

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΣΧΟΛΗ



ΤΙΤΛΟΣ

Διερεύνηση της ετήσιας επίπτωσης της Langerhans Cell Histiocytosis (LCH)
και του επιπολασμού τηςγονιδιακής μετάλλαξης BRAF σε ενήλικες Έλληνες
ασθενείς με LCH.

Δήμητρα Στάθη

Ιατρός

ΑΘΗΝΑ 2022

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Της Ιατρού

Στάθη Δήμητρας

ΤΙΤΛΟΣ

**Διερεύνηση της ετήσιας επίπτωσης της Langerhans Cell
Histiocytosis (LCH) και του επιπολασμού της γονιδιακής
μετάλλαξης BRAF σε ενήλικες Έλληνες ασθενείς με LCH.**

Επιβλέπων καθηγητής

**Γρηγόριος Καλτσάς, Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας,
Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου
Αθηνών**

* Παραχωρείται στο ΕΚΤ το μη-αποκλειστικό δικαίωμα να παρουσιάζει, αποθηκεύει, επεξεργάζεται και διαθέτει την υποβληθείσα διδακτορική διατριβή μέσω του Εθνικού Αρχείου Διδακτορικών Διατριβών, με κάθε πρόσφορο μέσο, ψηφιακό ή άλλο -μόνο με τις τροποποιήσεις εκείνες που είναι απολύτως αναγκαίες για τους σκοπούς της συγκρότησης του ΕΑΔΔ και της διάθεσής της για εκπαιδευτική και ερευνητική χρήση μη κερδοσκοπικού/εμπορικού χαρακτήρα χωρίς οικονομικές απαιτήσεις, αδιαλείπτως.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.

Στον Γιώργο, την Ματίνα και τον Γιάννη

Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

Ημερομηνία αίτησης: 05/03/2018

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 27/04/2018

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- Γρηγόριος Καλτσάς, Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)
- Ευανθία Κασσή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας-Ενδοκρινολογίας (ΕΚΠΑ)
- Αλέξανδρος Κόκκινος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας (ΕΚΠΑ)

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 30/05/2018

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής: 20.07.2022

Μέλη 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- Γρηγόριος Καλτσάς, Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)
- Ευανθία Κασσή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας-Ενδοκρινολογίας (ΕΚΠΑ)
- Αλέξανδρος Κόκκινος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας (ΕΚΠΑ)
- Μιχάλης Βουλγαρέλης, Καθηγητής Παθολογικής Φυσιολογίας-Αιματολογίας (ΕΚΠΑ)
- Νικόλαος Σύψας, Καθηγητής Παθολογικής Φυσιολογίας-Λοιμωξιολογίας (ΕΚΠΑ)
- Σταύρος Σουγιουλτζής, Αναπληρωτής Καθηγητής Γαστρεντερολογίας-Παθολογικής Φυσιολογίας (ΕΚΠΑ)
- Άννα Αγγελούση, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Α' Παθολογική Κλινική (ΕΚΠΑ)

Βιογραφικό σημείωμα

Όνομα: Δήμητρα Στάθη

Εκπαίδευση:

2003-2006	6ο Λύκειο Βόλου
2006-2012	Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2013-2014	Μεταπτυχιακός Τίτλος Σπουδών "Γενετική του Ανθρώπου" Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
06/2020	Τίτλος ειδικότητας "Γενική εσωτερική παθολογία"

Επαγγελματική εμπειρία

08/2021- Σήμερα	Clinical research fellow in Endocrinology and diabetes, Guy's and St Thomas' NHS Trust
01/2021-08/2021	Senior clinical fellow in Acute medicine with specialty interest Endocrinology and diabetes Guy's and St Thomas' NHS Trust
09/2019-01/2021	Ειδικευόμενη Παθολογίας Β' Παθολογική Κλινική, 251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας
04/2019-08/2019	Senior house officer in General medicine Peterborough City Hospital
12/2015-03/2019	Ειδικευόμενη Παθολογίας Β' Παθολογική Κλινική, 251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας
07/2014-07/2015	Ειδικευόμενη Παθολογίας Παθολογική Πανεπιστημιακή Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο

Συμμετοχή σε συνέδρια

- Περιστατικό με ταυτόχρονη παρουσία Ca μαστού και νεφροκυτταρικού Ca σε γυναίκα ασθενή με ήδη θεραπευθέν τρίτο νεοπλασματικό νόσημα (43^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο)
- Περίπτωση ασθενή με νεφρικά έμφρακτα και υπεράριθμες νεφρικές αρτηρίες σε έδαφος ινομυώδους δυσπλασίας μιμούμενο οξεία κοιλία (43^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο)
- Anti-TNF Induced Lupus (9th International Congress of Internal Medicine)
- Female treated with anti-TNF agent presents with severe anemia (22nd Congress of Balkan Military Medical Committee)
- Περιστατικό γλοιοβλαστώματος εγκεφάλου σε ασθενή με ήδη θεραπευθέν θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς και μελάνωμα αριστερού σκέλους (44^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο)
- Περίπτωση γυναίκας μέσης ηλικίας με πορφύρα Henoch-Schonlein (44^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο)
- Middle-aged woman presents with purpura after treatment with acenocoumarol (23rd Congress of Balkan Military Medical Committee)
- Case report of neuroglioblastoma in patient with medical history of excised melanoma and papillary thyroid carcinoma (23rd Congress of Balkan Military Medical Committee)
- Καταγραφή υψηλών ποσοστών ασθενών με ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) παρά τη χορήγηση παρά τη χορήγηση αντιπηκτικής ή αντιαιμοπεταλιακής αγωγής (29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νευρολογίας)
- Βακτηριαμία από Streptococcus Anginosus με συνοδό απόστημα ΟΜΣΣ (27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων)
- Συσχέτιση ισχαιμικών αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων (ΑΕΕ) με προηγηθείσα χορήγηση αντιπηκτικής ή αντιαιμοπεταλιακής αγωγής (6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο του Ι. Μ. Ε. Θ. Α)
- WCO-IOF-ESCEO congress 2020 (World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases), Barcelona, Spain-Poster presentation (Patient with primary bone cited lymphoma hospitalized as persistent fever)
- WCO-IOF-ESCEO congress (World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases), Paris France (2019) - Recipient of the ESCEO - Eli Lilly Scholarship & Poster presentation: Comparison of large-scale gene expression studies arrays in different joint tissues in osteoarthritis
- ASN Kidney Week (2019), Washington, Poster Presentation: Increased mortality among AKI patients attending Emergency Department; a retrospective hospital-based cohort study
- EDNSG 34st Annual Meeting (2022), oral presentation: Dapagliflozin does not influence arterial stiffness or markers of arterial aging in people with type 2 diabetes and kidney disease
- UK kidney week (2022), oral presentation: Effect of calcitriol treatment on bone turnover markers in people with type 2 diabetes and stage 3 chronic kidney disease
- EASD (2022), oral presentation: Effect of dapagliflozin on arterial stiffness and other markers of arterial ageing in people with type 2 diabetes and CKD

Σεμινάρια:

- ALS course (2018)
- ILS course (2021)
- Diasend academy course (2022)
- DAFNE diabetes course (Dose Adjustment For Normal Eating) (2022)

Δημοσιεύσεις:

1. Makras P, Stathi D, Yavropoulou M, Tsoli M, Kaltsas G. The annual incidence of Langerhans cell histiocytosis among adults living in Greece. *Pediatr Blood Cancer*. 2020 Sep;67(9):e28422. (Shared first authorship)
2. Stathi D, Yavropoulou MP, Allen CE, Abhyankar H, Scull B, Tsoli M, Andreakos E, Kaltsas G, Makras P. Prevalence of the *BRAF*^{V600E} mutation in Greek adults with Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Hematol Oncol*. 2022 Sep;39(6):540-548.
3. Triantafyllidis KK, Giannos P, Stathi D, Kechagias KS. Graves' disease following vaccination against SARS-CoV-2: A systematic review of the reported cases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Sep 27;13:938001. (Shared senior authorship)
4. Karalliedde J, Fountoulakis N, Corcillo A, Maltese G, Flaquer M, Stathi D, Mangelis A, Panagiotou A, Ayis S, Thomas S, Gnudi L. Effect of calcitriol treatment on arterial stiffness in people with type 2 diabetes and stage 3 chronic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2022 Aug 9.
5. Karalliedde J, Fountoulakis N, Stathi D, Corcillo A, Flaquer M, Panagiotou A, Maltese G, Mangelis A, Ayis S, Gnudi L. Does Dapagliflozin influence arterial stiffness and levels of circulating anti-aging hormone soluble Klotho in people with type 2 diabetes and kidney disease? Results of a randomized parallel group clinical trial. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Sep 30;9:992327.
6. Stathi D, Fountoulakis N, Panagiotou A, Maltese G, Corcillo A, Mangelis A, Ayis S, Gnudi L, Karalliedde J. Impact of treatment with active vitamin D calcitriol on bone turnover markers in people with type 2 diabetes and stage 3 chronic kidney disease. *Bone*. 2022 Oct 8;166:116581.

Περιεχόμενα

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
Ορισμός - ταξινόμηση	10
Ιστορική αναδρομή: Η αναγνώριση της νόσου.....	11
Η προέλευση του παθολογικού κυττάρου στην LCH.....	13
Νεόπλασμα ή ανοσολογική διαταραχή;	17
Κλωνικότητα και LCH.....	18
Γενετική και LCH.....	18
Γενετική και προέλευση του κυττάρου	24
Το αντίκτυπο της μετάλλαξης <i>BRAF</i> ^{V600E}	26
Κλινικές εκδηλώσεις της νόσου	27
Η LCH στους ενήλικες.....	35
LCH και συνύπαρξη άλλων κακοηθειών	36
Ιστολογική εξέταση	37
Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	38
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	42
Σκοπός της μελέτης	42
Είδος μελέτης	43
Υλικά και μέθοδοι.....	43
Α). Επιδημιολογική μελέτη	43
Β) Έλεγχος βιοψιών για την μετάλλαξη <i>BRAF</i> ^{V600E}	47
Αποτελέσματα	54
Συζήτηση	69
α) Καταγραφή ετήσιας επίπτωσης.....	69
β) Καταγραφή επίπτωσης της μετάλλαξης στους ενήλικες με LCH στον Ελληνικό πληθυσμό	71
Συμπεράσματα	75
Περίληψη.....	76
Summary.....	78
Γ. Βιβλιογραφικές αναφορές.....	79

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ορισμός - ταξινόμηση

Η ιστοκυττάρωση Langerhans (Langerhans cell histiocytosis-LCH) είναι μια σπάνια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μονήρεις ή πολλαπλές βλάβες με διήθηση των ιστών από παθολογικά κύτταρα, τα οποία προσομοιάζουν με τα κύτταρα Langerhans, μια υποκατηγορία των δενδριτικών κυττάρων που βρίσκονται στο δέρμα και τους βλεννογόνους. Μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε όργανο με εξαίρεση την καρδιά και τους νεφρούς και ανήκει στις ιστοκυτταρικές διαταραχές, οι οποίες διαχωρίζονται από την **Histiocyte Society** σε 5 κατηγορίες¹:

1. **Η ομάδα "L" (Langerhans):** περιλαμβάνει την LCH, την νόσο Erdheim-Chester (ECD), την μεικτή νόσο LCH/ECD και το εξωδερματικό νεανικό ξανθοκοκκίωμα.
2. **Η ομάδα "C" (cutaneous and mucocutaneous):** περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος νόσων που περιορίζονται στο δέρμα ή τους βλεννογόνους και δεν πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια της LCH. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το νεανικό ξανθοκοκκίωμα, το ξανθοκοκκίωμα των ενηλίκων και την δερματική νόσο Rosai-Dorfman.
3. **Η ομάδα "R" (Rosai-Dorfman disease):** περιλαμβάνει την νόσο Rosai-Dorfman και διάφορες ιστοκυτταρώσεις που δεν πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια της LCH.
4. **Η ομάδα "M" (malignant histiocytoses- κακοήθεις ιστοκυτταρώσεις):** Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει τις πρωτοπαθείς κακοήθεις ιστοκυτταρώσεις που προσβάλλουν το δέρμα, τους λεμφαδένες, το πεπτικό σύστημα, το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) κλπ., καθώς και τις κακοήθεις ιστοκυτταρώσεις που εμφανίζονται δευτεροπαθώς σε άλλα αιματολογικά νοσήματα (πχ οζώδες λέμφωμα, λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων, οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία).
5. **Η ομάδα "H" (hemophagocytic lymphohistiocytosis - αιμοφαγοκυτταρική λεμφοϊστοκυττάρωση):** περιλαμβάνει την πρωτοπαθή αιμοφαγοκυτταρική λεμφοϊστοκυττάρωση (primary hemophagocytic lymphohistiocytosis - HLH) και τα σύνδρομα ενεργοποίησης μακροφάγων, τόσο τα πρωτοπαθή μέσω μενδελικής

κληρονομικότητας όσο και τα δευτεροπαθή που σχετίζονται με λοιμώξεις, κακοήθειες, ρευματολογικά νοσήματα, ιατρογενή ενεργοποίηση ή καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και άλλες καταστάσεις.

Ιστορική αναδρομή: Η αναγνώριση της νόσου

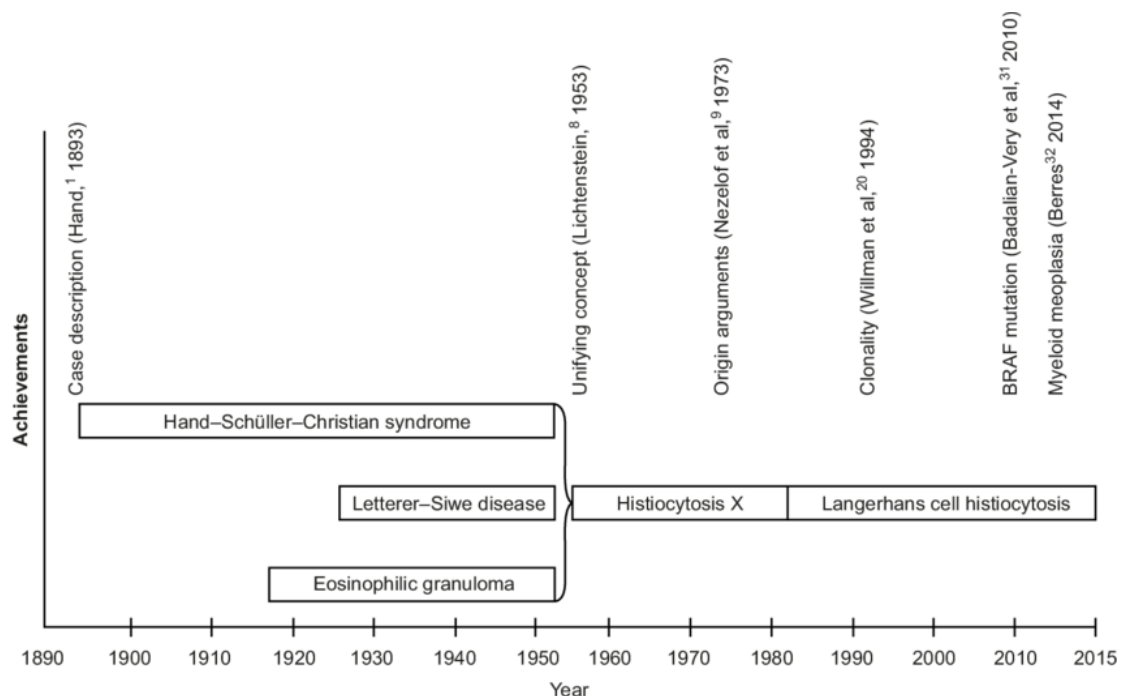
Το 1893 ο Dr Hand περιέγραψε την περίπτωση ενός παιδιού με εξόφθαλμο, άποιο διαβήτη, κρανιακές βλάβες και δερματολογικές εκδηλώσεις "που έμοιαζαν με ψώρα" και αποδόθηκαν σε πιθανή φυματίωση.² Αρκετά χρόνια αργότερα, το 1915, ο Dr Schueller ανέφερε άλλα δύο παιδιά με κρανιακές βλάβες και εξόφθαλμο, εκ των οποίων το ένα είχε άποιο διαβήτη και το άλλο λιπογεννητική δυστροφία.³ Ο Dr Schueller κατέληξε στο συμπέρασμα ότι και οι δύο ασθενείς είχαν κάποια νόσο στην οποία εμπλέκεται η υπόφυση. Ωστόσο, η πρώτη υπόθεση ότι το σύνολο αυτών των σημείων και συμπτωμάτων ίσως αποτελούν εκδηλώσεις μίας νόσου έγινε από τον Dr Christian οδηγώντας έτσι στην ονομασία της τριάδας "εξόφθαλμός, σκελετικές βλάβες και άποιος διαβήτης" σε νόσο Christian ή Schueller–Christian.⁴ Αν και μικρή σημασία είχε δοθεί στις πρώτες περιγραφές του Dr Hand, εκείνος περιέγραψε άλλες δύο περιπτώσεις παρόμοιες με αυτές των Schueller–Christian με αποτέλεσμα τον γνωστό όρο "νόσος Hand–Schuller–Christian", ενώ παράλληλα έθεσε το ερώτημα περί νεοπλασματικής ή χρόνιας λοιμώδους προέλευσης της νόσου που απασχόλησε την επιστημονική κοινότητα για πολλές δεκαετίες.⁵

Εν τω μεταξύ το 1924, ο Dr Letterer περιέγραψε ένα νεογνό με γενικευμένο εξάνθημα, ηπατοσπληνομεγαλία και αναιμία με διήθηση του δέρματος, του ήπατος, του σπληνός, των λεμφαδένων και του μυελού των οστών από μεγάλα δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα.⁶ Παρόμοιες περιπτώσεις αναφέρθηκαν ξανά στη βιβλιογραφία και συγκεντρώθηκαν από τον Dr Siwe το 1933, ο οποίος υπέθεσε ότι τα περιστατικά αποτελούσαν μέρος μίας ξεχωριστής κλινικοπαθολογοανατομικής οντότητας άγνωστης αιτιολογίας με συνέπεια τον όρο "νόσος Letterer–Siwe".⁷

Το 1953 ο Dr Lichtenstein πρότεινε την κατηγοριοποίηση των νόσων Hand–Schuller–Christian, Letterer–Siwe και του ηωσινοφιλικού κοκκιώματος υπό τον όρο ιστοκυττάρωση Χ, απορρίπτοντας παράλληλα τον όρο δικτυοενδοθηλίωση, διότι τα

κύτταρα στις ανωτέρω νόσους ήταν ξεκάθαρα ιστοκύτταρα με φαγοκυτταρικές ιδιότητες, δίνοντας έμφαση με την επιλογή του Χ στην ανάγκη εντατικής έρευνας προς ανεύρεση του αιτιολογικού παράγοντα.⁸

Η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου οδήγησε στην παρατήρηση των κοκκίων Birbeck στα περισσότερα μη κερατινοποιημένα κύτταρα δειγμάτων βιοψίας δέρματος ασθενών με ιστοκυττάρωση Χ, ενώ το 1973 ο Nezelof και οι συνεργάτες του, διερευνώντας το κύτταρο προέλευσης της νόσου κατέληξαν στην υπόθεση ότι η ιστοκυττάρωση Χ είναι μια ογκογενής διαδικασία στην οποία το κύτταρο Langerhans θα ήταν το "βλαστοκύτταρο", ενώ η νόσος είναι πιθανόν το αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού των παθολογικών κυττάρων Langerhans.^{9,10} Συγκεντρώνοντας τις γνώσεις των προηγούμενων δεκαετιών, η Histiocyte Society πρότεινε τελικά την ονομασία **Langerhans Cell Histiocytosis** το 1987 (εικόνα 1).¹¹

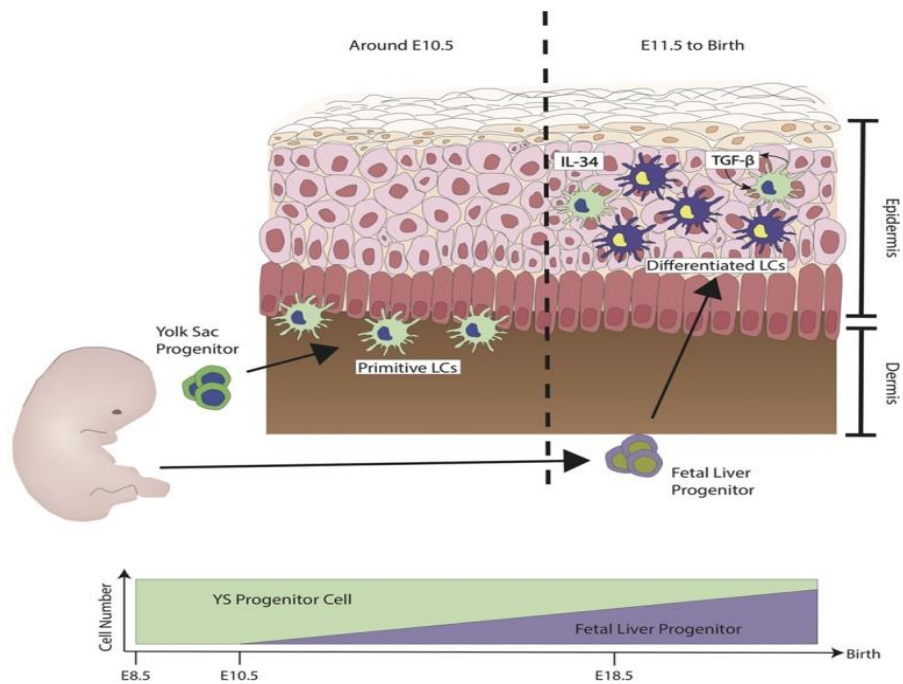


Εικόνα 1: Ιστορική αναδρομή (Insights into the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis: the development of targeted therapies - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: <https://www.researchgate.net/figure/LCH-historical-timeline-Abbreviation-LCH>)

