL,NEB). Το ένζυμο αυτό προέρχεται από το μικρόβιο *Thermus aquaticus* και δρα βέλτιστα σε θερμοκρασία 65°C σε συνδυασμό με το παρεχόμενο από το kit Buffer Cutsmart [50mM potassium acetate,20 mM tris-acetate,10 mM magnesium acetate, 100 μg/ml BSA, ph: 7,9 στους 25C). Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου σε δίκλωνο DNA είναι:



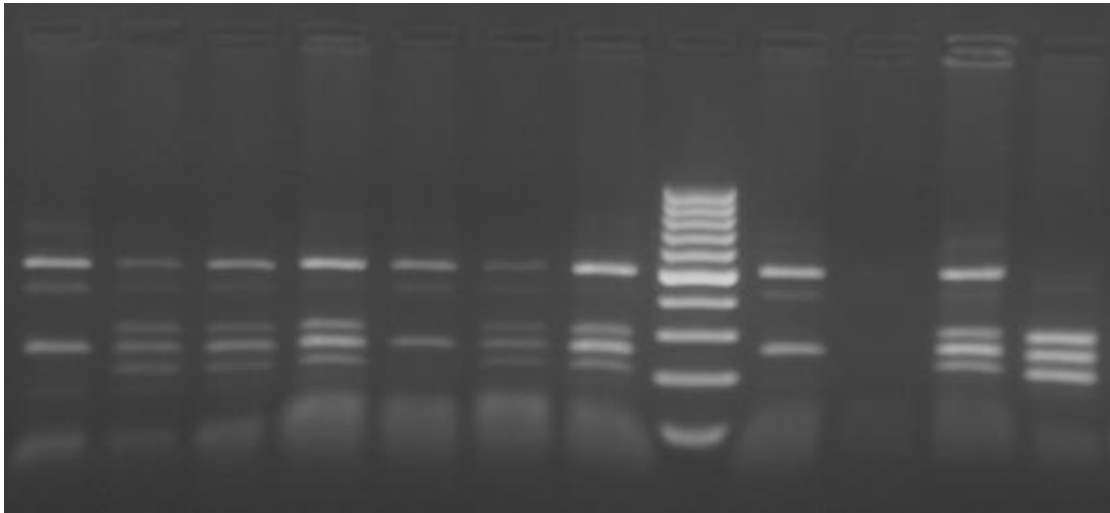
Η επώαση γίνεται με θέρμανση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 2 ώρες και πρωτόκολλο διαλύματος τελικού όγκου 15 μL, το οποίο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα :

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Προστιθέμενος όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Ένζυμο TaqI	20.000 U/mL	0,25 μl	5U
Buffer Cutsmart	10X	1,5 Ml	1X
PCR προϊόν	-	7 μl	-
H2O		6,25 μL	

**Πίνακας 66:** Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ενζυμική πέψη του γονδιακού τμήματος του *VDR*.

Μετά την επώαση ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% (εικόνα 45). Σε περίπτωση παρουσίας του T για την πολυμορφική θέση αλληλίου σε ομόζυγη κατάσταση το ένζυμο αναγνωρίζει μια θέση περιορισμού και το PCR προϊόν κόπτεται σε δύο τμήματα μεγέθους 495 και 245 bp (δύο ζώνες στην ηλεκτροφόρηση, θέση 1,5 και 9 στην εικόνα 45), ενώ στη περίπτωση παρουσίας του C για την πολυμορφική θέση αλληλίου η TaqI αναγνωρίζει δύο θέσεις περιορισμού και αποκόπτει το PCR προϊόν σε τρία κομμάτια (290, 245 και 205 bp, θέση 12 στην εικόνα 45). Σε περίπτωση ετεροζυγωτίας ανευρίσκονται 4 ζώνες στην ηλεκτροφόρηση (495, 290, 245 και 205 bp, π.χ. θέση 2,3,4,6,7 και 11 στην εικόνα 45).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



**Εικόνα 45:** Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αραρόζης 2% για την ανάλυση του πολυμορφισμού *ApaI* (στην θέση 8 τοποθετήθηκε δείκτης μοριακού βάρους 100bp). Στις θέσεις 1,5 και 9 παρατηρείται TT ομοζυγώτης, στις θέσεις 2,3,4,6,7,11 παρατηρείται CT ετεροζυγώτης για τον πολυμορφισμό και στη θέση 12 CC ομοζυγώτης.

### **Προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων του DNA (DNA sequencing)**

Η επιβεβαίωση μέρους των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τις ως άνω περιγραφείσες μεθόδους έγινε με τη χρήση της μεθοδολογίας αναφοράς, δηλαδή της αλληλούχισης του DNA (DNA sequencing) σε εξωτερικό εργαστήριο (CeMIA S.A.) . Ο όρος αλληλούχιση του DNA αναφέρεται σε μεθοδολογίες που αποσκοπούν στον προσδιορισμό των βάσεων κάποιου τμήματος δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος και περιλαμβάνουν τη χημική μέθοδο κατά Maxam και Gilbert , την ενζυμική μέθοδο κατά Sanger, καθώς και νεότερες παραλλαγές τους.

Η χημική μέθοδος αλληλούχισης εκμεταλλεύεται την ιδιότητα ορισμένων χημικών ενώσεων , όπως η υδραζίνη, το διμεθυλοθειικό οξύ ή το φορμικό οξύ να μπορούν να τροποποιήσουν τις βάσεις του DNA εντός του μορίου αυτού. Το DNA που αναλύεται επισημαίνεται με κάποιο ραδιοϊσότοπο σε ένα από τα 3',5' άκρα του και στη συνέχεια τροποποιείται με τη βοήθεια των προαναφερθεισών χημικών ενώσεων σε τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις, σε κάθε μια από τις οποίες χρησιμοποιείται ένα μόνο από τα εν λόγω αντιδραστήρια. Ακολούθως προστίθεται το αντιδραστήριο πιπεριδίνη που καταλύει τη διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού στο σημείο της τροποποιημένης βάσης. Η ενζυμική μέθοδος κατά Sanger ή μέθοδος των διεδόξυ-αντιδράσεων βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί

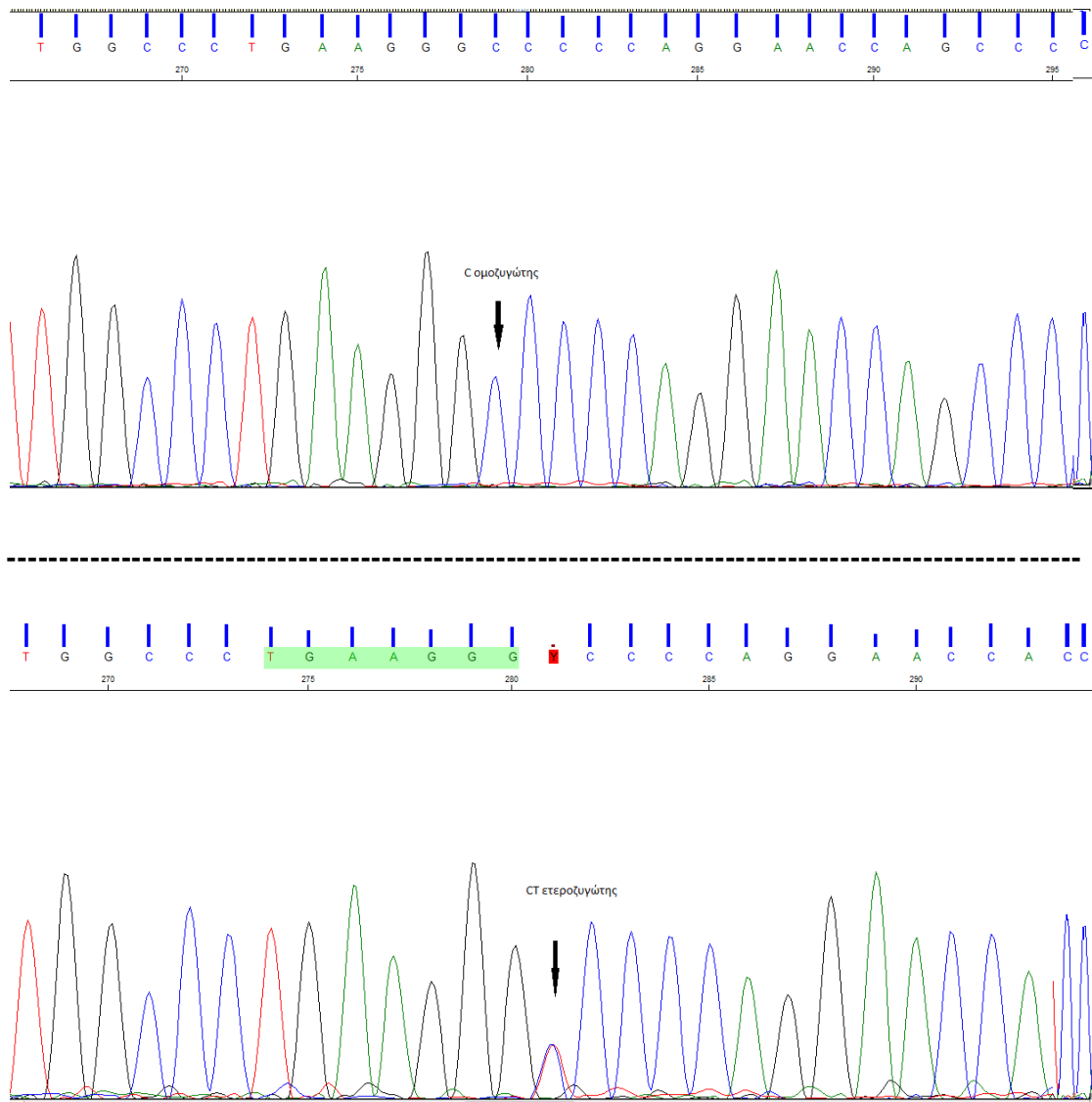
εκτός από τα τριφωσφορικά δεόξυνουκλεοτίδια (dNTPs) και τα 2',3'-τριφωσφορικά διδεόξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) σαν υποστρώματα. Ένας εκκινητής υβριδίζεται στον 3'-5' κλάδο του αναλυόμενου DNA και επεκτείνεται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση σε κατεύθυνση 5' προς 3' συμπληρωματικά στον αντιγραφόμενο κλώνο. Η επέκταση γίνεται σε 4 διαφορετικές αντιδράσεις, κάθε μια από τις οποίες περιέχει εκτός των τεσσάρων dNTPs και ένα εκ των τεσσάρων ddNTPs, το οποίο λόγω της έλλειψης 3' υδροξυλομάδας τερματίζει την αντίδραση νουκλεϊνικής σύνθεσης και χαρακτηρίζει την τελευταία βάση αυτού του κομματιού. Είναι κατανοητό ότι και στις δύο μεθόδους προκύπτουν ραδιοεπισημασμένα κομμάτια διαφορετικού μεγέθους του προς ανάλυση τμήματος DNA. Τα κομμάτια αυτά διαχωρίζονται και στις δύο περιπτώσεις με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υψηλής διακριτικής ικανότητας από όπου μπορεί να συναχθεί η συνολική αλληλουχία των βάσεων του υπο μελέτη τμήματος DNA [369-371].

Η τροποποίηση της μεθόδου Sanger με την αντικατάσταση της ραδιενεργούς σήμανσης από φθορίζουσες χρωστικές κατέστησε δυνατή την αυτοματοποίηση του DNA sequencing και τον ταχύ και αξιόπιστο προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων οργάνων (DNA Sequencers). Το προς ανάλυση δείγμα υπόκειται αρχικά σε ενίσχυση με συμβατική PCR με κατάλληλους εκκινητές, η οποία ακολουθείται από τη μέθοδο των θερμικών κύκλων (cycle sequencing). Σε αυτή το προϊόν PCR, αφού προηγουμένως καθαρισθεί, αντιγράφεται με χρήση της Taq πολυμεράσης παρουσία ενός εκκινητή, dNTPS και επισημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές ddNTPs. Τα διαφορετικού μεγέθους τμήματα που παράγονται, εισάγονται στη συνέχεια στο DNA sequencer, όπου πραγματοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε ειδικά τριχοειδή στα οποία διοχετεύεται ειδικό πολυμερές που αναγεννάται μετά το πέρας της αντίδρασης. Εφ' όσον τα φάσματα της εκπομπής των τεσσάρων χρωστικών δεν αλληλεπικαλύπτονται τότε με μια οπή στο τέλος του τριχοειδούς και το κατάλληλο laser και ανιχνευτή είναι δυνατόν να ανιχνεύονται τα σήματα φθορισμού που προκύπτουν από τις τέσσερις χρωστικές σε ένα μόνο πέρασμα στο ίδιο τριχοειδές. Τα σημάτα αντιστοιχίζονται σε καμπύλες με διαφορετικά χρώματα και στη συνέχεια «μεταφράζονται» σε βάσεις DNA με κατάλληλο λογισμικό [369-371].

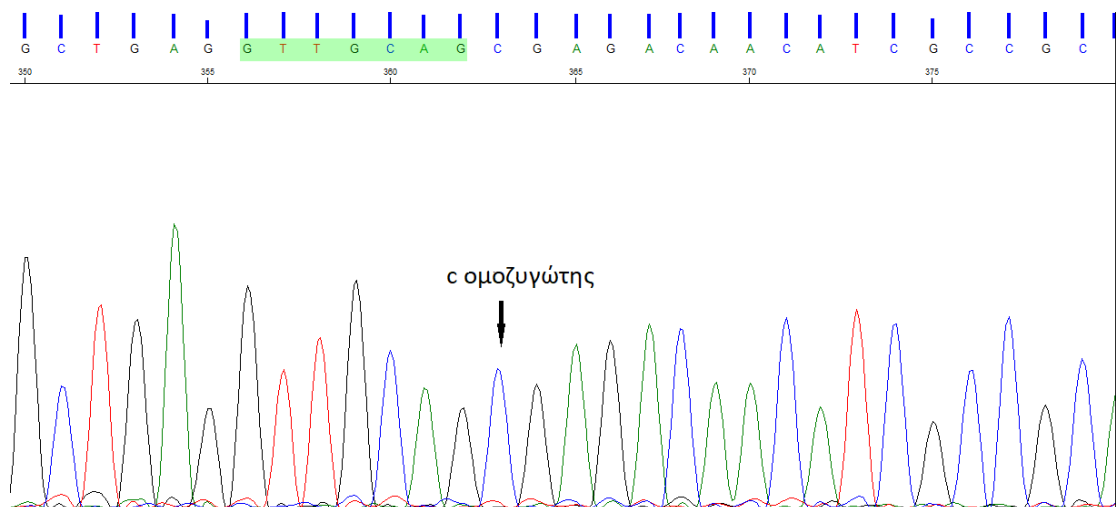
Για την πραγματοποίηση της αλληλούχισης ενός τμήματος DNA απαιτούνται τα εξής διαδοχικά βήματα:

- Ενίσχυση του τμήματος DNA με συμβατική PCR
- Καθαρισμός των PCR προϊόντων
- Εφαρμογή της μεθόδου θεμικών κύκλων (Cycle Sequencing) στα κεκαθαυμένα PCR προϊόντα
- Καθαρισμός των προϊόντων του Cycle Sequencing και προετοιμασία για εισαγωγή στον αναλυτή αλληλούχισης
- Αλληλούχιση και λήψη των δεδομένων

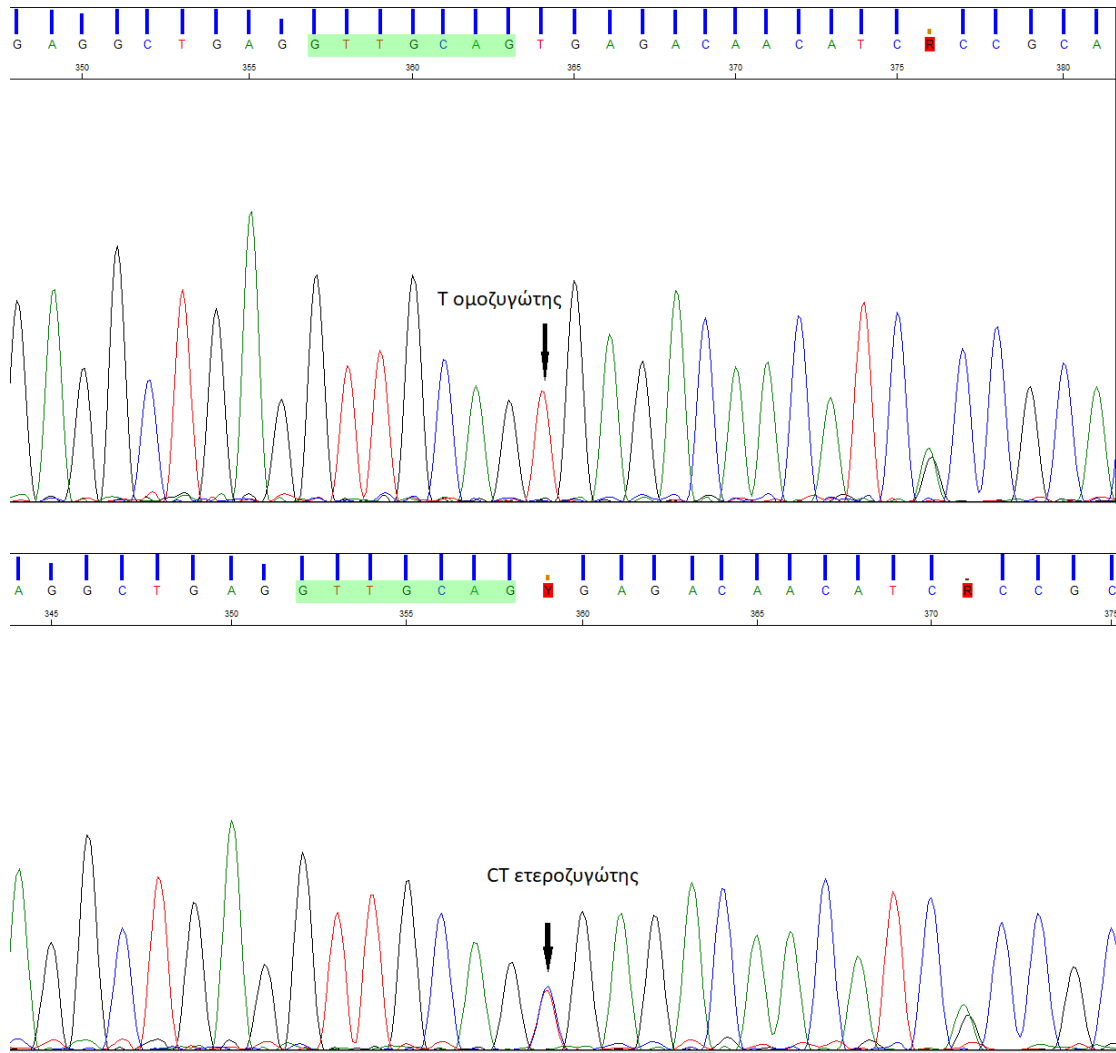
Σχετικά με τα πρωτόκολλα ενίσχυσης των προς γονοτύπωση τμημάτων DNA, ο αναγνώστης παραπέμπεται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Ο καθαρισμός των PCR προϊόντων έγινε με το προτυποποιημένο σετ αντιδραστηρίων QIAquick της Qiagen (Γερμανία). Η μέθοδος βασίζεται στην κατακράτηση του DNA από τις ειδικές στήλες του kit που περιέχουν μεμβράνες πυριτίου. Το DNA απορροφάται στην μεμβράνη παρουσία του διαλύματος πρόσδεσης το οποίο εξασφαλίζει τις απαραίτητες συνθήκες (υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και κατάλληλο pH). Οι προσμίξεις (όπως περίσσεια εκκινητών, άλατα, ένζυμα, μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια, αγαρόζη, χρωστικές, βρωμιούχο αιθίδιο) διαπερνούν την στήλη και απομακρύνονται με πλύσεις. Σε κάθε QIAquick στήλη μπορούν να προσδεθούν μέχρι 10 μg DNA, παρέχοντας αποτελεσματική πρόσδεση μονόκλωνων και δίκλωνων PCR προϊόντων μεγέθους μέχρι 100 bp καθώς και ποσοτική (99.5%) αφαίρεση εκκινητών μέχρι και 40 νουκλεοτίδια. Το DNA εκλύεται με 50 ή 30 μl από το διάλυμα έκλυσης ή με νερό. Η μέγιστη ικανότητα έκλυσης επιτυγχάνεται μεταξύ pH 7.0 και 8.5. Κατόπιν του καθαρισμού, τα λοιπά στάδια της αλληλούχισης έλαβαν χώρα στο εξωτερικό εργαστήριο όπου διατίθεντο τα απαιτούμενα αντιδραστήρια και εξοπλισμός. Εκ των χρωματογραφημάτων ήταν δυνατή η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων γονοτύπωσης για τους SNPs που μελετήθηκαν προς επικύρωση των μεθόδων, ιδίως εκείνων που αναπτύχθηκαν de novo στα πλαίσια της παρούσης εργασίας (εικόνες 46-48)



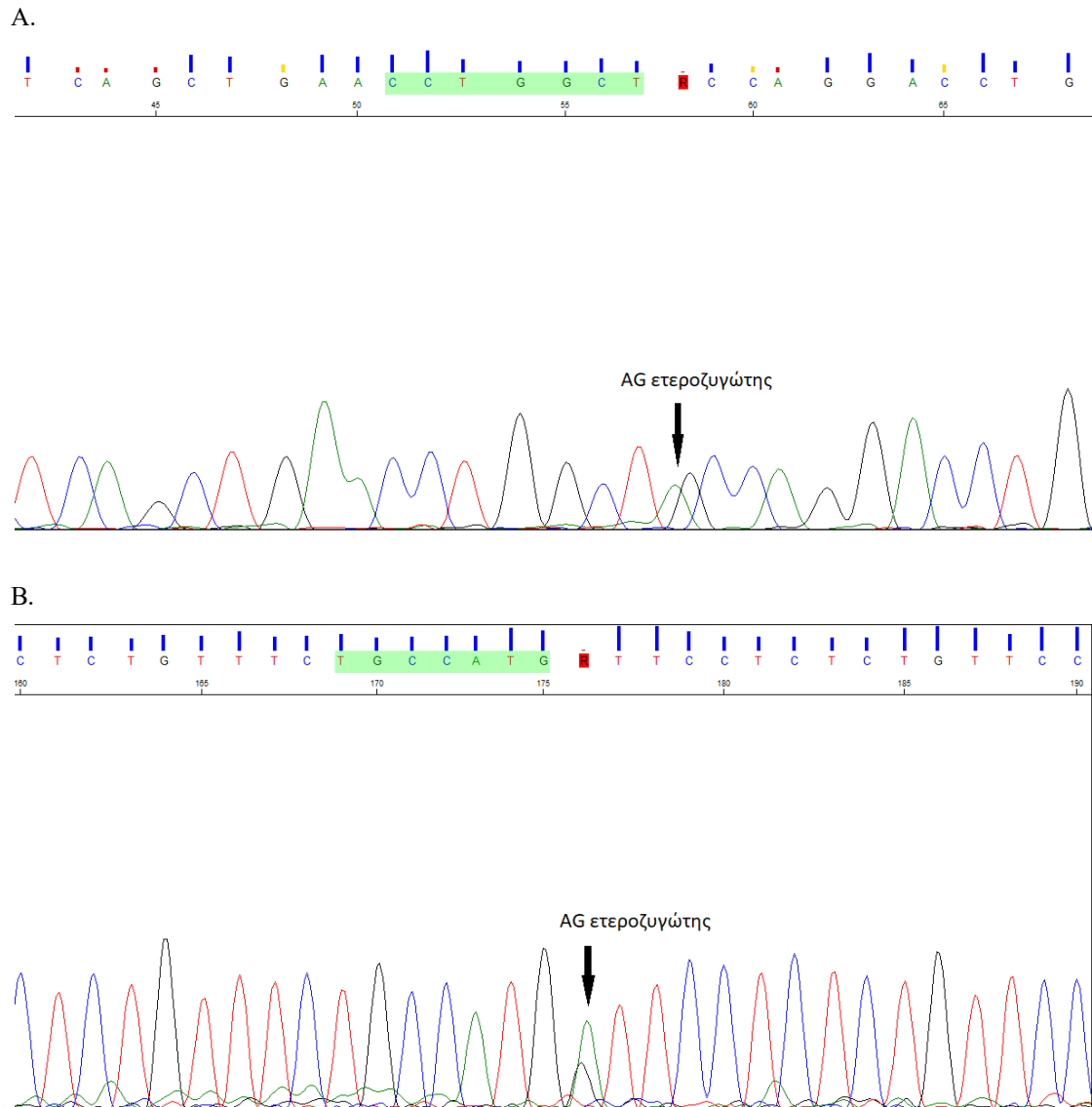
**Εικόνα 46:** Χρωματογράφημα δείγματος C ομοζυγώτη και CT ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό στο γονίδιο *TCF19*







**Εικόνα 47:** Χρωματογράφημα δείγματος C ομοζυγωτη, T ομοζυγώτη και CT ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό του γονιδίου *IL-22*



**Εικόνα 48:** Ενδεικτικά χρωματογραφήματα Α)AG ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό του γονιδίου *CTLA* και Β)AG ετεροζυγώτη για τον πολυμορφισμό του γονιδίου *LTA*.

### Βιοπληροφορική

Χρήση κατάλληλων λογισμικών έγινε σε αυτή την εργασία, για τον σχεδιασμό των εκκινητών και την επιλογή των κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων, καθώς και για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των αναλύσεων και την ανάδειξη συσχετίσεων μεταξύ των πολυμορφισμών και των υπό μελέτη λεμφωμάτων.

### **Σχεδιασμός εκκινητών και επιλογή περιοριστικών ενζύμων**

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για μια αντίδραση PCR συνιστά ένα βήμα νευραλγικής σημασίας, καθώς καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ειδικότητα και αξιοπιστία της ανάλυσης. Υπενθυμίζεται ότι οι εκκινητές θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από παρόμοια περιεκτικότητα σε γουανίνες-κυτοσίνες, να μη φέρουν συμπληρωματικές αλληλουχίες (ιδιαίτερα στο 3' άκρο τους) και να μη σχηματίζουν δευτεροταγείς και παλινδρομικές δομές. Εκ των ων ουκ άνευ είναι φυσικά η προϋπόθεση οι εκκινητές να είναι συμπληρωματικοί της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί και να μην προσδένονται μη ειδικά σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος, κάτι που μπορεί να διασφαλισθεί τόσο με την κατάρτιση ενός κατάλληλου θερμοκρασιακού προγράμματος, όσο κυρίως με τη σωστή επιλογή των εκκινητών [369-371].