Η προέλευση του παθολογικού κυττάρου στην LCH

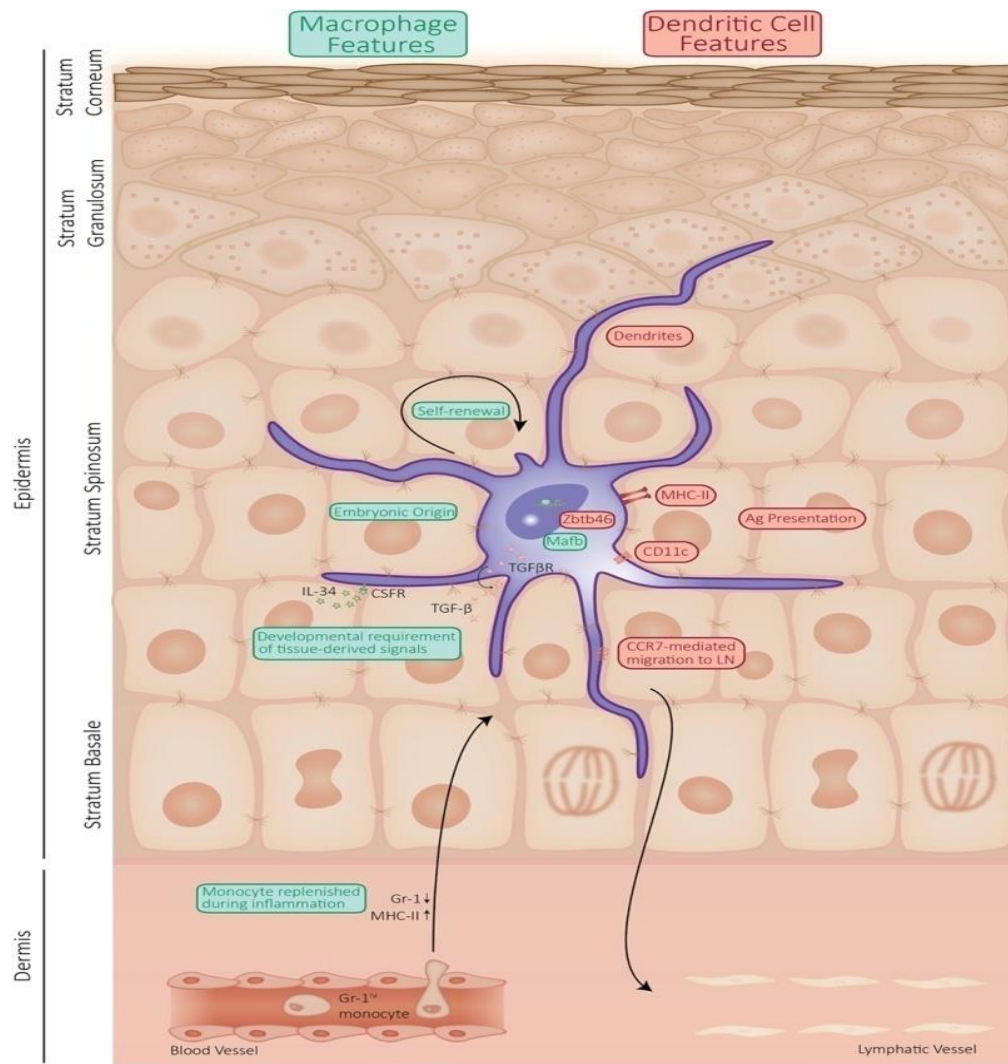
Το ερώτημα της προέλευσης του κυττάρου της νόσου έχει διερευνηθεί εξονυχιστικά. Η αρχική περιγραφή των κυττάρων Langerhans από τον Paul Langerhans πρότεινε ότι αυτά τα κύτταρα αποτελούν το 1% των κυττάρων της επιδερμίδας με χαρακτηριστικούς δενδρίτες που περιέγραψε ως νευρώνες.^{12,13} Τα κύτταρα παρέμειναν ένα αίνιγμα για τους επιστήμονες για δεκαετίες¹⁴ και χρειάστηκαν πάνω από 100 χρόνια για να καθιερωθεί η αιμοποιητική τους προέλευση, οι ομοιότητες τους με τα δενδριτικά κύτταρα και η λειτουργία τους στο ανοσοποιητικό σύστημα,¹⁵ μία ανακάλυψη που αναγνωρίστηκε με την απονομή του βραβείου Νόμπελ στον Dr Steinman το 2011.

Γνωρίζουμε πλέον ότι τα επιδερμικά κύτταρα Langerhans δεν είναι νευρώνες, αλλά δενδριτικά κύτταρα, μία ετερογενής ομάδα αιμοποιητικών κυττάρων. Στη δεκαετία του '70, οι Dr Steinman και Dr Cohn ξεχώρισαν τα δενδριτικά κύτταρα από τα μακροφάγα με βάση ειδικά μορφολογικά χαρακτηριστικά δενδριτικών κυττάρων και της ιδιαίτερης ικανότητας τους να παρουσιάζουν αντιγόνα και να ενεργοποιούν τα T λεμφοκύτταρα.¹⁵ Επιπλέον, τα επιδερμικά κύτταρα Langerhans είναι μοναδικά μεταξύ των δενδριτικών κυττάρων στο ότι δεν προέρχονται από τα πρόδρομα μυελοειδή κύτταρα στον μυελό των οστών,¹⁶ αλλά από πρόδρομα κύτταρα του λεκιθικού ασκού και προερχόμενα από το ήπαρ εμβρυϊκά μονοκύτταρα που μεταναστεύουν στο δέρμα πριν τη γέννηση και παραμένουν σε σταθερή κατάσταση (εικόνες 2 και 3).¹⁷



Εικόνα 2: Η προέλευση του επιδερμικού κυττάρου Langerhans από τα κύτταρα του λεκιθικού ασκού και τα εμβρυϊκά μονοκύτταρα του ήπατος <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01768>

Ωστόσο σε ένα σοβαρό τραυματισμό ή φλεγμονή, ενεργοποιημένα κύτταρα Langerhans κινητοποιούνται μέσω του υποδοχέα χημειοκινών CCR7 στους λεμφαδένες, όπου παρουσιάζουν το αντιγόνο στα T λεμφοκύτταρα και οδηγούνται σε απόπτωση ή απομακρύνονται με άλλους μηχανισμούς.¹⁸



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των ιδιοτήτων του κυττάρου Langerhans, ορισμένες εκ των οποίων κοινές με αυτές των δενδρικών κυττάρων και των μακροφάγων. (URL=<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00093>)

Οι ιστιοκυτταρικές διαταραχές γενικά χαρακτηρίζονται από τον κάτωθι κυτταρικό φαινότυπο: Η LCH μοιράζεται επιφανειακούς υποδοχείς με τα επιδερμικά κύτταρα Langerhans (CD1a+/CD207+), ενώ οι επιφανειακοί δείκτες του νεανικού ξανθοκοκκιώματος και της νόσου Erdheim–Chester είναι πιο χαρακτηριστικοί μακροφάγων (CD14+/CD68+/CD163+/FactorXIIIa–positive).¹⁹ Σε μερικές περιπτώσεις προκύπτει μία μεικτή διαταραχή στην οποία ξεχωριστές βλάβες έχουν διακριτούς φαινοτύπους ή μία μεμονωμένη βλάβη έχει μεικτό φαινότυπο.²⁰ Στις βλάβες της LCH, τα παθολογικά δενδρικά κύτταρα αποτελούν από λιγότερο του 1% μέχρι περισσότερο από 70% της κοκκιωματώδους βλάβης (μέσος όρος περίπου 8%).²¹ Το υπόλοιπο της βλάβης

αποτελείται από φλεγμονώδη κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των T κυττάρων σε ένα υπόβαθρο καταρράκτη κυττοκινών.²²

Λόγω των πολλών ομοιοτήτων των κυττάρων Langerhans και των κυττάρων της LCH, μεταξύ των οποίων η έκφραση δεικτών, όπως το CD1a και η ανεύρεση τους στην δερμοεπιδερμική συμβολή, προτάθηκε ότι τα κύτταρα της LCH σχετίζονται με τα κύτταρα Langerhans.²³ Ωστόσο, η πρώτη δεκαετία του 21ου αιώνα έφερε μία αναθεώρηση της αντίληψης ότι τα κύτταρα της LCH είναι μεταναστευτικά ιστικά δενδριτικά κύτταρα, εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους όσον αφορά τη λειτουργία τους. Συνεπώς είναι πλέον εμφανές ότι δεν σχετίζονται όλα τα κύτταρα της ιστοκυττάρωσης Langerhans με τα κύτταρα Langerhans, αλλά είναι εν μέρη σχετιζόμενα με τα δενδριτικά κύτταρα.²⁴

Τα κύτταρα Langerhans και τα κύτταρα της LCH έχουν κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, τα κοκκία Birbeck παρατηρούνται και στα φυσιολογικά κύτταρα Langerhans και στα κύτταρα της LCH. Οι δύο κυτταρικοί τύποι σχετίζονται περαιτέρω μεταξύ τους με την υψηλή έκφραση του CD1a και της Langerin. Ωστόσο, η απλή υπόθεση ότι τα κύτταρα της LCH προέρχονται από ώριμα κύτταρα Langerhans έχει πλέον αμφισβητηθεί μέσω γενετικών μελετών. Οι συγκρίσεις της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ των κυττάρων της LCH και των κυττάρων Langerhans δείχνουν ότι τα κύτταρα της LCH είναι σε σημαντικό βαθμό λιγότερο ώριμα από τα κύτταρα Langerhans, ενώ τα χαρακτηριστικά τους τα τοποθετούν μεταξύ των μυελοειδών δενδριτικών κυττάρων και των κυττάρων Langerhans.^{25,26} Η πρωϊμότερη έκφραση των υποδοχέων των χημειοκινών αποτελεί ένδειξη για την ανωριμότητα των κυττάρων της LCH, όπως επίσης και η έκφραση του CCR6, ο οποίος αποτελεί δείκτη ανώριμων δενδριτικών κυττάρων.²⁷

Οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης έχουν επίσης αναδείξει πολλές διαφορές μεταξύ των κυττάρων της LCH και των κυττάρων Langerhans: Τα κύτταρα της LCH εκφράζουν λιγότερο τους δείκτες EpCAM, E-cadherin και CD36 και υψηλότερα επίπεδα CD2, CD11b, CD11c, CD13, CD33, CD66c και CD300LF, δείκτες που σχετίζονται με τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα σε διάφορα στάδια ωρίμανσης. Επιπλέον, τα κύτταρα της LCH εκφράζουν υψηλά επίπεδα κυττοκινών και χημειοκινών συμπεριλαμβανομένου του SPP1 (οστεοποντίνη), μαζί με τους υποδοχείς CCR1 και NRP1, οι οποίοι επηρεάζουν την ικανότητα τους να προσελκύουν και να αλληλοεπιδρούν με τα T κύτταρα. Όταν απομονώνονται από τις βλάβες είναι σε ένα βαθμό ανώριμα, σε ένα περιβάλλον με

ηωσινόφιλα και ρυθμιστικά T κύτταρα. Επιπλέον, η ανεύρεση των μεταλλάξεων του γονιδίου BRAF στα κυκλοφορούντα πρόδρομα μυελοειδή κύτταρα κατευθύνει προς το μυελοειδές κύτταρο ως πρόδρομο του κυττάρου της LCH.²¹

Ως εκ τούτου, το παθολογικό κύτταρο της LCH προέρχεται από ένα πρόδρομο αιμοποιητικό κύτταρο, πιθανόν το μυελοειδές πρόδρομο κύτταρο του δενδριτικού κυττάρου και έχει χαρακτηριστικά του κυττάρου Langerhans.

Νεόπλασμα ή ανοσολογική διαταραχή;

Η αβεβαιότητα όσον αφορά ένα τόσο σημαντικό ερώτημα επικράτησε για μεγάλο διάστημα.

Η ενοποίηση των διαφόρων κλινικών εκδηλώσεων της LCH δημιουργεί μία ξεχωριστή νοσολογική οντότητα, αλλά ταυτόχρονα συμπεριλαμβάνει ένα μεγάλο φάσμα σημείων και συμπτωμάτων: ασθένειες με καλή έκβαση σε γενικές γραμμές, όπως το ηωσινοφιλικό κοκκίωμα, αλλά και νόσους που συμπεριφέρονται σαν κακοήθη νεοπλάσματα, όπως για παράδειγμα η νεογνική μορφή της νόσου Letterer-Siwe. Επιπλέον, υπάρχουν καταγεγραμμένες αναφορές αυτόματης ίασης ακόμα και σε πολυσυστηματικές μορφές της LCH σε νεογνά.

Γενικά, υπέρ της ανοσολογικής διαταραχής συνηγορούν οι ήπιες περιπτώσεις με αυτόματη ίαση, η ανταπόκριση στην αντιφλεγμονώδη αγωγή, οι εξάρσεις που σχετίζονται με λοιμώξεις, οι ενδείξεις παρουσίας ανώριμων κυττάρων Langerhans στις φλεγμονώδεις βλάβες, η απουσία κλωνικότητας στην πνευμονική LCH, η σποραδική νόσος στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, καθώς και η σημαντική διήθηση από κύτταρα φλεγμονής, όπως τα T κύτταρα και τα ηωσινόφιλα.²⁴

Από την άλλη πλευρά, τα σημεία που ευνοούν τη θεωρία της νεοπλασματικής νόσου είναι η κλωνικότητα των LCH κυττάρων, η παρουσία σωματικών γενετικών μεταλλάξεων, οι σπάνιες περιπτώσεις οικογενών μορφών με υψηλή επίπτωση σε μονοζυγωτικούς διδύμους και οι αναφορές διακοπής της ωρίμανσης των κυττάρων της νόσου *in vivo*.²⁹ Επιπλέον, βραχεία τελομερή και διαφορετικά μεγέθη τελομερών στην μονοσυστηματική σε αντίθεση με την πολυσυστηματική νόσο έχουν αναφερθεί σε κύτταρα της LCH, αλλά όχι σε φυσιολογικά δενδριτικά κύτταρα ή λεμφοκύτταρα των ίδιων ασθενών.³⁰

Κλωνικότητα και LCH

Το 1994 ο Dr William και οι συνεργάτες του μελέτησαν κύτταρα εκ των βλαβών της νόσου για πολυμορφισμούς του ανθρώπινου υποδοχέα ανδρογόνων και ανακατατάξεις στον υποδοχέα των T κυττάρων και ανέφεραν ενδείξεις για κλωνικότητα μεταξύ των παθολογικών κυττάρων Langerhans, αλλά όχι των T κυττάρων. Μετέπειτα δεδομένα έδειξαν ότι η LCH που εντοπίζεται στον πνεύμονα και διαγιγνώσκεται κατά βάση σε ενήλικες με ιστορικό καπνίσματος, βρέθηκε να είναι σε αρκετές περιπτώσεις πολυκλωνική (περίπου 29%).³¹

Υπάρχει σημαντική βιβλιογραφία σχετικά με τη σχέση της LCH με άλλες κακοήθειες όπως θα αναλυθεί και παρακάτω. Σε ασθενή που διεγνώσθη με ιστοκυττάρωση μετά από ΟΛΛ, και οι δύο ιστολογικές μελέτες είχαν την ίδια ανακατάταξη του γονιδίου σε υποδοχέα του T-κυττάρου (μετάλλαξη που ενεργοποιεί τον NOTCH-1).²⁵ Το μονοπάτι του NOTCH εμπλέκεται στην ανάπτυξη των T-κυττάρων και οι "gain of function" μεταλλάξεις σε αυτό το μονοπάτι είναι συχνές στην T-ΟΛΛ. Ο προσδέτης του NOTCH, JAG2, επίσης εκφράζεται στα κύτταρα της LCH. Επιπλέον, σε φυσιολογικά δενδρίτικα κύτταρα, η σηματοδότηση μέσω NOTCH πυροδοτείται είτε από το JAG2 είτε από άλλους προσδέτες που ωθούν την έκφραση συγκεκριμένων δεικτών των κυττάρων Langerhans, το οποίο συνεπάγεται ότι η "Langerhans Cell" φύση των κυττάρων της νόσου ίσως επάγεται στα πρόδρομα μυελοειδή κύτταρα από την σηματοδότηση NOTCH και ο αποκλεισμός αυτού του μονοπατιού θα μπορούσε να αποτελέσει μία θεραπευτική στρατηγική στην LCH.

Επομένως, η LCH είναι μία κλωνική διαταραχή και σε μερικές περιπτώσεις η LCH και η T-ΟΛΛ μπορεί να συμβούν ως κλωνικά σχετιζόμενες νόσοι με κοινό παθογενετικό υπόβαθρο, ευρήματα συμβατά με νεοπλασματική φύση της νόσου.

Γενετική και LCH

Οι κινητήριες μεταλλάξεις (driver mutations) οδηγούν στην έναρξη και την πρόοδο των κακοηθειών, ενώ οι τροποποιητικές (modifying mutations) ίσως συμβάλλουν σε διάφορα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά, όπως η φαρμακευτική αντίσταση. Μία ενεργοποιητική μετάλλαξη στο γονίδιο BRAF οδηγεί στην παραγωγή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης BRAF^{V600E}, η οποία έχει βρεθεί σε πάνω από το μισό των περιπτώσεων της

LCH, προτείνοντας ότι πρόκειται για μια κινητήρια μετάλλαξη της νόσου.³² Η πρωτεΐνη BRAF είναι μέλος της οικογένειας της κινάσης σερίνης/θρεονίνης RAF και αποτελεί ένα σημείο κλειδί στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK), το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων απαραίτητων για την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Η V600E (c.1799T>A transversion στο εξώνιο 15) είναι η πιο κοινή μετάλλαξη στο BRAF. Η συχνότητα της μετάλλαξης στην LCH ποικίλει από 25% σε 65%.³³

Η μετάλλαξη *BRAF*^{V600E} είναι η κινητήρια σε αρκετές κακοήθειες με τα υψηλότερα ποσοστά να ανευρίσκονται στην λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων, μία μορφή χρόνιας λευχαιμίας με χαρακτηριστική διήθηση του μυελού των οστών από τριχωτά κύτταρα θετικά στη χρώση TRAP και CD11c+, τα οποία φέρουν ομοιότητες με τα δενδριτικά κύτταρα. Άλλες κακοήθειες με ενεργοποιητικές BRAF μεταλλάξεις είναι το μελάνωμα, ο καρκίνος παχέος εντέρου, το Ca θυρεοειδούς και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα. Μεταλλάξεις στα γονίδια TP53 και MET έχουν επίσης βρεθεί. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS-RAF-MEK-ERK (όπου τα MEK και ERK είναι κινάσες) έχει αναφερθεί στο 100% των δειγμάτων ανεξάρτητα από την παρουσία της μετάλλαξης BRAF, υποστηρίζοντας ότι άλλα γονίδια ίσως φέρουν μεταλλάξεις και συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της LCH. Αυτή την άποψη υποστηρίζει και η έντονη χρώση του MEK-ERK ανεξάρτητα από το αν το BRAF είναι μεταλλαγμένο ή όχι. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η παρουσία της μετάλλαξης BRAF σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με νόσο Erdheim–Chester, αλλά όχι σε άλλες ιστοκυτταρώσεις.³⁴ Η επίπτωση της μετάλλαξης BRAF υποστηρίζει το χαρακτηρισμό της νόσου ως νεόπλασμα.

Οι αρχικές αναφορές ανέφεραν ότι δεν υπάρχει ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης της μετάλλαξης του BRAF με τα κλινικά χαρακτηριστικά, αλλά εν συνεχεία μία μελέτη με 100 παιδιατρικούς ασθενείς υποστήριξε ότι οι ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη έχουν υψηλότερα ποσοστά υποτροπής.³⁵ Αν και αρχικές αναφορές απέτυχαν στον εντοπισμό του *BRAF*^{V600E} στο περιφερικό αίμα με τη χρήση next generation sequencing,³⁶ ο Berres και οι συνεργάτες του κατάφεραν με τη χρήση PCR να εντοπίσουν τη μετάλλαξη σε ασθενείς με ενεργό πολυσυστηματική νόσο, αλλά όχι σε μονοσυστηματική νόσο.³⁷ Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η αξιολόγηση του κλινικού κινδύνου και η παρακολούθηση της απάντησης στη θεραπεία μπορούν να υποβοηθηθούν από την ανίχνευση του μεταλλαγμένου BRAF. Εξαιτίας τη δυσκολίας της ανίχνευσης της μετάλλαξης στις βλάβες

της LCH, ο Hyman και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν ένα droplet digital PCR assay στο πλάσμα και στα ούρα για την ποσοτική μέτρηση του μεταλλαγμένου BRAF σε μία ECD/LCH μελέτη.³⁸ Επειδή μόνο το 17% των ασθενών της μελέτης διαγνώσθηκε με LCH, αυτή η σχετικά εύκολη και μη επεμβατική μέθοδος πρέπει να μελετηθεί σε μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Επιπρόσθετα της μετάλλαξης V600E, το next generation sequencing έχει αποκαλύψει μεταλλάξεις στο BRAF που περιλαμβάνουν την V600D, την μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου 600DLAT, την γαμετική μετάλλαξη T599A, τις αφαιρέσεις στον τομέα της κινάσης (485_490LNVTPA>F, NVTAP486del και 486_491NVTAPT>K), και μία μετάλλαξη που αφορά το μάτισμα στο τέλος του εξωνίου 12 (R506_K507insLLR).^{39,40}

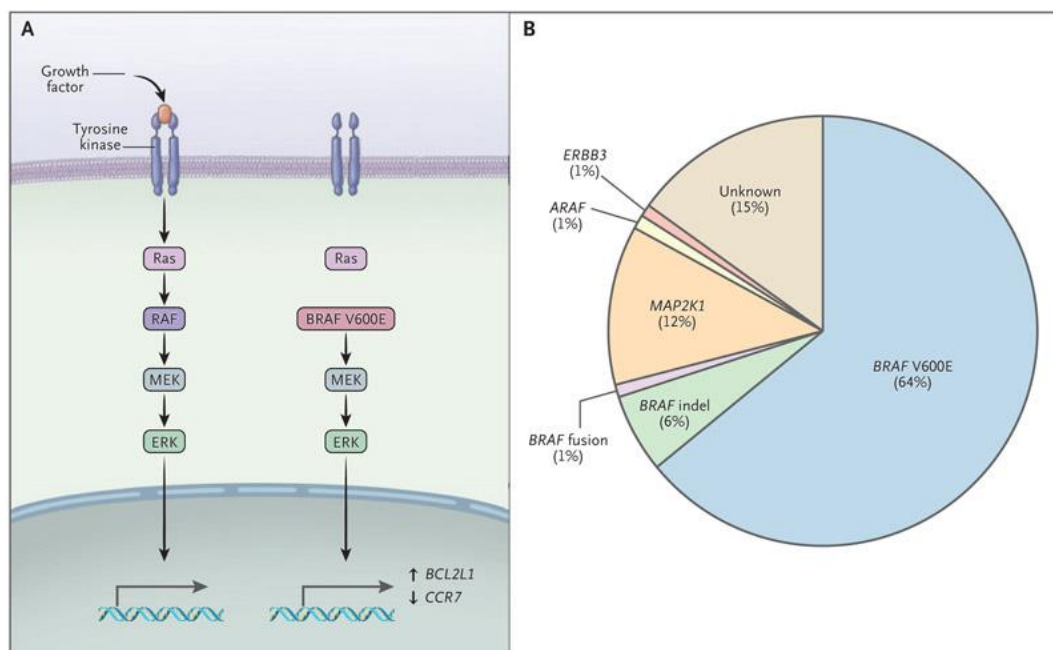
Η δραστηριότητα κινάσης αυτών των μεταλλάξεων δεν έχει πλήρως αξιολογηθεί, αλλά ίσως λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο με την *BRAF*^{V600E}, με συνέπεια την ενεργοποίηση του BRAF. Επιπρόσθετα η μετάλλαξη *BRAF*^{G466R} (missense mutation) στον τομέα κινάσης του BRAF, έχει περιγραφεί στην LCH, αν και η λειτουργία της είναι άγνωστη.⁴¹ Όσον αφορά τις μη LCH ιστιοκυττάρωσεις, η μετάλλαξη *BRAF*^{F595L} ταυτοποιήθηκε στο ιστιοκυτταρικό σάρκωμα και η μετάλλαξη BRAF-T599_V600delinsRE ταυτοποιήθηκε στην νόσο ECD.^{42,43}

Το δεύτερο σε συχνότητα μεταλλάξεων γονίδιο στην LCH είναι το *MAP2K1*, το οποίο είναι επίσης μέλος του μονοπατιού MAPK. Η κινάση *MAP2K1*, επίσης γνωστή ως MEK1, δρα μετά το BRAF στην σηματοδοτική οδό και συμβάλλει στην ενεργοποίηση των ERK1 και ERK2. Στην περίπτωση μεταλλάξεων BRAF και *MAP2K1* σε ασθενείς με LCH, η παρουσία της μίας αποκλείει αμοιβαία την άλλη, εύρημα το οποίο επιβεβαιώνει ότι οι μεταλλάξεις *BRAF* και *MAP2K1* δρουν στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι.

Μία μελέτη με χρήση whole exome και transcriptome sequencing σε ασθενείς με LCH και ECD ασθενείς ταυτοποίησε μία σύντηξη γονιδίων κινασών που περιλαμβάνουν τα BRAF, ALK και NTRK1, ένα εύρημα το οποίο ξεκάθαρα ταυτοποιεί νέους μηχανισμούς ενεργοποίησης μονοπατιών κινασών στην ιστιοκυττάρωση.⁴⁴ Αν και στη συγκεκριμένη μελέτη οι συντήξεις ανευρέθηκαν μόνο στους ασθενείς με ECD και όχι στην LCH, αναδεικνύουν την πιθανότητα σημαντικών δομικών γενομικών αλλαγών στην LCH.

Επιπλέον μελέτες με whole exome sequencing σε βλάβες LCH έχουν αποκαλύψει σε μικρότερο ποσοστό μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια του μονοπατιού MAPK, όπως το *ARAF*

(Εικόνα 2). Ενεργοποιητικές σωματικές μεταλλάξεις σε γονίδια υποδοχέων τυροσινικών κινασών (ERBB3), καθώς και στα γονίδια *NRAS* και *KRAS* έχουν επίσης αναφερθεί σε βλάβες LCH. Συγκεκριμένα, ο Nelson και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν μία ενεργοποιητική μετάλλαξη στο γονίδιο *ARAF* στον τομέα της κινάσης (F351L) καθώς και την έλλειψη Q347_A348del.⁴⁵ Ο Chakraborty και οι συνεργάτες του επίσης ταυτοποίησαν μία μετάλλαξη στο γονίδιο *ARAF* (T70M), η οποία συνυπήρχε με την μετάλλαξη *BRAF*^{V600E} σε ένα ασθενή με αλληλεπικαλυπτόμενη νόσο ECD/LCH.⁴⁶ Οι μη LCH ιστιοκυτταρώσεις έχουν γενικά μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων στο γονίδιο *ARAF*.⁴⁴ Μεταλλάξεις στον υποδοχέα τυροσινικής κινάσης ERBB3 (P921Q) έχουν επίσης αναφερθεί σε ασθενείς με ECD/LCH. Το σηματοδοτικό μονοπάτι ERK είναι ενεργοποιημένο σε όλα τα παθολογικά CD1a+ ιστιοκύτταρα σε ασθενείς με LCH ανεξάρτητα από την κατάσταση του BRAF, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ίσως και άλλες μεταλλάξεις είναι παρούσες στο μονοπάτι (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μεταλλάξεις στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK στην LCH και η συχνότητα των μεταλλάξεων που ενεργοποιούν το μονοπάτι σε μία παιδιατρική μελέτη. (Allen CE, Merad M, McClain KL. Langerhans-Cell Histiocytosis. *N England J Med* 2018;379(9):856-86)

Μόνο μία ενεργοποιητική μετάλλαξη στο *KRAS* σε ασθενείς με LCH (όχι σε μεμονωμένη προσβολή των πνευμόνων) έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα, ενώ οι μεταλλάξεις *N-RAS* είναι μοναδικά σχετιζόμενες με την πνευμονική LCH. Ο Mourah και οι συνεργάτες του

ανέλυσαν 26 πνευμονικές και 37 μη πνευμονικές βλάβες LCH για την παρουσία των μεταλλάξεων των *BRAF*, *MAP2K1*, *NRAS* και *KRAS*. Χρησιμοποιήθηκε επίσης φυσιολογικός ιστός πνεύμονα από 10 καπνιστές - μάρτυρες. Η μετάλλαξη *BRAF*^{V600E} παρατηρήθηκε σε 50% και 38% των πνευμονικών και μη πνευμονικών βλαβών αντίστοιχα. Επιπλέον, 40% των πνευμονικών βλαβών έφεραν τις μεταλλάξεις *NRAS* (Q61K) (/R), ενώ δεν ανευρέθηκαν μεταλλάξεις *NRAS* στις βιοψίες των μη πνευμονικών βλαβών της νόσου ή στα δείγματα των μαρτύρων. Σε 7 από τους 11 ασθενείς με μεταλλάξεις *NRAS*(Q61K) (/R), η *BRAF*^{V600E} ήταν επίσης παρούσα. Γονοτυπικές αναλύσεις CD1a θετικών περιοχών από τις ίδιες βλάβες πνευμονικού ιστού έδειξαν ότι οι συνυπάρχουσες μεταλλάξεις σε *BRAF* και *NRAS* αφορούσαν διαφορετικούς κυτταρικούς κλώνους. Οι μεταλλάξεις *NRAS*(Q61K) (/R) ενεργοποιούσαν τα μονοπάτια των *MAPK* και *AKT* (πρωτεϊνική κινάση Β). Η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο μεταλλάξεων *BRAF*^{V600E} και *NRAS*(Q61K) (/R) είχε σημαντική συσχέτιση με την έκβαση. Αυτά τα ευρήματα τονίζουν την σημασία του γενετικού ελέγχου του *NRAS* στις βλάβες της LCH στον πνεύμονα, καθώς η χρήση αναστολέων *BRAF* σε αυτά τα περιστατικά (με παρουσία και των δύο μεταλλάξεων) μπορεί να οδηγήσει σε παράδοση επιδείνωση της νόσου, ενώ οι αναστολείς της *MAPK* κινάσης σε βελτίωση.⁴⁷ Η επίδραση αυτών των προσφάτως ταυτοποιημένων μεταλλάξεων στην ενεργοποίηση του ERK παραμένει ασαφής.

Ένας από τους πιθανούς κινητήριους παράγοντες της νόσου πέρα από το μονοπάτι *MAPK*, είναι το μονοπάτι *PI3K* (*PI3K*-*AKT*-*mTOR*), το οποίο ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και αποτελεί σημείο κλειδί στην καρκινογένεση. Μέχρι σήμερα 3 παραλλαγές στο μονοπάτι *PI3K* έχουν αναφερθεί: *PICK1*, *PIK3R2*, και *PIK3CA*. Από αυτές, η μετάλλαξη *PIK3CA* (E542K) είναι η μόνη γνωστή ενεργοποιητική σωματική μετάλλαξη, η οποία οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού *PI3K*. Η μετάλλαξη *PIK3CA* αναφέρεται σε 10%-20% των περιπτώσεων ECD, ενώ μόνο μία περίπτωση έχει αναφερθεί στην LCH.^{48,49}

Επιπλέον έχουν παρατηρηθεί και κληρονομούμενες μεταλλάξεις γεννητικών κυττάρων στο γονίδιο *SMAD6*, οι οποίες έχουν περιγραφεί σε Λατινοαμερικάνους. Συγκεκριμένα το αλληλίο *SMAD6* rs12438941 έχει ανευρεθεί πιο συχνά σε Μεξικάνους και Περουβιανούς και οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Το αλληλίο βρίσκεται σε ένα ιντρόνιο μεταξύ των εξονίων 3 και 4. Τα SNPs στα ιντρόνια μπορούν να επηρεάσουν το

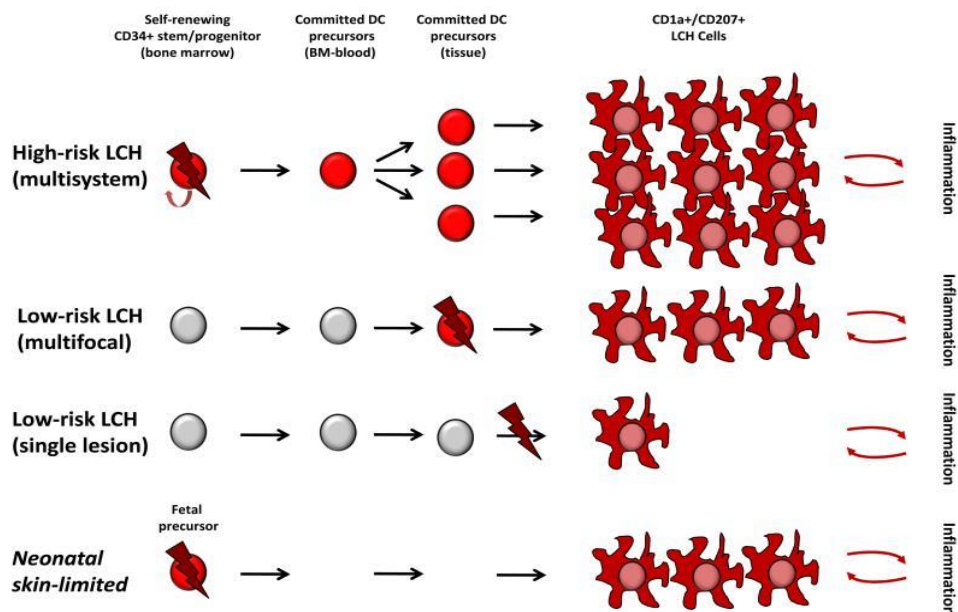
μάτισμα, οδηγώντας σε παραλλαγμένη δομή και λειτουργία του πρωτεϊνικού παραγώγου. Αν και αυτό το SNP δεν έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες για την LCH, αρκετοί πολυμορφισμοί του *SMAD6* σχετίζονται με διαταραχές βιολογικών γεγονότων συμπεριλαμβανομένου του κινδύνου εγκεφαλικής μετάστασης σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Η πρωτεΐνη *SMAD6* είναι ανασταλτική του BMP (bone morphogenetic protein) και του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- β (transforming growth factor- β)/ακτιβίνης. Τα BMP7-ALK3 (canonical BMP signaling) και TGF β 1-ALK5 (canonical TGF- β 1 signaling) εμπλέκονται στην διαφοροποίηση του επιδερμικού κυττάρου Langerhans από τα CD34⁺ αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα.^{50,51} Ενδιαφέρον πεδίο μελέτης αποτελεί η συσχέτιση των γενετικών αλλαγών με την παρουσία φλεγμονής στη νόσο. Το φλεγμονώδες περιβάλλον των ιστιοκυτταρικών βλαβών, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έχει πλέον επιβεβαιωθεί και οι πιθανές κλινικές εφαρμογές του αξιολογούνται. Συγκεκριμένα τα T κύτταρα και τα κύτταρα της LCH βρίσκονται σε κοντινή απόσταση στις βλάβες, όπου τα κύτταρα της νόσου επιδεικνύουν σημαντική έκφραση του CD40, ενώ τα T κύτταρα εκφράζουν το συνδέτη του CD40.⁵² Αυτή η αλληλεπίδραση ενεργοποιεί τα T κύτταρα, τα οποία αποτελούν τη βασική πηγή αιμοποιητικών αυξητικών παραγόντων και φλεγμονωδών κυττοκινών οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή κυττοκινών στην LCH, το οποίο πιθανότατα ευθύνεται για την κλινική εικόνα που προσομοιάζει με φλεγμονώδη διαταραχή.⁵³ Η ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS-RAF-MEK-ERK ίσως παρέχει νέες εξηγήσεις όσον αφορά τη συσχέτιση των φλεγμονωδών απαντήσεων στους όγκους με την εξέλιξη της νόσου. Η ιδέα ότι τα καρκινικά κύτταρα ίσως δημιουργούν ένα ανοσολογικά φλεγμονώδες περιβάλλον για να διατηρήσουν την επιβίωση τους είναι καλά καταγεγραμμένη.⁵⁴ Παραδείγματα αποτελούν η αυξημένη επίπτωση του καρκίνου παχέος εντέρου σε ασθενείς με IΦNE και του μελανώματος σε ασθενείς με φλεγμονώδεις διαταραχές του δέρματος. Πολλές κακοήθειες έχουν ενεργοποιημένο το μονοπάτι NOTCH, το οποίο όπως προαναφέρθηκε, συσχετίζεται με το μονοπάτι ERK, αν και η ακριβής σχέση τους παραμένει άγνωστη.^{55,56} Στην LCH ίσως η ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK να οδηγεί σε αυξημένες κυτταρικές φλεγμονώδεις απαντήσεις μέσω του μονοπατιού NOTCH. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στην υπόθεση ότι η φλεγμονώδης απάντηση που παρατηρείται στην LCH ίσως αποτελεί συνέπεια μεταλλάξεων στην οικογένεια RAF αντί για πρωταρχική αιτία της νόσου. Ωστόσο, οι μέχρι τώρα μελέτες δεν

μπορούν να αποκλείσουν ένα εναρκτήριο φλεγμονώδες γεγονός, το οποίο να οδηγεί για παράδειγμα σε δραστικές μορφές οξυγόνου.⁵⁷

Η παρουσία μεταλλάξεων στο *BRAF* ίσως παραδόξως να εξηγεί και τις περιπτώσεις αυτόματης ίασης στην LCH. Η έκφραση ογκογονιδίων στα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα οδηγεί σε απόπτωση, η οποία θεωρείται ότι είναι ένας προστατευτικός μηχανισμός από τις κακοήθειες. Στοιχεία που υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση προέρχονται από μελέτες σε σπίλους που εκφράζουν τη μετάλλαξη *BRAF^{V600E}*. Η καλοήθης φύση αυτών των βλαβών και η περιστασιακή αυτόματη ίαση έχει θεωρηθεί παράδειγμα επαγόμενης από τα ογκογονίδια γήρανσης *in vivo*. Είναι δυνατόν μερικά κύτταρα της νόσου να εκφράζουν την μετάλλαξη *BRAF^{V600E}* και να εισέρχονται σε αρκετούς κύκλους διαίρεσης που ακολουθούνται από επαγωγή γήρανσης ή απόπτωσης, η οποία θα ερμηνευόταν κλινικά ως αυτόματη ίαση. Ωστόσο, μία άμεση ένδειξη που να υποστηρίζει αυτό τον μηχανισμό παραμένει να βρεθεί.

Γενετική και προέλευση του κυττάρου

Σε συνέχεια της έρευνας για την αιμοποιητική προέλευση του κυττάρου της LCH, η ανάλυση δειγμάτων μυελού των οστών έδειξαν ότι η μετάλλαξη *BRAF^{V600E}* ήταν παρούσα στα CD34+ βλαστοκύτταρα και στα πρόδρομα κύτταρα (HSPC) σε μερικές, αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις ασθενών υψηλού κινδύνου. Πρέπει να αναφερθεί ότι στις μισές περιπτώσεις, όπου το *BRAF^{V600E}* είχε ταυτοποιηθεί στα δείγματα μυελού των οστών, η ιστολογική εξέταση είχε αναφερθεί ως φυσιολογική υποδεικνύοντας ότι η μετάλλαξη προέκυψε σε μορφολογικά φυσιολογικά πρόδρομα κύτταρα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι στις περιπτώσεις στις οποίες η μετάλλαξη *BRAF^{V600E}* ανευρέθηκε στα CD34+ HSPCs, μπορούσε να ανευρεθεί και στα κυκλοφορούντα CD19+ B κύτταρα, υποδεικνύοντας την εμπλοκή των πολυδύναμων βλαστοκυττάρων. Τα CD3+ T κύτταρα δεν είχαν ωστόσο επηρεαστεί αναφορικά με την διατήρηση της σχετικής τους ανεξαρτησίας από τον μυελό των οστών.²¹ Δεν είναι ξεκάθαρο, γιατί οι ίδιες κινητήριες μεταλλάξεις που προκύπτουν στα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα οδηγούν σε διαφορετικές νόσους. Πιθανές εξηγήσεις περιλαμβάνουν επιγενετικές αλλαγές ή επιπλέον τροποποιητικές σωματικές μεταλλάξεις στα προγονικά κύτταρα ή μεταλλάξεις σε διαφορετικά στάδια της αιμοποιητικής ανάπτυξης (Εικόνα 5).⁵⁹



Εικόνα 5: Το προτεινόμενο μοντέλο της παθογένεσης της LCH στο οποίο η σωματική μετάλλαξη και εν συνεχεία η ενεργοποίηση του ERK σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξης του δενδριτικού κυττάρου καθορίζει το κλινικό αποτέλεσμα. Η ενεργοποίηση του ERK σε ένα πρόδρομο κύτταρο / βλαστοκύτταρο στο μυελό των οστών έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει σε βλάβες σε αιμοποιητικά όργανα, στο ήπαρ και ουσιαστικά σε οποιοδήποτε όργανο οδηγώντας σε πολυσυστηματική νόσο με τη σωματική μετάλλαξη να ανιχνεύεται στο μυελό των οστών και στο αίμα. Αντίθετα, η ενεργοποίηση του ERK σε πιο προχωρημένα στάδια ανάπτυξης των προδρόμων κυττάρων μπορεί να δημιουργήσει πολλαπλές βλάβες σε ένα περιορισμένο αριθμό οργάνων, αλλά η σωματική μετάλλαξη δεν είναι συνήθως ανιχνεύσιμη στο μυελό των οστών ή στο αίμα κατά τη διάγνωση ή ακολούθως. Η ενεργοποίηση του ERK σε μετέπειτα στάδια της διαφοροποίησης, ακόμα και σε κύτταρα που βρίσκονται αποκλειστικά σε ένα ιστό ίσως οδηγήσει στην δημιουργία μεμονωμένων βλαβών. Με βάση πρόσφατα δεδομένα που περιγράφουν την προγεννητική προέλευση των μυελοειδών κυττάρων, είναι πιθανό η ενεργοποίηση του ERK να ξεκινά κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αυτό είναι υποθετικό, αλλά θα μπορούσε να εξηγήσει την αυτοϊούμενη νεογνική LCH (σύνδρομο Hashimoto Pritzker) στην οποία μεταλλαγμένα εμβρυϊκά πρόδρομα κύτταρα θα αντικαθίστανται από φυσιολογικά μυελοειδή κύτταρα μετά τη γέννηση. Σε όλα τα μοντέλα, προτείνεται ότι τα κύτταρα της LCH προσελκύουν και ενεργοποιούν φλεγμονώδη κύτταρα, τα οποία μπορεί να παρέχουν σήματα επιβίωσης και να παίζουν ρόλο στις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου. [Collin M, Bigley V, McClain KL, Allen CE. Cell(s) of Origin of Langerhans Cell Histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2015;29(5):825-838].