Για την αξιολόγηση των παραπάνω συνθηκών και την επιτυχή επιλογή εκκινητών αξιοποιήθηκαν αφενός τα διαδικτυακά εργαλεία GenBank και Blast του NCBI (National Center of Biotechnology Information) καθώς και το πρόγραμμα Primer3 και αφετέρου το λογισμικό CLC-Sequence Viewer (CLCbio, Δανία), που επιτρέπει την καλύτερη οπτικοποίηση, σχεδιασμό και αξιολόγηση των αλληλουχιών [372].

Από την άλλη μεριά, τα περιοριστικά ένζυμα αποτελούν το βασικό εργαλείο μιας PCR-RFLP αντίδρασης. Για την επιλογή τους είναι απαραίτητη η γνώση των αλληλουχιών αναγνώρισης και η χρήση κάποιου εργαλείου βιοπληροφορικής, ικανού να χαρτογραφεί τις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων σε μια δεδομένη αλληλουχία DNA. Στην παρούσα εργασία, αξιοποιήθηκε η διαδικτυακή εφαρμογή NEBCutter v.2, η οποία παράγει μια ολοκληρωμένη αναφορά των θέσεων αναγνώρισης των εμπορικά διαθέσιμων περιοριστικών ενδονουκλεασών για κάθε εισαγόμενη από το χρήστη αλληλουχία [373]. Έτσι είναι δυνατή η επιλογή ενζύμου που αποκόπτει διαφορετικά την αλληλουχία αναλόγως του γονοτύπου του μελετούμενου πολυμορφισμού καθώς και η πρόβλεψη τυχόν άλλων θέσεων αναγνώρισης εντός της ίδιας αλληλουχίας, με στόχο το βέλτιστο σχεδιασμό της μεθόδου.

### **Μέτρηση βιταμίνης D**

Η μέτρηση των επιπέδων της 25(OH)D στον ορό πραγματοποιήθηκε με μέθοδο χημειοφωταύγειας (Advia Centaur, Siemens, Germany).

## Στατιστική επεξεργασία

Από στατιστικής σκοπιάς ένας πολυμορφισμός μπορεί να θεωρηθεί ως μία κατηγορική μεταβλητή με τρεις δυνατές τιμές (ομοζυγώτης φυσιολογικός, ετεροζυγώτης, ομοζυγώτης μεταλλαγμένος). Έτσι είναι δυνατόν να ελεγχθεί με στατιστικά μέτρα η συσχέτιση ενός SNP με μία νόσο.

Πριν από την εφαρμογή κάθε στατιστικής επεξεργασίας, πρέπει να γίνει έλεγχος για την καταλληλότητα του υπό εξέταση πληθυσμού, μέσω της ισορροπίας Hardy-Weinberg. Ο έλεγχος αυτός εκτιμά την ανεξαρτησία μεταξύ των αλληλίων που κληρονομούνται από τους γονείς, ακολουθεί  $\chi^2$  κατανομή με 1 βαθμό ελευθερίας και έχει τύπο:

$$HW = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

όπου O: η παρατηρούμενη συχνότητα των αλληλίων, E: η αναμενόμενη συχνότητα του αλληλίων με την υπόθεση ανεξαρτησίας στην κληρονομηση.

Εφόσον επιβεβαιωθεί η υπόθεση της ανεξαρτησίας στη μεταβίβαση των αλληλίων, μπορεί να εξακολουθήσει η στατιστική ανάλυση. Συγκεκριμένα κατασκευάζεται πίνακας συνάφειας (contingency table) και εφαρμόζεται το τεστ  $\chi^2$ . Ο υπολογισμός του σχετικού λόγου συμπληρωματικών πιθανοτήτων OR (Odds Ratio) για κάθε γονότυπο συγκριτικά με το γονότυπο αναφοράς (ομοζυγώτες φυσιολογικοί) προϋποθέτει για το μέγεθος της υποκείμενης συσχέτισης.

Σε περίπτωση που χρειάζεται προσαρμογή του μοντέλου λόγω συγχυτικών παραγόντων χρησιμοποιούνται μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης, τα οποία εύκολα εκτιμούν την αλληλεπίδραση μεταξύ SNPs και άλλων παραγόντων. Ο γενικός τύπος της λογιστικής παλινδρόμησης είναι:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta G + \gamma Z$$

όπου: p η πιθανότητα εκδήλωσης της νόσου, G η κατηγορική μεταβλητή του πολυμορφισμού και Z η μεταβλητή που συνυπολογίζεται για την καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου. Η εξίσωση αυτή περιλαμβάνει τρεις παραμέτρους ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) που πρέπει να υπολογισθούν.

Ας λάβουμε για παράδειγμα πολυμορφισμό, όπου το C αλληλίο μεταβάλλει τον κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου. Ο κίνδυνος κάθε πιθανού γονοτύπου εξαρτάται από

τον αριθμό των C αλληλίων που αυτός περιλαμβάνει (ένα ή δύο). Ανάλογα με τον αριθμό των αλληλίων που χρειάζονται για τη μεταβολή του κινδύνου διακρίνονται 5 μοντέλα κληρονομικότητας:

- **Συνεπικρατές μοντέλο (Co-dominant model):** Είναι το πιο γενικό μοντέλο και επιτρέπει κάθε γονότυπος να προσδίδει έναν διαφορετικό και μη αθροιστικό κίνδυνο. Το μοντέλο αυτό συγκρίνει τους ετεροζυγώτες (He) και ομοζυγώτες μεταλλαγμένους (Va) προς τους ομοζυγώτες φυσιολογικούς και υπολογίζει δύο ORs αντίστοιχα. Ο τύπος που περιγράφει το μοντέλο είναι:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta_1 He + \beta_2 Va + \gamma Z$$

- **Επικρατές μοντέλο (Dominant model):** Στο μοντέλο αυτό ένα μόνο C αλληλίο θεωρείται αρκετό για να μεταβάλλει το κίνδυνο, με αποτέλεσμα οι ετερόζυγοι και ομόζυγοι μεταλλαγμένοι να φέρουν τον ίδιο κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου. Έτσι η σύγκριση γίνεται μεταξύ του συνόλου των T/C και C/C γονοτύπων (Do) προς τους T/T με βάση την εξίσωση:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta Do + \gamma Z$$

- **Υπολειπόμενο μοντέλο (Recessive model):** Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό δύο αντίγραφα του μεταλλαγμένου αλληλίου είναι απαραίτητα για τη μεταβολή του κινδύνου, με αποτέλεσμα οι γονότυποι T/T και T/C να έχουν την ίδια επίδραση. Ο συνδυασμός των T/T και T/C (Re) συγκρίνεται με το γονότυπο C/C με βάση την εξίσωση:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta Re + \gamma Z$$

- **Υπερ-επικρατές μοντέλο (Over-dominant model):** Το μοντέλο αυτό συγκρίνει τους ομοζυγώτες (T/T και C/C) με τους ετεροζυγώτες (T/C-He) με χρήση της εξίσωσης:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta He + \gamma Z$$

- **Αθροιστικό μοντέλο (Additive Model):** Το μοντέλο αυτό θεωρεί ότι κάθε αντίγραφο του C αλληλίου επιδρά στον κίνδυνο κατά τρόπο αθροιστικό, ώστε οι ομοζυγώτες μεταλλαγμένοι C/C να φέρουν διπλάσιο κίνδυνο από τους ετεροζυγώτες T/C. Έτσι η σύγκριση γίνεται μεταξύ του συνδυασμού των γονοτύπων C/C και T/C με βάρη 2 και 1 αντίστοιχα (Ad: 2C/C + 1T/C) και του γονοτύπου T/T με τύπο:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta Ad + \gamma Z$$

Για την επιλογή του πλέον κατάλληλου μοντέλου κληρονομικότητας συγκρίνεται κάθε μοντέλο με το πιο γενικό (το συνεπικρατές) μέσω της εφαρμογής του ελέγχου λόγου πιθανοφάνειας (Likelihood Ratio Test- LRT). Το τεστ αυτό παρέχει ένα μέτρο της καταλληλότητας του μοντέλου (goodness of fit) και εκτιμά ποιο μοντέλο ταιριάζει καλύτερα στο μελετούμενο σύνολο δεδομένων. Η εξίσωση που συγκρίνει το σκορ πιθανοφάνειας (likelihood score) δύο μοντέλων έχει ως εξής:

$$LR = 2 * (\ln L1 - \ln L2)$$

όπου L1 και L2 η πιθανοφάνεια (likelihood) των δύο μοντέλων που συγκρίνονται. Ωστόσο, κάποιες φορές το LRT δεν αρκεί ώστε να επιλεγεί κάποιο μοντέλο εις βάρος κάποιου άλλου. Κριτήρια όπως το AIC (Akaike information) μπορεί να φανούν χρήσιμα σε τέτοιες περιπτώσεις. Το μοντέλο με τη μικρότερη τιμή AIC είναι αυτό που προτιμάται. Η AIC υπολογίζεται από τον τύπο:

$$AIC = -2 \log L + 2 \# \text{parameters}$$

όπου L η πιθανοφάνεια (likelihood) του μοντέλου και #parameters ο αριθμός των παραμέτρων που συμπεριλαμβάνονται στο μοντέλο.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τα προγράμματα SPSS 16.0 (IBM, USA) και SNPStats [374].

## Κεφάλαιο 7: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Α. Αποτελέσματα για MALT λεμφώματα

#### Πληθυσμός μελέτης

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 83 ασθενείς με MALT λέμφωμα και 60 υγιείς μάρτυρες με ιστορικό ελεύθερο κακοήθειας ή συστηματικής αυτοάνοσης νόσου. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 55.9 έτη και των υγιών τα 56.2 έτη, ενώ η αναλογία ανδρών: γυναικών ήταν 1.1:1 και 1.3:1 αντίστοιχα. Η πλειοψηφία των ασθενών έπασχε από γαστρικό MALT λέμφωμα και μεταξύ των υπολοίπων εντοπίσεων περιλαμβάνονταν 6 περιπτώσεις εντερικού λεμφώματος, 3 περιπτώσεις οφθαλμικού, 7 δερματικού, 1 σιελογόνων αδένων, 1 πνευμονικό, 1 λέμφωμα υπερώας και μία περίπτωση πολυεστιακής νόσου με γαστρική, πνευμονική και εντερική συμμετοχή. 60 ασθενείς (72.3%) βρίσκονταν σε στάδιο I κατά τη διάγνωση, 14 (16.9%) σε στάδιο II, 1 ασθενής σε στάδιο III και 8 (9,6%) σε στάδιο IV. Επινέμεση στο μυελό των οστών ανευρέθη σε 6 (7.2%) ασθενείς (3 με γαστρικό, 1 με εντερικό, 1 με δερματικό και 1 με οφθαλμικό MALT λέμφωμα). Το σύνολο των ασθενών με GMZL αντιμετωπίστηκε αρχικά με θεραπεία εκρίζωσης του *H. pylori*, με χαμηλό ποσοστό ανταπόκρισης (15.9%). Ακολούθως, η πλειοψηφία των ασθενών αντιμετωπίστηκε με συνδυασμό χλωραμβουκίλης και ριτουξιμάβης (35%), μονοθεραπεία χλωραμβουκίλης (17%) ή μονοθεραπεία ριτουξιμάβης (10%), στο 11% χορηγήθηκε ριτουξιμάβη σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά σχήματα, ενώ 6 ασθενείς με GMZL υπεβλήθησαν σε χειρουργική θεραπεία και 1 σε ακτινοθεραπεία. Όσον αφορά τους ασθενείς με άλλη πλην της γαστρικής εντόπιση, δοξυκυκλίνη χορηγήθηκε αρχικά στους δύο ασθενείς με οφθαλμικό λέμφωμα προς εκρίζωση του *C.psittaci* χωρίς ωστόσο ανταπόκριση. Κατά αναλογία με το GMZL, οι χορηγηθείσες θεραπείες περιελάμβαναν ριτουξιμάβη ως μονοθεραπεία (40%) ή σε συνδυασμό με χλωραμβουκίλη (25%) καθώς και χειρουργική αφαίρεση (15%), ακτινοθεραπεία (10%) και ριτουξιμάβη σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά σχήματα (10%). Τα κλινικά δεδομένα ασθενών και υγιών μαρτύρων και η σύνοψη των αποτελεσμάτων της γονοτύπωσης καταγράφεται στον πίνακα 68.

Μεταβλητή	Ασθενείς	Μάρτυρες	
Ηλικία: μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	55.89 (12.37)	56.2 (17.1)	
Αναλογία ανδρών:γυναικών	1.1:1	1.3:1	
Στάδιο κατά τη διάγνωση (ποσοστά %)	I	III	IV
	72.3	16.9	9.6
Ανταπόκριση στη θεραπεία εκρίζωσης επί γαστρικού MALT	15.9%		
Αρχική θεραπεία (n, %):			
Ριτουξιμάβη-χλωραμβουκίλη	27 (32.5%)		
Ριτουξιμάβη	14 (16.9%)		
Χλωραμβουκίλη	11 (13.3%)		
R-CHOP	9 (10.8%)		
Χειρουργική θεραπεία	9 (10.8%)		
Ακτινοθεραπεία	3 (3.6%)		

Πολυμορφισμός	Υγιείς μάρτυρες	Ασθενείς MALT	Ασθενείς GMZL	OR ή $\chi^2$ (p) για ασθενείς MALT έναντι υγιών μαρτύρων	OR ή $\chi^2$ (p) για ασθενείς GMZL έναντι υγιών μαρτύρων
<b>TNFA 308G/A rs1800629</b>	G/G:54 (85%) A/G:6 (15%)	G/G:68(82%) A/G:15(18%)	G/G:53(84%) A/G:10(16%)	<b>OR: 1.99 (p:0.17)</b>	<b>OR: 1.70 (p:0.33)</b>
<b>TNFA 857C/T (rs1799724)</b>	C/C:29(48%) C/T:24 (40%) T/T:7 (12%)	C/C:30(36%) C/T:44(53%) T/T:9(11%)	C/C:23(37%) C/T:32(51%) T/T:8(13%)	<b>OR:1.69 (p:0.12)</b>	<b>OR:1.63 (p:0.18)</b>
<b>IL22 rs7314777</b>	T/T:39 (65%) C/T:18 (30%)	T/T: 52(63%) C/T:29(35%)	T/T:37 (59%) C/T:25 (40%)	<b>OR:0.47 (p:0.41)</b>	<b>OR:0.31 (p:0.28)</b>



	C/C:3 (5%)	C/C:2(2%)	C/C:1 (2%)		
<b>CTLA-4 49A/G</b> (rs231775)	A/A:37(62%) A/G:17(28%) G/G:6 (10%)	A/A: 32(39%) A/G:40(48%) G/G: 11(13%)	A/A:25(40%) A/G:29(46%) G/G: 9 (14%)	<b>OR:2.56</b> <b>(p:0.006)</b>	<b>OR:2.45</b> <b>(p:0.014)</b>
<b>TCF-19</b> <b>rs7750641</b>	C/C 57(95%) C/T: 3 (5%)	C/C:69(83%) C/T:14 (17%)	C/C:52(83%) C/T:11 (17%)	<b>OR:3.86</b> <b>(p:0.023)</b>	<b>OR:4.02</b> <b>(p:0.025)</b>
<b>LTA 252 A/G</b> (rs909253)	A/A 39(65%) A/G:19(32%) G/G:2 (3%)	A/A:45 (54%) A/G:36 (43%) G/G:2 (2%)	A/A:35(56%) A/G:26(41%) G/G:2 (3%)	<b>OR:1.65</b> <b>(p:0.15)</b>	<b>OR:1.52</b> <b>(p:0.27)</b>
<b>GSTT1 null</b>	Null:6 (10%) Non null:54 (90%)	Null:15 (18%) Non null:68 (82%)	Null:11(17%) Non null:52 (83%)	<b>p:0.18</b>	<b>p:0.23</b>
<b>GSTMI null</b>	Null:29(48%) Non null:31 (52%)	Null:40 (48%) Non null: 43 (52%)	Null:30 (48%) Non null: 33 (52%)	<b>p:0.99</b>	<b>p:0.94</b>
<b>IL1RN VNTR</b>	IL1RN2:20 (33%) NonIL1RN2: 40 (67%)	IL1RN2: 30 (36%) NonIL1RN2:5 3 (64%)	IL1RN2: 23 (37%) Non- IL1RN2:40 (63%)	<b>p:0.73</b>	<b>p:0.71</b>

**Πίνακας 67:** Κλινικά δεδομένα για ασθενείς και υγιείς μάρτυρες και σύνοψη αποτελεσμάτων γονοτύπωσης-συσχέτισης με τη νόσο.

#### **A.1.Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό 308A/G στο γονίδιο *TNFα***

Εκ των 83 ασθενών, 68 (82%) βρέθηκαν G/G ομοζυγώτες και 15 (18%) A/G ετεροζυγώτες. Στην υποομάδα των ασθενών με GMZL προσδιορίστηκαν 53 (84%) G/G ομοζυγώτες και 10 (16%) A/G ετεροζυγώτες. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 54 (90%) G/G ομοζυγώτες και 6 (10%) ετεροζυγώτες. (πίνακας 68)

Γονότυπος	Ασθενείς MALT		Ασθενείς GMZL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
G/G	68	82	53	84	54	90
A/G	15	18	10	16	6	10

**Πίνακας 68** : Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των γονοτύπων για τον TNFα 308A/G πολυμορφισμό σε MALT ασθενείς, GMZL ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό TNF308A/G υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

A)

TNFA308 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=143)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	122	21	0	265	21	1
MALT=0	54	6	0	114	6	1
MALT=1	68	15	0	151	15	1

B)

TNFA308 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=123)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	107	16	0	230	16	1
GMZL=0	54	6	0	114	6	1
GMZL=1	53	10	0	116	10	1

**Πίνακας 69** : Τεστ Hardy-Weinberg για το TNF308 A/G για τους MALT ασθενείς (A) και την υποομάδα των ασθενών με GMZL (B)

A).

TNFA308 association with response MALT (n=143, crude analysis)							
Model	Genotype	MALT=0	MALT=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
---	G/G	54 (90%)	68 (81.9%)	1.00	0.17	196.6	202.6
---	A/G	6 (10%)	15 (18.1%)	1.99 (0.72-5.46)			

B)

TNFA308 association with response GMZL (n=123, crude analysis)							
Model	Genotype	GMZL=0	GMZL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
---	G/G	54 (90%)	53 (84.1%)	1.00	0.33	173.5	179.1
---	A/G	6 (10%)	10 (15.9%)	1.70 (0.58-5.00)			

**Πίνακας 70:** A) Ο υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (MALT 0: υγιείς μάρτυρες, MALT 1: ασθενείς MALT λέμφωμα) για τον πολυμορφισμό TNF308 A/G. B) Ο υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (GMZL 0: υγιείς μάρτυρες, GMZL 1: ασθενείς με MALT λέμφωμα στομάχου) για τον πολυμορφισμό TNF308 A/G

Όπως συνάγεται από τον ως άνω πίνακα, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του TNF308A/G πολυμορφισμού και του MALT ή GMZL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

#### **A.2. Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό 857 C/T στο γονίδιο *TNFA***

Εκ των 83 ασθενών, 30 (36%) βρέθηκαν C/C ομοζυγώτες, 44 (53%) ετεροζυγώτες και 9 (11%) T/T ομοζυγώτες. Στην υποομάδα των ασθενών με GMZL προσδιορίστηκαν 23 (37%) C/C ομοζυγώτες και 32 (51%) C/T ετεροζυγώτες και 8 (13%) T/T ομοζυγώτες. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 29 (48%) C/C ομοζυγώτες, 24 (40%) ετεροζυγώτες και 7 (12%) T/T ομοζυγώτες, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς MALT		Ασθενείς GMZL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
C/C	30	36	23	37	29	48
C/T	44	53	32	51	24	40
T/T	9	11	8	13	7	12

**Πίνακας 71** : Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων για τον TNFa 857 C/T πολυμορφισμό σε ασθενείς με MALT, GMZL και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό *TNF857C/T* υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

TNFA857 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=143)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	59	68	16	186	100	0.71
MALT=0	29	24	7	82	38	0.56
MALT=1	30	44	9	104	62	0.35

TNFA857 association with response MALT (n=143, crude analysis)							
Model	Genotype	MALT=0	MALT=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	29 (48.3%)	30 (36.1%)	1.00			
	C/T	24 (40%)	44 (53%)	1.77 (0.87-3.61)	0.28	198	206.9
	T/T	7 (11.7%)	9 (10.8%)	1.24 (0.41-3.78)			
Dominant	C/C	29 (48.3%)	30 (36.1%)	1.00			
	C/T-T/T	31 (51.7%)	53 (63.9%)	1.65 (0.84-3.25)	0.14	196.4	202.3
Recessive	C/C-C/T	53 (88.3%)	74 (89.2%)	1.00			
	T/T	7 (11.7%)	9 (10.8%)	0.92 (0.32-2.63)	0.88	198.5	204.4
Overdominant	C/C-T/T	36 (60%)	39 (47%)	1.00			
	C/T	24 (40%)	44 (53%)	1.69 (0.86-3.32)	0.12	196.1	202.1
Log-additive	---	---	---	1.30 (0.78-2.17)	0.31	197.5	203.4

**Πίνακας 72:** Τεστ Hardy-Weinberg για το TNF857C/T πολυμορφισμό και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (MALT 0: υγιείς μάρτυρες, MALT 1: ασθενείς με MALT λέμφωμα) για τον πολυμορφισμό TNF857C/T.

TNFA857 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=123)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	52	56	15	160	86	1
GMZL=0	29	24	7	82	38	0.56
GMZL=1	23	32	8	78	48	0.79

TNFA857 association with response GMZL (n=123, crude analysis)							
Model	Genotype	GMZL=0	GMZL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	29 (48.3%)	23 (36.5%)	1.00			
	C/T	24 (40%)	32 (50.8%)	1.68 (0.79-3.60)	0.4	174.6	183
	T/T	7 (11.7%)	8 (12.7%)	1.44 (0.46-4.56)			
Dominant	C/C	29 (48.3%)	23 (36.5%)	1.00			
	C/T-T/T	31 (51.7%)	40 (63.5%)	1.63 (0.79-3.34)	0.18	172.7	178.3
Recessive	C/C-C/T	53 (88.3%)	55 (87.3%)	1.00			
	T/T	7 (11.7%)	8 (12.7%)	1.10 (0.37-3.25)	0.86	174.4	180
Overdominant	C/C-T/T	36 (60%)	31 (49.2%)	1.00			
	C/T	24 (40%)	32 (50.8%)	1.55 (0.76-3.16)	0.23	173	178.6
Log-additive	---	---	---	1.33 (0.78-2.26)	0.29	173.3	178.9

**Πίνακας 73:** Τεστ Hardy-Weinberg για το TNF857C/T πολυμορφισμό και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (GMZL 0: υγιείς μάρτυρες, GMZL 1: ασθενείς με GMZL) για τον πολυμορφισμό TNF857C/T.

Όπως συνάγεται από τον ως άνω πίνακα, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του TNF857C/T πολυμορφισμού και του MALT ή GMZL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

### **A.3. Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό 252A/G rs909253 στο γονίδιο LTA**

Εκ των 83 ασθενών, 45 (54%) βρέθηκαν A/A ομοζυγώτες , 36 (43%) A/G ετεροζυγώτες και 2 (2%) G/G ομοζυγώτες. Στην υποομάδα των ασθενών με GMZL προσδιορίστηκαν 35 (56%) βρέθηκαν A/A ομοζυγώτες , 26 (41%) A/G ετεροζυγώτες και 2 (3%) G/G ομοζυγώτες. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 39 (65%) AA ομοζυγώτες 19 (32%) AG ετεροζυγώτες και 2 (3%) GG ομοζυγώτες , όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς MALT		Ασθενείς GMZL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
A/A	45	54	35	56	39	65
A/G	36	43,5	26	41	19	32
G/G	2	2,5	2	3	2	3

*Πίνακας 74 : Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών για τον LTA 252A/G πολυμορφισμό σε ασθενείς με MALT, GMZL και υγιείς μάρτυρες.*

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό LTA 252A/G υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

LTA exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=143)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	84	55	4	223	63	0.22
MALT=0	39	19	2	97	23	1
MALT=1	45	36	2	126	40	0.13

LTA association with response MALT (n=143, crude analysis)							
Model	Genotype	MALT=0	MALT=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	39 (65%)	45 (54.2%)	1.00	0.36	198.5	207.4
	A/G	19 (31.7%)	36 (43.4%)	1.64 (0.81-3.31)			
	G/G	2 (3.3%)	2 (2.4%)	0.87 (0.12-6.44)			
Dominant	A/A	39 (65%)	45 (54.2%)	1.00	0.19	196.8	202.8
	A/G-G/G	21 (35%)	38 (45.8%)	1.57 (0.79-3.11)			
Recessive	A/A-A/G	58 (96.7%)	81 (97.6%)	1.00	0.74	198.4	204.3
	G/G	2 (3.3%)	2 (2.4%)	0.72 (0.10-5.23)			
Overdominant	A/A-G/G	41 (68.3%)	47 (56.6%)	1.00	0.15	196.5	202.4
	A/G	19 (31.7%)	36 (43.4%)	1.65 (0.82-3.31)			
Log-additive	---	---	---	1.39 (0.75-2.58)	0.29	197.4	203.3

**Πίνακας 75:** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (MALT 0: υγιείς μάρτυρες, MALT 1: ασθενείς με MALT λέμφωμα) για τον πολυμορφισμό LTA 252A/G.

LTA exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=123)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	74	45	4	193	53	0.59
GMZL=0	39	19	2	97	23	1
GMZL=1	35	26	2	96	30	0.49

LTA association with response GMZL (n=123, crude analysis)							
Model	Genotype	GMZL=0	GMZL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	39 (65%)	35 (55.6%)	1.00	0.54	175.2	183.6
	A/G	19 (31.7%)	26 (41.3%)	1.52 (0.72-3.22)			
	G/G	2 (3.3%)	2 (3.2%)	1.11 (0.15-8.34)			
Dominant	A/A	39 (65%)	35 (55.6%)	1.00	0.28	173.3	178.9
	A/G-G/G	21 (35%)	28 (44.4%)	1.49 (0.72-3.07)			
Recessive	A/A-A/G	58 (96.7%)	61 (96.8%)	1.00	0.96	174.4	180.1
	G/G	2 (3.3%)	2 (3.2%)	0.95 (0.13-6.97)			
Overdominant	A/A-G/G	41 (68.3%)	37 (58.7%)	1.00	0.27	173.2	178.8
	A/G	19 (31.7%)	26 (41.3%)	1.52 (0.72-3.18)			
Log-additive	---	---	---	1.35 (0.71-2.57)	0.35	173.6	179.2

**Πίνακας 76:** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (GMZL 0: υγιείς μάρτυρες, GMZL 1: ασθενείς με GMZL λέμφωμα) για τον πολυμορφισμό LTA 252A/G.