Ενεργοποιητικές σωματικές μεταλλάξεις σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και σε πρόδρομα μυελοειδή κύτταρα σε ασθενείς με LCH, μαζί με το σχηματισμό βλαβών υποκινούμενων από την *BRAF*^{V600E}, υποστηρίζουν την κατηγοριοποίηση της νόσου ως μυελογενούς νεοπλασίας. Παραλλαγμένοι κλώνοι δενδριτικών κυττάρων προσελκύουν φλεγμονώδη κύτταρα, που καταλήγουν σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε κυττοκίνες, το οποίο προωθεί την επιβίωση των κυττάρων της νόσου. Ως εκ τούτου προτείνεται ότι η LCH και οι σχετιζόμενες JXG και ECD ομοιάζουν με μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές.

Το αντίκτυπο της μετάλλαξης *BRAF*^{V600E}

Η μετάλλαξη *BRAF*^{V600E} διερευνήθηκε σε μία γαλλική μελέτη με παιδιατρικούς ασθενείς, στην οποία ανέλυσαν τις συσχετίσεις μεταξύ της παρουσίας της και της κλινικής εικόνας, της έκτασης της νόσου, της συχνότητας υποτροπής, της ανταπόκρισης στη θεραπεία και των μακροπρόθεσμων μόνιμων επιπτώσεων.⁵⁹ Μεταξύ 315 ασθενών με επιτυχώς καθορισμένο *BRAF* status, 173 (54.6%) έφεραν τη μετάλλαξη *BRAF*^{V600E}. Ασθενείς με τη μετάλλαξη εκδήλωσαν πιο σοβαρή νόσο από αυτούς με wild-type *BRAF*. Οι ασθενείς με τη μετάλλαξη αποτελούσαν το 87.8% των ασθενών (43 από τους 49) με πολυσυστηματική νόσο με εμπλοκή οργάνων υψηλού κινδύνου (ήπαρ, σπλήνας, αιμοποιητικό), 68.6% των ασθενών με πολυσυστηματική νόσο χωρίς εμπλοκή οργάνων υψηλού κινδύνου (35 από τους 51), 43.9% των ασθενών (86 από 196) με μονοσυστηματική LCH, και 42.1% των ασθενών (8 στους 19) με πνευμονική LCH. Η μετάλλαξη συσχετίστηκε επίσης με συμμετοχή οργάνων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μόνιμη, μη αναστρέψιμη βλάβη, όπως νευρολογικές βλάβες (75%) και βλάβες στην υπόφυση (72.9%). Επιπλέον, οι ασθενείς με την μετάλλαξη *BRAF*^{V600E} είχαν πιο συχνά αντίσταση στην συνδυαστική θεραπεία με βιμπλαστίνη και στεροειδή (21.9% vs. 3.3%; $P = 0.001$), είχαν υψηλότερη συχνότητα επανενεργοποίησης της νόσου (5-ετής ρυθμός επανενεργοποίησης, 42.8% έναντι 28.1%; $P = 0.006$), καθώς και συχνότερες μόνιμες συνέπειες από την νόσο ή τη θεραπεία (27.9% έναντι 12.6%; $P = 0.001$).

Αν και τα παιδιατρικά δεδομένα προτείνουν μία αυξημένη επίπτωση της μετάλλαξης *BRAF* στην υψηλού κινδύνου νόσο και την πολυσυστηματική νόσο,^{33,59} παρόμοια αποτελέσματα δεν έχουν διαπιστωθεί σε μεγάλες μελέτες ενηλίκων.^{60,61}

Κλινικές εκδηλώσεις της νόσου

Η κλινική παρουσίαση των ασθενών με LCH ποικίλει ανάλογα με τα σημεία και την έκταση της νόσου. Τα σημεία προσβολής και η έκταση της νόσου ποικίλουν τουλάχιστον σε σχέση με την ηλικία του ασθενούς.

Γενικά οι ασθενείς διαιρούνται σε δύο κατηγορίες με βάση την έκταση της νόσου:

1. **Μονοσυστηματική νόσος** – Οι ασθενείς μπορεί να είναι οποιασδήποτε ηλικίας και τυπικά δεν έχουν συστηματικά συμπτώματα (πχ απώλεια βάρους ή πυρετός). Μονοεστιακή ή πολυεστιακή εντόπιση μπορεί να βρεθεί σε ένα από τα κάτωθι όργανα/συστήματα: οστά, δέρμα, λεμφαδένες, πνεύμονες, ΚΝΣ ή άλλες σπάνιες εντοπίσεις (θυρεοειδής, θύμος αδένας).
2. **Πολυσυστηματική νόσος** – Δύο ή περισσότερα όργανα ή συστήματα με ή χωρίς εμπλοκή οργάνων υψηλού κινδύνου. Τα όργανα υψηλού κινδύνου περιλαμβάνουν το αιμοποιητικό σύστημα, το ήπαρ και το σπλήνα και προμηνύουν χειρότερη πρόγνωση. Αν και οι πνεύμονες είχαν θεωρηθεί όργανο υψηλού κινδύνου, πιο πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει ότι η προσβολή τους έχει μικρότερη επίδραση στην πρόγνωση.⁶⁴

Εκτεταμένη πολυσυστηματική νόσος με οξεία έναρξη συνήθως παρατηρείται στα παιδιά κάτω των 3 ετών, ενώ μια πιο ήπια κλινική εικόνα που περιλαμβάνει την προσβολή ενός μόνο οργάνου είναι πιο συνήθης στα μεγαλύτερα παιδιά και τους ενήλικες. Σε μία αναδρομική μελέτη με 1741 παιδιά με LCH παρατηρήθηκε συχνότερα προσβολή των οστών (77%) και ακολουθούν το δέρμα (39%), οι λεμφαδένες (19%), το ήπαρ (16%), ο σπλήνας (13%), ο στοματικός βλεννογόμος (13%), οι πνεύμονες (10%) και το ΚΝΣ (6%).⁶²

Τα συμπτώματα στους ενήλικες σε σειρά μειωμένης συχνότητας περιλαμβάνουν: εξάνθημα, δύσπνοια ή ταχύπνοια, πολυδιψία και πολουρία, οστικά άλγη, λεμφαδενοπάθεια, απώλεια βάρους, πυρετός, υπερτροφία ούλων, αταξία και διαταραχές μνήμης.⁶³ Παρατηρείται επικράτηση της μονοσυστηματικής πνευμονικής νόσου (40-50%) και ακολουθούν η πολυσυστηματική νόσος (35-50%), η μονοσυστηματική μονοεστιακή (15-20%) και μονοσυστηματική πολυεστιακή νόσος (5%).⁶⁴ Όσον αφορά την κατανομή της προσβολής οργάνων, η συμμετοχή των πνευμόνων

(50%) και των οστών (30-50%) αναφέρεται συχνότερα στους ενήλικες και ακολουθούν η υπόφυση και ο υποθάλαμος (25%), το ήπαρ (10-15%), ο σπλήνας (10-15%), το δέρμα (10-15%), οι λεμφαδένες (10-20%) και το ΚΝΣ (5-10%).

Ο ρυθμός ανάπτυξης της νόσου ποικίλει και το χρονικό διάστημα από τα πρώτα συμπτώματα μέχρι τη διάγνωση μπορεί να είναι μεγάλο. Πολλές φορές χρειάζονται ένα έως τέσσερα χρόνια πριν τη σωστή διάγνωση, ενώ τα συμπτώματα μπορεί να προηγούνται της διάγνωσης από 5 έως 20 έτη. Σε αυτή την περίπτωση, ο άποιος διαβήτης είναι συχνά το αρχικό σύμπτωμα, μερικές φορές ξεκινά κατά την παιδική ηλικία και δεν αναγνωρίζεται ως συνέπεια της νόσου μέχρι να προκύψουν και άλλα συμπτώματα κατά την πορεία της.

Κλινικές εκδηλώσεις ανά όργανο

1. Λυτικές οστικές βλάβες: Η συμμετοχή των οστών αναφέρεται στην πλειοψηφία των ασθενών με LCH. Αν και μερικές βλάβες είναι ασυμπτωματικές, ο ασθενής μπορεί να αναφέρει άλγος εντοπισμένο στο οστό, ενώ η κλινική εξέταση συνήθως αποκαλύπτει ένα μαλακό, ευαίσθητο σημείο. Ακτινολογικά ευρήματα τυπικά αποκαλύπτουν μία λυτική "runched out" εμφάνιση που μερικές φορές συνοδεύεται από μία μάζα μαλακού ιστού (Εικόνα 6). Η LCH μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε οστό και διαφορές παρατηρούνται ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς. Στα παιδιά, τα πιο συχνά σημεία προσβολής είναι το κρανίο (40%), το μηριαίο οστό, οι πλευρές, οι σπόνδυλοι, και το βραχιόνιο οστό. Αντιθέτως, τα κυρίαρχα σημεία της οστικής συμμετοχής στους ενήλικες είναι η γνάθος (30%), το κρανίο (21%), τα άκρα (17%), οι σπόνδυλοι (13%), η πύελος (13%), και οι πλευρές (6%).



Εικόνα 6: Μονήρης οστεολυτική βλάβη στο στέρνο σε CT θώρακα 38-χρονης γυναίκας που προσήλθε λόγω θωρακικού άλγους. (Fazio N, Spaggiari L, Pelosi G, et al. Langerhans' cell histiocytosis. Lancet 2005; 365:598. Copyright © 2005 Elsevier).

2. Δέρμα και στοματικός βλεννογόνος: Η συμμετοχή του δέρματος αφορά περίπου 40% των ασθενών. Οι συνηθέστερες δερματικές εκδηλώσεις είναι οι καφέ προς μωβ βλατίδες (συγγενή αυτοϊώμενη δικτυοϊστιοκυττάρωση - Εικόνα 7) και ένα εξάνθημα που προσομοιάζει με έκζεμα/καντιντίαση.



Εικόνα 7: Χαρακτηριστικές κοκκινοκαφέ βλατίδες στον θώρακα νεογνού με συγγενή αυτοϊώμενη δικτυοιστιοκυττάρωση (www.visualdx.com. Copyright VisualDx. All rights reserved).

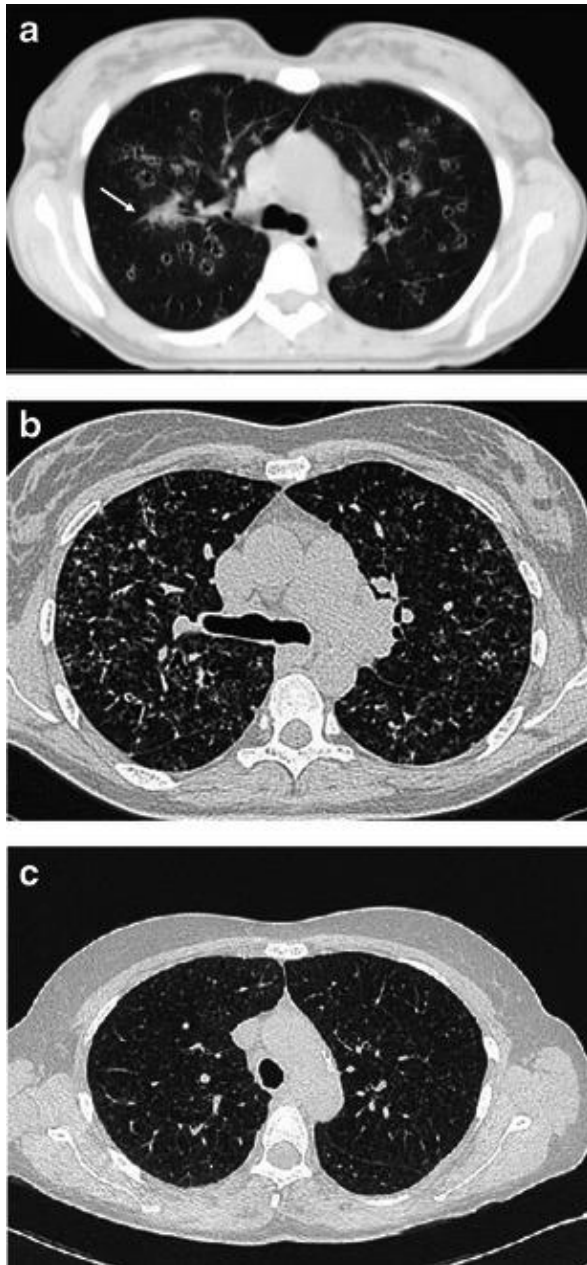
Οι στοματικές βλάβες: Οι πιο κοινές εκδηλώσεις είναι η απώλεια οδόντων, η ουλίτιδα, οι ενδοστοματικές μάζες και τα έλκη του στοματικού βλεννογόνου.

3. Λεμφαδένες και μυελός των οστών: Λεμφαδενοπάθεια παρατηρείται σε περίπου 20% των ασθενών. Οι αυχενικοί LNS εμπλέκονται συνηθέστερα. Υπάρχουν λιγότερα δεδομένα σχετικά με τη συχνότητα εμπλοκής μυελού των οστών σε ασθενείς με LCH, αλλά μία μελέτη διαπίστωσε ότι φτάνει το 34%.⁶⁵ Οι περισσότεροι ασθενείς με συμμετοχή του μυελού των οστών είναι μικρά παιδιά με διάχυτη νόσο σε ήπαρ, σπλήνα, λεμφαδένες και δέρμα. Μια μακροχρόνια υπόθεση ήταν ότι η διήθηση του μυελού των οστών ανευρίσκεται μόνο όταν υπάρχει σημαντική θρομβοκυτταροπενία, αναιμία ή ουδετεροπενία. Ωστόσο, αναλύσεις δειγμάτων μυελού των οστών που έχουν χρωματιστεί με αντι-CD1a έχουν αναδείξει την παρουσία κυττάρων της νόσου σε ασθενείς με πολυεστιακή νόσο των οστών και φυσιολογική γενική αίματος, καθώς και σε ασθενείς χαμηλού κινδύνου με μονοεστιακή νόσο. Επίσης, η ανάλυση για τη μετάλλαξη *BRAF*^{V600E} στο μυελό των οστών, όπως ήδη προαναφέρθηκε, αποκάλυψε την παρουσία μεταλλαγμένων κυττάρων σε ιστολογικά φυσιολογικά δείγματα.

4. Ήπαρ και σπλήνα: Το ήπαρ και ο σπλήνας είναι και τα δύο "όργανα υψηλού κινδύνου" και η συμμετοχή τους υποδηλώνει χειρότερη πρόγνωση. Η ηπατική συμμετοχή μπορεί να περιλαμβάνει μάζες ή κυστικές βλάβες ή ηπατομεγαλία και

μπορεί να συνοδεύεται από αυξημένα ηπατικά ένζυμα και ηπατική δυσλειτουργία, οδηγώντας σε υποαλβουμιναιμία με ασκίτη ή/και ανεπάρκεια παραγόντων πήξης. Μαζική σπληνομεγαλία μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροπενία λόγω υπερσπληνισμού.

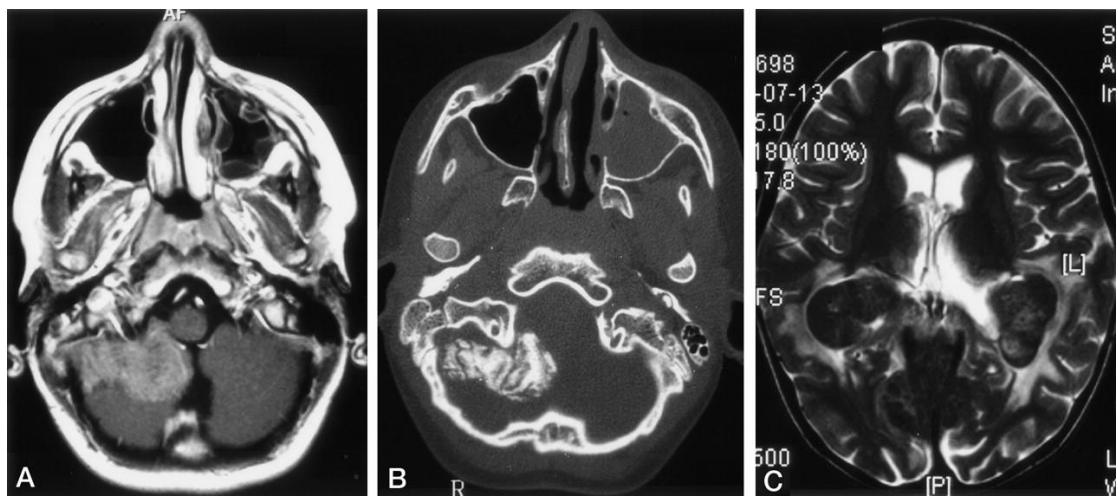
5. Πνεύμονες: Η συμμετοχή των πνευμόνων παρατηρείται σε περίπου 10% των περιπτώσεων. Είναι λιγότερο συχνή στα παιδιά απ' ό τι στους ενήλικες, με το κάπνισμα να αποτελεί βασικό αιτιολογικό παράγοντα. Ασθενείς με πνευμονική συμμετοχή μπορεί να παρουσιάσουν αυτόματο πνευμοθώρακα ή γενικά συμπτώματα, όπως μη παραγωγικό βήχα, δύσπνοια, θωρακικό άλγος, πυρετό ή απώλεια βάρους. Υποτροπιάζων αυτόματος πνευμοθώρακας εμφανίζεται στο 15%-25% των ασθενών. Σχεδόν το 20% των ενηλίκων με πνευμονική συμμετοχή δεν έχουν συμπτώματα. Η πιο ευαίσθητη διαγνωστική εξέταση είναι μια αξονική τομογραφία υψηλής ανάλυσης, η οποία συχνά αποκαλύπτει κύστες και οζίδια που αποτελούν χαρακτηριστικά της νόσου. Μια αξονική τομογραφία θώρακα υψηλής ευκρίνειας που δείχνει ένα συνδυασμό πολλαπλών κύστεων και οζιδίων, κυρίως στη μεσαία έως ανώτερη ζώνη και διάμεση πάχυνση σε νεαρό καπνιστή είναι τόσο χαρακτηριστική που μπορεί να είναι διαγνωστική της νόσου (Εικόνα 8). Εάν το ακτινογραφικό μοτίβο είναι μη διαγνωστικό, ο συνδυασμός της βιοψίας των πνευμόνων και του βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) που δείχνει αύξηση του αριθμού των θετικών κυττάρων CD1a υποδηλώνει έντονα πνευμονική LCH, ειδικά όταν περισσότερα από το 5% των κυττάρων στο BAL είναι CD1a θετικά.



Εικόνα 8: Διάφορες απεικονίσεις πνευμονικής LCH κατά τη διάγνωση: α) Μία 48χρονη γυναίκα, καπνίστρια, με ξηρό βήχα και χαμηλό πυρετό. Η CT ανέδειξε πολλαπλά οζίδια, τα οποία φέρουν σπήλαια και περιβάλλονται από ground glass βλάβες, ενώ παρατηρείται και πύκνωση (βέλος). β) Μία 46χρονη γυναίκα με ξηρό βήχα. Η HRCT ανέδειξε ένα διάχυτο μικροοζώδες πρότυπο, όζους με σπήλαια, κύστες και ήπια διάμεση πάχυνση. γ) Μία 50χρονη γυναίκα, καπνίστρια, με ξηρό βήχα. Η HRCT έδειξε κυστική νόσο με λίγα μικροοζώδη στοιχεία. (Castoldi MC, Verrioli A, De Juli E, Vanzulli A. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: the many faces of presentation at initial CT scan. *Insights Imaging*. 2014;5(4):483-492).