Όπως συνάγεται από τους ως άνω πίνακες, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του *LTA 252A/G* πολυμορφισμού και του MALT ή GMZL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

#### **A.4.Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό CTLA-4 49 A/G- rs231775 στο γονίδιο CTLA-4**

Εκ των 83 ασθενών, 32 (39%) βρέθηκαν AA ομοζυγώτες , 40 (48%) AG ετεροζυγώτες και 11 (14%) GG ομοζυγώτες. Στην υποομάδα των ασθενών με GMZL προσδιορίστηκαν 25 (40%) βρέθηκαν A/A ομοζυγώτες , 29 (46%) A/G ετεροζυγώτες και 9 (14%) G/G ομοζυγώτες. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 37 (62%) AA ομοζυγώτες, 17 (28%) AG ετεροζυγώτες και 6 (10%) GG ομοζυγώτες , όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς MALT		Ασθενείς GMZL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
A/A	32	39	25	40	37	62
A/G	40	48	29	46	17	28
G/G	11	13	9	14	6	10

**Πίνακας 77:** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον CTLA-4 49A/G πολυμορφισμό σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό CTLA-4 49A/G υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

CTLA exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=143)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	69	57	17	195	91	0.34
MALT=0	37	17	6	91	29	0.083
MALT=1	32	40	11	104	62	1

CTLA association with response MALT (n=143, crude analysis)							
Model	Genotype	MALT=0	MALT=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	37 (61.7%)	32 (38.5%)	1.00	0.021	192.8	201.7
	A/G	17 (28.3%)	40 (48.2%)	<b>2.72 (1.30-5.70)</b>			
	G/G	6 (10%)	11 (13.2%)	2.12 (0.70-6.38)			
Dominant	A/A	37 (61.7%)	32 (38.5%)	1.00	0.0061	191	196.9
	A/G-G/G	23 (38.3%)	51 (61.5%)	<b>2.56 (1.30-5.07)</b>			
Recessive	A/A-A/G	54 (90%)	72 (86.8%)	1.00	0.55	198.2	204.1
	G/G	6 (10%)	11 (13.2%)	1.37 (0.48-3.95)			
Overdominant	A/A-G/G	43 (71.7%)	43 (51.8%)	1.00	0.016	192.7	198.6
	A/G	17 (28.3%)	40 (48.2%)	<b>2.35 (1.16-4.77)</b>			
Log-additive	---	---	---	<b>1.80 (1.08-3.02)</b>	0.021	193.2	199.1

**Πίνακας 78 :** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (MALT 0: υγιείς μάρτυρες, MALT 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό CTLA-4 49A/G.

CTLA exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=123)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	62	46	15	170	76	0.2
GMZL=0	37	17	6	91	29	0.083
GMZL=1	25	29	9	79	47	1

CTLA association with response GMZL (n=123, crude analysis)							
Model	Genotype	GMZL=0	GMZL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	37 (61.7%)	25 (39.7%)	1.00	0.049	170.4	178.8
	A/G	17 (28.3%)	29 (46%)	<b>2.52 (1.15-5.53)</b>			
	G/G	6 (10%)	9 (14.3%)	2.22 (0.70-7.02)			
Dominant	A/A	37 (61.7%)	25 (39.7%)	1.00	0.014	168.5	174.1
	A/G-G/G	23 (38.3%)	38 (60.3%)	<b>2.45 (1.18-5.05)</b>			
Recessive	A/A-A/G	54 (90%)	54 (85.7%)	1.00	0.47	173.9	179.5
	G/G	6 (10%)	9 (14.3%)	1.50 (0.50-4.51)			
Overdominant	A/A-G/G	43 (71.7%)	34 (54%)	1.00	0.042	170.3	175.9
	A/G	17 (28.3%)	29 (46%)	<b>2.16 (1.02-4.56)</b>			
Log-additive	---	---	---	<b>1.76 (1.03-3.00)</b>	0.034	170	175.6

**Πίνακας 79:** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (GMZL 0: υγιείς μάρτυρες, GMZL 1: ασθενείς με GMZL λέμφωμα) για τον πολυμορφισμό CTLA-4 49A/G.

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, για τον πολυμορφισμό CTLA-4 49A/G πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το MALT λέμφωμα η οποία διατηρείται και στην



υποομάδα του GMZL. Από τα προτεινόμενα μοντέλα κληρονόμησης το επικρατητικό είναι εκείνο με τη μικρότερη τιμή AIC και ο OR που υπολογίζεται είναι 2.56 (p:0.0061) για το MALT και 2.45 (p:0.014) για το GMZL.

#### A.5. Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό rs7314777 στο γονίδιο IL-22

Εκ των 83 ασθενών, 52 (63%) βρέθηκαν T/T ομοζυγώτες, 29 (35%) ετεροζυγώτες και 2 (2%) C/C ομοζυγώτες. Στην υποομάδα των ασθενών με GMZL προσδιορίστηκαν 37 (59%) T/T ομοζυγώτες, 25 (40%) C/T ετεροζυγώτες και 1 (2%) C/C ομοζυγώτης. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 39 (65%) T/T ομοζυγώτες, 18 (30%) ετεροζυγώτες και 3 (5%) C/C ομοζυγώτες, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς MALT		Ασθενείς GMZL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
T/T	52	63	37	59	39	65
C/T	29	35	25	40	18	30
C/C	2	2	1	1	3	5

**Πίνακας 80** : Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον rs7314777 πολυμορφισμό σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό rs7314777 υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

IL22 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=143)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	91	47	5	229	57	1
MALT=0	39	18	3	96	24	0.68
MALT=1	52	29	2	133	33	0.51

IL22 association with response MALT (n=143, crude analysis)							
Model	Genotype	MALT=0	MALT=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	T/T	39 (65%)	52 (62.6%)	1.00	0.62	199.6	208.5
	C/T	18 (30%)	29 (34.9%)	1.21 (0.59-2.48)			
	C/C	3 (5%)	2 (2.4%)	0.50 (0.08-3.14)			
Dominant	T/T	39 (65%)	52 (62.6%)	1.00	0.77	198.4	204.4
	C/T-C/C	21 (35%)	31 (37.4%)	1.11 (0.55-2.21)			
Recessive	T/T-C/T	57 (95%)	81 (97.6%)	1.00	0.41	197.8	203.8
	C/C	3 (5%)	2 (2.4%)	0.47 (0.08-2.90)			
Overdominant	T/T-C/C	42 (70%)	54 (65.1%)	1.00	0.53	198.1	204.1
	C/T	18 (30%)	29 (34.9%)	1.25 (0.61-2.56)			
Log-additive	---	---	---	0.99 (0.55-1.80)	0.98	198.5	204.4

Πίνακας 81: Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (MALT 0: υγιείς μάρτυρες, MALT 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό rs7314777.

IL22 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=123)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	76	43	4	195	51	0.59
GMZL=0	39	18	3	96	24	0.68
GMZL=1	37	25	1	99	27	0.26

IL22 association with response GMZL (n=123, crude analysis)							
Model	Genotype	GMZL=0	GMZL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	T/T	39 (65%)	37 (58.7%)	1.00	0.34	174.3	182.7
	C/T	18 (30%)	25 (39.7%)	1.46 (0.69-3.11)			
	C/C	3 (5%)	1 (1.6%)	0.35 (0.03-3.53)			
Dominant	T/T	39 (65%)	37 (58.7%)	1.00	0.47	173.9	179.6
	C/T-C/C	21 (35%)	26 (41.3%)	1.31 (0.63-2.71)			
Recessive	T/T-C/T	57 (95%)	62 (98.4%)	1.00	0.28	173.3	178.9
	C/C	3 (5%)	1 (1.6%)	0.31 (0.03-3.03)			
Overdominant	T/T-C/C	42 (70%)	38 (60.3%)	1.00	0.26	173.2	178.8
	C/T	18 (30%)	25 (39.7%)	1.54 (0.73-3.24)			
Log-additive	---	---	---	1.10 (0.58-2.08)	0.78	174.4	180

Πίνακας 82: Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (GMZL 0: υγιείς μάρτυρες, GMZL 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό rs7314777.

Όπως συνάγεται από τον ως άνω πίνακα, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του rs7314777 πολυμορφισμού και του MALT λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

#### Α.6.Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό rs7750641 στο γονίδιο *TCF-19*

Εκ των 83 ασθενών, 69 (83%) βρέθηκαν C/C ομοζυγώτες και 14 (17%) ετεροζυγώτες. Στην υποομάδα των ασθενών με GMZL προσδιορίστηκαν 52 (83%) C/C ομοζυγώτες και 11 (17%) C/T ετεροζυγώτες. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 57 (95%) C/C ομοζυγώτες και 3 (5%) ετεροζυγώτες, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς MALT		Ασθενείς GMZL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
C/C	69	83	52	83	57	95
C/T	14	17	11	17	3	5

**Πίνακας 83** : Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των γονοτύπων για τον rs7750641 πολυμορφισμό σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό rs7750641 υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

TCF exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=143)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	126	17	0	269	17	1
MALT=0	57	3	0	117	3	1
MALT=1	69	14	0	152	14	1

TCF association with response MALT (n=143, crude analysis)							
Model	Genotype	MALT=0	MALT=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
---	C/C	57 (95%)	69 (83.1%)	1.00	0.023	193.4	199.3
	C/T	3 (5%)	14 (16.9%)	<b>3.86 (1.06-14.08)</b>			

**Πίνακας 84:** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (MALT 0: υγιείς μάρτυρες, MALT 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό rs7750641.

TCF exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=123)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	109	14	0	232	14	1
GMZL=0	57	3	0	117	3	1
GMZL=1	52	11	0	115	11	1

TCF association with response GMZL (n=123, crude analysis)							
Model	Genotype	GMZL=0	GMZL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
---	C/C	57 (95%)	52 (82.5%)	1.00	0.025	169.4	175
	C/T	3 (5%)	11 (17.5%)	<b>4.02 (1.06-15.21)</b>			

**Πίνακας 85:** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (GMZL 0: υγιείς μάρτυρες, GMZL 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό rs7750641.

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, για τον πολυμορφισμό rs7750641 στο γονίδιο *TCF-19* πιστοποιείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο, με OR που υπολογίζεται στο 3.86 (p:0.023), συσχέτιση που παραμένει σημαντική στην υποομάδα των ασθενών με GMZL (OR: 4.02, p: 0.025).

#### **A.7. Αποτελέσματα για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων *GSTT1* και *GSTM1***

Εκ των 83 ασθενών, 15 (18%) βρέθηκαν ομοζυγώτες για την έλλειψη του *GSTT1* γονιδίου και 40 (48%) ομοζυγώτες για την έλλειψη του *GSTM1* γονιδίου. Στην υποομάδα των ασθενών με GMZL προσδιορίστηκαν 11 (17%) με έλλειψη του *GSTT1* και 30 (48%) με έλλειψη του *GSTM1*. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 6 (10%) ομοζυγώτες για την έλλειψη του *GSTT1* γονιδίου και 29

(48%) για τη διαγραφή του *GSTM1* γονιδίου, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς		Ασθενείς με GMZL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
GSTT1 null	15	18	11	17	6	10
Παρουσία GSTT1	68	82	52	83	54	90
GSTM1 null	40	48	30	48	29	48
Παρουσία GSTM1	43	52	33	52	31	52

**Πίνακας 86** : Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των ομοζυγωτών και μη ομοζυγωτών για τη διαγραφή των γονιδίων GSTT1 και GSTM1. (null γονότυπος= ομοζυγώτες για την έλλειψη γονιδίου)

Ο έλεγχος σημαντικότητας έγινε με τη διενέργεια της δοκιμασίας  $\chi^2$ . Δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για τον πολυμορφισμό του γονιδίου GSTT1 ( $p$ : 0.18) ή για τον πολυμορφισμό του γονιδίου GSTM1 ( $p$ : 0.99).

#### **A.8. Αποτελέσματα για τον VNTR πολυμορφισμό στο γονίδιο IL1RN**

Ο πολυμορφισμός που εξετάστηκε στο γονίδιο IL1RN αφορά την παρουσία διαφορετικού αριθμού αλληλόμορφων επαναλήψεων μιας αλληλουχίας 86bp εντός του δεύτερου εσωνίου του γονιδίου (VNTR: Various Number Tandem Repeats). Συγκεκριμένα αναγνωρίζονται τα εξής πιθανά αλλήλια: Το αλλήλιο 1 που περιλαμβάνει τέσσερις επαναλήψεις και αποδίδει προϊόν 410bp, το αλλήλιο 2 με δύο επαναλήψεις και μέγεθος 240bp, το αλλήλιο 3 με πέντε επαναλήψεις και μέγεθος 500bp, το αλλήλιο 4 με τρεις επαναλήψεις και μέγεθος 325 bp και το αλλήλιο 5 με έξι επαναλήψεις και μέγεθος 595bp (πίνακας 87). Για τη στατιστική ανάλυση και λόγω της μικρής συχνότητας των αλληλίων 3,4 και 5 οι γονότυποι κατηγοριοποιήθηκαν σε IL1RN2, όταν υπάρχει ένα τουλάχιστον αλλήλιο 2 και μη IL1RN2, όταν ο εξεταζόμενος δε φέρει κανένα αλλήλιο 2.

Αλληλίο	Αριθμός επαναλήψεων	Μέγεθος προϊόντος	Στατιστική ανάλυση
1	4	410	Μη IL1RN2
2	2	240	IL1RN2
3	5	500	Μη IL1RN2
4	3	325	Μη IL1RN2
5	6	595	Μη IL1RN2

**Πίνακας 87:** Ονομασία αλληλίων ανάλογα με τον αριθμό επαναλήψεων της αλληλουχίας των 86 bp στο εσώνιο 2 του γονιδίου *IL1RN*.

Εκ των 83 ασθενών, 30 (36%) βρέθηκαν να φέρουν τουλάχιστον ένα αλληλίο 2, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό βρέθηκε 37% μεταξύ των ασθενών με GMZL (23 επί συνόλου 63) και μεταξύ των υγιών μαρτύρων προσδιορίστηκε στο 33% (20 επί συνόλου 60). Αναλυτικά οι γονότυποι που ανευρέθησαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς MALT		Ασθενείς GMZL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
IL1RN2	30	36	23	37	20	33
Μη IL1RN2	53	64	40	63	40	67

**Πίνακας 88:** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των γονοτύπων για τον VNTR πολυμορφισμό στο γονίδιο *IL1RN* σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος σημαντικότητας έγινε με τη διενέργεια της δοκιμασίας  $\chi^2$ . Για τον πολυμορφισμό του γονιδίου *IL1RN* δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση στο μελετούμενο πληθυσμό MALT ( $p: 0.73$ ) ή GMZL ( $p:0.71$ ) ασθενών.

## **B. Αποτελέσματα για T-δερματικά λεμφώματα**

### **Πληθυσμός μελέτης**

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 58 ασθενείς με CTCL λέμφωμα και 60 υγιείς μάρτυρες με ιστορικό ελεύθερο κακοήθειας ή συστηματικής αυτοάνοσης νόσου. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 55.5 έτη και των υγιών τα 53.5 έτη, ενώ η αναλογία ανδρών: γυναικών ήταν 2.4:1 και 1.6:1 αντίστοιχα. Η πλειοψηφία των ασθενών έπασχε από σπογγοειδή μυκητίαση (74%) και μεταξύ των υπολοίπων περιλαμβάνονταν 3 περιπτώσεις συνδρόμου Sézary, 10 περιπτώσεις CD 30(+) λεμφώματος (7 αναπλαστικού λεμφώματος και 3 λυμφοματοειδούς βλατίδωσης), 1 γδ (+) λέμφωμα και ένα μη άλλως προσδιοριζόμενο περιφερικό T λέμφωμα. 31 ασθενείς (53%) βρίσκονταν σε στάδιο I κατά τη διάγνωση, 12 (21%) σε στάδιο II, 12 (21%) ασθενείς σε στάδιο III και 3 (5%) σε στάδιο IV. Διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις εφαρμόστηκαν ως πρώτη γραμμή θεραπείας αναλόγως υποτύπου: Μεταξύ των ασθενών με MF, η πλειοψηφία αντιμετωπίστηκε αρχικά με μονοθεραπείες (12 PUVA, 5 κορτικοστεροειδή, 5 ιντερφερόνη, 1 μεξαροτένιο, 1 ακτινοθεραπεία, 1 γεμισιταβίνη), 1 υπεβλήθη σε χημειοθεραπεία (CHOP), 9 έλαβαν συνδυασμούς ενώ 8 δεν έλαβαν θεραπεία αλλά ετέθησαν σε παρακολούθηση. Οι ασθενείς με σύνδρομο Sézary αντιμετωπίστηκαν αρχικά με ιντερφερόνη σε συνδυασμό με PUVA ή μεθοτρεξάτη και γεμισιταβίνη. Οι 3 ασθενείς με LyP έλαβαν ιντερφερόνη και ακτινοθεραπεία, μεθοτρεξάτη και καμία θεραπεία αντιστοίχως, ενώ οι περιπτώσεις αναπλαστικού λεμφώματος αντιμετωπίστηκαν με μεθοτρεξάτη, ακτινοθεραπεία, συνδυασμούς βασιζόμενους στην ιντερφερόνη (ιντερφερόνη+ακτινοθεραπεία ή ιντερφερόνη+caelyx) ή χημειοθεραπευτικά σχήματα (CHOP/CNOP). Ο ασθενής με PTCL NOS υπεβλήθη σε ακτινοθεραπεία και ο ασθενής με το γδ λέμφωμα σε χημειοθεραπεία (CHOEP). Η πλειοψηφία των συμμετεχόντων (32 ασθενείς, 55%) χρειάστηκε περισσότερες της μίας γραμμής θεραπείας κατά την πορεία της νόσου. Ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης ήταν οι 56.3 μήνες. Τα κλινικά δεδομένα ασθενών και υγιών μαρτύρων, καθώς και οι χορηγηθείσες θεραπείες παρατίθενται στον πίνακα 89, τα συνοπτικά αποτελέσματα γονοτύπωσης στον πίνακα 90 και οι μετρήσεις της βιταμίνης D στον πίνακα 91.

<b>Μεταβλητή</b>	<b>Ασθενείς</b>	<b>Μάρτυρες</b>
Ηλικία μέση τιμή (τυπική απόκλιση)	55.5 (14.1)	53.5 (15.9)
Αναλογία ανδρών:γυναικών	2.4:1	1.6:1

<b>Υπότυπος</b>	<b>MF</b> N=43	<b>SS</b> N=3	<b>Anaplastic</b> N=7	<b>LyP</b> N=3	<b>Γδ</b> N=1	<b>PTCL</b> <b>NOS</b> N=1
<b>Αρχική θεραπεία</b>						
PUVA	<b>12</b>					
Ιντερφερόνη	<b>5</b>					
Κορτικοστεροειδή	<b>5</b>					
Βεξαροτένιο	<b>1</b>					
Μεθοτρεξάτη			<b>2</b>	<b>1</b>		
Ακτινοθεραπεία	<b>1</b>		<b>1</b>		<b>1</b>	
Γεμισταβίνη	<b>1</b>					<b>1</b>
Χημιοθεραπεία	<b>1</b>		<b>2</b>			
Συνδυασμοί	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>		
Παρακολούθηση	<b>8</b>			<b>1</b>		



Στάδιο κατά τη διάγνωση (n,%)	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIB	IV
	21 36,2%	10 17,2%	3 5,2%	9 15,5%	9 15,5%	3 5,2%	3 5,2%

**Πίνακας 89:** Κλινικά δεδομένα για ασθενείς με CTCL λέμφωμα και υγιείς μάρτυρες. (MF: Σπογγοειδής μυκητίαση, SS: Σύνδρομο Sézary, LyP: λεμφωματοειδής βλατίδωση, PTCL NOS: περιφερικό T δερματικό λέμφωμα μη άλλως καθοριζόμενο)

SNP	Ασθενείς	Μάρτυρες	Γονότυπος OR (95% CI)
<b>TNFA 308G/A rs1800629</b>	G/G:51 (88%) A/G:7 (12%)	G/G:54 (90%) A/G:6 (10%)	G/G: 1.0 A/G: 1.24 (0.39-3.92)
<b>TNFA 857C/T (rs1799724)</b>	C/C:33 (57%) C/T:24(41%) T/T:1(2%)	C/C:30 (50%) C/T:25 (42%) T/T:5 (8%)	C/C-C/T: 1.0 T/T: 0.19(0.02-1.71)
<b>CTLA-4 49A/G (rs231775)</b>	A/A: 31 (53,5%) A/G:20 (34,5%) G/G: 7 (12%)	A/A:36 (60%) A/G:18 (30%) G/G:6 (10%)	A/A: 1.0 A/G-G/G: 1.31 (0.63-2.71)
<b>LTA252 A/G (rs909253)</b>	A/A:33 (57%) A/G:22 (38%)	A/A: 39(65%) A/G:19(32%)	A/A: 1.0

	G/G:3 (5%)	G/G:2 (3%)	A/G-G/G: 1.41 (0.67-2.96)
<b>VDR ApaI</b>	A/A:13 (22%) A/G:36 (62%) G/G:9 (16%)	A/A:12 (30%) A/G:20 (50%) G/G:8 (20%)	A/A-G/G:1.0 A/G:1.64 (0.72-3.70)
<b>VDR BsmI</b>	A/A:9 (16%) A/G:36 (62%) G/G:13 (22%)	A/A:7 (17,5%) A/G:22 (55%) G/G:11 (27,5%)	A/A-G/G:1.0 A/G:1.34 (0.59-3.03)
<b>VDR TaqI</b>	C/C: 6 (10%) C/T: 36 (62%) T/T: 16 (28%)	C/C: 6 (15%) C/T: 20 (50%) T/T: 14 (35%)	T/T-C/C:1.0 C/T:1.64 (0.72-3.70)
<b>VDR FokI</b>	C/C: 27 (46,5%) C/T: 22 (38%) T/T: 9 (15,5%)	C/C: 21 (52%) C/T: 18 (45%) T/T: 1 (3%)	C/C-C/T:1 T/T: 7.16(0.87-58.98)
<b>Πολυμορφισμός</b>	<b>Ασθενείς</b>	<b>Μάρτυρες</b>	<b>Επίπεδο σημαντικότητας <math>\chi^2</math></b>
<b><i>GSTT1</i> null</b>	Null:13 (22%) Non-null:45 (78%)	Null:6 (10%) Non-null:54 (90%)	

			p=0.11
<b>GSTM1 null</b>	Null:28 (48%) Non-null:30 (52%)	Null:29 (48%) Non-null:31 (52%)	p=0.86
<b>IL1RN VNTR</b>	IL1RN2: 25 (43%) Non- IL1RN2:33 (57%)	IL1RN2: 20 (33%) Non- IL1RN2: 40 (67%)	p=0.37

**Πίνακας 90:** Συχνότητες γονοτύπων σε ασθενείς με CTCL και υγιείς μάρτυρες, υπολογιζόμενες τιμές ORs και επίπεδο σημαντικότητας.

<b>Επίπεδα 25(OH)D3</b>	<b>Ασθενείς</b>	<b>Υγιείς μάρτυρες</b>	<b>Επίπεδο σημαντικότητας</b>
<b>Διαμεση τιμή (εύρος)</b>	17.1 ng/mL (6.3-34.3)	17.5 ng/mL (8.2-32.5)	p=0.82
<b>&gt;30 ng/mL n (%)</b>	2 (5%)	3(7.5%)	
<b>20-30 ng/mL n (%)</b>	14 (35%)	9 (22.5%)	
<b>10-20 ng/mL n (%)</b>	14 (35%)	26 (65%)	
<b>&lt;10 ng/mL n (%)</b>	10 (25%)	2(5%)	

**Πίνακας 91 :** Επίπεδα βιταμίνης D σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Διάμεσες τιμές και ποσοστά ανά επίπεδο επάρκειας.

### B.1.Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό 308A/G στο γονίδιο *TNFα*

Εκ των 58 ασθενών, 51 (88%) βρέθηκαν G/G ομοζυγώτες και 7 (12%) A/G ετεροζυγώτες. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 54 (90%) G/G ομοζυγώτες και 6 (10%) A/G ετεροζυγώτες.ομοζυγώτες και 6 (10%) ετεροζυγώτες.

Γονότυπος	Ασθενείς CTCL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
G/G	51	88	54	90
A/G	7	12	6	10

**Πίνακας 92:** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των γονοτύπων για τον TNFα 308A/G πολυμορφισμό σε CTCL ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό TNF308A/G υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

TNF308 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=118)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	105	13	0	223	13	1
CTCL=0	54	6	0	114	6	1
CTCL=1	51	7	0	109	7	1

TNF308 association with response CTCL (n=118, crude analysis)						
Model	Genotype	CTCL=0	CTCL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC BIC
---	G/G	54 (90%)	51 (87.9%)	1.00	0.72	167.4 173
	A/G	6 (10%)	7 (12.1%)	1.24 (0.39-3.92)		

**Πίνακας 93:** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (CTCL 0: υγιείς μάρτυρες, CTCL 1: ασθενείς με CTCL λέμφωμα) για τον πολυμορφισμό TNF308 A/G.

Όπως συνάγεται από τον ως άνω πίνακα, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του TNF308A/G πολυμορφισμού και του CTCL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

## B.2. Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό 857 C/T στο γονίδιο *TNFA*

Εκ των 58 ασθενών, 33 (57%) βρέθηκαν C/C ομοζυγώτες, 24 (41%) C/T ετεροζυγώτες και 1 (2%) T/T ομοζυγώτης. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 30 (50%) C/C ομοζυγώτες 25 (42%) ετεροζυγώτες και 5 (18%) T/Τομοζυγώτες. (πίνακας 94)

Γονότυπος	Ασθενείς CTCL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
C/C	33	57	30	50
C/T	24	41	25	42
T/T	1	2	5	18

**Πίνακας 94** : Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των γονοτύπων για τον TNFa 857C/T πολυμορφισμό σε CTCL ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό TNF308A/G υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

TNF857 exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=118)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	63	49	6	175	61	0.47
CTCL=0	30	25	5	85	35	1
CTCL=1	33	24	1	90	26	0.26

TNF857 association with response CTCL (n=118, crude analysis)							
Model	Genotype	CTCL=0	CTCL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	30 (50%)	33 (56.9%)	1.00	0.22	166.5	174.8
	C/T	25 (41.7%)	24 (41.4%)	0.87 (0.41-1.84)			
	T/T	5 (8.3%)	1 (1.7%)	0.18 (0.02-1.65)			
Dominant	C/C	30 (50%)	33 (56.9%)	1.00	0.45	167	172.5
	C/T-T/T	30 (50%)	25 (43.1%)	0.76 (0.37-1.56)			
Recessive	C/C-C/T	55 (91.7%)	57 (98.3%)	1.00	0.088	164.6	170.2
	T/T	5 (8.3%)	1 (1.7%)	0.19 (0.02-1.71)			
Overdominant	C/C-T/T	35 (58.3%)	34 (58.6%)	1.00	0.97	167.5	173.1
	C/T	25 (41.7%)	24 (41.4%)	0.99 (0.48-2.06)			
Log-additive	---	---	---	0.68 (0.36-1.26)	0.21	166	171.5

**Πίνακας 95:** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (CTCL 0: υγιείς μάρτυρες, CTCL 1: ασθενείς με CTCL λέμφωμα) για τον πολυμορφισμό TNF857 C/T.

Όπως συνάγεται από τον ως άνω πίνακα, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του TNF857 C/T πολυμορφισμού και του CTCL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

### B.3. Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό 252A/G rs909253 στο γονίδιο LTA

Εκ των 58 ασθενών, 33 (57%) βρέθηκαν A/A ομοζυγώτες, 22 (38%) A/G ετεροζυγώτες και 3 (5%) G/G ομοζυγώτες. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 39 (65%) AA ομοζυγώτες 19 (32%) AG ετεροζυγώτες και 2 (3%) GG ομοζυγώτες, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς CTCL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
A/A	33	57	39	65
A/G	22	38	19	32
G/G	3	5	2	3

**Πίνακας 96 :** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων για τον LTA 252A/G πολυμορφισμό σε ασθενείς με CTCL και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό *LTA 252A/G* υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

LTA exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=118)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	72	41	5	185	51	1
CTCL=0	39	19	2	97	23	1
CTCL=1	33	22	3	88	28	1

LTA association with response CTCL (n=118, crude analysis)							
Model	Genotype	CTCL=0	CTCL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	39 (65%)	33 (56.9%)	1.00	0.64	168.7	177
	A/G	19 (31.7%)	22 (37.9%)	1.37 (0.63-2.95)			
	G/G	2 (3.3%)	3 (5.2%)	1.77 (0.28-11.25)			
Dominant	A/A	39 (65%)	33 (56.9%)	1.00	0.37	166.7	172.3
	A/G-G/G	21 (35%)	25 (43.1%)	1.41 (0.67-2.96)			
Recessive	A/A-A/G	58 (96.7%)	55 (94.8%)	1.00	0.62	167.3	172.8
	G/G	2 (3.3%)	3 (5.2%)	1.58 (0.25-9.83)			
Overdominant	A/A-G/G	41 (68.3%)	36 (62.1%)	1.00	0.47	167	172.6
	A/G	19 (31.7%)	22 (37.9%)	1.32 (0.62-2.82)			
Log-additive	---	---	---	1.35 (0.72-2.55)	0.35	166.7	172.2

**Πίνακας 97:** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (CTCL 0: υγιείς μάρτυρες, CTCL 1: ασθενείς με CTCL λέμφωμα) για τον πολυμορφισμό *LTA 252A/G*.

Όπως συνάγεται από τον ως άνω πίνακα, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του *LTA 252A/G* πολυμορφισμού και του CTCL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

#### **B.4.Αποτελέσματα για τον πολυμορφισμό CTLA-4 49 A/G- rs231775 στο γονίδιο CTLA-4**

Εκ των 58 ασθενών, 31 (53%) βρέθηκαν AA ομοζυγώτες, 20 (34%) AG ετεροζυγώτες και 7 (12%) GG ομοζυγώτες. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 36 (60%) AA ομοζυγώτες, 18 (30%) AG ετεροζυγώτες και 6 (10%) GG ομοζυγώτες, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς CTCL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
A/A	31	53	36	60
A/G	20	34	18	30
G/G	7	12	6	10

**Πίνακας 98:** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον CTLA-4 49A/G πολυμορφισμό σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό CTLA-4 49A/G υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

CTLA exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=118)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	67	38	13	172	64	0.06
CTCL=0	36	18	6	90	30	0.16
CTCL=1	31	20	7	82	34	0.21

CTLA association with response CTCL (n=118, crude analysis)							
Model	Genotype	CTCL=0	CTCL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	36 (60%)	31 (53.5%)	1.00	0.77	169	177.3
	A/G	18 (30%)	20 (34.5%)	1.29 (0.58-2.86)			
	G/G	6 (10%)	7 (12.1%)	1.35 (0.41-4.46)			
Dominant	A/A	36 (60%)	31 (53.5%)	1.00	0.47	167	172.6
	A/G-G/G	24 (40%)	27 (46.5%)	1.31 (0.63-2.71)			
Recessive	A/A-A/G	54 (90%)	51 (87.9%)	1.00	0.72	167.4	173
	G/G	6 (10%)	7 (12.1%)	1.24 (0.39-3.92)			
Overdominant	A/A-G/G	42 (70%)	38 (65.5%)	1.00	0.6	167.3	172.8
	A/G	18 (30%)	20 (34.5%)	1.23 (0.57-2.66)			
Log-additive	---	---	---	1.20 (0.71-2.04)	0.49	167.1	172.6

**Πίνακας 99 :** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (CTCL 0: υγιείς μάρτυρες, CTCL 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό CTLA-4 49A/G.



Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του CTLA-4 49A/G πολυμορφισμού και του CTCL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

### B.5. Αποτελέσματα για τους πολυμορφισμούς των γονιδίων *GSTT1* και *GSTM1*

Εκ των 58 ασθενών, 13 (22%) βρέθηκαν ομοζυγώτες για την έλλειψη του *GSTT1* γονιδίου και 28 (48%) ομοζυγώτες για την έλλειψη του *GSTM1* γονιδίου. Μεταξύ των 60 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 6 (10%) ομοζυγώτες για την έλλειψη του *GSTT1* γονιδίου και 29 (48%) για τη διαγραφή του *GSTM1* γονιδίου, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
GSTT1 null	13	22	6	10
Παρουσία GSTT1	45	78	54	90
GSTM1 null	28	48	29	48
Παρουσία GSTM1	30	52	31	52

**Πίνακας 100** : Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των ομοζυγωτών και μη ομοζυγωτών για τη διαγραφή των γονιδίων *GSTT1* και *GSTM1*. (null γονότυπος= ομοζυγώτες για την έλλειψη γονιδίου)

Ο έλεγχος σημαντικότητας έγινε με τη διενέργεια της δοκιμασίας  $\chi^2$ . Δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για τον πολυμορφισμό του γονιδίου *GSTT1* ( $p$ : 0.07) ή για τον πολυμορφισμό του γονιδίου *GSTM1* ( $p$ : 0.99).

### B.6. Αποτελέσματα για τον VNTR πολυμορφισμό στο γονίδιο *IL1RN*

Εκ των 58 ασθενών, 25 (43%) βρέθηκαν να φέρουν τουλάχιστον ένα αλληλίο 2, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό βρέθηκε μεταξύ των υγιών μαρτύρων προσδιορίστηκε στο 33% (20 επί συνόλου 60). Αναλυτικά οι γονότυποι που ανευρέθησαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς CTCL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
IL1RN2	25	43	20	33
Μη IL1RN2	33	57	40	67

**Πίνακας 101:** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των γονοτύπων για τον VNTR πολυμορφισμό στο γονίδιο IL1RN σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος σημαντικότητας έγινε με τη διενέργεια της δοκιμασίας  $\chi^2$ . Για τον πολυμορφισμό του γονιδίου IL1RN δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση στο μελετούμενο πληθυσμό CTCL ( $p$ : 0.27) ασθενών.

### **B.7. Αποτελέσματα για τους πολυμορφισμούς του γονιδίου του υποδοχέα της βιταμίνης D (VDR)**

#### **A. *ApaI***

Εκ των 58 ασθενών, 13 (22%) βρέθηκαν AA ομοζυγώτες, 36 (62%) AG ετεροζυγώτες και 7 (16%) GG ομοζυγώτες. Μεταξύ των 40 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 12 (30%) AA ομοζυγώτες, 20 (50%) AG ετεροζυγώτες και 8 (20%) GG ομοζυγώτες, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς CTCL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
A/A	13	16	7	18
A/G	36	62	22	55

G/G	9	22	11	28
-----	---	----	----	----

**Πίνακας 102:** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον *ApaI* πολυμορφισμό σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό *ApaI* υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

ApaI exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=98)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	25	56	17	106	90	0.16
CTCL=0	12	20	8	44	36	1
CTCL=1	13	36	9	62	54	0.11

ApaI association with response CTCL (n=98, crude analysis)							
Model	Genotype	CTCL=0	CTCL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	A/A	12 (30%)	13 (22.4%)	1.00			
	A/G	20 (50%)	36 (62.1%)	1.66 (0.64-4.32)	0.49	137.1	144.9
	G/G	8 (20%)	9 (15.5%)	1.04 (0.30-3.57)			
Dominant	A/A	12 (30%)	13 (22.4%)	1.00	0.4	135.8	141
	A/G-G/G	28 (70%)	45 (77.6%)	1.48 (0.59-3.71)			
Recessive	A/A-A/G	32 (80%)	49 (84.5%)	1.00	0.57	136.2	141.4
	G/G	8 (20%)	9 (15.5%)	0.73 (0.26-2.10)			
Overdominant	A/A-G/G	20 (50%)	22 (37.9%)	1.00	0.24	135.1	140.3
	A/G	20 (50%)	36 (62.1%)	1.64 (0.72-3.70)			
Log-additive	---	---	---	1.08 (0.58-2.00)	0.82	136.5	141.6

**Πίνακας 103 :** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (CTCL 0: υγιείς μάρτυρες, CTCL 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό *ApaI*.

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του *ApaI* πολυμορφισμού και του CTCL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

## B. *BsmI*

Εκ των 58 ασθενών, 9 (16%) βρέθηκαν AA ομοζυγώτες, 36 (62%) AG ετεροζυγώτες και 13 (22%) GG ομοζυγώτες. Μεταξύ των 40 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 7 (18%) AA ομοζυγώτες, 22 (55%) AG ετεροζυγώτες και 11 (28%) GG ομοζυγώτες, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς CTCL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
A/A	9	16	7	17,5
A/G	36	62	22	55
G/G	13	22	11	27,5

**Πίνακας 104:** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον BsmI πολυμορφισμό σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό BsmI υπολογίσθηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

<b>BsmI exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=98)</b>						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
<b>All subjects</b>	24	58	16	106	90	0.071
<b>CTCL=0</b>	11	22	7	44	36	0.75
<b>CTCL=1</b>	13	36	9	62	54	0.11

<b>BsmI association with response CTCL (n=98, crude analysis)</b>							
Model	Genotype	CTCL=0	CTCL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	G/G	11 (27.5%)	13 (22.4%)	1.00	0.78	138	145.8
	A/G	22 (55%)	36 (62.1%)	1.38 (0.53-3.62)			
	A/A	7 (17.5%)	9 (15.5%)	1.09 (0.30-3.89)			
Dominant	G/G	11 (27.5%)	13 (22.4%)	1.00	0.57	136.2	141.4
	A/G-A/A	29 (72.5%)	45 (77.6%)	1.31 (0.52-3.32)			
Recessive	G/G-A/G	33 (82.5%)	49 (84.5%)	1.00	0.79	136.5	141.6
	A/A	7 (17.5%)	9 (15.5%)	0.87 (0.29-2.55)			
Overdominant	G/G-A/A	18 (45%)	22 (37.9%)	1.00	0.48	136	141.2
	A/G	22 (55%)	36 (62.1%)	1.34 (0.59-3.03)			
Log-additive	---	---	---	1.08 (0.57-2.04)	0.81	136.5	141.6

**Πίνακας 105 :** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (CTCL 0: υγιείς μάρτυρες, CTCL 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό BsmI.

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του BsmI πολυμορφισμού και του CTCL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

### Γ. TaqI

Εκ των 58 ασθενών, 6 (10%) βρέθηκαν CC ομοζυγώτες, 36 (62%) CT ετεροζυγώτες και 16 (28%) TT ομοζυγώτες. Μεταξύ των 40 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 6 (15%) CC ομοζυγώτες, 20 (50%) CT ετεροζυγώτες και 14 (35%) TT ομοζυγώτες, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς CTCL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
C/C	6	10	6	15
C/T	36	62	20	50
T/T	16	28	14	35

**Πίνακας 106:** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον TaqI πολυμορφισμό σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό TaqI υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

TaqI exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=98)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	30	56	12	116	80	0.095
CTCL=0	14	20	6	48	32	1
CTCL=1	16	36	6	68	48	0.057

TaqI association with response CTCL (n=98, crude analysis)							
Model	Genotype	CTCL=0	CTCL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	T/T	14 (35%)	16 (27.6%)	1.00	0.49	137.1	144.8
	C/T	20 (50%)	36 (62.1%)	1.57 (0.64-3.88)			
	C/C	6 (15%)	6 (10.3%)	0.87 (0.23-3.34)			
Dominant	T/T	14 (35%)	16 (27.6%)	1.00	0.44	135.9	141.1
	C/T-C/C	26 (65%)	42 (72.4%)	1.41 (0.59-3.37)			
Recessive	T/T-C/T	34 (85%)	52 (89.7%)	1.00	0.49	136.1	141.2
	C/C	6 (15%)	6 (10.3%)	0.65 (0.19-2.20)			
Overdominant	T/T-C/C	20 (50%)	22 (37.9%)	1.00	0.24	135.1	140.3
	C/T	20 (50%)	36 (62.1%)	1.64 (0.72-3.70)			
Log-additive	---	---	---	1.07 (0.56-2.04)	0.83	136.5	141.7

**Πίνακας 107 :** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (CTCL 0: υγιείς μάρτυρες, CTCL 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό TaqI.

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του TaqI πολυμορφισμού και του CTCL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

#### Δ. FokI

Εκ των 58 ασθενών, 27 (47%) βρέθηκαν CC ομοζυγώτες, 22 (38%) CT ετεροζυγώτες και 9 (16%) TT ομοζυγώτες. Μεταξύ των 40 υγιών μαρτύρων περιλαμβάνονταν 21 (52%) CC ομοζυγώτες, 18 (45%) CT ετεροζυγώτες και 1 (3%) TT ομοζυγώτης, όπως συνοψίζεται στον ακόλουθο πίνακα.

Γονότυπος	Ασθενείς CTCL		Υγιείς μάρτυρες	
	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)	Απόλυτος αριθμός	Αναλογία (%)
C/C	27	46,5	21	52
C/T	22	38	18	45
T/T	9	15,5	1	3

**Πίνακας 108:** Απόλυτος αριθμός και σχετική συχνότητα των τριών γονοτύπων και των δύο αλληλίων για τον FokI πολυμορφισμό σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.

Ο έλεγχος της ισορροπίας Hardy-Weinberg, ο σχετικός κίνδυνος, τα όρια εμπιστοσύνης και οι τιμές AIC (Akaike information criterion) για τον πολυμορφισμό FokI υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα snpstats και παρατίθενται παρακάτω:

FokI exact test for Hardy-Weinberg equilibrium (n=98)						
	N11	N12	N22	N1	N2	P-value
All subjects	48	40	10	136	60	0.81
CTCL=0	21	18	1	60	20	0.4
CTCL=1	27	22	9	76	40	0.25

FokI association with response CTCL (n=98, crude analysis)							
Model	Genotype	CTCL=0	CTCL=1	OR (95% CI)	P-value	AIC	BIC
Codominant	C/C	21 (52.5%)	27 (46.5%)	1.00	0.075	133.3	141.1
	C/T	18 (45%)	22 (37.9%)	0.95 (0.41-2.21)			
	T/T	1 (2.5%)	9 (15.5%)	7.00 (0.82-59.68)			
Dominant	C/C	21 (52.5%)	27 (46.5%)	1.00	0.56	136.2	141.4
	C/T-T/T	19 (47.5%)	31 (53.5%)	1.27 (0.57-2.84)			
Recessive	C/C-C/T	39 (97.5%)	49 (84.5%)	1.00	0.023	131.4	136.5
	T/T	1 (2.5%)	9 (15.5%)	7.16 (0.87-58.98)			
Overdominant	C/C-T/T	22 (55%)	36 (62.1%)	1.00	0.48	136	141.2
	C/T	18 (45%)	22 (37.9%)	0.75 (0.33-1.69)			
Log-additive	---	---	---	1.56 (0.83-2.93)	0.16	134.6	139.7

**Πίνακας 109:** Τεστ Hardy-Weinberg και υπολογιζόμενος σχετικός κίνδυνος (CTCL 0: υγιείς μάρτυρες, CTCL 1: ασθενείς) για τον πολυμορφισμό FokI.

Όπως φαίνεται από τα ανωτέρω, δε διαφαίνεται στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του FokI πολυμορφισμού και του CTCL λεμφώματος στο μελετούμενο πληθυσμό.

#### Μέτρηση επιπέδων 25(OH)D<sub>3</sub> στον ορό

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της βιταμίνης D στον ορό ασθενών και υγιών μαρτύρων συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Επίπεδα 25(OH)D <sub>3</sub>	Ασθενείς	Υγιείς μάρτυρες	Επίπεδο σημαντικότητας
Διάμεση τιμή (εύρος)	17.1 ng/mL (6.3-34.3)	17.5 ng/mL (8.2-32.5)	p=0.82
>30 ng/mL n (%)	2 (5%)	3(7.5%)	
20-30 ng/mL n (%)	14 (35%)	9 (22.5%)	
10-20 ng/mL n (%)	14 (35%)	26 (65%)	
<10 ng/mL n (%)	10 (25%)	2(5%)	

**Πίνακας 110:** Επίπεδα 25(OH)D<sub>3</sub> στον ορό σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες. Διάμεσες τιμές και ποσοτά ανά επίπεδο επάρκειας.

Όπως φαίνεται οι ασθενείς με CTCL εμφανίζουν έλλειψη βιταμίνης D, αλλά σε βαθμό παρόμοιο με αυτόν που παρατηρείται στην ομάδα των μαρτύρων, υπογραμμίζοντας την υψηλή επίπτωση έλλειψης βιταμίνης D στον γενικό πληθυσμό στη χώρα μας.

## Κεφάλαιο 8: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα NHL συνιστούν μια λίαν ετερογενή ομάδα αιματολογικών κακοηθειών με ποικιλία κλινικών χαρακτηριστικών, παθοφυσιολογικών, προγνωστικών και θεραπευτικών γνωρισμάτων, κοινή συνισταμένη των οποίων είναι η επικράτηση και ο με άλλοτε άλλη ταχύτητα πολλαπλασιασμός και επέκταση ενός κακοήθους λεμφοκυτταρικού κλώνου. Η μελέτη της επιδημιολογίας, φυσικής ιστορίας καθώς και κυρίως των εμπλεκόμενων υποκυτταρικών και γενετικών μηχανισμών ενέχει ιδιαίτερη σημασία, ιδιαιτέρως για την ταυτοποίηση γενετικών ή/και άλλων δυνητικά τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου, την οριοθέτηση διακριτών υποομάδων ασθενών με διαφορετική ανταπόκριση στα τρεχόντως διαθέσιμα θεραπευτικά σχήματα, αλλά και την ανάδειξη νέων πλέον εξειδικευμένων θεραπευτικών στόχων



και φαρμακογενωμικών βιοδεικτών που ιδανικά θα εξασφαλίζουν βελτιστοποίηση της έκβασης με ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση της τοξικότητας.

Η αναγνώριση γενετικής προδιάθεσης στις αιματολογικές κακοήθειες, πέρα από τα σπάνια κληρονομικά σύνδρομα, έχει υπάρξει αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια. Πρώτου βαθμού συγγενείς ασθενών με NHL, HL, και CLL επιδεικνύουν έναν αυξημένο κατά 1.7, 3.1 και 8.5 φορές κίνδυνο εμφάνισης NHL, HL, και CLL, αντίστοιχα και δεδομένα από μελέτες διδύμων, κούρτες, μελέτες ασθενών μαρτύρων και μελέτες βασισμένες σε μητρώα ασθενών (registry based studies) συγκλίνουν προς την ίδια διαπίστωση. Μελέτες υποψηφίων γονιδίων και GWAS σε διάφορους υποτύπους NHL έχουν αναδείξει εμπλεκόμενους γενετικούς τόπους που κατά κανόνα είναι κοινοί (MAF >5%) και έχουν μικρή επίδραση (effect size), γεγονός που υποστηρίζει ένα πολυγονικό μοντέλο προδιάθεσης. Σε αυτά τα πλαίσια είναι χρήσιμη η μελέτη της γενετικής προδιάθεσης σε καλά φαινοτυπικά καθορισμένες σειρές ασθενών καθώς και σε διαφορετικές εθνικές και εθνοτικές ομάδες, με διαφορετική επίπτωση NHL [275-278].

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο σχετικά σπάνιες υποομάδες NHL, τα MALT λεμφώματα και τα T-δερματικά λεμφώματα- CTCL. Τα MALT λεμφώματα αποτελούν μια ομάδα λεμφωμάτων με ποικίλη εντόπιση και σχετικά ήπια κλινική πορεία. Κατατάσσονται στα λεμφώματα οριακής ζώνης και αναπτύσσονται πρωτοπαθώς σε βλεννογονικές περιοχές με προεξάρχουσα εντόπιση τον γαστρικό βλενογόνο. Χαρακτηρίζονται παθολογοανατομικά από την παρουσία λεμφοεπιθηλιακών βλαβών, φέρουν ανοσοφαινότυπο αντίστοιχο όλων των MZL και φιλοξενούν ποικίλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες και σωματικές μεταλλάξεις με καλύτερα χαρακτηρισμένη και συχνότερα ευρισκόμενη τουλάχιστον όσον αφορά το γαστρικό MALT την αντιμετάθεση t(11;18)(q21;q21). Κύριο χαρακτηριστικό τους από παθοφυσιολογικής σκοπιάς είναι η συσχέτιση τους με χρόνιες φλεγμονές, μικροβιακής ή αυτοάνοσης αρχής. Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, το σύνδρομο Sjogren, τα *C. psittaci* και το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού αποτελούν κάποιες από τις αναγνωρισμένες προδιαθεσικές συνθήκες ανάπτυξης MALT στον θυρεοειδή αδένα, στους σιελογόνους αδένες, τον οφθαλμό και το στόμαχο αντίστοιχα. Προτείνεται έτσι ότι η χρονίζουσα φλεγμονή δημιουργεί το κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την υπέρμετρη ανάπτυξη του λεμφωματικού κλώνου, ο οποίος για το λόγο αυτό είναι

αρχικά ευαίσθητος στην απομάκρυνση του αντιγόνου, κάτι που εξηγεί τη θεραπευτική αξία της χορήγησης κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας επί γαστρικών και οφθαλμικών λεμφωμάτων. Ωστόσο σταδιακά όσο ο κλώνος συσσωρεύει σωματικές και χρωμοσωμικές ανωμαλίες παύει να είναι εξαρτώμενος από την αντιγονική διέγερση και το κυτταροκινικό μικροπεριβάλλον και καθίσταται έτσι ικανός για ανεξάρτητο πολλαπλασιασμό και επέκταση [1,2].

Σε αυτά τα πλαίσια, η βασική και γενετική έρευνα έχει σε μεγάλο βαθμό επικεντρωθεί στην πολυμορφία της ανοσιακής απάντησης έναντι των ενοχοποιούμενων αντιγόνων. Άλλωστε η μεγάλη επίπτωση επί παραδείγματι του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού συγκρινόμενη με τη σπανιότητα του γαστρικού MALT απαιτεί τη διευκρίνηση των ανοσιακών μηχανισμών που οδηγούν από μια συχνή και κατά κανόνα αντιμετωπίσιμη λοίμωξη σε μια κατάσταση χρονίζουσας φλεγμονής και εν συνεχεία στην ανεξέλεγκτη ανάπτυξη ενός κακοήθους κλώνου. Όλες οι συνισταμένες του ανοσοποιητικού συστήματος, από τη φυσική ανοσία έως και την ειδική χυμική και κυτταρική ανοσία έχουν υπάρξει αντικείμενο μελέτης, ιδιαίτερος βέβαια στο μοντέλο της συχνότερης γαστρικής εντόπισης της νόσου. Στο πεδίο της γενετικής έρευνας αυτό έχει μεταφρασθεί σε μεγάλο αριθμό μελετών που εξετάζουν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της πάθησης με σημειακούς πολυμορφισμούς σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι, προσπάθειες συσχέτισης έχουν πραγματοποιηθεί για πολυμορφισμούς στα γονίδια *IL1*, *IL1RN*, *TNF-α*, *TNFR2*, *IL-10*, *IL10RA*, *IL-22*, *TLR-1*, *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-5*, *TLR-9*, *CD-14*, *NOD-1*, *NOD-2*, *CD28*, *ICOS* και *CTLA-4*, καθώς και σε γονίδια τρανσφερασών της γλουταθειόνης [281-294]. Στον ελληνικό πληθυσμό αναφέρεται μία έως σήμερα μελέτη που συμπεριέλαβε 56 ασθενείς με γαστρικό λέμφωμα και 51 ασθενείς με *H. pylori* γαστρίτιδα και εξέτασε πολυμορφισμούς γονιδίων της φυσικής ανοσίας διαπιστώνοντας έναν επιβαρυντικό ρόλο (OR=2,44 p=0,042) για τον πολυμορφισμό -159C στον συν-υποδοχέα του TLR-4, CD14 [294]. Η απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων που παρατηρείται μεταξύ διαφόρων ερευνητικών ομάδων μπορεί ως κάποιο βαθμό να εξηγηθεί από τη φυλετική και εθνοτική ετερογένεια των μελετούμενων δειγμάτων πληθυσμού, τα διαφορετικά κριτήρια επιλογής των ομάδων ελέγχου και τον μικρό αριθμό συμμετεχόντων, ωστόσο παράλληλα δεν παύει να καταδεικνύει την πολυπλοκότητα του γενετικού υποβάθρου του MALT λεμφώματος που φαίνεται να εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό γενετικών τόπων έκαστος εκ των

οποίων προσδίδει μια μικρή μόνο γενετική επιβάρυνση ή προφύλαξη [276]. Σημαντική προσθήκη στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, υπήρξε μια GWAS μελέτη του 2015 που ανέδειξε συσχέτιση με πολυμορφικές θέσεις στο HLA σύστημα [280].