6. ΚΝΣ: Η LCH προσβάλλει το ΚΝΣ σε περίπου 6% των ασθενών κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Ωστόσο, ο κίνδυνος εμπλοκής του ΚΝΣ ποικίλλει ανάλογα με τη θέση εμπλοκής των οστών. Βλάβες των οστών του προσώπου ή των οστών του πρόσθιου ή μεσαίου κρανιακού βόθρου θέτουν σε κίνδυνο το ΚΝΣ με τη συμμετοχή του σε σχεδόν 25% των περιπτώσεων. Τα συμπτώματα που σχετίζονται με τη συμμετοχή του ΚΝΣ ποικίλλουν ανάλογα με το σημείο της νόσου. Οι πιο συχνές εκδηλώσεις είναι ο

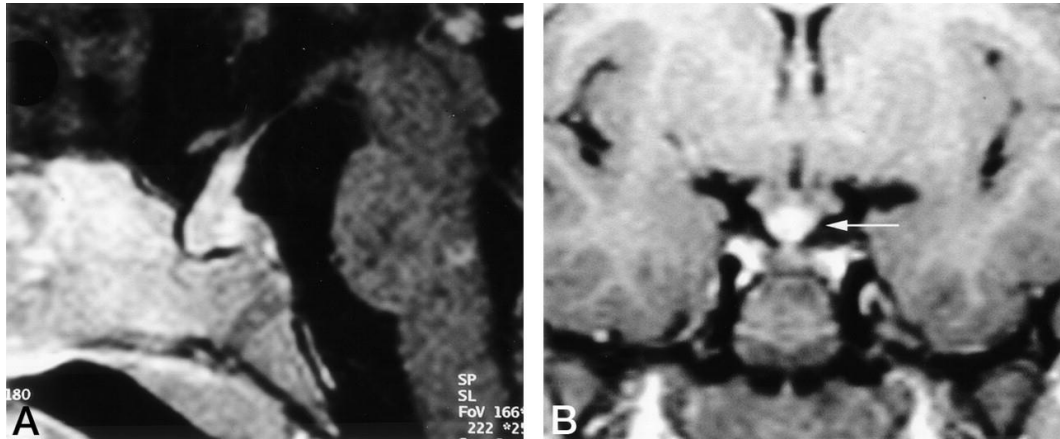
άποιος διαβήτης και τα συμπτώματα νευροεκφυλιστικής νόσου (για παράδειγμα αταξία, γνωστική δυσλειτουργία). Οι ασθενείς μπορεί επίσης να έχουν πρόπτωση οφθαλμών. Ο άποιος διαβήτης παρουσιάζεται συνήθως με πολυδιψία και πολουρία. Εμφανίζεται λόγω διήθησης της οπίσθιας υπόφυσης. Περίπου το 1% με LCH αναπτύσσουν μαζικές βλάβες ή κοκκιώματα στο εγκεφαλικό παρέγχυμα ή στο χοριοειδές πλέγμα, με το τελευταίο να οδηγεί σε απόφραξη της ροής του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (εικόνα 9).⁶⁶



Εικόνα 9: A και B, Βλάβες σε ασθενή 3 ετών με LCH. Μάζα που εξορμάται από τη μήνιγγα με παρουσία αβεστοποίησης. C, Βλάβη στο χοριοειδές πλέγμα σε ένα κορίτσι 6 ετών με ιστορικό LCH από την ηλικία των 2 ετών. [Associated with Langerhans Cell Histiocytosis. Daniela Prayer, Nicole Grois, Helmut Prosch, Helmut Gadner and Anthony J. Barkovich. American Journal of Neuroradiology May 2004, 25 (5) 880-891].

7. Άποιος διαβήτης και άλλες ενδοκρινοπάθειες: Η δυσλειτουργία της οπίσθιας υπόφυσης έχει περιγραφεί σε έως 20% των ασθενών με LCH, και συνήθως σχετίζεται με άποιο διαβήτη. Ωστόσο, η λειτουργία της οπίσθιας υπόφυσης δεν έχει μελετηθεί συστηματικά σε ενήλικες με LCH και οι περισσότερες πληροφορίες προέρχονται από μελέτες σε παιδιά. Η οπίσθια υποφυσιακή ανεπάρκεια στην LCH συσχετίζεται σχεδόν πάντα με άποιο διαβήτη, ενώ ελάχιστες μόνο περιπτώσεις υποφυσιακής ανεπάρκειας χωρίς άποιο διαβήτη έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία. Ο άποιος διαβήτης είναι η συχνότερη ενδοκρινολογική εκδήλωση της νόσου και ανευρίσκεται σε 30% όλων των ασθενών, στο 40% των ασθενών με πολυσυστηματική νόσο και στο 94% των ενηλίκων με άλλη ορμονική υποφυσιακή ανεπάρκεια. Αν και μπορεί να ακολουθεί τη διάγνωση

της νόσου, συνήθως προηγείται αυτής, ακόμα και πολλά έτη πριν τη διάγνωση. Συσχετιζόμενα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν την πολυσυστηματική νόσο με κρανιακές βλάβες, κυρίως στο κροταφικό ή στο μετωπιαίο οστό με ενδοκράνια επέκταση του όγκου. (εικόνα 10).



Εικόνα 10: A, Πάχυνση του μίσχου της υπόφυσης σε ένα κορίτσι 2 ετών με διάγνωση LCH από έτους και πρόσφατη έναρξη συμπτωμάτων συμβατών με άποιο διαβήτη. B, Απεικόνιση 6χρόνου κοριτσιού 2 έτη μετά τη διάγνωση άποιου διαβήτη. Παρατηρείται πάχυνση του μίσχου της υπόφυσης. MR Imaging Presentation of Intracranial Disease Associated with Langerhans Cell Histiocytosis. Daniela Prayer, Nicole Grois, Helmut Prosch, Helmut Gadner and Anthony J. Barkovich. American Journal of Neuroradiology May 2004, 25 (5) 880-891.

Η ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης αφορά σχεδόν το 40% των προσβεβλημένων παιδιών και έως το 50% των ασθενών με άποιο διαβήτη και σχετίζεται με την διήθηση του υποθαλάμου από ιστιοκύτταρα. Συχνά αποτελεί την πρώτη ενδοκρινολογική ανεπάρκεια επιπρόσθετα του άποιου διαβήτη, συνήθως εντός έτους από τη διάγνωση του τελευταίου. Η καθυστέρηση της αύξησης, αν και έχει περιγραφεί στο παρελθόν, θεωρείται σπάνια εκδήλωση της LCH, αλλά θα πρέπει να ληφθεί υπόψη σε παιδιά με LCH και άποιο διαβήτη. Οι ενήλικες με έλλειψη GH παρουσιάζουν συχνά αύξηση της ευεξίας και ένα ευνοϊκότερο μεταβολικό προφίλ ως απάντηση στη θεραπεία με αυξητική ορμόνη, για αυτό και η αξιολόγηση της ανεπάρκειας μπορεί να αποτελεί σημαντικό βήμα στην διαχείριση των ενηλίκων ασθενών. Υπάρχουν λίγες μόνο αναφορές όσον αφορά τη λειτουργία των γονάδων σε ενήλικες ασθενείς με LCH, ενώ οι περισσότερες μελέτες αφορούν παιδιά προ της εφηβείας. Αν και οι αρχικές μελέτες σε ενήλικες με LCH και άποιο διαβήτη απέτυχαν να αναδείξουν ανωμαλίες στην έκκριση των γοναδοτροπινών, φαίνεται να αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη υποφυσιακή ανεπάρκεια που παρουσιάζεται σε ασθενείς με άποιο διαβήτη και

εκδηλώνεται είτε με διαταραχές εμμήνου ρύσεως στις γυναίκες είτε με μειωμένη libido στους άνδρες. Παρομοίως, η ανεπάρκεια της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης μπορεί να αποτελεί μέρος της υποφυσιακής ανεπάρκειας σε ασθενείς με LCH και σχετίζεται σχεδόν πάντα με πανυποφυσισμό. Η ανεπάρκεια της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) παρουσιάζεται κυρίως στα πλαίσια γενικευμένης προσβολής της υπόφυσης αν και λίγες περιπτώσεις μεμονωμένης ανεπάρκειας ACTH έχουν περιγραφεί.⁶⁷

Η συμμετοχή του θυρεοειδή αδένος είναι σπάνια με ελάχιστες περιπτώσεις στην βιβλιογραφία να περιλαμβάνουν βρογχοκήλη και σε ορισμένες περιπτώσεις υποθυρεοειδισμό. Η παγκρεατική διήθηση έχει επίσης αναφερθεί αλλά χωρίς προφανή δυσλειτουργία.⁶⁷

8.Γαστρεντερικό σύστημα: Η γαστρεντερική συμμετοχή της LCH είναι ασυνήθιστη. Περίπου 2% των ασθενών παρουσιάζουν διαρροϊκές κενώσεις ή δυσσαπορρόφηση. Η διάγνωση της γαστρεντερικής συμμετοχής είναι δύσκολη λόγω της διαλείπουσας παρουσίας των βλαβών της νόσου στο γαστρεντερικό σωλήνα. Απαιτείται προσεκτική ενδοσκοπική εξέταση με βιοψίες. Ένα case report και μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για την γαστρεντερική LCH διαπίστωσαν ότι το 64% εντοπιζόταν στο ορθό, το σιγμοειδές ή άλλα σημεία του παχέος εντέρου.⁶⁸ Έχουν αναφερθεί δέκα ενήλικες ασθενείς με γαστρεντερική συμμετοχή, οι μισοί εκ των οποίων ήταν ασυμπτωματικοί με μέση ηλικία τα 58 έτη, ενώ το 75% ήταν γυναίκες.⁶⁹

Η LCH στους ενήλικες

Τα χαρακτηριστικά της νόσου έχουν περιγραφεί αναλυτικά στα παιδιά, παραμένουν ωστόσο ασαφώς καθορισμένα στους ενήλικες. Από τον Ιανουάριο του 2000 μέχρι τον Ιούνιο του 2001, 274 ενήλικες από 13 χώρες με αποδεδειγμένη μέσω βιοψίας νόσο, καταγράφηκαν στο International Histiocyte Society Registry. Η συλλογή πληροφοριών περιλάμβανε τη συμπτωματολογία κατά τη διάγνωση, το οικογενειακό ιστορικό, ιατρικό ιστορικό, ιστορικό καπνίσματος και θεραπευτικές παρεμβάσεις με σκοπό τη βελτίωση της μελλοντικής διαχείρισης αποφάσεων σε ασθενείς 18 ετών και άνω. Παρατηρήθηκε μικρή υπεροχή των ανδρών (143 άνδρες:126 γυναίκες), ενώ η μέση ηλικία (+/- τυπική απόκλιση) κατά τη έναρξη των συμπτωμάτων και τη διάγνωση ήταν 33 έτη (+/- 15 έτη) και 35 έτη (+/- 14 έτη),

αντίστοιχα. Ένας ασθενής είχε οικογενειακό ιστορικό LCH, ενώ 129 ήταν καπνιστές (47.1%) και 17 (6.2%) είχαν προηγηθέν ιστορικό κακοήθειας. Μονοσυστηματική LCH ανευρέθηκε σε 86 ασθενείς (31.4%) και συμπεριελάμβανε μεμονωμένη πνευμονική συμμετοχή σε 44 περιπτώσεις, ενώ 188 ασθενείς (68.6%) είχαν πολυσυστηματική νόσο και 81 ασθενείς (29.6%) είχαν άποιο διαβήτη. Η αρχική θεραπεία βασιζόταν στο σχήμα βιμπλαστίνης με ή χωρίς στεροειδή, σε 82 ασθενείς (29.9%), συμπεριλαμβανομένων 9 που ελάμβαναν και ετοποσίδη, ενώ 19 ασθενείς έλαβαν μονοθεραπεία με ετοποσίδη. Σε ένα μέσο follow-up 28 μηνών από τη διάγνωση, 15 ασθενείς (6.4%) είχαν αποβιώσει (ρυθμός, 1.5/100 άτομα έτη, 95% όρια αξιοπιστίας (95% CI 0.9-2.4). Η πιθανότητα 5ετούς επιβίωσης μετά τη διάγνωση ήταν 92.3% (95% CI 85.6-95.9), 100% για ασθενείς με μονοσυστηματική νόσο (n=37), 87.8% (95% CI 54.9-97.2) για μεμονωμένη πνευμονική νόσο (n=34), και 91.7% (95% CI 83.6-95.9) για πολυσυστηματική νόσο (n=163). Η επιβίωση δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ ασθενών με πολυσυστηματική νόσο με ή χωρίς συμμετοχή του ήπατος ή των πνευμόνων με 5ετή επιβίωση 93.6% (95% CI 84.7-97.4) έναντι 87.5% (95% CI 65.5-95.9), αντίστοιχα, p value 0.1).⁷⁰

LCH και συνύπαρξη άλλων κακοηθειών

Ο Ma και οι συνεργάτες του κατέγραψαν την πρώτη μεγάλη μελέτη όσον αφορά τη συσχέτιση της LCH με επιπλέον κακοήθειες. Συνολικά 132 ασθενείς άνω των 18 ετών με ιστολογική διάγνωση LCH εκτιμήθηκαν στο κέντρο τους μεταξύ 1990 και 2015, εκ των οποίων 42 (32%) είχαν μία επιπλέον κακοήθεια. Καταγράφηκαν 53 κακοήθειες μεταξύ των 42 ασθενών, με 31 (58%) να προηγούνται της διάγνωσης της LCH, 11 ταυτόχρονες (≤ 3 μήνες από τη διάγνωση της LCH, 21%) και 11 (21%) να έπονται. Η μέση ηλικία ήταν 54 έτη (εύρος 28-89 ετών) με μέσο follow-up 3.7 έτη (0.1-22.2). Η επιβίωση μετά από 3 έτη ήταν 98% για τους ασθενείς με LCH και 82% μεταξύ των ασθενών με επιπλέον κακοήθεια. Συμπαγείς όγκοι, λέμφωμα και άλλες αιματολογικές κακοήθειες καταγράφηκαν ως εξής: 39 (74%), 9 (17%) και 5 (9%). Οι κακοήθειες του πνεύμονα και του μαστού ήταν οι συχνότερες όσον αφορά τους συμπαγείς όγκους. Το γεγονός ότι τα περισσότερα περιστατικά αφορούσαν προηγηθείσες ή ταυτόχρονες κακοήθειες υπονοεί μία αιτία ανεξάρτητη από τις ανεπιθύμητες ενέργειες της θεραπείας της LCH. Άλλωστε κανένας ασθενής στην μελέτη τους

δεν έλαβε ετοποσίδη. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν μεγαλύτερη συχνότητα κακοηθειών στους ενήλικες με LCH σε σχέση με τα παιδιά και ένα προφίλ ογκογένεσης με βάση την ηλικία. Επιπλέον στους ενήλικες η επίπτωση των συμπαγών όγκων υπονοεί ένα διακριτό προφίλ συμπαγών κακοηθειών στην ενήλικη LCH σε αντίθεση με τις αιματολογικές κακοήθειες που παρατηρούνται στην παιδιατρική νόσο.⁷¹

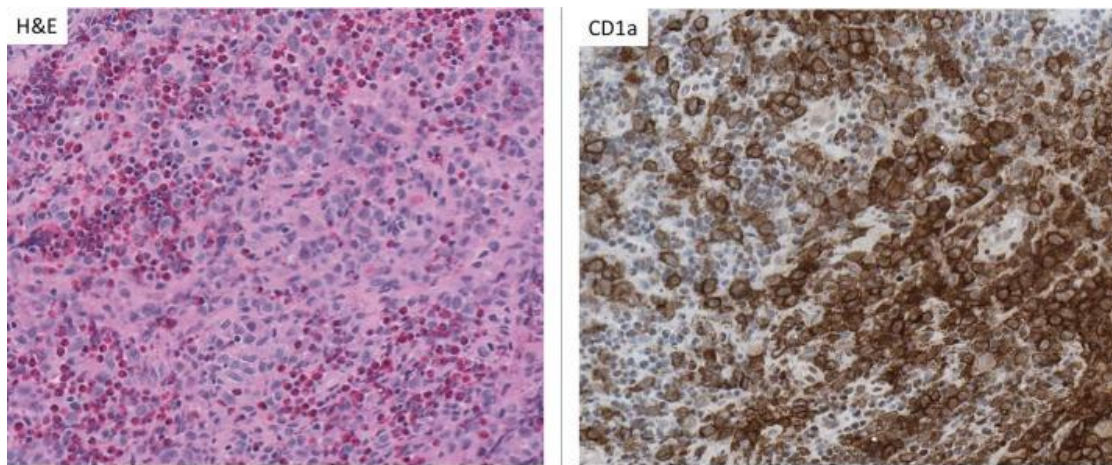
Μια υποθετική συσχέτιση της LCH και των επιπλέων κακοηθειών αφορά μία συστηματική φλεγμονώδη διαδικασία, ίσως ήπια και χρόνια που προηγείται και των δύο νόσων και υποστηρίζεται και από την παρουσία αυξημένων κυττοκινών και αυξητικών παραγόντων στην LCH. Στους ασθενείς με πνευμονική LCH και κακοήθεια πνεύμονα, το κάπνισμα είναι πιθανό να εμπλέκεται στην ανωτέρω διαδικασία. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις σε BRAF/ERK μπορεί να ευθύνονται για την ογκογένεση σε αυτούς τους ασθενείς. Η περαιτέρω διερεύνηση της βιολογίας της νόσου αναμένεται να διευκρινίσει τους μηχανισμούς αυτής της αυξημένης συσχέτισης.

Ιστολογική εξέταση

Η LCH διαγιγνώσκεται με βάση τη βιοψία, με την παθολογοανατομική εξέταση του εμπλεκόμενου ιστού που ερμηνεύεται εντός του κλινικού πλαισίου. Γενικά προτιμάται η βιοψία οστεολυτικής οστικής βλάβης ή δερματικής βλάβης. Η βιοψία της υπόφυσης μπορεί να απαιτείται για την οριστική διάγνωση μιας μονήρους βλάβης της υπόφυσης, αλλά είναι επεμβατική και εξαρτάται από το μέγεθος της βλάβης και την εμπειρία του νευροχειρουργού. Για ασθενείς με υποψία νόσου περιορισμένης στην υπόφυση, η ταυτοποίηση του *BRAF*^{V600E} στο περιφερικό αίμα ή στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό μπορεί να υποστηρίξει τη διάγνωση, αν και δεν διακρίνει την LCH από τη νόσο Erdheim-Chester. Σε τέτοιες περιπτώσεις είναι λογικό να ξεκινήσει εμπειρική θεραπεία με παρακολούθηση της ανταπόκρισης της νόσου με MRI. Ενώ τα κύτταρα Langerhans μπορούν να αναγνωριστούν με βάση μορφολογικά κριτήρια, η ταυτότητά τους πρέπει να επιβεβαιωθεί είτε με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για CD1a και CD207 είτε με την ταυτοποίηση των κοκκίων Birbeck με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (εικόνα 11).⁶³

Οι βιοψίες του εμπλεκόμενου ιστού συνήθως χαρακτηρίζονται από διήθηση από κύτταρα Langerhans, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, μικρά λεμφοκύτταρα και ιστιοκύτταρα (τα οποία

μπορεί να σχηματίζουν πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα). Στα ηωσινοφιλικά αποστήματα μπορεί να παρατηρείται κεντρική νέκρωση με ή χωρίς κρυστάλλους Charcot-Leyden. Μορφολογικά, τα κύτταρα Langerhans είναι μεγάλα οβάλ μονοπύρρηνα κύτταρα με λίγα κυτταροπλασματικά κενοτόπια, λίγο ή καθόλου φαγοκυτταρικό υλικό και ελαφρώς ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα, εκφράζουν τους δείκτες των ιστοκυττάρων CD1a, S100 και CD207 (langerin) και περιέχουν κοκκία Birbeck. Τα κοκκία Birbeck είναι ενδοκυτταροπλασματικά οργανίδια σε σχήμα ράβδου που μπορούν να αναδειχθούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.⁷²



Εικόνα 11: (Αριστερά) Χρώση ηωσίνης - αιματοξυλίνης, η οποία αναδεικνύει μεγάλα κύτταρα με άφθονο ηωσινοφιλικό κυτταρόπλασμα και ανώμαλους πυρήνες καθώς και εμπύρρηνα γιγαντοκύτταρα. (Δεξιά) Ιστολογική εξέταση θετική για LCH με χρώση για το αντίσωμα CD1a. (Zachary C. Gersey, Ian Zheng, Amade Bregy, Nitin Agarwal, Ricardo J. Komotar, Intracranial Langerhans cell Histiocytosis: A review, Interdisciplinary Neurosurgery, Volume 21, 2020, 100729, +ISSN 2214-7519)

Θεραπευτική αντιμετώπιση

Δεν υπάρχει σταθερό πρωτόκολλο για τη θεραπεία της LCH των ενηλίκων και δεν έχουν διενεργηθεί προοπτικές μελέτες σε αυτό τον πληθυσμό. Η θεραπεία ποικίλει εξαιτίας της ετερογενούς κλινικής εικόνας, ενώ οι συστάσεις βασίζονται στην εμπλοκή οργάνων και την έκταση της νόσου.

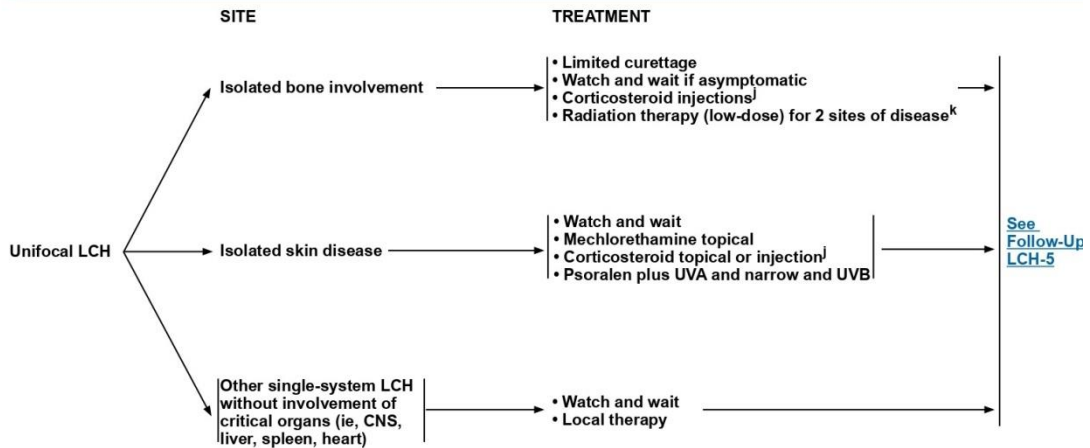
- 1. Θεραπεία πρωτοπαθούς νόσου περιορισμένης στον πνεύμονα:** Η διακοπή του καπνίσματος αποτελεί προτεραιότητα σε αυτή την κατηγορία ασθενών. Στους μη καπνιστές ή τους ασθενείς με προοδευτική νόσο παρά τη διακοπή του καπνίσματος, η συστηματική θεραπεία με στεροειδή ή κλαδριβίνη (2-CdA) θα μπορούσε να είναι μία χρήσιμη επιλογή. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ακτινοθεραπεία δεν είναι

χρήσιμη στην PLCH. Η μεταμόσχευση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με πολύ επιθετική νόσο με μη αναστρέψιμες βλάβες πνεύμονα ή σοβαρή πνευμονική υπέρταση.