Από την άλλη μεριά, με τον όρο CTCL περιγράφεται μια σειρά T-λεφοκυτταρικών κακοηθειών με πρωταρχική εντόπιση στο δέρμα, με μικρή πλην όμως αυξανόμενη τα τελευταία χρόνια επίπτωση στον πληθυσμό. Οι κύριοι εκπρόσωποι των CTCL, ήτοι η MF και το σύνδρομο Sézary, εμφανίζουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στη βαρύτητα, ταχύτητα εξέλιξης, κλινική εικόνα, κυτταρική προέλευση και μοριακή υπογραφή. Έτσι η συχνότερη και κατά κανόνα ηπιότερη MF χαρακτηρίζεται από μονήρεις ή πολλαπλές κνησμώνες ή μη δερματικές βλάβες κυμαινόμενες από κηλίδες έως και όγκους που απαιτούν ιδιαίτερη εμπειρία στην αναγνώρισή τους, ιδίως στα αρχικά στάδια που όχι σπάνια διαλάθουν της διάγνωσης. Αντιθέτως το βαρύτερο σύνδρομο Sézary, παρουσιάζεται με θορυβώδη κλινική εικόνα, όπου προεξάρχει η γενικευμένη ερυθροδερμία και ο κνησμός, έχει ταχύτερη εξέλιξη και απαιτεί επιθετικότερους θεραπευτικούς χειρισμούς [198].

Ομοίως με τα MALT έτσι και στα CTCL, η γενεσιουργός αιτία θεωρείται ότι είναι η χρονίζουσα φλεγμονή στο δέρμα, χωρίς ωστόσο να έχουν αναγνωρισθεί τα εμπλεκόμενα αντιγόνα. Και εδώ η ανοσολογική αντίδραση είναι καίριας σημασίας όσον αφορά την αδυναμία ελέγχου της φλεγμονής και ως εκ τούτου την εγκατάσταση επιτρεπτικών συνθηκών για την επέκταση του λεμφωματικού κλώνου.

Γενετικοί πολυμορφισμοί σε γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα *CTLA-4*, *IFN $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* , *LTA*, *IL-2*, *IL-6*, *IL-10* και *IL-13*, έχουν και εδώ εξετασθεί σε κατά κανόνα μικρές, ένεκα της σπανιότητας τη πάθησης, σειρές ασθενών και με ποικίλα συμπεράσματα [295-300]. Στον ελληνικό πληθυσμό, τέτοια μελέτη δεν έχει μέχρι σήμερα επιχειρηθεί. Σαφώς ελλείπει μια GWAS μελέτη στο πεδίο του CTCL που θα έριχνε περισσότερο φως στο γενετικό υπόβαθρο της νόσου.

Τελευταία, εύλογο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει συγκεντρώσει ο πιθανός ρόλος της βιταμίνης D στις δερματικές κακοήθειες και στα CTCL. Η βιταμίνη D συντιθέμενη κατά κύριο λόγο στο δέρμα υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας έχει προταθεί ότι διαθέτει ανοσοτροποποιητικές και αντινεοπλασματικές ιδιότητες. Η συμμετοχή της στην παρακρινή ενεργοποίηση των B και T λεμφοκυττάρων, την ελάττωση των Th1 κυτταροκινών, αλλά και την αύξηση της μεταγραφής

αντιμικροβιακών πεπτιδίων, όπως η ντεφενσίνη, μέσω του συμπλόκου της με τον υποδοχέα της VDR, διαγράφει πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων η ανεπάρκεια βιταμίνης D δύναται να εμπλέκεται στην εγκατάσταση χρονίζουσας φλεγμονής στο πάσχον δέρμα. Άλλωστε η ίδια η εμφάνιση των βλαβών του CTCL είναι συχνότερη σε μη εκτεθειμένες στο ηλιακό φως περιοχές του σώματος και μια κοινή θεραπευτική προσέγγιση της νόσου είναι η φωτοθεραπεία, χωρίς να έχει ωστόσο διερευνηθεί αν η επίδραση της τελευταίας διαμεσολαβείται μέσω της τοπικής/συστηματικής αύξησης της βιταμίνης D. Ασθενείς με CTCL έχειδειχθεί να έχουν χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης στον ορό, ενώ η παρουσία της σε επίπεδα επάρκειας μόνη η σε συνδυασμό με hexarotene έχειδειχθεί να επάγει την απόπτωση των κυττάρων του CTCL τόσο σε πρωτοπαθή T-κύτταρα ασθενούς με σύνδρομο Sézary όσο και σε κυτταρικές σειρές. Οι ακριβείς δράσεις της βιταμίνης σε υποκυτταρικό επίπεδο καθώς και η πιθανή συνεισφορά των γενετικών πολυμορφισμών του υποδοχέα της (VDR) σε γενετικό επίπεδο είναι ένα πεδίο ανοιχτό σε μελέτη. Πρόσφατες δημοσιεύσεις αναφέρουν πιθανή συσχέτιση των TaqI και FokI πολυμορφισμών του VDR με το CTCL, με μη συγκλίνοντα ωστόσο αποτελέσματα, ενώ αντίστοιχη ερευνητική προσπάθεια σε ελληνικό πληθυσμό λείπει από την βιβλιογραφία [257,258,299,300].

Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκε η συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών με την εκδήλωση MALT και CTCL στον ελληνικό πληθυσμό. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκε ένα ευμέγεθες σύνολο ασθενών (83 ασθενείς MALT και 58 ασθενείς CTCL) που παρακολουθούνταν στην παθολογική και αιματολογική κλινική του Λαϊκού νοσοκομείου από το 1994 και εντεύθεν και για τους οποίους συγκεντρώθηκαν δημογραφικά δεδομένα, κλινικές πληροφορίες και δείγματα ολικού αίματος και ορού. Αντίστοιχα συλλέχθηκε ομάδα ελέγχου υγιών μαρτύρων με ατομικό ιστορικό ελεύθερο κακοηθειών και συστηματικών αυτοάνοσων νόσων.

Οι πολυμορφισμοί που εξετάστηκαν στα MALT ήταν οι 308A/G (rs1800629) και 857C/T (rs1799724) στο γονίδιο *TNFA*, 49A/G (rs231775) στο γονίδιο *CTLA4*, 252A/G (rs909253) στο γονίδιο *LTA*, rs7314777 στο γονίδιο *IL22*, rs7750641 στο γονίδιο *TCF19*, ο πολυμορφισμός VNTR στο γονίδιο *IL1RN* καθώς και οι πολυμορφισμοί που αφορούν έλλειψη στον γονιδίων *GSTT1*, *GSTM1*. Για τα CTCL μελετήθηκαν οι πολυμορφισμοί 308A/G (rs1800629) και 857C/T (rs1799724) στο γονίδιο *TNFA*, 49A/G (rs231775) στο γονίδιο *CTLA4*, 252A/G (rs909253) στο

γονίδιο *LTA*, ο *VNTR* πολυμορφισμός στο γονίδιο *ILIRN* και οι σημειακοί πολυμορφισμοί *TaqI* (rs731236), *ApaI* (rs7975232), *BsmI* (rs1544410) και *FokI* (rs2228570) στο γονίδιο *VDR*.

Όλοι οι πολυμορφισμοί γονοτυπήθηκαν με PCR βασιζόμενες μεθόδους, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων με ήδη δημοσιευμένες μεθόδους PCR-RFLP με μικρές τροποποιήσεις, ενώ αναπτύχθηκαν και δύο νέες PCR-RFLP για τα SNPs στα γονίδια *TCF-19* και *IL22*. Μέρος των αποτελεσμάτων της γονοτύπωσης επιβεβαιώθηκε με την gold standard μέθοδο της αλληλούχισης του DNA. Τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό μετρήθηκαν κατά τη χειμερινή περίοδο με μέθοδο χημιοφωταύγειας σε μάρτυρες και ασθενείς με CTCL που δεν είχαν υποβληθεί σε PUVA τον τελευταίο έτος και δεν ελάμβαναν θεραπεία υποκατάστασης με σκευάσματα βιταμίνης D.

Στην υποομάδα του MALT λεμφώματος, αναγνωρίστηκαν δύο πολυμορφισμοί με στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο. Πρόκειται για τους πολυμορφισμούς *CTLA 49A/G* και *TCF19 rs7750641*. Η μελέτη μας δεν κατάφερε να αναπαράγει την πρότερα αναφερθείσα συσχέτιση του πολυμορφισμού *GSTT null* με τη νόσο.

Ο *rs7750641* SNP, ένας από τους SNPs που συνδέθηκε με τα MZL με τη GWAS μελέτη, είναι ένας παρανοηματικός πολυμορφισμός εδραζόμενος στο γονίδιο *TCF-19*. Ο *TCF-19* είναι ένας μεταγραφικός παράγων με υψηλά επίπεδα έκφρασης στα βλαστικά κέντρα, τα pro-B και pre-B κύτταρα και διαμεσολαβεί τη μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Έχει εμπλακεί στην αύξηση του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο και καρκίνο πνεύμονος και έχει μελετηθεί ως γονίδιο ευαλωτότητας στην ηπατίτιδα B και τον σακχαρώδη διαβήτη. Στον καρκίνο του παχέως εντέρου έχει συσχετισθεί με μείωση της έκφρασης του *WWC1* και αυξημένη επίπτωση απομακρυσμένων μεταστάσεων και χειρότερη πρόγνωση. Υπερέκφρασή του σε β-κυτταρα του παγκρέατος σχετίζεται με υπερέκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και στη φλεγμονή, πολλά εκ των οποίων ελέγχονται μεταγραφικά από την οδό του *STAT1* και *STAT2*, ενώ η απουσία του οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Η λειτουργική σημασία του πολυμορφισμού *rs7750641* δεν έχει προς το παρόν διερευνηθεί και απομένει να διευκρινισθεί κατά πόσο μπορεί αυτός να επιφέρει αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ή στις αλληλεπιδράσεις αυτής με συνδέτες της στα διάφορα μονοπάτια όπου εμπλέκεται ο *TCF-19* και τη ρύθμιση

γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη απόκριση και την επιδιόρθωση του DNA [300,347-351,353].

Η πρωτεΐνη CTLA-4 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της T-κυτταρικής ενεργοποίησης, ο οποίος συγκαταλέγεται στα επονομαζόμενα σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (immune checkpoints), πρωτεΐνες δηλαδή σημαντικές για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του ανοσοποιητικού συστήματος που δρουν με σκοπό την καταστολή της ανοσιακής ενεργοποίησης και την αποφυγή της υπέρμετρης ανοσιακής απόκρισης. Η κύρια εντόπισή του είναι στην κυτταρική επιφάνεια των ενεργοποιημένων T-κυττάρων, όπου προσδένεται σε μόρια B7 παρόντα επί της κυτταρικής επιφανείας αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων. Ο ρόλος του στον περιορισμό της T-κυτταρικής ενεργοποίησης, που είναι κρίσιμης σημασίας για την παθογένεση του MALT, το καθιστά κατάλληλο υποψήφιο για στοχευμένη γενετική έρευνα. Ο πολυμορφισμός 49 A/G έχει μέχρι στιγμής μελετηθεί στα πλαίσια πολυάριθμων αυτοάνοσων και φλεγμονωδών παθήσεων, όπως η νόσος Grave's και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I, καθώς και στο πολλαπλούν μύελωμα και NHLs. Πρόκειται για μη συνώνυμο SNP που οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέος από θρεονίνη σε αλανίνη στη θέση 17 του πρόδρομου πεπτιδίου (leader peptide) του CTLA-4 (Thr17Ala). Σε λειτουργικό επίπεδο, η παρουσία του A/A (Thr17) γονότυπου, σε αντίθεση με τον G/G γονότυπο (Ala17), έχει συσχετισθεί με σημαντικά χαμηλότερη T κυτταρική ενεργοποίηση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έχει επίσης δειχθεί ότι το μόριο CTLA-4 με (Thr17) επιδεικνύει μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης του CD80 και ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση επί της T κυτταρικής ενεργοποίησης έναντι του CTLA-4 με (Ala17). Ακόμα, προτείνεται ότι οι (Ala17) ομοζυγώτες μπορεί να έχουν μειωμένη έκφραση CTLA-4 στην T κυτταρική επιφάνεια σε σχέση με τους (Thr17) ομοζυγώτες, μέσω πιθανής διαφοροποίησης στο ρυθμό ενδοκυττάρωσης και μεμβρανικής κυκλοφορίας της πρωτεΐνης (surface trafficking). Μπορεί λοιπόν να προταθεί ότι στην περίπτωση του MALT λεμφώματος, το G αλληλίο σχετίζεται με μεγαλύτερη T-κυτταρική ενεργοποίηση σε σχέση με το αλληλίο A και προσφέρει έτσι καταλληλότερο κυτταροκινικό μικροπεριβάλλον για την επέκταση του λεμφωματικού κλώνου [328-335].

Συσχέτιση του G αλληλίου με το GMZL είχε αναφερθεί από τους Cheng και συνεργάτες σε ασθενείς ασιατικής προέλευσης, αλλά η συσχέτιση αυτή δεν είχε μέχρι στιγμής αναζητηθεί σε Καυκασίους [290].

Στην υποομάδα των ασθενών με CTCL δεν ανευρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη νόσο για κανέναν εκ των μελετηθέντων πολυμορφισμών. Η βιταμίνη D διαπιστώθηκε μειωμένη στον ορό των ασθενών, όπως άλλωστε έχει βρεθεί και σε άλλες αναφορές, χωρίς ωστόσο να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από την αντίστοιχη συγκέντρωσή της στον ορό των υγιών μαρτύρων. Κανένας εκ των πολυμορφισμών του VDR δεν έδειξε συσχέτιση με τη νόσο.

Είναι σαφές ότι οι αιματολογικές κακοήθειες έχουν πολυπαραγοντική αιτιολογία και η αποσαφήνιση των γεγονότων που οδηγεί στην εκδήλωσή τους συνιστά δύσκολο εγχείρημα. Περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου έχουν περιγραφεί σε μεγάλες επιδημιολογικές καταγραφές. Παρομοίως η γενετική συνιστώσα δεν είναι αμελητέα σε αυτές της παθήσεις, όπου η ύπαρξη συγγενούς 1ου βαθμού με NHL προσδίδει αυξημένο κατά 1.7 φορές κίνδυνο νόσησης. Έτσι πιστεύεται ότι ένας συνδυασμός περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων είναι αυτός που θα οδηγήσει στην απώλεια της ομοιοστασίας, ωστόσο η αναγνώρισή τους δεν είναι πάντα ευχερής. Στην περίπτωση του MALT λεμφώματος και ιδίως στη γαστρική εντόπιση αυτού, η περιβαλλοντική συνιστώσα είναι καλύτερα περιγεγραμμένη. Έτσι η παρουσία του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού καταδεικνύεται από δεδομένα επιδημιολογικά και βασικής έρευνας ως καθοριστική στην παθοφυσιολογία της νόσου. Ωστόσο η πολυμορφία της ανοσιακής απάντησης έναντι του μικροοργανισμού είναι εξίσου σημαντική και στα πλαίσια αυτά η ανοσογενετική προσέγγιση του MALT λεμφώματος αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στο CTCL, όπου η αιτιολογία παραμένει ακόμα πιο δυσδιάκριτη, περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία για τον καθορισμό τόσο των εξωγενών όσο και των γενετικών παραγόντων κινδύνου. Και εδώ η αναγνώριση χαρακτήρων χρονίζουσας φλεγμονής στο πάσχον δέρμα επιβάλλει την διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας στο πεδίο της ανοσιακής απόκρισης.

Η παρούσα μελέτη προς διερεύνηση των ως άνω ερωτημάτων επέτυχε να συγκεντρώσει δυο μεγάλες σειρές ασθενών πασχόντων εκ των δύο σπάνιων αυτών ομάδων λεμφωμάτων. Ένας ικανός αριθμός πολυμορφισμών σε γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν με ομάδα ελέγχου. Στο

MALT λέμφωμα, επιβεβαιώθηκε στο δείγμα μας η συσχέτιση που είχε ταυτοποιηθεί από την GWAS μελέτη για τον πολυμορφισμό του γονιδίου TCF19, καθώς και εκείνη με τον SNP CTLA49A/G που είχε περιγραφεί σε κορεατική μελέτη. Στα CTCL καμία συσχέτιση δεν έφτασε σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας και δεν ήταν δυνατή η επιβεβαίωση κάποιων συσχέτισεων που έχουν αναφερθεί σε άλλους πληθυσμούς και σε μικρά δείγματα ασθενών στη βιβλιογραφία. Η μελέτη της βιταμίνης D και των πολυμορφισμών των υποδοχέων της στην ομάδα του CTCL κατέδειξε μεν έλλειψη της βιταμίνης στους πάσχοντες χωρίς αυτή όμως να διαφέρει από την παρατηρούμενη έλλειψη στο γενικό πληθυσμό, ενώ οι τέσσερις SNPs του VDR δεν έδειξαν να επιδρούν στατιστικά σημαντικά στον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου στο δείγμα μας.

Η παρούσα μελέτη συνιστά μία από τις λίγες στο πεδίο, ιδιαιτέρως όσον αφορά τον ελληνικό πληθυσμό, και διεξήχθη σε μια μεγάλη σειρά ασθενών δεδομένης και της σπανιότητας των εξεταζόμενων παθήσεων. Ωστόσο δεν στερείται ορισμένων περιορισμών, όπως η σχετικά μικρή ομάδα ελέγχου και η έλλειψη πληροφοριών όσον αφορά μεταβλητές που άπτονται έξω και βαθμού έκθεσης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (όπως λόγου χάρη η έκθεση στον ήλιο για τους ασθενείς με CTCL), δεδομένα που θα βοηθούσαν στη διαπίστωση πιθανών δημογραφικών παραγόντων κινδύνου. Επίσης ο αριθμός των συμμετεχόντων που υπεβλήθησαν σε μέτρηση της βιταμίνης D ήταν περιορισμένος, ενώ δεδομένα δε συνελέγησαν όσον αφορά το BMI, τη διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης D και τη μελάγχρωση του δέρματος. Μεροληψία στην επιλογή των ασθενών δεν μπορεί να αποκλειστεί, καθώς το τμήμα μας λειτουργεί ως κέντρο αναφοράς και ασθενείς με πτωχή ανταπόκριση σε αρχικές θεραπευτικές παρεμβάσεις πιθανώς υπεραντιπροσωπεύονται, όπως καταδεικνύει επί παραδείγματι η χαμηλή ανταπόκριση στην θεραπεία εκρίζωσης του *H. pylori* που καταγράφηκε στους συμμετέχοντες ασθενείς με GMZL. Επίσης, η μελέτη μιας επιπλέον ομάδας ελέγχου αποτελούμενης από ασθενείς με *H.pylori* λοίμωξη θα μπορούσε να προσφέρει πολύτιμη πληροφορία όσον αφορά την γενετική ευαλωτότητα στο GMZL.

Συμπερασματικά, η γενετική προδιάθεση στα NHL αποτελεί μια ερευνητική πρόκληση που απαιτεί γενετική έρευνα σε μεγάλες σειρές ασθενών για τους οποίους διατίθεται πλήρης και ανελλιπής καταγραφή των κλινικών τους δεδομένων. Οι



διαφορετικοί φαινότυποι που συλλήβδην κατατάσσονται κάτω από τη γενική διάγνωση ενός NHL μπορεί να αντιπροσωπεύουν διαφορετικές παθογενετικές διαδικασίες που με τη σειρά τους σχετίζονται με διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο. Έτσι μια σημαντική συσχέτιση για έναν συγκεκριμένο υποπληθυσμό ασθενών μπορεί να περάσει απαρατήρητη στο σύνολο των εξεταζομένων, ενώ αντίθετα μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση για το σύνολο μπορεί να μην έχει την ίδια επίδραση σε όλους τους υποπληθυσμούς. Έχοντας το συλλογισμό αυτό κατά νου, καθίσταται σαφές ότι το μεγάλο ζητούμενο για τέτοιου είδους μελέτες στο μέλλον θα είναι η κατά το δυνατόν ακριβής και προτυποποιημένη κατάταξη των ασθενών σε υποομάδες βάσει φαινοτυπικών ευρημάτων. Έτσι, ευκταίο είναι η τρέχουσα προσπάθεια να εμπλουτισθεί με νέους ασθενείς και τις αντίστοιχες κλινικές πληροφορίες ώστε να αποτελέσει παρακαταθήκη για μελλοντικές απόπειρες γενετικών συσχέτισεων στον ελληνικό πληθυσμό.

## Περίληψη

Τα MALT (mucosa associated lymphoid tissue) λεμφώματα, δηλαδή τα λεμφώματα που προέρχονται από το λεμφικό ιστό που συνδέεται με τους βλεννογόνους, κατατάσσονται στα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα οριακής ζώνης και αναπτύσσονται σε διάφορες βλεννογονικές θέσεις, με συχνότερη εντόπιση το στόμαχο. Τα T-δερματικά λεμφώματα (CTCL) συνιστούν ετερογενή ομάδα λεμφωμάτων T-κυτταρικής προέλευσης εντοπιζόμενων στο δέρμα με κυριότερους εκπροσώπους τη σπογγοειδή μυκητίαση (MF: Mucosis Fungoides) και το σύνδρομο Sézary. Πρόκειται για λεμφώματα που σε γενικές γραμμές χαρακτηρίζονται από ήπια κλινική εικόνα και ευνοϊκή πρόγνωση. Σημαντικό ρόλο στην αιτιοπαθογένεια φαίνεται να διαδραματίζει η παρουσία χρονίζουσας φλεγμονής, καθώς και η γενετική προδιάθεση με μεγάλες επιδημιολογικές καταγραφές να υποστηρίζουν αυξημένο κίνδυνο νόσησης παρουσία συγγενούς 1ου βαθμού με NHL. Η βιταμίνη D, μια στεροειδής ορμόνη που εξασκεί τη δράση της μέσω σύνδεσης στον υποδοχέα της VDR (Vitamin D Receptor), πέρα από την παραδοσιακά αποδιδόμενη συνεισφορά της στην ομοιοστασία του ασβεστίου και τον οστικό μεταβολισμό, τα τελευταία χρόνια συγκεντρώνει την ερευνητική προσοχή ως προς την εμπλοκή της σε ανοσιακές διεργασίες και το ρόλο της στην καρκινογένεση. Η συμμετοχή της στην παθογένεση των CTCL και η συνεισφορά των σημειακών πολυμορφισμών (SNPs) στο γονίδιο του VDR στην εμφάνιση και πρόοδο της νόσου δεν έχει επαρκώς διερευνηθεί.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συσχέτιση γενετικών πολυμορφισμών με την ανάπτυξη MALT και CTCL λεμφωμάτων στον ελληνικό πληθυσμό. Στα MALT λεμφώματα μελετήθηκαν οι σημειακοί πολυμορφισμοί rs7750641 στο γονίδιο *TCF19*, rs7314777 στο γονίδιο *IL22*, rs231775 στο γονίδιο *CTLA4*, rs1800629 και rs1799724 στο γονίδιο *TNFA*, rs909253 στο γονίδιο *LTA*, οι πολυμορφισμοί *GSTT1* null, *GSTM1* null και ο VNTR (Various Number Tandem Repeats) πολυμορφισμός στο γονίδιο *IL1RN*. Στα CTCL μελετήθηκαν οι σημειακοί πολυμορφισμοί rs231775 στο γονίδιο *CTLA4*, rs1800629 και rs1799724 στο γονίδιο *TNFA*, rs909253 στο γονίδιο *LTA*, rs1544410, rs2228570, rs731236 και rs7975232 στο γονίδιο VDR, οι πολυμορφισμοί *GSTT1* null, *GSTM1* null και ο VNTR (Various Number Tandem Repeats) πολυμορφισμός στο γονίδιο *IL1RN*. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων στον ορό της 25(OH)D3 για τους συμμετέχοντες στη μελέτη CTCL ασθενείς και τους υγιείς μάρτυρες.

Στη μελέτη συμμετείχαν 83 ασθενείς με MALT και 58 ασθενείς με CTCL καθώς και ομάδα 60 υγιών μαρτύρων με ιστορικό ελεύθερο αιματολογικής και συμπαγούς κακοήθειας και συστηματικής αυτοάνοσης νόσου. Η γονοτύπωση των πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε με τεχνικές PCR και RFLP. Η μέτρηση των επιπέδων της 25(OH)D3 έγινε με χημειοφωταύγεια σε δείγματα που συνελέγησαν μεταξύ των μηνών Οκτωβρίου και Μαρτίου. Εκ των μετρήσεων αποκλείστηκαν ασθενείς που ελάμβαναν σκευάσματα βιταμίνης D ή είχαν υποβληθεί σε PUVA κατά το τελευταίο έτος.

Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με το MALT λέμφωμα ανευρέθησαν για τον πολυμορφισμό *CTLA-4* 49A/G – αλληλίο G (OR:2.56,p: 0.006) καθώς και το T αλληλίο του *TCF19* rs7750641 SNP (OR: 3.86, p:0.023). Κανένας εκ των μελετηθέντων πολυμορφισμών δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το CTCL. Τα επίπεδα της 25(OH)D3 στον ορό, παρότι ανευρέθησαν χαμηλά στην ομάδα των ασθενών, δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά από την ομάδα των υγιών μαρτύρων.

Περαιτέρω μελέτες μπορούν να συμβάλλουν στην επιβεβαίωση των ευρημάτων για τα MALT λεμφώματα στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς και τη διερεύνηση της γενετικής προδιάθεσης για τα CTCL λεμφώματα.

## Summary

MALT (mucosa associated lymphoid tissue) lymphoma, is an indolent type of NHL (non-Hodgkin Lymphoma), classified under extranodal marginal zone lymphomas that can arise in almost every organ of the human body. The commonest and best studied site remains the gastric mucosa. Cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) is a rare and diverse group of primary cutaneous diseases, which comprise of multiple subtypes. MF (Mycosis Fungoides) and its leukemic variant SS (Sezary Syndrome) are the commonest subtypes. A significant role is recognized in disease pathogenesis for chronic inflammation and genetic predisposition, as epidemiologic studies support increased risk for 1st degree relatives of NHL patients. Vitamin D, a steroid compound that plays a pivotal role in calcium metabolism and exerts its wide array of actions through binding to its dedicated receptor (VDR), has been recently implicated in many immunological and tumorigenesis pathways. Its involvement in CTCLs and the importance of VDR polymorphisms in disease onset and progression is a field poorly defined and warranting further research.

The purpose of the current study was the association of genetic polymorphisms to MALT and CTCL lymphomas in the Greek population. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs7750641 in *TCF19* gene, rs7314777 in *IL22* gene, rs231775 in *CTLA4* gene, rs1800629 and rs1799724 in *TNF $\alpha$*  gene, rs909253 in *LTA* gene, as well as the *GSTT1* null, *GSTM1* null polymorphisms and the VNTR (Various Number Tandem Repeats) polymorphism in *IL1RN* gene were studied in MALT lymphomas. rs231775 in *CTLA4* gene, rs1800629 and rs1799724 in *TNF $\alpha$*  gene, rs909253 in *LTA* gene, rs1544410, rs2228570, rs731236 and rs7975232 in the *VDR* gene, *GSTT1* null, *GSTM1* null polymorphisms and the VNTR (Various Number Tandem Repeats) polymorphism in *IL1RN* gene were studied in CTCL lymphomas. 25(OH)D3 serum levels were measured in CTCL patients and controls.

83 MALT patients, 58 CTCL patients and a group of 60 healthy controls without history of malignant or systemic autoimmune disease were recruited for the study. Genotyping was performed with PCR and RFLP techniques. 25(OH)D3 serum levels measurements were carried out by a chemiluminescence assay in samples collected between October and March. Patients and controls who received oral vitamin D supplementation or had undergone PUVA/NUVB during the last 12 months were excluded from serum vitamin D levels measurement.

Statistically significant associations to MALT lymphoma were detected for the polymorphism *CTLA-4* 49A/G – G variant (OR:2.56,p: 0.006) and the T variant of *TCF19* rs7750641 SNP (OR: 3.86, p:0.023). None of the studied SNPs was associated to CTCL. 25(OH)D3 serum levels in CTCL patients, although low, did not differ significantly from those of the control group.

Further studies could help confirm our findings regarding MALT lymphomas in the Greek population and the assessment of genetic predisposition to CTCL lymphomas.

## Βιβλιογραφία

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Introduction and overview of the classification of the lymphoid neoplasms. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008:58-166.
2. Hu Q, Zhang Y, Zhang X, Fu K. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori* infection: a review of current diagnosis and management. *Biomarker Research*. 2016;4:15. doi:10.1186/s40364-016-0068-1.
3. Isaacson, P. and Wright, D. H. (1983), Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer*, 52: 1410–1416.
4. Isaacson, P. and Wright, D. H. (1984), Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer*, 53: 2515–2524.
5. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361–1392.
6. Bracci PM, Benavente Y, Turner JJ, et al. Medical History, Lifestyle, Family History, and Occupational Risk Factors for Marginal Zone Lymphoma: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2014;2014(48):52-65.
7. Sriskandarajah P, Dearden CE. Epidemiology and environmental aspects of marginal zone lymphomas, *Best Practice & Research Clinical Haematology* , Volume 30 , Issue 1 , 84 –
8. Zucca, E., Conconi, A., Pedrinis, E., Cortelazzo, S., Motta, T., Gospodarowicz, M. K., Patterson, B. J., Ferreri, A. J., Ponzoni, M., Devizzi, L., Giardini, R., Pinotti, G., Capella, C., Zinzani, P. L., Pileri, S., López-Guillermo, A., Campo, E., Ambrosetti, A., Baldini, L., & Cavalli, F. (2003). Nongastric marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood*, 101(7), 2489-2495.
9. Zucca, E., & Bertoni, F. (2016). The spectrum of MALT lymphoma at different sites: biological and therapeutic relevance. *Blood*, 127(17), 2082-2092.
10. G. Papaxoinis, G. Fountzilias, D. Rontogianni, M. A. Dimopoulos, N. Pavlidis, C. Tsatalas, D. Pectasides, N. Xiros & T. Economopoulos Low-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a retrospective analysis of 97 patients by the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG). *Ann Oncol* (2008) 19 (4): 780-786.
11. Zucca E, Roggero E, Bertoni F, Cavalli F. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphomas, part 1: gastrointestinal, cutaneous and genitourinary lymphomas. *Ann Oncol*. 1997;8:727-737.

12. Zucca E, Roggero E, Bertoni F, Conconi A, Cavalli F. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphomas, part 2: head and neck, central nervous system and other less common sites. *Ann Oncol.* 1999;10:1023-1033.
13. Khalil MO, Morton LM, Devesa SS, et al. Incidence of marginal zone lymphoma in the United States, 2001–2009 with a focus on primary anatomic site. *British journal of haematology.* 2014;165(1):67-77.
14. Chihara D, Nastoupil LJ, Williams JN, Lee P, Koff JL, Flowers CR. New insights into the epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. *Expert review of anticancer therapy.* 2015;15(5):531-544.
15. Doglioni C, Wotherspoon AC, Moschini A, De Boni M, Isaacson PG. High incidence of primary gastric lymphoma in northeastern Italy. *Lancet.* 1992;339:834-835.
16. Economopoulos T, Papageorgiou S, Dimopoulos MA et al. Non-Hodgkin's lymphomas in Greece according to the WHO classification of lymphoid neoplasms..A retrospective analysis of 810 cases. *Acta Haematol* 2005; 113: 97–103.
17. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *British Journal of Cancer.* 2011;105(11):1684-1692. doi:10.1038/bjc.2011.450.
18. Pier Luigi Zinzani. The many faces of marginal zone lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:426-32.
19. LI X, WANG X, ZHAN Z, ZHANG L, SUN B, ZHANG Y. Evaluation of the clinical characteristics, management, and prognosis of 103 patients with gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Oncology Letters.* 2016;11(3):1713-1718.
20. C Thieblemont, Y Bastion, F Berger, C Rieux, G Salles, C Dumontet, P Felman, B Coiffier. Mucosa-associated lymphoid tissue gastrointestinal and nongastrointestinal lymphoma behavior: analysis of 108 patients. *Journal of Clinical Oncology* 15, no. 4 (April 1997) 1624-30.
21. Kalpadakis, C., Pangalis, G.A., Vassilakopoulos, T.P. et al. Clinical Aspects of Malt Lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep* 9, 262–272 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11899-014-0218-1>
22. Morton LM, Slager SL, Cerhan JR, 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):130-144.
23. Nakamura S, Matsumoto T. Helicobacter pylori and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: recent progress in pathogenesis and management. *World J Gastroenterol* 2013; 19:8181-8187
24. Zucca, E., Bertoni, F., Roggero, E., & Cavalli, F. (2000). The gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type. *Blood*, 96(2), 410-419.

25. Bacon CM, Du M, Dogan A. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma: a practical guide for pathologists. *Journal of Clinical Pathology*. 2007;60(4):361-372.
26. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993;342:575–7.
27. Hummel M, Oeschger S, Barth TFE, et al. Wotherspoon criteria combined with B cell clonality analysis by advanced polymerase chain reaction technology discriminates covert gastric marginal zone lymphoma from chronic gastritis. *Gut*. 2006;55(6):782-787.
28. Thieblemont C, Bertoni F, Copie-Bergman C, Ferreri AJ, Ponzoni M. Chronic inflammation and extra-nodal marginal-zone lymphomas of MALT type. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:33-42.
29. Witkowska M, Smolewski P. *Helicobacter pylori* Infection, Chronic Inflammation, and Genomic Transformations in Gastric MALT Lymphoma. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:523170.
30. Rohatiner A, d'Amore F, Coiffier B, et al. Report on a workshop convened to discuss the pathological and staging classifications of gastrointestinal tract lymphoma. *Ann Oncol* 1994;5:397–400.
31. Ruskone-Fourmesttraux A, Lavergne A, Aegerter PH, et al. Predictive factors for regression of gastric MALT lymphoma after anti-*Helicobacter pylori* treatment. *Gut* 2001;48:297–303.
32. Liu, H, Ye, H, and Ruskone-Fourmesttraux, A (2002). T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. *Gastroenterology*. 122, 1286-1294.
33. Nakamura S, Matsumoto T, Suekane H, et al. Predictive value of endoscopic ultrasonography for regression of gastric low grade and high grade MALT lymphomas after eradication of *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001;48:454–60.
34. Ruskoné-Fourmesttraux A, Dragosics B, Morgner A, Wotherspoon A, de Jong D. Paris staging system for primary gastrointestinal lymphomas. *Gut*. 2003;52(6):912-913.
35. E. Zucca, C. Copie-Bergman, U. Ricardi, C. Thieblemont, M. Raderer, M. Ladetto, on behalf of the ESMO Guidelines Working Group; Gastric marginal zone lymphoma of MALT type: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 (suppl\_6): vi144-vi148.
36. N.Asano, K. Iijima, T. Koike, A. Imatani, T. Shimosegawa. *Helicobacter pylori* -negative gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas: A review. *World J Gastroenterol* 2015 July 14; 21(26): 8014-8020
37. Zullo A, Hassan C, Andriani A, Cristofari F, Bassanelli C, Spinelli GP, Tomao S, Morini S. Treatment of low-grade gastric MALT lymphoma unresponsive to *Helicobacter pylori* therapy: a pooled data analysis. *Med Oncol* 2010; 27: 291-295



38. A. Ruskoné-Fourmestreaux, T. Matysiak-Budnik, B. Fabiani, P. Cervera, H. Brixi, K. Le Malicot, I. Nion-Larmurier, JF Fléjou, C. Hennequin, L. Quéro. Exclusive moderate-dose radiotherapy in gastric marginal zone B-cell MALT lymphoma: Results of a prospective study with a long term follow-up, *Radiotherapy and Oncology*, Volume 117, Issue 1, October 2015, Pages 178-182
39. Zucca E, Conconi A, Laszlo D, López-Guillermo A, Bouabdallah R, Coiffier B, Sebban C, Jardin F, Vitolo U, Morschhauser F, Pileri SA, Copie-Bergman C, Campo E, Jack A, Floriani I, Johnson P, Martelli M, Cavalli F, Martinelli G, Thieblemont C. Addition of rituximab to chlorambucil produces superior event-free survival in the treatment of patients with extranodal marginal-zone B-cell lymphoma: 5-year analysis of the IELSG-19 Randomized Study. *J Clin Oncol* 2013; 31: 565-572
40. Sindel A, Al-Juhaishi T, Yazbeck V. Marginal Zone Lymphoma: State-of-the-Art Treatment. *Curr Treat Options Oncol*. 2019 Dec 5;20(12):90. doi: 10.1007/s11864-019-0687-5. PMID: 31807935..
41. N.H. Fowler, R.E. Davis, S. Rawal, L. Nastoupil, F.B. Hagemeister, P. McLaughlin, et al. Safety and activity of lenalidomide and rituximab in untreated indolent lymphoma: an open-label, phase 2 trial *Lancet Oncol*, 15 (12) (2014 Nov), pp. 1311-1318
42. A. Noy, S. de Vos, C. Thieblemont, P. Martin, C.R. Flowers, F. Morschhauser, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed/refractory marginal zone lymphoma, *Blood*, 129 (2017), pp. 2224-2232
43. Kiesewetter B, Raderer M Antibiotic therapy in nongastrointestinal MALT lymphoma: a review of the literature. *Blood* 2013;122(8):1350-1357.
44. Defrancesco I, Arcaini L. Overview on the management of non-gastric MALT lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2018 Mar;31(1):57-64. doi: 10.1016/j.beha.2017.11.001. Epub 2017 Nov 14. PMID: 29452667.
45. Ferreri AJ, Guidoboni M, Ponzoni M, et al. Evidence for an association between *Chlamydia psittaci* and ocular adnexal lymphomas. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(8): 586-594.
46. Roggero E, Zucca E, Mainetti C, et al. Eradication of *Borrelia burgdorferi* infection in primary marginal zone B-cell lymphoma of the skin. *Hum Pathol*. 2000;31(2):263-268.
47. Lecuit M, Abachin E, Martin A, et al. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N Engl J Med*. 2004;350(3):239-248.
48. Adam P, Czapiewski P, Colak S, et al. Prevalence of *Achromobacter xylosoxidans* in pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in different regions of Europe. *Br J Haematol*. 2014;164(6):804-810.
49. Hyjek E, Isaacson PG Primary B cell lymphoma of the thyroid and its relationship to Hashimoto's thyroiditis. *Hum Pathol*. 1988 Nov;19(11):1315-26.

50. Nocturne G, Mariette X. Sjögren Syndrome-associated lymphomas: an update on pathogenesis and management. *Br J Haematol.* 2015 Feb;168(3):317-27.
51. Arcaini L, Burcheri S, Rossi A, et al. Prevalence of HCV infection in nongastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT. *Ann Oncol.* 2007;18(2):346-350
52. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet.* 1991 Nov 9;338(8776):1175-6.
53. J Parsonnet, S Hansen, L Rodriguez, AB. Gelb, RA. Warnke, E Jellum, N Orentreich, JH. Vogelmann, GD. Friedman. Helicobacter pylori Infection and Gastric Lymphoma *N Engl J Med* 1994; 330:1267-1271
54. Enno, A., O'Rourke, J. L., Howlett, C. R., Jack, A., Dixon, M. F., & Lee, A. (1995). MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with Helicobacter felis. A mouse model of Helicobacter pylori-induced gastric lymphoma. *The American Journal of Pathology*, 147(1), 217–222.
55. Wang, H.-P., Zhu, Y.-L., & Shao, W. (2013). Role of Helicobacter pylori virulence factor cytotoxin-associated gene A in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 19(45), 8219–8226.
56. Zucca E, Bertoni F, Roggero E, Bosshard G, Cazzaniga G, Pedrinis E, Biondi A, Cavalli F. Molecular analysis of the progression from Helicobacter pylori-associated chronic gastritis to mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma of the stomach *N Engl J Med.* 1998 Mar 19; 338 (12): 804-10.
57. Wyatt JJ, Rathbone BJ. Immune response of the gastric mucosa to Campylobacter pylori. *Scand J Gastroenterol* 1988;23(suppl 142):44–9.
58. Stolte M, Eidt S. Lymphoid follicles in the antral mucosa: immune response to Campylobacter pylori. *J Clin Pathol* 1989;42:1269–71.
59. Stolte, M., Bayerdorffer, E., Morgner, A., Alpen, B., Wundisch, T., Thiede, C., & Neubauer, A. (2002). Helicobacter and gastric MALT lymphoma. *Gut*, 50(Suppl 3), iii19–iii24.
60. Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010). Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 713–739.
61. Marshall, B. J., and J. R. Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* i:1311-1315.
62. Blaser, M. J., and D. E. Berg. 2001. Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease. *J. Clin. Invest.* 107:767-773.
63. Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs. 2000. A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization. *Science* 287:482-485
64. MQ. Du. Malt Lymphoma: Recent advances in aetiology and molecular genetics, *J Clin Exp Haematopatholog*, Vol 47, No 2, Nov 2007

65. Eusebi, L. H., Zagari, R. M. and Bazzoli, F. (2014), Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 19: 1–5. doi:10.1111/hel.12165
66. Krisch, L. M., Posselt, G., Hammerl, P., & Wessler, S. (2016). CagA Phosphorylation in *Helicobacter pylori*-Infected B Cells Is Mediated by the Nonreceptor Tyrosine Kinases of the Src and Abl Families. *Infection and Immunity*, 84(9), 2671–2680.
67. Zhu Y, Wang C, Huang J, Ge Z, Dong Q, Zhong X, Su Y, Zheng S. The *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes Erk1/2-mediated Bad phosphorylation in lymphocytes: a mechanism of CagA-inhibited lymphocyte apoptosis. *Cell Microbiol* 2007; 9: 952-961
68. Lin WC, Tsai HF, Kuo SH, Wu MS, Lin CW, Hsu PI, Cheng AL, Hsu PN. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer Res* 2010; 70: 5740-5748
69. Umehara S, Higashi H, Ohnishi N, Asaka M, Hatakeyama M. Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* 2003; 22: 8337-8342
70. Eck M, Schmausser B, Haas R, Greiner A, Czub S, Müller- Hermelink HK. MALT-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the CagA protein. *Gastroenterology* 1997; 112: 1482-1486
71. Schmausser B, Eck M, Greiner A, Kraus M, Müller-Hermelink HK. Mucosal humoral immune response to CagA shows a high prevalence in patients with gastric MALT-type lymphoma. *Virchows Arch* 2000; 436: 115-118
72. Delchier JC, Lamarque D, Levy M, Tkoub EM, Copie-Bergman C, Deforges L, Chaumette MT, Haioun C. *Helicobacter pylori* and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuse large B-cell lymphoma but not in low-grade lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Gastroenterol*. 2001 Aug;96(8):2324-8.
73. Kuo SH, Chen LT, Lin CW, Wu MS, Hsu PN, Tsai HJ, Chu CY, Tzeng YS, Wang HP, Yeh KH, Cheng AL. Detection of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma cells: clinical and biological significance. *Blood Cancer J* 2013; 3: e125
74. Sumida T, Kitadai Y, Hiyama T, Shinagawa K, Tanaka M, Kodama M, Masuda H, Ito M, Tanaka S, Yoshihara M, Chayama K. Antibodies to *Helicobacter pylori* and CagA protein are associated with the response to antibacterial therapy in patients with H. pylori-positive API2-MALT1-negative gastric MALT lymphoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 1075-1081
75. Lehours P, Ménard A, Dupouy S, et al. Evaluation of the Association of Nine *Helicobacter pylori* Virulence Factors with Strains Involved in Low-Grade Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma . *Infection and Immunity*. 2004;72(2):880-888.
76. Abolghasem Tohidpour, CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori*, *Microbial Pathogenesis*, Volume 93, April 2016, Pages 44-55

77. Da Costa DM, Pereira E dos S, Rabenhorst SHB. What exists beyond cagA and vacA? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2015;21(37):10563-10572.
78. Lehours, P., Dupouy, S., Bergey, B., Ruskoné-Foumestaux, A., Delchier, J. C., Rad, R., Ménard, A. (2004). Identification of a genetic marker of *Helicobacter pylori* strains involved in gastric extranodal marginal zone B cell lymphoma of the MALT-type. *Gut*, 53(7), 931–937
79. Lehours, P., Zheng, Z., Skoglund, A., Mégraud, F., & Engstrand, L. (2009). Is There a Link between the Lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* Gastric MALT Lymphoma Associated Strains and Lymphoma Pathogenesis? *PLoS ONE*, 4(10), e7297.
80. Graham DY, Yamaoka Y. Disease-specific *Helicobacter pylori* virulence factors: the unfulfilled promise. *Helicobacter*. 2000;5 Suppl 1:S3-9; discussion S27-31.
81. Floch P, Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma. Crabtree JE, Wessler S, eds. *Toxins*. 2017;9(4):132.
82. Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K, Neubauer B, Neubauer A, Stolte M, Bayerdörffer E. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology*. 2000 May;118(5):821-8.
83. Stolte M, Kroher G, Meining A, Morgner A, Bayerdörffer E, Bethke B. A comparison of *Helicobacter pylori* and *H. heilmannii* gastritis. A matched control study involving 404 patients. *Scand J Gastroenterol*. 1997 Jan;32(1):28-33
84. Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., Ducatelle, R. (2009). Gastric *Helicobacters* in Domestic Animals and Nonhuman Primates and Their Significance for Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 202–223.
85. Salama, N. R., Hartung, M. L., & Müller, A. (2013). Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(6), 385–399.
86. Peek, R. M., Fiske, C., & Wilson, K. T. (2010). Role of Innate Immunity in *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Malignancy. *Physiological Reviews*, 90(3), 831–858.
87. Kronsteiner, B., Bassaganya-Riera, J., Philipson, C., Viladomiu, M., Carbo, A., Abedi, V., & Hontecillas, R. (2016). Systems-wide analyses of mucosal immune responses to *Helicobacter pylori* at the interface between pathogenicity and symbiosis. *Gut Microbes*, 7(1), 3–21.
88. Alvarez-Arellano L, Camorlinga-Ponce M, Maldonado-Bernal C, Torres J. Activation of human neutrophils with *Helicobacter pylori* and the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the response. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51:473-9
89. Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M, Tasca E, Azzurri A, D'Elis MM, Del Prete G, et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest* 2006; 116:1092-101

90. Rad R, Ballhorn W, Volland P, Eisenächer K, Mages J, Rad L, Ferstl R, Lang R, Wagner H, Schmid RM, et al. Extracellular and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2009; 136:2247-57
91. Ishihara S, Rumi MA, Kadowaki Y, Ortega-Cava CF, Yuki T, Yoshino N, Miyaoka Y, Kazumori H, Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y. Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Immunol* 173:1406–1416, 2004.
92. Backhed F, Rokbi B, Torstensson E, Zhao Y, Nilsson C, Seguin D, Normark S, Buchan AM, Richter-Dahlfors A. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *J Infect Dis* 187: 829–836, 2003.
93. Smith MF Jr, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NFkappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 278: 32552–32560, 2003.
94. Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG, Wang TC, Kurt-Jones EA. Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not tolllike receptor 4. *Infect Immun* 72: 6446–6454, 2004.
95. Viala J, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 2004;5:1166–74.
96. Allison CC, Kufer TA, Kremmer E, Kaparakis M, Ferrero RL. *Helicobacter pylori* induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism. *J Immunol*. 2009;183:8099–109.
97. Grubman A, et al. The innate immune molecule, NOD1, regulates direct killing of *Helicobacter pylori* by antimicrobial peptides. *Cell Microbiol*. 2009;12:626–39.
98. Muotiala A, Helander IM, Pyhälä L, Kosunen TU, Moran AP.. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1992; 60:1714-6; PMID:1548097
99. Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect* 5: 1345–1356, 2003.
100. Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9247–9252, 2005.
101. Uno K, Kato K, Shimosegawa T.. Novel role of toll-like receptors in *Helicobacter pylori* - induced gastric malignancy. *World J Gastroenterol* 2014; 20:5244-51
102. Adam P., Schmausser B., Göbeler-Kolve M., Müller-Hermelink H.K., Eck M. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphomas of MALT type exclusively express toll-like

- receptor 4 in contrast to other lymphomas infiltrating the stomach. *Ann Oncol* 2008; 19 (3): 566-569.
103. Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., & Nuñez, G. (2009). The Inflammasome: A Caspase-1 Activation Platform Regulating Immune Responses and Disease Pathogenesis. *Nature Immunology*, 10(3), 241.
  104. Semper RP, Mejías-Luque R, Groß C, Anderl F, Müller A, Vieth M, Busch DH, Prazeres da Costa C, Ruland J, Groß O, et al. Helicobacter pylori-Induced IL-1 $\beta$  Secretion in Innate Immune Cells Is Regulated by the NLRP3 Inflammasome and Requires the Cag Pathogenicity Island. *J Immunol* 2014; 193:3566-76
  105. Benoit BN, Kobayashi M, Kawakubo M, Takeoka M, Sano K, Zou J, Itano N, Tsutsui H, Noda T, Fukuda M, et al. Role of ASC in the mouse model of Helicobacter pylori infection. *J Histochem Cytochem* 2009; 57:327-38
  106. Kameoka S, Kameyama T, Hayashi T, Sato S, Ohnishi N, Hayashi T, Murata-Kamiya N, Higashi H, Hatakeyama M, Takaoka A Helicobacter pylori induces IL-1 $\beta$  protein through the inflammasome activation in differentiated macrophagic cells. *Biomed Res.* 2016;37(1):21-7.
  107. Pérez-Figueroa E, Torres J, Sánchez-Zauco N, Contreras-Ramos A, Alvarez-Arellano L, Maldonado-Bernal C. Activation of NLRP3 inflammasome in human neutrophils by Helicobacter pylori infection. *Innate Immun.* 2016 Feb;22(2):103-12.
  108. Kim D. J., J. H. Park, L. Franchi, S. Backert, G. Núñez . 2013. The Cag pathogenicity island and interaction between TLR2/NOD2 and NLRP3 regulate IL-1 $\beta$  production in Helicobacter pylori infected dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 43: 2650–2658.
  109. D'Elios, M. M., Amedei, A., Benagiano, M., Azzurri, A. and Del Prete, G. (2005), Helicobacter pylori, T cells and cytokines: the “dangerous liaisons”. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 44: 113–119. doi:10.1016/j.femsim.2004.10.013
  110. Larussa T, Leone I, Suraci E, Imeneo M, Luzzza F, Helicobacter pylori and T Helper Cells: Mechanisms of Immune Escape and Tolerance, *Journal of Immunology Research*, vol. 2015, Article ID 981328, 10 pages, 2015. doi:10.1155/2015/981328
  111. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145–73. doi: 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045
  112. L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan et al., “Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages,” *Nature Immunology*, vol. 6, no. 11, pp. 1123–1132, 2005.
  113. Eyerich K, Eyerich S. Th22 cells in allergic disease. *Allergo Journal International.* 2015;24(1):1-7. doi:10.1007/s40629-015-0039-3.