2. **Θεραπεία μονοσυστηματικής νόσου:** Τοπικές θεραπείες συνιστώνται στην μεμονωμένη νόσο του δέρματος ή οστών. Η χειρουργική εξαίρεση της βλάβης χρησιμοποιείται σε περιορισμένο αριθμό περιστατικών με μεμονωμένη βλάβη δέρματος. Σε νόσο περιορισμένη στο δέρμα, συστήνεται εβδομαδιαία χορήγηση μεθοτρεξάτης (MTX) με ή χωρίς 6-μερκαπτοπουρίνη ή αζαθειοπρίνη. Αποτελεσματικές θεραπείες φωτός για νόσο δέρματος έχουν επίσης αναφερθεί. Σε αντίθεση με τους παιδιατρικούς ασθενείς, η ακτινοθεραπεία στην μονοσυστηματική νόσο με οστικές βλάβες εφαρμόζεται στους ενήλικες με αποδεκτό αριθμό ανεπιθύμητων ενεργειών. Πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι η υδροξυουρία με ή χωρίς MTX και τα διφωσφονικά μπορεί να είναι αποτελεσματικά σε μονοσυστηματική νόσο με πολλαπλές οστικές βλάβες. Ωστόσο, σε ασθενείς με πολυεστιακή οστική νόσο, συστηματική θεραπεία ανάλογη με αυτής που χορηγείται στην πολυσυστηματική νόσο χρησιμοποιείται συχνά σαν αρχική θεραπεία.
3. **Θεραπεία πολυσυστηματικής νόσου:** Συστηματική θεραπεία συστήνεται για την πολυσυστηματική νόσο καθώς και την πολυεστιακή οστική νόσο. Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός βιμπλαστίνης και πρεδνιζόνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί όπως στη παιδιατρική νόσο.
Οι ενήλικες εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξικότητα από τα παιδιά, με αποτέλεσμα μία πτωχή συνολική απάντηση. Η κυτταραβίνη ή το 2-CdA ίσως να είναι προτιμότερα ως θεραπεία πρώτης γραμμής. Για ασθενείς με βλάβες ΚΝΣ, πρωτοπαθείς ή ανθεκτικές ή υποτροπιάζουσες μορφές της νόσου, η 2-CdA και η κυτταραβίνη προτιμώνται λόγω της διείσδυσης τους στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αναδρομικές αναλύσεις βραχέων χημειοθεραπευτικών σχημάτων με MTX, δοξορουβικίνη, κυκλοφωσφαμίδη, βινκριστίνη, πρεδνιζόνη και μπλεομυκίνη σε επιθετική νόσο στους ενήλικες υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητά τους. Ωστόσο η εντατική θεραπεία πρέπει να περιορίζεται σε πολύ σοβαρή νόσο. Η αλλογενής μεταμόσχευση του μυελού των οστών ήταν επιτυχής σε μερικές επιθετικές περιπτώσεις.
4. **Θεραπεία υποθαλαμικής/υποφυσιακής νόσου:** Οι μάζες συχνά αντιμετωπίζονται με βιμπλαστίνη / πρεδνιζόνη ή 2-CdA. Ανεξάρτητα από την θεραπεία, στις

περισσότερες περιπτώσεις ο άποιος διαβήτης ή η ορμονική δυσλειτουργία δεν αναστρέφεται και απαιτεί ορμονική υποκατάσταση.

5. **Στοχευμένες Θεραπείες:** Το imatinib, ένας αναστολέας τυροσινικής κινάσης, είναι αποτελεσματικό στην ανθεκτική πολυσυστηματική νόσο, ωστόσο λόγω αναφοράς και μη ευνοϊκών επιπτώσεων ελάχιστοι ειδικοί συστήνουν πλέον τη χρήση του. Το vemurafenib, ένας αναστολέας του BRAF έχει δείξει αποτελεσματικότητα σε σοβαρές περιπτώσεις με την μετάλλαξη *BRAF^{V600E}*. Παρά την αποτελεσματικότητά του, σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες μεταξύ των οποίων η ανάπτυξη πλακώδους καρκίνου, έχουν αναφερθεί και η πλειοψηφία των ασθενών υποτροπιάζουν μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Ωστόσο, ο Diamond και οι συνεργάτες ανέφεραν πρόσφατη διετή αποτελεσματικότητα και δεδομένα ασφαλείας για το vemurafenib σε ασθενείς με ECD και LCH που έλαβαν μέρος στη μελέτη VE-BASKET, μία ανοιχτού τύπου, μη τυχαιοποιημένη μελέτη, βασισμένη στην ιστολογική εκτίμηση ασθενών με κακοήθειες εκτός του μελανώματος που φέρουν τη μετάλλαξη *BRAF^{V600E}*.⁸⁹ Συνολικά 22 ασθενείς με ECD και 4 με LCH έλαβαν θεραπεία με vemurafenib. Το ποσοστό διετούς επιβίωσης ελεύθερης νόσου ήταν 86% και η συνολική επιβίωση 96%. Μία αναδρομική μελέτη περιστατικών ανθεκτικής ή υποτροπιάζουσας νόσου ECD ή LCH στα οποία χρησιμοποιήθηκε το dabrafenib, ένας άλλος αναστολέας BRAF, έδειξε ότι ήταν αποτελεσματικό και ασφαλές, ενώ επιτυχής θεραπεία πολυσυστηματικής νόσου έχει αναφερθεί και με ένα MEK1/2 αναστολέα της μετάλλαξης E102_I103delEI, το trametinib, αν και η δερματικές βλάβες επανεμφανίστηκαν μετά τη διακοπή της θεραπείας.^{33,87} Το NCCS (National comprehensive cancer network) δημοσίευσε πρόσφατα κατευθυντήριες οδηγίες για την θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου (εικόνα 12).



Printed by Polyzois Makras on 4/7/2021 1:44:25 AM. For personal use only. Not approved for distribution. Copyright © 2021 National Comprehensive Cancer Network, Inc., All Rights Reserved.



FOLLOW-UP

Imaging of involved sites to evaluate treatment response (PET/CT [preferred], CT, or MRI)

- After 2–3 cycles of systemic therapy and at completion
- After completion of surgical curettage
- After radiation therapy

Surveillance

- H&P and labs as clinically indicated
- Imaging: PET/CT (preferred), CT, or MRI
 - Every 3–6 months for the first 2 years post completion of treatment
 - >2 years: no more than annually
 - For asymptomatic patients with a single-site bone lesion, imaging surveillance can potentially end after year 1, with continued tracking of symptoms
- Pulmonary function testing for pulmonary LCH
- Bone marrow evaluation in the presence of cytopenias or other blood count abnormalities (to rule out associated myeloid neoplasm)
- Regular skin examination and ECG for patients treated with BRAF inhibitors^e
- Monitor every 1–2 years for pituitary hormone abnormalities

**RELAPSED/
REFRACTORY DISEASE**

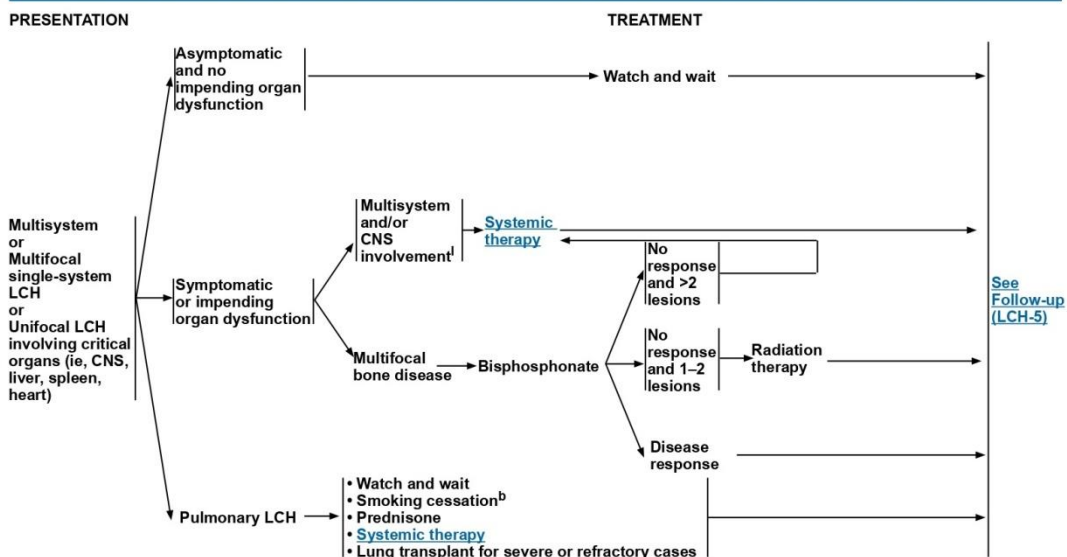
Systemic therapy

- If duration of response >1 year, consider same regimen; otherwise use a regimen not used for first-line



^eSee Management of Toxicities Associated with Targeted Therapy (ME-K) in the NCCN Guidelines for Melanoma: Cutaneous.

Note: All recommendations are category 2A unless otherwise indicated.
Clinical Trials: NCCN believes that the best management of any patient with cancer is in a clinical trial. Participation in clinical trials is especially encouraged.



Εικόνα 12: Κατευθυντήριες οδηγίες για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της μελέτης

Ο πρωτογενής στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η καταγραφή της ετήσιας επίπτωσης της LCH στους ενήλικες, καθώς και η διερεύνηση του επιπολασμού της μετάλλαξης *BRAF^{V600E}* στον ελληνικό πληθυσμό ενηλίκων με LCH. Παρόμοια αντίστοιχη μελέτη δεν είχε διενεργηθεί έως σήμερα και αντίστοιχα δεδομένα δεν υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία.

Δευτερογενής στόχος ήταν η καταγραφή των κλινικό-εργαστηριακών δεδομένων με έμφαση στην έκταση της νόσου, την ηλικία κατά τη διάγνωση, το φύλο, την προσβολή οργάνων, την ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία (χημειοθεραπεία, χειρουργική εκτομή, διακοπή καπνίσματος, τοπική ακτινοθεραπεία ή συνδυαστική θεραπεία), την παρουσία άποιου διαβήτη, το ιστορικό κακοήθειας και τον κίνδυνο υποτροπής, καθώς και την ύπαρξης συσχέτισης των ανωτέρω παραμέτρων με την παρουσία της μετάλλαξης *BRAF*

στον ενήλικο πληθυσμό της χώρας. Συγκεκριμένα, η συλλογή πληροφοριών πραγματοποιήθηκε μέσω της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων της κλινικής ενηλίκων με LCH που λαμβάνει χώρα στο 251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας και αποτελεί κέντρο αναφοράς της νόσου καθώς και με την βοήθεια ερωτηματολογίων που συμπληρώθηκαν από τους συμμετέχοντες στη μελέτη.

Είδος μελέτης

Πρόκειται για προοπτική, ανοικτή (open-label), κλινική μελέτη παρατήρησης.

Υλικά και μέθοδοι

A). Επιδημιολογική μελέτη

Από την 1η Σεπτεμβρίου 2018 έως τις 31 Αυγούστου 2019, όλες οι νέες περιπτώσεις με οριστική ιστολογική διάγνωση ιστοκυττάρωσης Langerhans σε ενήλικες άνω των 18 ετών καταγράφηκαν προοπτικά σε εθνικό επίπεδο χρησιμοποιώντας δύο μεθόδους. Η πρώτη ήταν μέσω των παθολογοανατομικών εργαστηρίων που λειτουργούν στο Ελληνικό Σύστημα Υγείας (ΕΣΥ). Συγκεκριμένα, συμπεριλήφθηκαν συνολικά 102 από τα 120 δημόσια και ιδιωτικά εργαστήρια Παθολογοανατομίας στην Ελλάδα, φθάνοντας συνολικά ποσοστό κάλυψης 85%.

Μετά από την αρχική πληροφόρηση σχετικά με τους πρωταρχικούς στόχους της μελέτης, ακολούθησε τακτική (κάθε 3 μήνες) επικοινωνία προκειμένου να καταγραφούν όλα τα νέα ιστολογικά επιβεβαιωμένα περιστατικά. Δεν συμπεριλήφθηκαν περιπτώσεις με πιθανή διάγνωση LCH με βάση το ποσοστό των θετικών για CD1a κυττάρων του BAL.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε επικοινωνία με τους διευθυντές των εργαστηρίων παθολογικής ανατομίας των κρατικών νοσοκομείων της χώρας με σκοπό την ενημέρωση για το σχεδιασμό και τους στόχους της μελέτης, καθώς και το βέλτιστο τρόπο επικοινωνίας με το εκάστοτε εργαστήριο κατά της διάρκεια του έτους (τηλεφωνική επικοινωνία, email, επισκέψεις στο εργαστήριο) για την καταγραφή των νέων περιστατικών. Ακολούθησε εν συνεχεία η αποστολή μίας σύνοψης του πρωτοκόλλου καθώς και της φόρμας καταγραφής των νέων περιπτώσεων LCH. Σύμφωνα με τον Γενικό Κανονισμό για την Προστασία Προσωπικών Δεδομένων (GDPR) και προκειμένου να αποφευχθεί η διπλή αναφορά περιστατικών, καταγράφηκαν σε κάθε περίπτωση τα

αρχικά του ονοματεπώνυμου των ασθενών, η ηλικία, το φύλο, η εθνικότητα, το είδος του ιστού, τυχόν προϋπάρχον ιστορικό LCH και όταν ήταν εφικτό ο αριθμός των εμπλεκόμενων σε κάθε περίπτωση συστημάτων. Η επικοινωνία με εργαστήρια όπου τα ύποπτα για την νόσο δείγματα αποστέλλονται εξ αρχής σε άλλο εργαστήριο λόγω έλλειψης υλικών για περαιτέρω διερεύνηση, δεν επαναλήφθηκε.

Η αρχική επικοινωνία περιλάμβανε τα κάτωθι κρατικά, ιδιωτικά και στρατιωτικά νοσοκομεία:

1. Αττική:

251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας, 401 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο (ΓΝ) Δυτικής Αττικής Αγία Βαρβάρα, Παθολογικό νοσοκομείο Αγία Ελένη - Σπηλιοπούλειο, Γενικό ογκολογικό νοσοκομείο Άγιοι Ανάργυροι, Γενικό αντικαρκινικό - ογκολογικό νοσοκομείο Άγιος Σάββας, Αιγινήτειο νοσοκομείο, ΓΝ Αλεξάνδρα, ΓΝ Αμαλία Φλέμινγκ, Νοσοκομείο αφροδίσιων και δερματικών νόσων Ανδρέας Συγγρός, ΓΠΝ Αρεταίειο, ΓΝ Ασκληπιείο Βούλας, ΠΓΝ Αττικό, ΓΝ Νίκαιας, ΓΝ Γεώργιος Γεννηματάς, ΓΝ Έλενα Βενιζέλου, ΓΝ Ελπίς, Ερρίκος Ντυνάν Hospital center, ΓΝ Ευαγγελισμός, Ευγενίδειο Θεραπευτήριο, ΓΝ Θριάσιο, Ιασώ General hospital, ΠΓΝ Ιπποκράτειο, Ιατρικό Κέντρο Αθηνών, ΚΑΤ, Κοργιαλένιο - Μπενάκειο" Ε.Ε.Σ, ΓΝ Κωνσταντοπούλειο ("Αγία Όλγα"), ΠΓΝ Λαϊκό, Γενικό αντικαρκινικό - ογκολογικό νοσοκομείο Μεταξά, Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών, ΝΙΜΤΣ, ΓΝ Σισμανόγλειο, ΓΝ νοσημάτων θώρακα Σωτηρία, ΓΝ Τζάνειο, Νοσοκομείο Υγεία, Metropolitan Hospital.

2. Θεσσαλονίκη:

ΓΝ Γ.Παπανικολάου, ΓΝ Παπαγεωργίου, ΓΝ Ιπποκράτειο, ΓΝ Γ.Γεννηματάς, ΓΝ Άγιος Παύλος, ΠΓΝ ΑΧΕΠΑ, Γενικό αντικαρκινικό - ογκολογικό νοσοκομείο Θεαγένειο, 424 ΓΣΝΕ, Ιατρικό Διαβαλκανικό Κέντρο.

3. Στερεά Ελλάδα:

ΓΝ Άμφισσας, ΓΝ Θήβας, ΓΝ Καρπενησίου, ΓΝ Λαμίας, ΓΝ Λιβαδειάς, ΓΝ Χαλκίδας.

4. Κεντρική Μακεδονία:

ΓΝ Κατερίνης, ΓΝ Κιλκίς, ΓΝ Σερρών, ΓΝ Βέροιας, ΓΝ Νάουσας, ΓΝ Γιαννιτσών, ΓΝ Έδεσσας,
ΓΝ Χαλκιδικής, Δυτική Μακεδονία ΓΝ Φλώρινας, ΓΝ Κοζάνης, ΓΝ Πτολεμαΐδας, ΓΝ
Καστοριάς

5. Πελοπόννησος:

ΓΝ Κορίνθου, ΓΝ Λακωνίας, ΓΝ Καλαμάτας

6. Κρήτη:

ΠΓΝ Ηρακλείου, Βενιζέλειο Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, ΓΝ Χανίων "Άγιος Γεώργιος",
Ναυτικό Νοσοκομείο Κρήτης, ΓΝ Ρεθύμνου, ΓΝ Λασιθίου

7. Βόρειο Αιγαίο:

ΓΝ Μυτιλήνης, ΓΝ Χίου

8. Νότιο Αιγαίο:

ΓΝ Ρόδου, ΓΝ Σύρου

9. Ιόνιοι Νήσοι:

ΓΝ Κερκύρας, ΓΝ Λευκάδας, ΓΝ Ζακύνθου

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε τακτική επικοινωνία με τις ιατρικές και οδοντιατρικές
σχολές της χώρας:

- Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Αθηνών
- Εργαστήριο Στοματολογίας Οδοντιατρικής σχολής Αθηνών
- Ιατρική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
- Εργαστήριο Στοματολογίας Οδοντιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Θεσσαλονίκης
- Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Ιατρική Σχολή Κρήτης
- Ιατρική Σχολή Θράκης
- Ιατρική Σχολή Ιωαννίνων
- Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Πατρών

Όσον αφορά τον ιδιωτικό τομέα, η ανεύρεση των ιδιωτικών εργαστηρίων διενεργήθηκε μέσω των ιατρικών συλλόγων και περιλάμβανε τα κάτωθι εργαστήρια: Βιοϊατρική Αθηνών, Histiobio Diagnosis, Istomedica, Locus Medicus, Micromedica, Παθολογοανατομικό Εργαστήριο κ.Γρηγοριάδη, Μικροδιαγνωστική Χατζημπούγιας, Ιστοδιερευνητική Ζαραμπούκας, Παθολογοανατομικά εργαστήρια κ.Καφούση Μ, κ.Γλουσιανού Γ, κ. Καλογερόπουλου Ν, κ.Καπράνου Ν, κ.Παντελιδάκη Κ, κ.Τζιράκη Μ, κ.Τσελένη-Μπαλαφούτα Σ, κ.Αναγνώστου Ε (Ιστότυπος), Istolab κ.Γκούρλας / κ.Σέκουλη, κ. Σύλλα Κ, κ.Μολύβα Ε, κ.Φραγκούδη Κ, κ.Νταμπάκη Κ, κ.Δάλλα Π, κ.Νάκου Μ, κ.Βέρρα Δ, κ.Δαριώτη Ε, κ.Σκόρδα Β, ιστολογική και μοριακή διάγνωση κ.Λαμπρή, ιστοδιαγνωστική κ.Ντούλια/ κ. Σίμου, Παθολογοανατομικά εργαστήρια κ. Γεωργίου Ι, κ. Χαραλαμπίδη Χ, κ.Καφανά Α, κ. Πρέσβελου Β, κ. Πλατανιά Χ, κ.Παπαμιχαήλ Β και κ.Πέτρου Β.

Για να αποφύγουμε την απώλεια των περιπτώσεων που διαγιγνώσκονται στο εξωτερικό, χρησιμοποιήσαμε επίσης μια δεύτερη μέθοδο εξακρίβωσης μέσω του Συλλόγου «Άρτεμις» για την Ιστοκυττάρωση (https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=EN&Expert=326541), ο οποίος πληροφορούσε και παρέπεμψε όλους τους νέους ασθενείς στην κλινική ενηλίκων με LCH που λαμβάνει χώρα στο 251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας ως κέντρο εμπειρογνωμοσύνης που αναγνωρίζεται επίσημα από την Εθνική Επιτροπή Σπάνιων Νόσων. Ο κατάλογος των νέων κρουσμάτων που παραπέμφθηκαν από τον Σύλλογο «Άρτεμις» διασταυρώθηκε με τα αποτελέσματα των παθολογοανατομικών εργαστηρίων, προκειμένου να εξαιρεθούν οι διπλές καταγραφές.