114. S. Sakaguchi, M. Miyara, C. M. Costantino, D. A. Hafler, "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system," *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 7, pp. 490–500, 2010.
115. Gray BM, Fontaine CA, Poe SA, Eaton KA. Complex T Cell Interactions Contribute to *Helicobacter pylori* Gastritis in Mice. Morrison RP, ed. *Infection and Immunity*. 2013;81(3):740-752. doi:10.1128/IAI.01269-12.
116. Yun CH, Lundgren A, Azem J, Sjöling A, Holmgren J, Svennerholm AM, Lundin BS.. Natural killer cells and *Helicobacter pylori* infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production. *Infect Immun* 2005; 73:1482-90;
117. Lindgren A, Pavlovic V, Flach CF, Sjöling A, Lundin S.. Interferon-gamma secretion is induced in IL-12 stimulated human NK cells by recognition of *Helicobacter pylori* or TLR2 ligands. *Innate Immun* 2011; 17:191-203
118. D'Elíos MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burróni D, Telford JL, Romagnani S, Del Prete G. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol*. 1997 Jan 15;158(2):962-7. PMID: 8993017.
119. K. A. Eaton, L. H. Benson, J. Haeger, and B. M. Gray, "Role of transcription factor T-bet expression by CD4+ cells in gastritis due to *Helicobacter pylori* in mice," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 8, pp. 4673–4684, 2006
120. M. Mohammadi, J. Nedrud, R. Redline, N. Lycke, and S. J. Czinn, "Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load," *Gastroenterology*, vol. 113, no. 6, pp. 1848–1857, 1997.
121. C. A. Garhart, J. G. Nedrud, F. P. Heinzl, N. E. Sigmund, and S. J. Czinn, "Vaccine-induced protection against *Helicobacter pylori* in mice lacking both antibodies and interleukin-4," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 6, pp. 3628–3633, 2003.
122. Greiner, A., Knorr, C., Qin, Y., Sebald, W., Schimpl, A., Banchereau, J., Muller-Hermelink, H.K. (1997) Low-grade B cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-type) require CD40-mediated signaling and Th2-type cytokines for in vitro growth and differentiation. *Am. J. Pathol.* 150, 1583–1593.
123. Mueller A, O'Rourke J, Chu P, Chu A, Dixon MF, Bouley DM et al. The role of antigenic drive and tumor-infiltrating accessory cells in the pathogenesis of *helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Pathol* 2005; 167: 797–812
124. D'Elíos, M.M., Amedei, A., Manghetti, M., Costa, F., Baldari, C.T., Quazi, A.S., Telford, J.L., Romagnani, S., Del Prete, G. (1999) Impaired T-cell regulation of B-cell growth in *Helicobacter pylori*-related gastric low-grade MALT lymphoma. *Gastroenterology* 117,1105–1112

125. Shi Y, Liu XF, Zhuang Y, Zhang JY, Liu T, Yin Z, Wu C, Mao XH, Jia KR, Wang FJ, et al. *Helicobacter pylori*-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J Immunol* 2010; 184:5121-9; PMID:20351183;
126. Khamri W, Walker MM, Clark P, Atherton JC, Thursz MR, Bamford KB, Lechler RI, Lombardi G. *Helicobacter pylori* stimulates dendritic cells to induce interleukin-17 expression from CD4+ T lymphocytes. *Infect Immun* 2010; 78:845-53; PMID:19917709
127. Al-Sammak F, Kalinski T, Weinert S, Link A, Wex T, Malfertheiner P. Gastric epithelial expression of IL-12 cytokine family in *Helicobacter pylori* infection in human: is it head or tail of the coin? *PLoS One* 2013; 8:e75192; PMID:24069393
128. Munari F, Fassan M, Capitani N, Codolo G, Vila-Caballer M, Pizzi M, Rugge M, Della Bella C, Troilo A, D'Elis S, et al. Cytokine BAFF released by *Helicobacter pylori*-infected macrophages triggers the Th17 response in human chronic gastritis. *J Immunol* 2014; 193:5584-94; PMID:25339679;
129. F. Luzza, T. Parrello, G. Monteleone et al., "Up-regulation of IL-17 is associated with bioactive IL-8 expression in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa," *The Journal of Immunology*, vol. 165, no. 9, pp. 5332–5337, 2000
130. Carbo A, Olivares-Villagómez D, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J, Chaturvedi R, Piazuelo MB, Delgado A, Washington MK, Wilson KT, Algood HMS. Systems modeling of the role of interleukin-21 in the maintenance of effector CD4+ T cell responses during chronic *Helicobacter pylori* infection. *MBio* 2014; 5:e01243-14; PMID:25053783;
131. Zhuang Y, Cheng P, Liu XF, Peng LS, Li BS, Wang TT, Chen N, Li WH, Shi Y, Chen W, et al. A pro-inflammatory role for Th22 cells in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Gut* 2015; 64:1368-78; PMID:25134787;
132. Lundgren A, Trollmo C, Edebo A, Svennerholm AM, Lundin BS. *Helicobacter pylori*-specific CD4+ T cells home to and accumulate in the human *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Infect Immun* 2005; 73:5612-9;
133. Harris PR, Wright SW, Serrano C, Riera F, Duarte I, Torres J, Peña A, Rollán A, Viviani P, Guiraldes E, et al. *Helicobacter pylori* gastritis in children is associated with a regulatory T-cell response. *Gastroenterology* 2008; 134:491-9
134. Robinson K., et al. *Helicobacter pylori*-induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. *Gut*. 2008;57:1375–1385.
135. Oertli M, Sundquist M, Hitzler I, Engler DB, Arnold IC, Reuter S, Maxeiner J, Hansson M, Taube C, Quiding-Järbrink M, et al. DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine *Helicobacter pylori*-specific immune tolerance, and asthma protection. *J Clin Invest* 2012; 122:1082-96;



136. Zhang M, Liu M, Luther J, Kao JY.. *Helicobacter pylori* directs tolerogenic programming of dendritic cells. *Gut Microbes* 2010; 1:325-9;
137. Kaebisch R, Mejías-Luque R, Prinz C, Gerhard M.. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A impairs human dendritic cell maturation and function through IL-10-mediated activation of STAT3. *J Immunol* 2014;192:316-23;
138. M. García, B. Bellosillo, B. Sánchez-González et al., “Study of regulatory T-cells in patients with gastric malt lymphoma: influence on treatment response and outcome,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, Article ID e51681, 2012.
139. Craig VJ, Cogliatti SB, Arnold I, Gerke C, Balandat JE, Wundisch T, Muller A. B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in *Helicobacter*-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia*.2010;24(6):1186–1196.
140. Perez-Perez GI, Dworkin BM, Chodos JE, Blaser MJ. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann Intern Med*.1988;109:11–17
141. Nurgalieva, Z. Z., M. E. Conner, A. R. Opekun, C. Q. Zheng, S. N. Elliott, P. B. Ernst, M. Osato, M. K. Estes, and D. Y. Graham. 2005. B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans. *Infect. Immun.* 73:2999-3006.
142. Wang Y-K, Kuo F-C, Liu C-J, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2015;21(40):11221-11235. doi:10.3748/wjg.v21.i40.11221.
143. Mattsson, A., A. Tinnert, A. Hamlet, H. Lonroth, I. Bolin, and A. M. Svennerholm. 1998. Specific antibodies in sera and gastric aspirates of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 5:288-293.
144. Gosciniak, G. 1997. IgG and IgA antibodies in *Helicobacter pylori* infections. *Zentralbl Bakteriol* 286:494-502
145. Mattsson, A., M. Quiding-Jarbrink, H. Lonroth, A. Hamlet, I. Ahlstedt, and A. Svennerholm. 1998. Antibody-secreting cells in the stomachs of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infection and immunity* 66:2705- 2712.
146. Cover, T. L. 1996. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Molecular microbiology* 20:241-246.
147. Lenze D, Berg E, Volkmer-Engert R, et al. Influence of antigen on the development of MALT lymphoma. *Blood*. 2006;107(3): 1141-1148
148. Bende RJ, Aarts WM, Riedl RG, et al. Among B cell non-Hodgkin's lymphomas, MALT lymphomas express a unique antibody repertoire with frequent rheumatoid factor reactivity. *J Exp Med*.2005;201: 1229-1241.

149. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Dogan A, Spencer J. Immunoglobulin specificity of low grade B cell gastrointestinal lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) type. *Am J Pathol.* 1993;142: 285-292.
150. Greiner A, Marx A, Heesemann J, et al. Idiotype identity in a MALT-type lymphoma and B cells in *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis. *Lab Invest.* 1994;70: 572-578.
151. Du M, Diss TC, Xu C, et al. Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia.* 1996;10: 1190-1197.
152. Qin Y, Greiner A, Hallas C, Haedicke W, Muller-Hermelink HK. Intraclonal offspring expansion of gastric low-grade MALT-type lymphoma: evidence for the role of antigen-driven high-affinity mutation in lymphomagenesis. *Lab Invest.* 1997;76: 477-485.
153. Dunn-Walters D, Thiede C, Alpen B, Spencer J. Somatic hypermutation and B-cell lymphoma. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B.* 2001;356(1405):73-82.
154. Zhang, Y., Wei Z., Li J., Liu P. Molecular pathogenesis of lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue—from (auto)antigen driven selection to the activation of NF- $\kappa$ B signaling *Sci. China Life Sci.* (2015) 58: 1246.
155. Munari F, Lonardi S, Cassatella MA, Doglioni C, Cangi MG, Amedei A, Facchetti F, Eishi Y, Ruge M, Fassan M, de Bernard M, D'Elis MM, Vermi W. Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma. *Blood*, 2011, 117:6612–6616
156. Deutsch AJ, Steinbauer E, Hofmann NA, Strunk D, Gerlza T, Beham-Schmid C, et al. Chemokine receptors in gastric MALT lymphoma: loss of CXCR4 and upregulation of CXCR7 is associated with progression to diffuse large B-cell lymphoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26(2):182–194
157. Bessede E, Copie-Bergman C, Lehours P, Levy M, Leroy K, Baia M, Riou A, Megraud F, Delchier JC, Salles N. Is elevated gastric tissue NOX2 associated with lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue? *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16: 1205–1211
158. Troppan K, Wenzl K, Neumeister P, Deutsch A. Molecular Pathogenesis of MALT Lymphoma. *Gastroenterology Research and Practice.* 2015;2015:102656.
159. Inagaki H. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: molecular pathogenesis and clinicopathological significance. *Pathol Int.* 2007;57:474–484
160. Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, et al. Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature.* 2004;427(6970):167–171
161. Novak U, Rinaldi A, Kwee I, et al. The NF- $\kappa$ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood.* 2009;113(20):4918-4921.

162. Chanudet E, Ye H, Ferry J et al. A20 deletion is associated with copy number gain at the TNFA/B/C locus and occurs preferentially in translocation-negative MALT lymphoma of the ocular adnexa and salivary glands. *J. Pathol.* 2009; 217; 420–430.
163. Chanudet E, Huang Y, Ichimura K et al. A20 is targeted by promoter methylation, deletion and inactivating mutation in MALT lymphoma. *Leukemia* 2010; 24; 483–487.
164. Peng H, Diss T, Isaacson PG, Pan L. c-myc gene abnormalities in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas. *J Pathol*, 1997, 181: 381–386
165. Du M, Peng H, Singh N, Isaacson PG, Pan L. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood*, 1995, 86: 4587–4593
166. Seeberger H, et al. Loss of Fas (CD95/APO-1) regulatory function is an important step in early MALT-type lymphoma development. *Lab Invest.* 2001;81(7):977–86.
167. Kondo T, Oka T, Sato H, Shinnou Y, Washio K, Takano M, Morito T, Takata K, Ohara N, Ouchida M, Shimizu K, Yoshino T. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development and progression of gastric MALT lymphoma. *Int J Oncol*, 2009, 35: 547–557
168. Z.-M. Li, A. Rinaldi, A. Cavalli et al., “MYD88 somatic mutations in MALT lymphomas,” *British Journal of Haematology*, vol. 158, no. 5, pp. 662–664, 2012
169. Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM et al. t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann Oncol* 1997; 8: 979–85.
170. Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I et al. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 1999; 93:3601–9.
171. Ye H, Liu H, Attygalle A et al. Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: Significant association with CagA strains of *H pylori* in gastric MALT lymphoma. *Blood* 2003; 102: 1012–18.
172. Baens M, Maes B, Steyls A, Geboes K, Marynen P, De Wolf- Peeters C. The product of the t(11;18), an API2–MLT fusion, marks nearly half of gastric MALT type lymphomas without large cell proliferation. *Am J Pathol* 2000; 156: 1433–9.
173. Inagaki H. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: molecular pathogenesis and clinicopathological significance. *Pathol Int.* 2007;57:474–484
174. Rosenwald A, Ott G, Stilgenbauer S et al. Exclusive detection of the t(11;18)(q21;q21) in extranodal marginal zone B cell lymphomas (MZBL) of MALT type in contrast to other MZBL and extranodal large B cell lymphomas. *Am J Pathol* 1999;155: 1817–21.
175. J. Dierlamm, I. Wlodarska, L. Michaux et al., “Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma,” *Hematological Oncology*, vol. 18, no. 1, pp. 1–13, 2000.

176. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R et al. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997; 16: 6914–25.
177. Akagi T, Motegi M, Tamura A et al. A novel gene, MALT1 at 18q21, is involved in t(11;18)(q21;q21) found in low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Oncogene* 1999; 18: 5785–94.
178. Morgan JA, Yin Y, Borowsky AD et al. Breakpoints of the t(11;18)(q21;q21) in mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma lie within or near the previously undescribed gene MALT1 in chromosome 18. *Cancer Res* 1999;59: 6205–13.
179. Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N et al. Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 19 012–19.
180. Inagaki H, Okabe M, Seto M, Nakamura S, Ueda R, Eimoto T. API2-MALT1 fusion transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: Multiplex RT-PCR detection using formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Am J Pathol* 2001; 158: 699–706.
181. Motegi M, Yonezumi M, Suzuki H et al. API2-MALT1 chimeric transcripts involved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogeneous products. *Am J Pathol* 2000; 156: 807–12
182. Liu H, Hamoudi RA, Ye H et al. t(11;18)(q21;q21) of mucosaassociated lymphoid tissue lymphoma results from illegitimate non-homologous end joining following double strand breaks. *Br J Haematol* 2004; 125: 318–29.
183. Baens M, Steyls A, Dierlamm J et al. Structure of the MLT gene and molecular characterization of the genomic breakpoint junctions in the t(11;18)(q21;q21) of marginal zone B-cell lymphomas of MALT type. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 29: 281–91
184. Izumiyama K, Nakagawa M, Yonezumi M et al. Stability and subcellular localization of API2-MALT1 chimeric protein involved in t(11;18)(q21;q21) MALT lymphoma. *Oncogene* 2003; 22: 8085–92.
185. Liu H, Ruskon-Fourmestraux A, Lavergne-Slove A et al. Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Lancet* 2001; 357: 39–40.
186. Sugiyama T, Asaka M, Nakamura T et al. API2-MALT1 chimeric transcript is a predictive marker for the responsiveness of *H. pylori* eradication treatment in low-grade gastric MALT lymphoma. *Gastroenterology* 2001; 120: 1884–5.
187. Alpen B, Neubauer A, Dierlamm J et al. Translocation t(11;18) absent in early gastric marginal zone B-cell lymphoma of MALT type responding to eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Blood* 2000; 95: 4014–15.

188. Levy M, Copie-Bergman C, Gameiro C, et al . Prognostic value of translocation t(11;18) in tumoral response of low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type to oral chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23:5061–6.
189. Streubel B, Ye H, Du MQ, et al .Translocation t(11;18)(q21;q21) is not predictive of response to chemotherapy with 2CdA in patients with gastric MALT lymphoma. *Oncology* 2004;66:476–80.
190. Martinelli G, Laszlo D, Ferreri AJ, et al . Clinical activity of rituximab in gastric marginal zone non-Hodgkin's lymphoma resistant to or not eligible for anti-Helicobacter pylori therapy. *J Clin Oncol* 2005;23:1979–83.
191. Ruskoné-Fourmestreaux A, Fischbach W, Aleman BMP, et al EGILS consensus report. Gastric extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT *Gut* 2011;60:747-758.
192. Du M.Q. MALT lymphoma: many roads lead to nuclear factor- $\kappa$ b activation. *Histopathology*. 2011;58(1):26–38.
193. Juilland M, Thome M. Role of the CARMA1/BCL10/MALT1 complex in lymphoid malignancies. *Current Opinion in Hematology*. 2016;23(4):402-409.
194. M.Q. Du MALT lymphoma: a paradigm of NF-kappaB dysregulation *Semin. Cancer Biol.*, 39 (2016), pp. 49-60
195. Vega F, Medeiros LJ. Marginal-zone B-cell lymphoma of extranodal mucosa-associated lymphoid tissue type: molecular genetics provides new insights into pathogenesis. *Adv Anat Pathol*. 2001 Nov;8(6):313-26. doi: 10.1097/00125480-200111000-00001. PMID: 11707622.
196. Willemze R., Cerroni L., Kempf W. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood*. 2019;133(16):1703–1714
197. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): Part I. Diagnosis: Clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol*. 2014; 70:205.e1–205.e16. 10.1016/j.jaad.2013.07.049
198. Phan A, Veldman R, Lechowicz MJ. T-cell lymphoma epidemiology: the known and unknown. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016;6:492-503.
199. Morton LM et al. Rationale and design of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph) Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2014;2014(48):1–14.
200. Korgavkar K, Xiong M, Weinstock M. Changing incidence trends of cutaneous T-cell lymphoma. *JAMA Dermatol*. (2013) 149:1295–9. 10.1001/jamadermatol.2013.5526
201. Saunes M, Nilssen TI, Johannesen TB. Incidence of primary cutaneous T-cell lymphoma in Norway. *Br J Dermatol*. (2009) 160:376–9. 10.1111/j.1365-2133.2008.08852.x
202. Riou-Gotta MO, Fournier E, Mermet I, Pelletier F, Humbert P, Danzon A, et al. . Primary cutaneous lymphomas: a population-based descriptive study of 71 consecutive cases

- diagnosed between 1980 and 2003. *Leuk Lymphoma*. (2008) 49:1537–44. 10.1080/10428190802136368
203. Ghazawi FM, Alghazawi N, Le M, et al. Environmental and other extrinsic risk factors contributing to the pathogenesis of cutaneous T cell lymphoma (ctcl) *Front Oncol*. 2019;9:300. doi: 10.3389/fonc.2019.00300
204. Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. (2017) 92:1085–102. 10.1002/ajh.24876
205. Ν. Ζακοπούλου, Χ. Βλαχάκη, Γ. Κοντοχριστόπουλος, Α. Τασσίδου Αναδρομική κλινική και επιδημιολογική μελέτη δερματικών λεμφωμάτων *ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE: ISSN 11-05-3992*
206. Nikolaou V, Papadavid E, Patsatsi A et al. Prognostic indicators for mycosis fungoides in a Greek population. *Br J Dermatol* 2017; 176: 1321– 1330.
207. Gip L, Nilsson E. Clustering of mycosis fungoides in the County of Vasternorrland. *Lakartidningen*. (1977) 74:1174–6.
208. Moreau JF, Buchanich JM, Geskin JZ, Akilov OE, Geskin LJ. Non-random geographic distribution of patients with cutaneous T-cell lymphoma in the greater Pittsburgh area. *Dermatol. Online J*. (2014) 20.
209. Litvinov IV, Tetzlaff MT, Rahme E, Habel Y, Risser DR, Gangar P, et al. . Identification of geographic clustering and regions spared by cutaneous T-cell lymphoma in Texas using 2 distinct cancer registries. *Cancer*. (2015) 121:1993–2003. 10.1002/cncr.29301
210. Jahan-Tigh RR, Huen AO, Lee GL, Pozadzides JV, Liu P, Duvic M. Hydrochlorothiazide and cutaneous T cell lymphoma: prospective analysis and case series. *Cancer*. (2013) 119:825–31. 10.1002/cncr.27740
211. Pomerantz RG, Campbell LS, Jukic DM, Geskin LJ. Posttransplant cutaneous T-cell lymphoma: case reports and review of the association of calcineurin inhibitor use with posttransplant lymphoproliferative disease risk. *Arch Dermatol*. 2010;146(5):513–6.
212. Biggar RJ, Engels EA, Frisch M, Goedert JJ. Risk of T-cell lymphomas in persons with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;26(4):371–6.
213. Aschebrook-Kilfoy B, Cocco P, La Vecchia C, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for mycosis fungoides and Sézary syndrome: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2014;2014(48):98-105. doi:10.1093/jncimonographs/lgu008
214. Talpur R, Cox KM, Hu M, Geddes ER, Parker MK, Yang BY, et al. . Vitamin D deficiency in mycosis fungoides and Sézary syndrome patients is similar to other cancer patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. (2014) 14:518–24. 10.1016/j.clml.2014.06.023

215. Jackow CM, McHam JB, Friss A, Alvear J, Reveille JR, et al. HLA-DR5 and DQB1\*03 class II alleles are associated with cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 1996;107(3):373–6
216. Mirvish JJ, Pomerantz RG, Falo LD, Jr, Geskin LJ. Role of infectious agents in cutaneous T-cell lymphoma: facts and controversies. *Clin Dermatol.* (2013) 31:423–31. 10.1016/j.clindermatol.2013.01.009
217. Ahn C. S., ALSayyah A., Sangüeza O. P. Mycosis fungoides: an updated review of clinicopathologic variants. *American Journal of Dermatopathology.* 2014;36(12):933–951
218. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, et al. . Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* (2005) 53:1053–63. 10.1016/j.jaad.2005.08.057
219. Pulitzer M. Cutaneous T-cell Lymphoma. *Clin Lab Med.* 2017;37(3):527–546. doi:10.1016/j.cll.2017.06.006
220. Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G, et al. ; ISCL . Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(1):95-106. doi:10.1067/mjd.2002.118538
221. E. Olsen, E. Vonderheid, N. Pimpinelli, et al. Revisions of the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC) *Blood*, 110 (2007), pp. 1713-1722
222. Olsen EA. Evaluation, Diagnosis, and Staging of Cutaneous Lymphoma. *Dermatol Clin.* 2015;33(4): 643–54. 10.1016/j.det.2015.06.00
223. Kempf W, Mitteldorf C. Pathologic diagnosis of cutaneous lymphomas. *Dermatol Clin.* 2015; 33( 4): 655- 681.
224. Fujii K, Kanekura T. Next-Generation Sequencing Technologies for Early-Stage Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Front Med (Lausanne).* 2019;6:181. Published 2019 Aug 13. doi:10.3389/fmed.2019.00181
225. Chitgopeker P, Sahni D. T-cell receptor gene rearrangement detection in suspected cases of cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* (2014) 134:1–5. 10.1038/jid.2014.73
226. Batrani M, Bhawan J. Pitfalls in the diagnosis of cutaneous lymphoma. *Am J Dermatopathol.* 2014;36(1):90–100. doi: 10.1097/DAD.0b013e31827654cd.
227. Klemke CD, Booken N, Weiss C, et al, Histopathological and immunophenotypical criteria for the diagnosis of Sézary syndrome in differentiation from other erythrodermic skin diseases: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Task Force Study of 97 cases. *Br J Dermatol.* 2015 ; 173 (1): 93-105.

228. Scarisbrick JJ, Hodak E, Bagot M, Stranzenbach R, Stadler R, Ortiz-Romero PL, Papadavid E, Evison F, Knobler R, Quaglino P, et al. Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: Recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer*. 2018;93:47–56.
229. Whittaker S, Hoppe R, Prince HM. How I treat mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Blood*. 2016;127(25):3142–3153.
230. Benton EC, Crichton S, Talpur R et al. A cutaneous lymphoma international prognostic index (CLIPi) for mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Eur J Cancer* 2013; 49: 2859–2868.
231. Scarisbrick JJ, Quaglino P, Prince HM, Papadavid E, Hodak E, Bagot M, et al. . The PROCLIPi international registry of early-stage mycosis fungoides identifies substantial diagnostic delay in most patients. *Br J Dermatol*. (2019) 181:350–7. 10.1111/bjd.17258
232. Jawed S.I., Myskowski P.L., Horwitz S., Moskowitz A., Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part II. Prognosis, management, and future directions. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(2):223.e1–223.e17.
233. Zackheim HS, Kashani-Sabet M, Amin S. Topical corticosteroids for mycosis fungoides. Experience in 79 patients. *Arch Dermatol* 1998;134:949-54.
234. Lovgren, M., Scarisbrick, J.. Update on skin directed therapies in mycosis fungoides. *Chinese Clinical Oncology, North America*, 8, nov. 2018.
235. Kim YH, Martinez G, Varghese A, Hoppe RT. Topical nitrogen mustard in the management of mycosis fungoides: update of the Stanford experience. *Arch Dermatol*. (2003) 139:165–73. doi: 10.1001/archderm.139.2.165
236. Breneman D, Duvic M, Kuzel T, Yocum R, Truglia J, Stevens VJ. Phase 1 and 2 trial of bexarotene gel for skin-directed treatment of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol*. (2002) 138:325–32. doi: 10.1001/archderm.138.3.325
237. Herrmann JJ, Roenigk HH Jr, Hurria A, et al. Treatment of mycosis fungoides with photochemotherapy (PUVA): long-term follow-up. *J Am Acad Dermatol*.1995;33(2 Pt 1):234-242.
238. Berthelot C, Rivera A, Duvic M. Skin directed therapy for mycosis fungoides: a review. *J Drugs Dermatol*. 2008;7(7):655-666
239. Stern RS, Laird N, Melski J, Parrish JA, Fitzpatrick TB, Bleich HL. Cutaneous squamous cell carcinoma in patients treated with PUVA. *N Engl J Med*. 1984;310(18):1156-1161.
240. Stern RS, Nichols KT, V'akev'a LH. Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA). The PUVA Follow-Up Study. *N Engl J Med*. 1997;336(15):1041-1045
241. Litvinov IV, Shtreis A, Kobayashi K, Glassman S, Tsang M, Woetmann A, et al. . Investigating potential exogenous tumor initiating and promoting factors for cutaneous T-



- cell lymphomas (CTCL), a rare skin malignancy. *Oncoimmunology*. (2016) 5:e1175799. 10.1080/2162402X.2016.1175799
242. Axelrod PI, Lorber B, Vonderheid EC. Infections complicating mycosis fungoides and sézary syndrome. *JAMA*. 1992;267:1354–1358. doi:10.1001/jama.267.4.507b.
243. Willerslev-Olsen A, Krejsgaard T, Lindahl LM, et al. Bacterial toxins fuel disease progression in cutaneous T-cell lymphoma. *Toxins (Basel)*. 2013;5(8):1402–1421.
244. Talpur R, Bassett R, Duvic M. Prevalence and treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br J Dermatol* 2008; 159:105-12; PMID:18489588; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08612.x>
245. Lindahl LM, Willerslev-Olsen A, Gjerdrum L, Nielsen PR, Blümel E, Rittig A, et al. Antibiotics inhibit disease activity in CTCL. *Blood*. 2019;134(13):1072-1083. doi: 10.1182/blood.2018888107
246. Andreas WO, Thorbjørn K, Lise ML, Ivan VL, Simon F, David LP, Claudia N, Robert G, Nigel PM, Denis S et al. *Staphylococcus aureus* enterotoxin A (SEA) stimulates STAT3 activation and IL-17 expression in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*. 2016. Mar 10; 127:1287-96; PMID:26738536; <http://dx.doi.org/2380163410.1182/blood-2015-08-662353>
247. Blümel E, Willerslev-Olsen A, Glud M, et al. Staphylococcal alpha-toxin tilts the balance between malignant and non-malignant CD4+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma. *Oncoimmunology*. 2019;8(11):e1641387.
248. Rubio Gonzalez B, Zain J, Rosen ST, Querfeld C. Tumor microenvironment in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Curr Opin Oncol*. (2016) 28:88–96. 10.1097/CCO.0000000000000243
249. E. Netchiporouk, I.V. Litvinov, L. Moreau, M. Gilbert, D. Sasseville, M. Duvic Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell Cycle*, 13 (21) (2014), pp. 3331-3335
250. Jókai H, Marschalkó M, Csomor J, Szakonyi J, Kontár O, Barna G, Kárpáti S, Holló P. Tissue-specific homing of immune cells in malignant skin tumors. *Pathol Oncol Res*. 2012 Oct;18(4):749-59. doi: 10.1007/s12253-012-9529-5. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22528565.
251. J. Choi, G. Goh, T. Walradt, B.S. Hong, C.G. Bunick, K. Chen, et al. Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma, *Nat Genet*, 47 (9) (2015 Sep), pp. 1011-1019
252. Moosic KB, Paila U, Olson KC, Dziejulska K, Wang TT, Xing JC, Ratan A, Feith DJ, Loughran TP Jr, Olson TL. Genomics of LGL leukemia and select other rare leukemia/lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2019 Sep;32(3):196-206.
253. Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med* 50(4): 20, 2018. PMID: 29657326. DOI: 10.1038/s12276-018-0038-9
254. Heaney RP. Vitamin D in health and disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2008;3:1535–1541.