Η ετήσια επίπτωση της νόσου υπολογίστηκε με βάση τα προσφάτως καταγεγραμμένα περιστατικά σε σχέση με τον εκτιμώμενο ενήλικο πληθυσμό (άνω των 18 ετών) που διέμενε στην Ελλάδα κατά την ίδια περίοδο (συνολικός πληθυσμός ενηλίκων: 8.869.144), σύμφωνα με την Ελληνική Στατιστική Αρχή (<https://www.statistics.gr/en/home/>).

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Ιατρική Επιτροπή Δεοντολογίας του 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας και του Γενικού Νοσοκομείου "Λαϊκό" και πραγματοποιήθηκε

σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι του 1964 και τις μεταγενέστερες τροποποιήσεις της.

B) Έλεγχος βιοψιών για την μετάλλαξη *BRAF^{V600E}*

Από τη βάση δεδομένων 162 ενηλίκων ασθενών της κλινικής ενηλίκων με LCH, 40 ασθενείς (24,7%) είχαν άμεσα διαθέσιμο ιστό (σε μπλοκ παραφίνης) για ανάλυση. Κλινικά δεδομένα, όπως η ημερομηνία γέννησης των ασθενών, το φύλο, το ιστορικό, συμπεριλαμβανομένου του ιστορικού κακοήθειας, το οικογενειακό ιστορικό LCH, το κοινωνικό ιστορικό, η ηλικία κατά τη διάγνωση, η κύρια εντόπιση κατά τη διάγνωση, η συμμετοχή ενός συστήματος ή παρουσία πολυσυστηματικής νόσου, η προσβολή οργάνων, η ύπαρξη ή μη άποιου διαβήτη, η αρχική θεραπεία, η ανταπόκριση στη θεραπεία, το ιστορικό υποτροπής και θεραπείας μετά την υποτροπή και η παρούσα φαρμακευτική αγωγή ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων και διασταυρώθηκαν με λήψη ιστορικού απευθείας από τους ασθενείς με τη βοήθεια ερωτηματολογίων. Οι ασθενείς ενημερώθηκαν αρχικά για τους σκοπούς της μελέτης και ζητήθηκε υπογεγραμμένη συγκατάθεσή τους. Εν συνεχεία ακολούθησε συλλογή των μπλοκ ή έτοιμων τομών εκ της βλάβης από τα εργαστήρια παθολογικής ανατομικής, όπου φυλασσόταν τα δείγματα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Κατανομή μπλοκ παραφίνης στα εργαστήρια Παθολογικής Ανατομίας της χώρας

Εργαστήρια	Αριθμός δειγμάτων
Νοσοκομείο Ευαγγελισμός	8
Νοσοκομείο Γεννηματά	4
Micromedica lab	4
Βιοϊατρική Αμπελοκήπων	1
251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας	5
Ιατρική Σχολή Αθηνών	4
Locus medicus	2
Εργαστήριο κας Καφούση (Ηράκλειο)	1

Κρήτης)	
Ευγενίδειο Θεραπευτήριο	1
Νοσοκομείο Υγεία	1
Νοσοκομείο Metropolitan	4
HISTOBIO DIAGNOSIS (κ.Φραγκιά - Τσίβου)	2
Νοσοκομείο Σωτηρία	1
Ιατρική Σχολή Λάρισας	1
Παθολογοανατομικό εργαστήριο κας Αρώνη	1

Σαράντα δείγματα ιστών σε φορμαλδεΰδη 10% και ενσωματωμένα σε μπλοκ παραφίνης (FFPE) υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία για ανάλυση. Από κάθε block χρησιμοποιήθηκαν 3-5 τομές (10μm) για την εξαγωγή DNA, ενώ μία τομή (3μm) βάφτηκε με χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης (H&E) για τη μορφολογική αξιολόγηση και επαλήθευση της βλάβης. Η επεξεργασία των block πραγματοποιήθηκε είτε στο εκάστοτε εργαστήριο στο οποίο είχε γίνει η διάγνωση της νόσου είτε στο εργαστήριο παθολογικής ανατομικής του 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας.

Η εξαγωγή DNA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το GeneRead DNA FFPE Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen GmbH, Γερμανία) στο κέντρο έρευνας του 251 ΓΝΑ.

Η εξαγωγή του DNA

Μέθοδος: Με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου του GeneRead DNA FFPE απομακρύνεται η παραφίνη και αναστρέφονται οι συνδέσεις της φορμαλίνης από το δείγμα DNA πριν συνδεθεί στη στήλη του QIAamp MinElut. Μετά τη θέρμανση για την καταστροφή των συνδέσεων, το DNA καθίσταται πλέον προσβάσιμο για την απομάκρυνση των απαμινωμένων καταλοίπων κυττοσίνης από το ένζυμο Ουρακίλη- N γλυκοζυλάση. Το βελτιστοποιημένο δείγμα της αντίδρασης παρέχει τις συνθήκες στις οποίες το ένζυμο

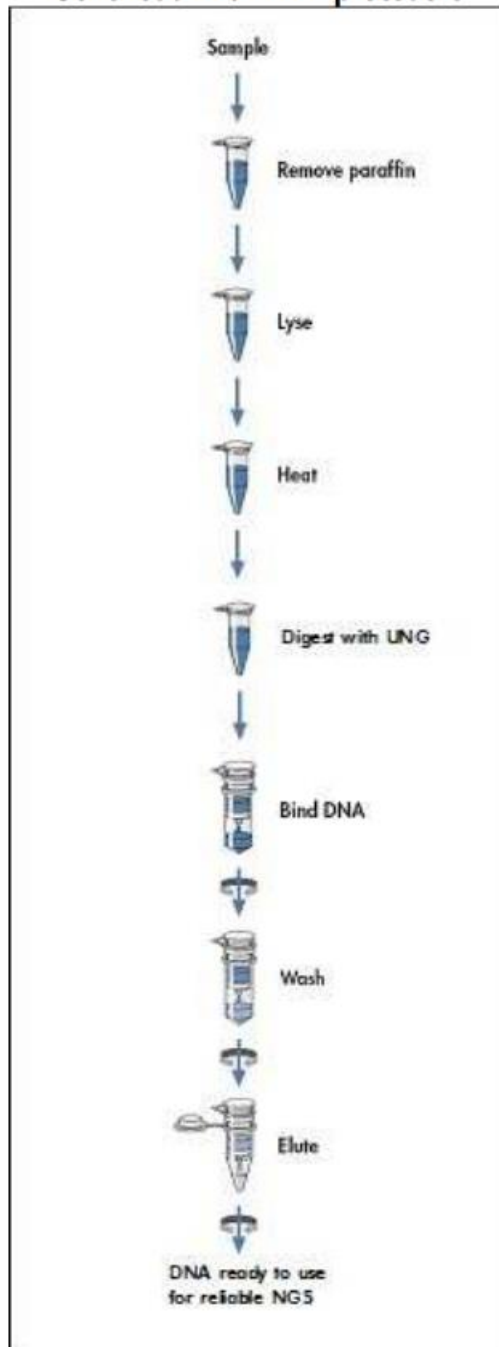
μπορεί συγκεκριμένα να απομακρύνει την ουρακίλη από το DNA που εξάγεται από το δείγμα FFPE. Μετά τη σύνδεση του DNA στη στήλη φυγοκέντρησης, οι υπολειπόμενες προσμίξεις, όπως τα άλατα απομακρύνονται με τα Buffers AW1 και AW2, καθώς και με την αιθανόλη. Υπολειπόμενη αιθανόλη, η οποία θα μπορούσε να παρεμβαίνει στις επακόλουθες ενζυματικές αντιδράσεις, απομακρύνεται με ένα επιπρόσθετο βήμα φυγοκέντρησης.

Η διαδικασία:

1. Το υλικό από τις τομές των 10 μm τοποθετήθηκε σε σωληνάρια φυγοκέντρησης των 1.5 ml or 2 ml.
2. Προσθήκη 160 μl Deparaffinization Solution και εν συνεχεία τοποθέτηση σε vortex για 10 δευτερόλεπτα και βραχεία φυγοκέντρηση ώστε το δείγμα να μεταφερθεί στη βάση του σωληναρίου.
3. Επώαση στους 56°C για 3 λεπτά και μετά προσαρμογή για λίγα λεπτά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στην περίπτωση χρήσης υπερβολικά μικρής ποσότητας Deparaffinization Solution ή εάν το δείγμα φέρει μεγάλη ποσότητα παραφίνης και το Deparaffinization Solution στερεοποιούταν μετά την τοποθέτηση στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, προσθέταμε επιπλέον Deparaffinization Solution και επαναλαμβάνουμε την επώαση στους 56°C.
4. Προσθήκη 55 μl RNase-free water, 25 μl Buffer FTB και 20 μl πρωτεΐνης K.
5. Τοποθέτηση για Vortex και βραχεία φυγοκέντρηση των δειγμάτων.
6. Επώαση στους 56°C για 1 h και εν συνεχεία στους 90°C για 1 h. Με τη επώαση στους 90°C σε Buffer FTB εν μέρη αναστρέφεται η τροποποίηση των νουκλεϊκών οξέων από την φορμαλδεΐδη. Αποφύγαμε το μεγαλύτερο χρόνο επώασης ή την επιλογή υψηλότερης θερμοκρασίας καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε πιο κατακερματισμένο DNA.
7. Βραχεία φυγοκέντρηση του σωληναρίου απομακρύνει στις σταγόνες από την κορυφή.
8. Μεταφορά του καθαρού περιεχομένου σε ένα νέο σωληνάριο, προσθήκη 115 μl RNase-free water και ανάμειξη.
9. Προσθήκη 35 μl UNG στο δείγμα, τοποθέτηση σε vortex και επώαση στους 50°C για μία ώρα σε heating block.

10. Βραχεία φυγοκέντρωση.
11. Προσθήκη 2 μl RNase I RNase A (100 mg/ml), ανάμειξη και επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Προσθήκη 250 μl Buffer AL στο δείγμα και ανάμειξη με vortex.
13. Προσθήκη 250 μl αιθανόλης (96–100%) στο δείγμα και εκ νέου ανάμειξη με vortex και βραχεία φυγοκέντρωση.
14. Μεταφορά 700 μl του δείγματος στη στήλη QIAamp MinElute (σε ένα σωληνάριο των 2 ml) και φυγοκέντρωση του δείγματος για λεπτό.
15. Απόρριψη του flow-through και επαναχρησιμοποίηση του σωληναρίου. Επανάληψη της διαδικασίας μέχρι η στήλη QIAamp MinElute να αδειάσει.
16. Προσθήκη 500 μl Buffer AW1 και φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για ένα λεπτό. Απόρριψη του flow-through και επαναχρησιμοποίηση του σωληναρίου.
17. Προσθήκη 500 μl Buffer AW2 στην στήλη φυγοκέντρωσης και φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για ένα λεπτό. Απόρριψη του flow-through και επαναχρησιμοποίηση του σωληναρίου.
18. Προσθήκη 250 μl αιθανόλης (96–100%) και φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για ένα λεπτό. Απόρριψη του flow-through και επαναχρησιμοποίηση του σωληναρίου.
19. Τοποθέτηση του δείγματος σε νέο σωληνάριο των 2 ml και φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για ένα λεπτό για να την απομάκρυνση υπολειπόμενων υγρών.
20. Τοποθέτηση της στήλης QIAamp MinElute σε ένα καθαρό σωληνάριο των 1.5 ml και απόρριψη του σωληναρίου που φέρει το flow-through. Τοποθέτηση 20– 40 μl Buffer ATE.
21. Επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ένα λεπτό. Φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα (20,000 x g or 14,000 rpm) για ένα λεπτό (εικόνα 13).

GeneRead DNA FFPE procedure



Εικόνα 13: GeneRead DNA FFPE

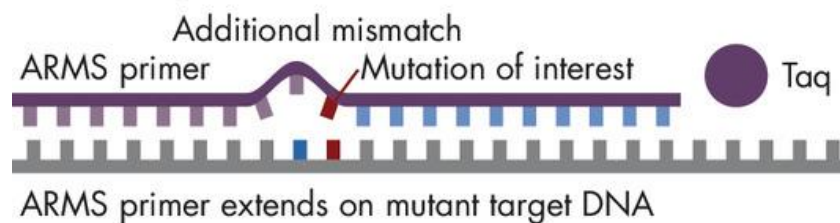
Μετά την εξαγωγή του DNA, οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων DNA προσδιορίστηκαν με φωτομέτρηση στο φασματοφωτόμετρο NanoDrop ND-1000. Η ποιότητα του υλικού αξιολογήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Τριάντα ένα δείγματα απέδωσαν επαρκές DNA για μοριακή ανάλυση. Ακολούθησε real-time PCR, η οποία εκτελέστηκε στο Texas Children's Cancer Center. Το καθαρό gDNA

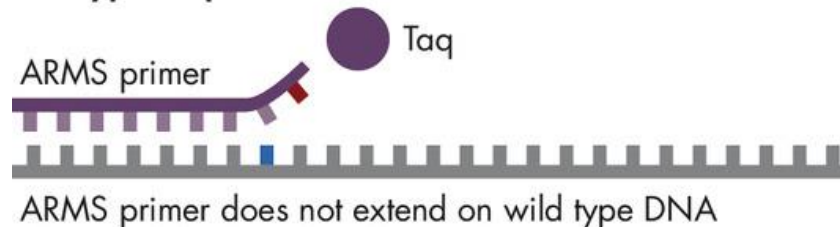
χρησιμοποιήθηκε σε *BRAF^{V600E}* qPCR mutation assay (*BRAF^{V600E}* qPCR Somatic Mutation Assay for BRAF_476; Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). Η τεχνολογία ARMS (Amplification Refractory Mutation System) χρησιμοποιεί ένα primer που ενισχύει ειδικά το μεταλλαγμένο DNA-στόχο και βασίζεται στη διάκριση από την Taq πολυμεράση του λανθασμένου DNA στο 3' άκρο του primer, ενώ μια πρόσθετη αναντιστοιχία μεταξύ του ARMS primer και του DNA που βρίσκεται κοντά στη μετάλλαξη δεν αναστέλλει την επέκταση του μεταλλαγμένου DNA-στόχου, αλλά εμποδίζει την ενίσχυση της wild-type αλληλουχίας (εικόνα 14).

Η υπό μελέτη μετάλλαξη του γονιδίου BRAF και οι primers αναφοράς συμπεριλήφθηκαν σε κάθε αντίδραση. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν διπλές αντιδράσεις.

Mutant template



Wildtype template

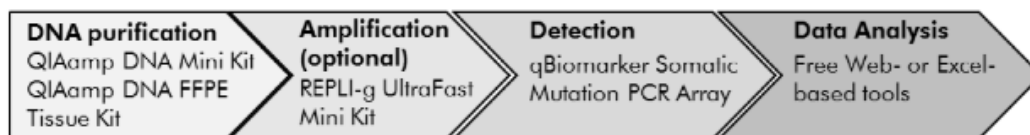


Εικόνα 14: Η μέθοδος διάκρισης του μεταλλαγμένου αλληλίου με την τεχνολογία ARMS. Ο primer είναι σχεδιασμένος ώστε να πολλαπλασιάζει συγκεκριμένα το μεταλλαγμένο DNA. Ένας επιπρόσθετος λανθασμένος συνδυασμός μεταξύ του ARMS primer και της αλληλουχίας DNA που είναι κοντά στην υπό διερεύνηση μετάλλαξη δεν αναστέλλει την επέκταση από τον ARMS primer του μεταλλαγμένου DNA στόχου. Ωστόσο, ο πολλαπλασιασμός της wild-type αλληλουχίας εμποδίζεται.

Η διαδικασία της PCR:

1. Χρήση του mastermix, nuclease free water και 500 ng DNA για κάθε μικροσυστοιχία.
2. Τοποθέτηση του μείγματος σε RT2 PCR Array Loading reservoir.
3. Προσθήκη του μείγματος (25 μl σε κάθε σειρά) στην qBiomarker Somatic Mutation PCR Array.
4. Τοποθέτηση στον θερμοκυκλοποιητή.

5. Υπολογισμός του threshold cycle (CT) με χρήση του λογισμικού (εικόνα 15)



Εικόνα 15: Μετά την ανάμειξη του δείγματος DNA που μας ενδιαφέρει με το qBiomarker Probe Mastermix, ακολούθησε η real-time PCR και η ανάλυση των δεδομένων. Πηγή Qiagen site.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ένα σύστημα ανίχνευσης CFX96 Touch Real-time PCR (Bio-Rad Laboratories). Εν ολίγοις, υπολογίστηκαν τα μέσα Ct mut και Ct ref για τον προσδιορισμό του $\Delta Ct = Ct\ mut(ave) - Ct\ ref(ave)$. Το ΔCt συγκρίθηκε με μια καμπύλη αναφοράς (standard curve) για την εκτίμηση του ποσοστού των κυττάρων με αλληλία $BRAF^{V600E}$. Η τυποποιημένη καμπύλη δημιουργήθηκε με την διενέργεια 11 αραιώσεων gDNA που απομονώνονται από την A375 κυτταρική σειρά (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) με gDNA που απομονώνεται από την κυτταρική σειρά HEK293 (ATCC). Το ΔCt σχεδιάστηκε με βάση το ποσοστό των κυττάρων από τις κυτταρικές ομάδες A375/HEK293 (0,05%-100% $BRAF^{V600E}$) από τα οποία απομονώθηκε το gDNA. Για κάθε δείγμα gDNA, το ποσοστό των κυττάρων με τη μετάλλαξη $BRAF^{V600E}$ υπολογίστηκε εν συνέχεια με βάση την τυποποιημένη καμπύλη όπως περιγράφεται προηγουμένως.

γ) Στατιστική ανάλυση

Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται με τη χρήση αριθμών και ποσοστών για τις κατηγορηματικές μεταβλητές και με διάμεσο και διατεταρτημοριακό διάστημα για τις συνεχείς μεταβλητές. Για να εντοπίσουμε πιθανές διαφορές μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήσαμε τα Fisher's Exact Test ή Mann–Whitney U test για κατηγορηματικές και συνεχείς μεταβλητές, αντίστοιχα. Μια τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση λογισμικού STATA (version 13.1) (STATA Corp. LP, College Station, Texas, USA). Οι εκτιμήσεις της επίπτωσης της μετάλλαξης παρέχονται με 95% όρια αξιοπιστίας (95% CI), τα οποία υπολογίστηκαν με μία διωνυμική κατανομή.

Αποτελέσματα

Επιδημιολογική μελέτη:

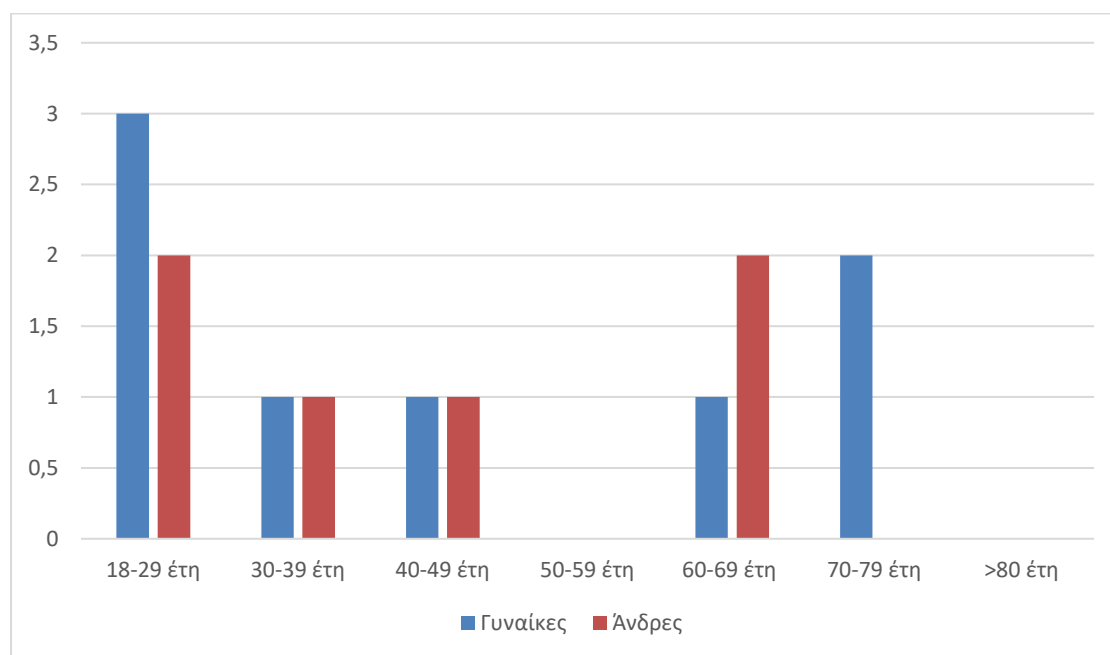
Νέα περιστατικά με ιστολογική διάγνωση εντοπίστηκαν σε τέσσερις μεγάλες πόλεις, συγκεκριμένα στην Αθήνα, τη Θεσσαλονίκη, την Πάτρα και τη Λάρισα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις (n=4) η διάγνωση επιβεβαιώθηκε εκ νέου σε εξειδικευμένο παθολογοανατομικό εργαστήριο.

Συνολικά, 17 ιστολογικές εκθέσεις περιλάμβαναν τη διάγνωση της LCH, 14 (οκτώ γυναίκες) εκ των οποίων αποτελούνταν από νεοδιαγνωσθέντες λευκούς καυκάσιους ασθενείς χωρίς προηγούμενο ιστορικό της νόσου, ενώ 3 ασθενείς είχαν προϋπάρχουσα νόσο (πίνακας 2). Έντεκα από τα 14 νέα, ιστολογικά επιβεβαιωμένα περιστατικά εκτιμήθηκαν στην κλινική ενηλίκων με LCH είτε απευθείας είτε μέσω παραπομπής από τον Σύλλογο «Άρτεμις» για την ιστοκυττάρωση.