255. Bendik I, Friedel A, Roos FF, Weber P, Eggersdorfer M. Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health *Front Physiol.* 2014 Jul 11;5:248.
256. Khazai N, Judd SE, Tangpricha V. Calcium and vitamin D: skeletal and extraskelatal health. *Curr Rheumatol Rep.* 2008;10(2):110–117. doi: 10.1007/s11926-008-0020-y.
257. Christakos S, Hewison M, Gardner DG, Wagner CL, Sergeev IN, Rutten E, et al. . Vitamin D: beyond bone. *Ann N Y Acad Sci.* (2013) 1287:45–58. 10.1111/nyas.12129
258. Manson JE, Cook NR, Lee IM, et al. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2019;380:33–44.
259. Keum N, Giovannucci E. Vitamin D supplements and cancer incidence and mortality: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2014;111:976-980.
260. Moyer VA. Vitamin, mineral, and multivitamin supplements for the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2014;160:558-564.
261. Kulling PM, Olson KC, Olson T, Feith DJ, Loughran T. Vitamin D in hematological disorders and malignancies. *Eur J Haematol.* 2017;98(3):187–197. doi:10.1111/ejh.12818
262. Baeke F, Korf H, Overbergh L, van Etten E, Verstuyf A, Gysemans C, Mathieu C. Human T lymphocytes are direct targets of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the immune system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Jul;121(1-2):221-7. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.037. Epub 2010 Mar 17. PMID: 20302932.
263. Müller K, Bendtzen K. Inhibition of human T lymphocyte proliferation and cytokine production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Differential effects on CD45RA+ and CD45R0+ cells. *Autoimmunity.* 1992;14(1):37-43. doi: 10.3109/08916939309077355. PMID: 1299346.
264. Chen J, Bruce D, Cantorna MT. Vitamin D receptor expression controls proliferation of naive CD8+ T cells and development of CD8 mediated gastrointestinal inflammation. *BMC Immunol.* 2014;15:6.
265. Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammas DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol.* 2009;183(9):5458–67.
266. Tang JY , Fu T, Lau C, Oh DH, Bikle DD, Asgari MM. Vitamin D in cutaneous carcinogenesis: part II. *J Am Acad Dermatol.* 2012 Nov; 67(5):817.e1–11;
267. Drake MT, Maurer MJ, Link BK, Habermann TM, Ansell SM, Micallef IN, Kelly JL, Macon WR, Nowakowski GS, Inwards DJ, Johnston PB, Singh RJ, Allmer C, Slager SL, Weiner GJ, Witzig TE, Cerhan JR. Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2010;28(27):4191–8.

268. Mrotzek C, Felcht M, Sommer A, Schrader A, Klemke CD, Herling M, Schlaak M, Fabri M. Vitamin D controls apoptosis and proliferation of cutaneous T-cell lymphoma cells. *Exp Dermatol*. 2015;24(10):798–800.
269. Θεραπευτικές οδηγίες χορήγησης της βιταμίνης D στον Ελληνικό πληθυσμό, Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρία 2019
270. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, et al.: The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J ClinEndocrinolMetab* 2011; 96: 53-8.
271. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al.: Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J ClinEndocrinolMetab*. 2011; 96: 1911–30
272. Schleicher RL, Sternberg MR, Looker AC, et al. National estimates of serum total 25-hydroxyvitamin D and metabolite concentrations measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the US population during 2007-2010. *J Nutr* 2016;146(5):1051–61.
273. Cashman KD, Dowling KG, Skrabakova Z, et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr* 2016;103(4):1033–4
274. Cerhan JR, Slager SL. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood*. 2015 Nov 12;126(20):2265-73. doi: 10.1182/blood-2015-04-537498. Epub 2015 Sep 24. PMID: 26405224; PMCID: PMC4643002.
275. Skibola CF, Curry JD, Nieters A. Genetic susceptibility to lymphoma. *Haematologica*. 2007; 92(7):960-969.2.
276. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86(21):1600-1608
277. Goldin LR, Landgren O, McMaster ML, et al. Familial aggregation and heterogeneity of non-Hodgkin lymphoma in population-based samples. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(10): 2402-2406
278. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Highly increased familial risks for specific lymphoma subtypes. *Br J Haematol*. 2009;146(1):91–94.
279. Vijai J, Wang Z, Berndt SI, et al. A genome-wide association study of marginal zone lymphoma shows association to the HLA region. *Nat Commun*. 2015;6:5751
280. Rollinson S, Levene AP, Mensah FK, Roddam PL, Allan JM, Diss TC, Roman E, Jack A, MacLennan K, Dixon MF, Morgan GJ. Gastric marginal zone lymphoma is associated with polymorphisms in genes involved in inflammatory response and antioxidative capacity. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):1007-11. doi: 10.1182/blood-2002-12-3803. Epub 2003 Apr 3. PMID: 12676777.

281. Wu MS, Shun CT, Huang SP, Cheng AL, Chen LT, Lin JT. Effect of interleukin-1beta and glutathione S-transferase genotypes on the development of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Haematologica*. 2004 Aug;89(8):1015-7. PMID: 15339690.
282. Hellmig S, Vollenberg S, Goebeler-Kolve ME, Fischbach W, Hampe J, Fölsch UR, Schreiber S. IL-1 gene cluster polymorphisms and development of primary gastric B-cell lymphoma in *Helicobacter pylori* infection. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2994-5. doi: 10.1182/blood-2004-05-1792. PMID: 15498865.
283. Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Fölsch UR, Hampe J, Schreiber S. A functional promoter polymorphism of TNF-alpha is associated with primary gastric B-Cell lymphoma. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2644–2649.
284. Wu MS, Chen LT, Shun CT, Huang SP, Chiu HM, Wang HP et al. Promoter polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with risk of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Int J Cancer* 2004; 110: 695–700.
285. Hellmig S, Bartscht T, Fischbach W, Fölsch UR, Schreiber S. Interleukin-10 (-819 C/T) and TNF-A (-308 G/A) as risk factors for *H. pylori*-associated gastric MALT-lymphoma. *Dig Dis Sci*. 2008 Jul;53(7):2007-8. doi: 10.1007/s10620-008-0231-0. Epub 2008 Mar 13. PMID: 18338261.
286. Skibola CF, Bracci PM, Nieters A, Brooks-Wilson A, de Sanjosé S, Hughes AM, Cerhan JR, Skibola DR, Purdue M, Kane E, Lan Q, Foretova L, Schenk M, Spinelli JJ, Slager SL, De Roos AJ, Smith MT, Roman E, Cozen W, Boffetta P, Krickler A, Zheng T, Lightfoot T, Cocco P, Benavente Y, Zhang Y, Hartge P, Linet MS, Becker N, Brennan P, Zhang L, Armstrong B, Smith A, Shiao R, Novak AJ, Maynadie M, Chanock SJ, Staines A, Holford TR, Holly EA, Rothman N, Wang SS. Tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin-alpha (LTA) polymorphisms and risk of non-Hodgkin lymphoma in the InterLymph Consortium. *Am J Epidemiol*. 2010 Feb 1;171(3):267-76. doi: 10.1093/aje/kwp383. Epub 2010 Jan 4. PMID: 20047977; PMCID: PMC2842204.
287. Achyut BR, Tripathi P, Ghoshal UC, Moorchung N, Mittal B. Interleukin-10 (-819 C/T) and tumor necrosis factor-alpha (-308 G/A) gene variants influence gastritis and lymphoid follicle development. *Dig Dis Sci*. 2008 Mar;53(3):622-9. doi: 10.1007/s10620-007-9925-y. Epub 2007 Aug 24. PMID: 17717744.
288. Liao F, Hsu YC, Kuo SH, Yang YC, Chen JP, Hsu PN, Lin CW, Chen LT, Cheng AL, Fann CS, Lin JT, Wu MS. Genetic polymorphisms and tissue expression of interleukin-22 associated with risk and therapeutic response of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood Cancer J*. 2014 Oct 10;4(10):eXX. doi: 10.1038/bcj.2014.70. PMID: 25303370; PMCID: PMC4220648.
289. Cheng TY, Lin JT, Chen LT, Shun CT, Wang HP, Lin MT, Wang TE, Cheng AL, Wu MS. Association of T-cell regulatory gene polymorphisms with susceptibility to gastric mucosa-

- associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006 Jul 20;24(21):3483-9. doi: 10.1200/JCO.2005.05.5434. PMID: 16849765.
290. Nieters A, Beckmann L, Deeg E, Becker N. Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. *Genes Immun.* 2006 Dec;7(8):615-24. doi: 10.1038/sj.gene.6364337. Epub 2006 Sep 14. PMID: 16971956.
291. Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Fölsch UR, Hampe J, Schreiber S. Association study of a functional Toll-like receptor 4 polymorphism with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2005 Jun;46(6):869-72. doi: 10.1080/1042819050086451. PMID: 16019531.
292. Rosenstiel P, Hellmig S, Hampe J, Ott S, Till A, Fischbach W, Sahly H, Lucius R, Fölsch UR, Philpott D, Schreiber S. Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Cell Microbiol.* 2006 Jul;8(7):1188-98. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00701.x. PMID: 16819970.
293. Türe-Ozdemir F, Gazouli M, Tzivras M, Panagos C, Bovaretos N, Petraki K, Giannakopoulos A, Korkolopoulou P, Mantzaris GJ. Association of polymorphisms of NOD2, TLR4 and CD14 genes with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Anticancer Res.* 2008 Nov-Dec;28(6A):3697-700. PMID: 19189651.
294. J. Liu, J. Liu, B. Song, T. Wang, Y. Liu, J. Hao, J. Yu Genetic variations in CTLA-4, TNF- $\alpha$ , and LTA and susceptibility to T-cell lymphoma in a Chinese population *Cancer Epidemiology*, 37 (2013), pp. 930-934
295. Nedoszytko B, Olszewska B, Roszkiewicz J, et al. The role of polymorphism of interleukin-2, -10, -13 and TNF- $\alpha$  genes in cutaneous T-cell lymphoma pathogenesis. *Postepy Dermatol Alergol.* 2016;33(6):429–434. doi:10.5114/ada.2016.63881
296. Hodak E, Akerman L, David M, et al. Cytokine gene polymorphisms in patch-stage mycosis fungoides. *Acta Derm Venereol.* 2005;85:109–12.
297. Vasku JA, Vasku A, Goldbergova M, et al. Heterozygote AG variant of -596 A/G IL-6 gene polymorphism is a marker for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) *Clin Immunol.* 2004;113:256–60.
298. Rasheed H, Hegazy RA, Gawdat HI, et al. Serum Vitamin D and Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in Mycosis Fungoides Patients: A Case Control Study. *PLoS One.* 2016;11(6):e0158014. Published 2016 Jun 23. doi:10.1371/journal.pone.0158014
299. Incel Uysal P, Alli N, Hayran Y, Candar T. Mycosis Fungoides and Vitamin D Status: Analyses of Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Single Nucleotide Polymorphisms in the Vitamin D Receptor Gene. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2018 Apr;26(1):8-14
300. Elahi M.M., Asotra K., Matata B.M., Mastana S.S. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1792:163–172. doi: 10.1016/j.bbdis.2009.01.007.

301. Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun.* 2010;11:27–60. doi:10.1159/000289196
302. Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine.* 2000 Feb;12(2):110-9. doi: 10.1006/cyto.1999.0529. PMID: 10671295.
303. Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF  $\alpha$ ) -308 promoter polymorphism in TNF- $\alpha$  gene regulation. *J Inflamm.* 1996;46:32–41.
304. Hohjoh H, Tokunaga K. Allele-specific binding of the ubiquitous transcription factor OCT-1 to the functional single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the tumor necrosis factor-alpha gene (TNFA) promoter. *Genes Immun.* 2001;2:105–109.
305. Van Heel DA, Udalova IA, De Silva AP, McGovern DP, Kinouchi Y, Hull J, Lench NJ, Cardon LR, Carey AH, Jewell DP, Kwiatkowski D. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF- $\kappa$ B transcription factors. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1281–1289
306. Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT, Spinelli JJ, Willett E, De Sanjose S, Cocco P, Berndt SI, Brennan P, Brooks-Wilson A, Wacholder S, Becker N, Hartge P, Zheng T, Roman E, Holly EA, Boffetta P, Armstrong B, Cozen W, Linet M, Bosch FX, Ennas MG, Holford TR, Gallagher RP, Rollinson S, Bracci PM, Cerhan JR, Whitby D, Moore PS, Leaderer B, Lai A, Spink C, Davis S, Bosch R, Scarpa A, Zhang Y, Severson RK, Yeager M, Chanock S, Nieters A, Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium, *Lancet Oncol.* 2006 Jan;7(1):27-38
307. Zhang C, Zhao MQ, Liu J, Huang Q, Li P, Ni J, et al. Association of lymphotoxin alpha polymorphism with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Int J Rheum Dis.* 2015;18(4):398–407. doi: 10.1111/1756-185X.12588
308. Santos MJ, Fernandes D, Caetano-Lopes J, et al. Lymphotoxin- $\alpha$  252 A>G polymorphism: a link between disease susceptibility and dyslipidemia in rheumatoid arthritis?. *J Rheumatol.* 2011;38(7):1244-1249. doi:10.3899/jrheum.101170
309. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001;482(1-2):21-26.
310. Yang F, Xiong J, Jia XE, et al. GSTT1 deletion is related to polycyclic aromatic hydrocarbons-induced DNA damage and lymphoma progression. *PLoS One.* 2014;9(2):e89302. Published 2014 Feb 20.
311. Ramos Hernández C, Mouronte-Roibás C, Barros-Dios JM, Fernández-Villar A, Ruano-Ravina A. Deletion of GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer survival: a systematic review. *Tumori.* 2017;103(4):338-344.

312. You D, Lu N, Duan D, Li H, Xing W. The Association between GSTM1, GSTT1 Genetic Variants and Gastric Carcinoma Susceptibility in Chinese: A Systematic Review Article. *Iran J Public Health*. 2016;45(9):1103-111
313. Hu XY, Huang XY, Ma J, et al. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms predict treatment outcome for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol*. 2016;37(1):151-162.
314. Zhou TB, Drummen GP, Jiang ZP, Qin YH. GSTT1 polymorphism and the risk of developing prostate cancer. *Am J Epidemiol*. 2014;180(1):1-10.
315. Xiao Q, Deng D, Li H, et al. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms predict treatment outcome for acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol*. 2014;93(8):1381-1390
316. Dahabreh IJ, Giannouli S, Gota V, Voulgarelis M. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and myelodysplastic syndrome risk: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2010;126(7):1716-1723.
317. Bin Q, Luo J. Role of polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma risk: a Human Genome Epidemiology (HuGE) review. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(1):14-20.
318. Li M, Zheng M, Chen H, Yu H. Effects of GST variants on the risk odds of hematological malignancy: A meta-analysis *J Cell Biochem*. 2018;10.1002/jcb.28145.
319. Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol*. 2016;941:21-29.
320. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-1018. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010
321. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8-27. doi:10.1111/imr.12621
322. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis*. 2002;
323. Demeter J, Messer G, Rämisch S, et al. Polymorphism within the second intron of the IL-1 receptor antagonist gene in patients with hematopoietic malignancies. *Cytokines Mol Ther*. 1996;2(4):239-242.
324. Matsuo K, Hamajima N, Suzuki R, et al. No substantial difference in genotype frequencies of interleukin and myeloperoxidase polymorphisms between malignant lymphoma patients and non-cancer controls. *Haematologica*. 2001;86(6):602-608.
325. Gu Y, Shore RE, Arslan AA, et al. Circulating cytokines and risk of B-cell non-Hodgkin lymphoma: a prospective study. *Cancer Causes Control*. 2010;21(8):1323-1333.
326. Gupta M, Stenson M, O'Byrne M, et al. Comprehensive serum cytokine analysis identifies IL-1RA and soluble IL-2R $\alpha$  as predictors of event-free survival in T-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2016;27(1):165-172.

327. Ghaderi A. CTLA4 gene variants in autoimmunity and cancer: a comparative review. *Iran J Immunol.* 2011;8(3):127-149.
328. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:65-97
329. Gough SC, Walker LS, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005; 204:102-15
330. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* 2000; 165: 6606–6611.
331. Sun T, Zhou Y, Yang M, Hu Z, Tan W, Han X, et al. Functional genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. *Cancer Res.* 2008; 68:7025-34.
332. Wagner M, Jasek M, Karabon L. Immune Checkpoint Molecules-Inherited Variations as Markers for Cancer Risk. *Front Immunol.* 2021 Jan 14;11:606721. doi: 10.3389/fimmu.2020.606721. PMID: 33519815; PMCID: PMC7840570.
333. Hou R, Cao B, Chen Z, Li Y, Ning T, Li C, et al. Association of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 gene haplotype with the susceptibility to gastric cancer. *Mol Biol Rep.* 2010; 37:515-20
334. Piras G, Monne M, Uras A, Palmas A, Murineddu M, Arru L, et al. Genetic analysis of the 2q33 region containing CD28-CTLA4-ICOS genes: association with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.* 2005; 129:784-90.
335. Monne M, Piras G, Palmas A, Arru L, Murineddu M, Latte G, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and susceptibility to non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol.* 2004; 76:14-8.
336. Dixon BREA, Hossain R, Patel RV, Algood HMS. Th17 Cells in *Helicobacter pylori* Infection: A dichotomy of Help and Harm. *Infect Immun.* 2019;87(11):e00363-19
337. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol.* 2011;23(3):159-163
338. Ji Y, Yang X, Li J, et al. IL-22 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via IL-22R1/AKT/MMP-9 signaling. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):3694-3703.
339. Fukui H, Zhang X, Sun C, et al. IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling. *Br J Cancer.* 2014;111(4):763-771.
340. Gelebart P, Zak Z, Dien-Bard J, Anand M, Lai R. Interleukin 22 signaling promotes cell growth in mantle cell lymphoma. *Transl Oncol.* 2011 Feb 1; 4(1):9-19.



341. Hennig BJ, Frodsham AJ, Hellier S, Knapp S, Yee LJ, Wright M, et al. Influence of IL-10RA and IL-22 polymorphisms on outcome of hepatitis C virus infection. *Liver Int.* 2007;27:1134–1143.
342. Thompson CL, Plummer SJ, Tucker TC, Casey G, Li L. Interleukin-22 genetic polymorphisms and risk of colon cancer. *Cancer Causes Control.* 2010;21:1165–1170.
343. Zhang G, Chen X, Chan L, Zhang M, Zhu B, Wang L, et al. An SNP selection strategy identified IL-22 associating with susceptibility to tuberculosis in Chinese. *Sci Rep.* 2011;1:20
344. Ku DH, Chang CD, Koniecki J, Cannizzaro LA, Boghosian-Sell L, Alder H, Baserga R. A new growth-regulated complementary DNA with the sequence of a putative trans-activating factor. *Cell Growth Differ.* 1991;2:179–186.
345. Hystad ME, Myklebust JH, Bo TH, Sivertsen EA, Rian E, Forfang L, Munthe E, Rosenwald A, Chiorazzi M, Jonassen I, Staudt LM, Smeland EB. Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *J Immunol.* 2007;179:3662–3671.
346. Krautkramer, K. A., Linnemann, A. K., Fontaine, D. A., Whillock, A. L., Harris, T. W., Schleis, G. J., Truchan, N. A., Marty-Santos, L., Lavine, J. A., Cleaver, O., Kimple, M. E., and Davis, D. B. (2013) Tcf19 is a novel islet factor necessary for proliferation and survival in the INS-1  $\beta$ -cell line. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E600–E610
347. Zhou, Z., Chen, G., Deng, C., Tang, J., Xie, L., Zhou, H., Ye, X., Zhang, D., Shi, R., Tian, D., Qiao, G., and Ben, X. (2019) TCF19 contributes to cell proliferation of non-small cell lung cancer by inhibiting FOXO1. *Cell Biol. Int.* 43, 1416–1424
348. Zeng, C. X., Fu, S. B., Feng, W. S., Zhao, J. Y., Li, F. X., and Gao, P. (2019) TCF19 enhances cell proliferation in hepatocellular carcinoma by activating the ATK/FOXO1 signaling pathway. *Neoplasma* 66, 46–53
349. Du WB, Huang Z, Luo L, et al. TCF19 aggravates the malignant progression of colorectal cancer by negatively regulating WWC1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(2):655-663.
350. Krishnan BR, Jamry I, Chaplin DD. Feature mapping of the HLA class I region: localization of the POU5F1 and TCF19 genes. *Genomics.* 1995;30(1):53-58.
351. Ferreira MA, Hottenga JJ, Warrington NM, Medland SE, Willemsen G, Lawrence RW, Gordon S, Geus EJ, Henders AK, Smit JH, Campbell MJ, Wallace L, Evans DM, Wright MJ, Nyholt DR, James AL, Beilby JP, Penninx BW, Palmer LJ, Frazer IH, Montgomery GW, Martin NG, Boomsma DI. Sequence variants in three loci influence monocyte counts and erythrocyte volume. *Am J Hum Genet.* 2009;85:745–749. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.10.005
352. Cheung YH, Watkinson J, Anastassiou D. Conditional meta-analysis stratifying on detailed HLA genotypes identifies a novel type 1 diabetes locus around TCF19 in the MHC. *Hum Genet.* 2011;129(2):161-176. doi:10.1007/s00439-010-0908-2

353. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338(2):143-156. doi:10.1016/j.gene.2004.05.014
354. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004;89-90(1-5):187-193.
355. Rai V, Abdo J, Agrawal S, Agrawal DK. Vitamin D Receptor Polymorphism and Cancer: An Update. *Anticancer Res*. 2017;37(8):3991-4003.
356. Bizzaro G, Antico A, Fortunato A, Bizzaro N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit?. *Isr Med Assoc J*. 2017;19(7):438-443.
357. Esfahani A, Ghoreishi Z. Is there any association between vitamin D receptor polymorphisms and acute myeloid leukemia? *Ann Oncol* 2016;27:suppl 6.
358. Algadal SFS, Ali EW, Elamin HA, et al. Association of Vitamin D Receptor (VDR) Start Codon Fok-I Polymorphism with Chronic Myeloid Leukemia. *IJAPBC* 2015;4:228-32.
359. Rajab SA, Ibrahim IK, Abdelgader EA, et al. Vitamin D receptor gene (FokI) polymorphism in Sudanese patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Am J Res Commun* 2015;3:71-8
360. He Y, Ou C, Pang W, Lin Y, He J, Li C, Lin X Genetic association of VDR polymorphisms and multiple myeloma susceptibility: a case control study. *Int J Clin Exp Pathol* 10(3): 3538-3542, 2017.
361. Pezeshki SMS, Asnafi AA, Khosravi A, Shahjahani M, Azizidoost S, Shahrabi S. Vitamin D and its receptor polymorphisms: New possible prognostic biomarkers in leukemias. *Oncol Rev*. 2018;12(2):366. Published 2018 Oct 8.
362. Renné C, Benz AH, Hansmann ML. Vitamin D3 receptor is highly expressed in Hodgkin's lymphoma. *BMC Cancer*. 2012;12:215.
363. Tekgündüz SA, Yeşil Ş, Ören AC, et al. Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphisms in Pediatric Patients Presenting With Hodgkin's Lymphoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017;39(2):e59-e61
364. Purdue MP, Lan Q, Krickler A, Vajdic CM, Rothman N, Armstrong BK. Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2007;92(8):1145-1146.
365. Smedby KE, Eloranta S, Duvefelt K, et al. Vitamin D receptor genotypes, ultraviolet radiation exposure, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Am J Epidemiol*. 2011;173(1):48-54.
366. Purdue MP, Hartge P, Davis S, et al. Sun exposure, vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control*. 2007;18(9):989-999.
367. Kelly JL, Drake MT, Fredericksen ZS, et al. Early life sun exposure, vitamin D-related gene variants, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control*. 2012;23(7):1017-1029.

368. Evrard, A., Boulle, N. and Lutfalla, G.S. in Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology, Boisseau, P., Houdy, P., Lahmani, M., Springer, Berlin, 2010 Chapter 15: Real Time PCR, σελ. 845-869
369. Λιανίδου Ε. Σημειώσεις στο μάθημα: Τεχνικές μοριακής διαγνωστικής. Μεταπτυχιακό πρόγραμμα ειδίκευσης στην κλινική χημεία, 2009, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 27-53, 69-75.
370. Burt C.A, Ashwood E.R and Bruns D.E, Tietz Textbook of Clinical chemistry and molecular diagnostics, 4th Edition, Elsevier, St Louis, 2006, σελ. 1393-1445
371. Βελισσάρη, Α., 2011, Ανάπτυξη Μεθοδολογιών Για την Ανίχνευση Σημειακών Πολυμορφισμών (SNPs) Σχετιζόμενων με την Ηλικιακή Εκφύλιση της Ωχράς Κηλίδας (ARMD), Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
372. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012 Aug 1;40(15):e115.
373. Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes *Nucleic Acids Res.* 31: 3688-3691 (2003)
374. Xavier Sole, Elisabet Guino, Joan Valls, Raquel Iniesta, and Victor Moreno, 2006, SNPStats: a web tool for the analysis of association studies, *Bioinformatics*, 22, 1928-1929.