Πίνακας 2: Κατανομή των νέων περιπτώσεων LCH στα παθολογοανατομικά εργαστήρια της χώρας

ΠΓΝ Αττικό	1
Ιατρική σχολή Πάτρας	1
ΓΝ Νέας Ιωνίας Κωνσταντοπούλειο	1
Metropolitan General Hospital	2
Ιατρική σχολή Λάρισας	1
424 Γενικό Στρατιωτικό νοσοκομείο	1
Γενικό αντικαρκινικό - ογκολογικό νοσοκομείο Άγιος Σάββας	1
Histio Bio Diagnosis Lab	1
Micromedica Lab	1
Ιδιωτικό εργαστήριο κ.Ζαραμπούκα	2
Θριάσιο Γενικό Νοσοκομείο Ελευσίνας	1
Ιατρικό κέντρο Αθηνών	1

Η ηλικία διάγνωσης κυμαινόταν από 19 έως 76 έτη, με μέση ηλικία τα 43,5 έτη (Εικόνα 16) (πίνακας 3). Αν και νέα περιστατικά ανευρέθηκαν σε όλες τις ηλικιακές ομάδες η νόσος εντοπίστηκε πιο συχνά σε νεαρούς ενήλικες (19-39 ετών) (7 ασθενείς) και μεταξύ εκείνων άνω των 64 ετών (5 ασθενείς). Η αναλογία γυναικών/ανδρών ήταν 1,34. Η μέση ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν παρόμοια και στα δύο φύλα (43,6 έτη στις γυναίκες και 43,3 έτη στους άνδρες). Μεταξύ όλων των νέων διαγνώσεων, το οστό ήταν ο πιο συχνά εμπλεκόμενος ιστός (6 περιπτώσεις, 43%) και ακολούθως οι πνεύμονες (5 περιπτώσεις, 36%), το δέρμα (2 περιπτώσεις, 14%), και οι αμυγδαλές (1 περίπτωση, 7%). Στους άνδρες, η LCH εντοπιζόταν κυρίως στον σκελετό (4 περιπτώσεις) και τους πνεύμονες (2 περιπτώσεις). Μεταξύ των γυναικών υπήρχε μεγαλύτερο εύρος προσβεβλημένων ιστών: πνεύμονες (3 περιπτώσεις), οστά (2 περιπτώσεις), δέρμα (2 περιπτώσεις) και αμυγδαλές (1 περίπτωση).



Εικόνα 16: Αριθμός νέων περιστατικών με βάση την ηλικία και το φύλο

Πίνακας 3: Βιοψίες με διάγνωση ιστοκυττάρωσης Langerhans κατά το έτος 01.09.2018 έως 01.09.2019

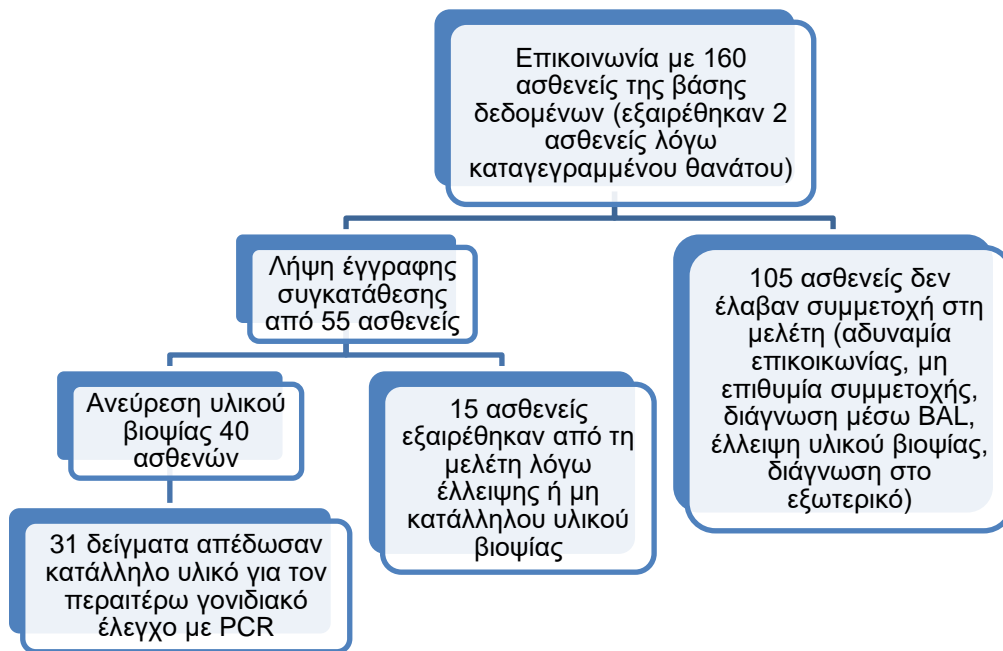
Φύλο	Ιστός	Σύστημα	Ηλικία	Ιστορικό LCH
Άρρεν	Πνεύμονας	Μονοσυστηματική	65 ετών	Χωρίς ιστορικό
Θήλυ	Ούλα	Πολυσυστηματική	42 ετών	Με ιστορικό
Θήλυ	Αμυγδαλή	Μονοσυστηματική	21 ετών	Χωρίς ιστορικό
Θήλυ	Δέρμα	Άγνωστο	42 ετών	Χωρίς ιστορικό
Θήλυ	Πνεύμονας	Μονοσυστηματική	71 ετών	Χωρίς ιστορικό
Θήλυ	Οστό	Μονοσυστηματική	19 ετών	Χωρίς ιστορικό
Άρρεν	Οστό	Άγνωστο	42 ετών	Με ιστορικό
Άρρεν	Οστό	Άγνωστο	20 ετών	Χωρίς ιστορικό
Θήλυ	Οστό	Άγνωστο	52 ετών	Με ιστορικό
Άρρεν	Οστό	Πολυσυστηματική	24 ετών	Χωρίς ιστορικό
Θήλυ	Πνεύμονας	Πολυσυστηματική	65 ετών	Χωρίς ιστορικό
Άρρεν	Οστό	Άγνωστο	65 ετών	Χωρίς ιστορικό
Θήλυ	Πνεύμονας	Μονοσυστηματική	76 ετών	Χωρίς ιστορικό
Άρρεν	Πνεύμονας	Μονοσυστηματική	38 ετών	Χωρίς ιστορικό
Άρρεν	Οστό	Άγνωστο	48 ετών	Χωρίς ιστορικό
Θήλυ	Οστό	Μονοσυστηματική	35 ετών	Χωρίς ιστορικό
Θήλυ	Δέρμα	Μονοσυστηματική	20 ετών	Χωρίς ιστορικό

Κατά τη διάγνωση, η νόσος αναφέρθηκε ως μονοσυστηματική με μία μόνο εντόπιση (8 περιπτώσεις, 57%), που περιοριζόταν συχνότερα είτε στα οστά (3 περιπτώσεις) είτε στους πνεύμονες (3 περιπτώσεις). Δύο ασθενείς είχαν πολυσυστηματική νόσο με πνευμονική και οστική συμμετοχή, επιβεβαιωμένα από την ιστολογική εξέταση και τον απεικονιστικό έλεγχο. Δεν ήταν δυνατή η παροχή κλινικών πληροφοριών σχετικά με την έκταση της νόσου για τις υπόλοιπες 4 περιπτώσεις (πίνακας 3).

Στη μελέτη μας, η ετήσια επίπτωση της LCH μεταξύ των ενηλίκων που ζούνε στην Ελλάδα υπολογίστηκε σε 1,58 ανά εκατομμύριο πληθυσμού, η οποία είναι σύμφωνη με την εκτίμηση που είχε αναφερθεί προηγουμένως. Σε σύγκριση με παιδιατρικές μελέτες, η ετήσια συχνότητα εμφάνισης της LCH ενηλίκων φαίνεται χαμηλότερη από αυτή που αναφέρθηκε μεταξύ των παιδιών, η οποία κυμαίνεται μεταξύ 2,2 και 8,9 ανά εκατομμύριο πληθυσμού ετησίως.⁷³

Έλεγχος βιοψιών για τη μετάλλαξη BRAF^{V600E}

Τριάντα ένα δείγματα ιστού συμπεριλήφθηκαν τελικά στην ανάλυση (19 γυναίκες, διάμεση ηλικία: 45,28 έτη, εύρος: 21 έως 75 έτη). Οι υπόλοιπες εννέα περιπτώσεις αποκλείστηκαν, καθώς η εξαγωγή DNA απέδωσε ανεπαρκή ποσότητα για ανάλυση (εικόνα 17).



Εικόνα 17: Study flowchart

Η διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση ήταν 32 έτη (εύρος 1-58 ετών) χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών και η διάμεση περίοδος παρακολούθησης στο κέντρο μας ήταν 10,7 έτη. Όλοι οι ασθενείς ήταν ενήλικες εκτός από έναν ασθενή με υποτροπιάζουσα βρεφική νόσο. Κανείς δεν ανέφερε οικογενειακό ιστορικό της νόσου. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη σε σύγκριση με το

σύνολο των ασθενών της βάσης δεδομένων και το σύνολο των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη αναφέρονται αναλυτικότερα στους πίνακες 4 και 5, επιβεβαιώνοντας την αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος.

Οι πλέον συχνές εντοπίσεις της νόσου ήταν τα οστά (22 ασθενείς, 70,97%), οι πνεύμονες (15 ασθενείς, 48,39%), το ΚΝΣ (8 ασθενείς, 25,81%), το δέρμα (6 ασθενείς, 19,35%), οι λεμφαδένες (5 ασθενείς, 16,13%) και ο στοματικός βλεννογόνο (2 ασθενείς, 6,45%). Μόνο ένας ασθενής είχε εμπλοκή οργάνου υψηλού κινδύνου (ήπαρ). Η συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων αφορούσε τα οστά (πίνακας 6).

Πίνακας 4: Σύγκριση των κύριων χαρακτηριστικών των ασθενών με διαθέσιμες βιοψίες για εξαγωγή DNA έναντι των ασθενών της βάσης δεδομένων που δεν είχαν διαθέσιμο μπλοκ βιοψίας ή δεν επιθυμούσαν να συμμετάσχουν στη μελέτη: Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων όσον αφορά το φύλο, την ηλικία κατά την έναρξη της μελέτης, την ηλικία διάγνωσης, το οικογενειακό ιστορικό LCH, την προσβολή οργάνων ή συστημάτων.

Παράμετρος	Ασθενείς χωρίς διαθέσιμα δείγματα (N=122)	Ασθενείς με διαθέσιμα δείγματα (N=40)	p-value
Φύλο, n (%)			0.203 ¹
Άνδρας	69 (56.6)	18 (45.0)	
Γυναίκα	53 (43.4)	22 (55.0)	
Μέση ηλικία (κατά την έναρξη της μελέτης)	45.7 (14.2)	46.3 (13.6)	0.590 ²
Μέση ηλικία διάγνωσης	30.2 (16.9)	33.4 (14.6)	0.860 ²
Οικογενειακό ιστορικό LCH, n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Σύστημα, n (%)			0.590 ¹
Πολυσυστηματική	52 (42.6)	21 (52.5)	
Μονοσυστηματική	70 (57.4)	19 (47.5)	
Προσβολή οργάνων			
Οστό	71 (58.2)	28 (70.0)	0.184 ¹

Πνεύμονες	46 (37.7)	13 (32.5)	0.553 ¹
Λεμφαδένες	14 (11.5)	5 (12.5)	0.861 ¹
Δέρμα	21 (17.2)	7 (17.5)	0.967 ¹
Βλεννογόνοι	12 (9.8)	5 (12.5)	0.766 ³
ΚΝΣ	10 (8.2)	4 (10.0)	0.749 ³
Άποιος διαβήτης	18 (14.8)	6 (15.0)	0.970 ¹
Θυρεοειδής αδέννας	3 (2.5)	2 (5.0)	0.599 ³
Παρωτίδα	1 (0.8)	1 (2.5)	0.434 ³
Ήπαρ	2 (1.6)	1 (2.5)	1.000 ³

¹ Chi-square test, ² t-test, ³ Fisher's exact test

Πίνακας 5: Σύγκριση των κυρίων χαρακτηριστικών της τελικής ομάδας μελέτης (ασθενείς με υλικό βιοψίας κατάλληλο για εξαγωγή DNA) έναντι ασθενών που τελικά εξαιρεθήκαν από τη μελέτη λόγω ανεπαρκούς υλικού προς ανάλυση: Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων όσον αφορά το φύλο, την ηλικία κατά την έναρξη της μελέτης, την ηλικία διάγνωσης, το οικογενειακό ιστορικό LCH, την προσβολή οργάνων ή συστημάτων.

	Ασθενείς που αποκλείστηκαν από την ανάλυση DNA (N=9)	Ομάδα μελέτης (N=31)	p-value
Φύλο, n (%)			0.253 ¹
Άρρεν	6 (66.7)	12 (38.7)	
Θήλυ	3 (33.3)	19 (61.3)	
Μέση ηλικία (κατά την έναρξη της μελέτης)	42.1 (10.9)	46.3 (13.6)	0.797 ²
Μέση ηλικία διάγνωσης	27.0 (15.6)	34.2 (14.2)	0.902 ²
Οικογενειακό ιστορικό LCH	0 (0.0)	0 (0.0)	
Σύστημα, n (%)			1.000 ¹
Πολυσυστηματική	6 (66.7)	20 (64.5)	
Μονοσυστηματική	3 (33.3)	11 (35.5)	
Προσβολή οργάνων			
Οστό	6 (66.7)	22 (70.9)	1.000 ¹

Πνεύμονες	2 (22.2)	15 (48.9)	0.256 ¹
Λεμφαδένες	2 (22.2)	5 (16.1)	0.645 ¹
Δέρμα	2 (22.2)	6 (19.4)	1.000 ¹
Βλεννογόνοι	2 (22.2)	2 (6.5)	0.213 ¹
ΚΝΣ	2 (22.2)	8 (25.8)	1.000 ¹
Άποιος διαβήτης	1 (11.1)	8 (25.8)	0.654 ¹
Θυρεοειδής αδένας	2 (22.2)	1 (3.2)	0.121 ¹
Παρωτίδα	0 (0.0)	1 (3.2)	1.000 ¹
Ήπαρ	0 (0.0)	1 (3.2)	1.000 ¹

Πίνακας 6: Κατανομή των 31 δειγμάτων που απέδωσαν επαρκές DNA για μοριακή ανάλυση και τα αποτελέσματα του γονιδιακού ελέγχου ανά ιστό: Η πλειοψηφία των δειγμάτων προς ανάλυση προερχόταν από τα οστά.

Ιστός	Όλα τα δείγματα (n=31)	<i>BRAF</i> ^{V600E+} (n=12)	<i>BRAF</i> ^{V600E-} (n=13)	<i>BRAF</i> inconclusive (n=6)
Οστό	18(58.0)	8 (66.6)	6 (46.1)	4 (66.6)
Πνεύμονες	4 (12.9)	3 (25.0)	1 (7.6)	0 (0.0)
Λεμφαδένες	2 (6.4)	0 (0.0)	1 (7.6)	1 (16.7)
Δέρμα	2 (6.4)	0 (0.0)	1 (7.6)	1 (16.7)
Ήπαρ	1 (3.2)	0 (0.0)	1 (7.6)	0 (0.0)
Παρωτίδα	1 (3.2)	0 (0.0)	1 (7.6)	0 (0.0)
ΚΝΣ	2 (6.4)	1 (8.3)	1 (7.6)	0 (0.0)
Βλεννογόνοι	1 (3.2)	0 (0.0)	1 (7.6)	0 (0.0)

Η πλειοψηφία των ασθενών (20, 64,5%) είχαν πολυσυστηματική νόσο (πίνακας 7). Τα οστά και οι πνεύμονες συμμετείχαν ταυτόχρονα σε 9 (45%) εκ των πολυσυστηματικών περιπτώσεων. Δύο ασθενείς παρουσίασαν μεμονωμένη LCH πνεύμονα και οι δύο ήταν καπνιστές (20-25 pack years). Συνολικά πνευμονική συμμετοχή καταγράφηκε σε 15 ασθενείς, με θετικό ιστορικό καπνίσματος στο ένα τρίτο εξ αυτών (που κυμαινόταν από 5 έως 30 pack years).

Η μετάλλαξη $BRAF^{V600E}$ εντοπίστηκε σε 12 ασθενείς (38,71%), ενώ 13 ασθενείς (41,94%) δεν έφεραν τη μετάλλαξη. Σε 6 ασθενείς (2 άνδρες), (19,35%), η qPCR μελέτη του $BRAF^{V600E}$ δεν πληρούσε τα τεχνικά πρότυπα που απαιτούνται για την οριστική ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 7: Συμμετοχή οργάνων στις μονοσυστηματικές και πολυσυστηματικές περιπτώσεις της μελέτης με την πλειοψηφία των μονοσυστηματικών περιπτώσεων να αφορούν τα οστά και τις πολυσυστηματικές περιπτώσεις να περιλαμβάνουν συχνά την προσβολή οστών και / ή πνευμόνων: Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά την προσβολή των πνευμόνων.

Συμμετοχή οργάνου	Σύνολο περιπτώσεων (N=31)	Μονοσυστηματική (N=11)	Πολυσυστηματική (N=20)	p-value
Οστό, n (%)				1.000
Ναι	22 (70.97)	8 (72.73)	14 (70.0)	
Όχι	9 (29.03)	3 (27.27)	6 (30.0)	
Πνεύμονες, n (%)				0.023
Ναι	15 (48.39)	2 (18.18)	13 (65.0)	
Όχι	16 (51.61)	9 (81.82)	7 (35.0)	
Λεμφαδένες, n (%)				0.133
Ναι	5 (16.13)	0 (0.0)	5 (25.0)	
Όχι	26 (83.87)	11 (100.0)	15 (75.0)	
ΚΝΣ, n (%)				0.203
Ναι	8 (25.81)	1 (9.09)	7 (35.0)	
Όχι	23 (74.19)	10 (90.91)	13 (65.0)	
Δέρμα, n (%)				0.383
Ναι	6 (19.35)	1 (9.09)	5 (25.0)	
Όχι	25 (80.65)	10 (90.91)	15 (75.0)	
Βλεννογόνο, n (%)				1.000
Ναι	2 (6.45)	1 (9.09)	1 (5.0)	
Όχι	29 (93.55)	10 (90.91)	19 (95.0)	

* το p-value αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ μονοσυστηματικής και πολυσυστηματικής νόσου.

Συγκρίνοντας τις δύο ομάδες ($BRAF^{V600E+}$ έναντι $BRAF^{V600E-}$), παρατηρήθηκε επικράτηση των γυναικών στους φορείς της μετάλλαξης $BRAF^{V600E}$ (83,33% έναντι 38,46%, τιμή p : 0,022). Ωστόσο, ούτε η μέση ηλικία διάγνωσης (36,5 ετών στους $BRAF^{V600E+}$ έναντι 30 ετών στους $BRAF^{V600E-}$, p value: 0,384) ούτε η εντόπιση της νόσου διέφεραν μεταξύ των ομάδων $BRAF^{V600E+}$ και $BRAF^{V600E-}$ (Πίνακας 8). Επιπλέον, η παρουσία της μετάλλαξης δεν συσχετίστηκε με την έκταση της νόσου (πολυσυστηματική νόσος: 58,33% στους φορείς $BRAF^{V600E}$ έναντι 76,92% σε ασθενείς χωρίς τη μετάλλαξη, p value: 0,411) ή με συμμετοχή συγκεκριμένων οργάνων.

Πίνακας 8: Πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής εμπλοκή οργάνων και $BRAF$ status: Περιλαμβάνεται η προσβολή των οργάνων, ανεξάρτητα αν πρόκειται για πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή προσβολή. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά σχετικά με το $BRAF$ status.

Ιστός	Όλοι οι ασθενείς	$BRAF^{V600E+}$	$BRAF^{V600E-}$	p -value
Οστό	22 (70.97)	10 (83.33)	7 (53.85)	0.114
Πνεύμονες	15 (48.39)	7 (58.33)	7 (53.85)	0.821
Λεμφαδένες	5 (16.13)	1 (8.33)	3 (23.08)	0.593
ΚΝΣ	8 (25.81)	1 (8.33)	4 (30.77)	0.322
Δέρμα	6 (19.35)	1 (8.33)	3 (23.08)	0.593
Βλεννογόνοι	2 (6.45)	0 (0.00)	2 (15.38)	0.480
Παρωτίδα	1 (3.2)	0 (0.0)	1 (7.6)	1.000
Ήπαρ	1 (3.2)	0 (0.0)	1 (7.6)	1.000

* p -value αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ ασθενών με $BRAF^{V600E+}$ και $BRAF^{V600E-}$.

Στο σύνολο της ομάδας μελέτης, 8 ασθενείς (25,8%) είχαν ιστορικό άλλης νεοπλασματικής νόσου. Με εξαίρεση έναν ασθενή με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, οι υπόλοιποι επτά ασθενείς είχαν ιστορικό συμπαγών όγκων [θυρεοειδής αδένας (3 ασθενείς), προστάτης αδένας (1 ασθενής), αιδοίο (1 ασθενής) και μαστός (2 ασθενείς)]. Η μετάλλαξη $BRAF^{V600E}$ δεν

συσχετίστηκε με το ιστορικό κακοήθειας (33,33% στους φορείς της μετάλλαξης έναντι 23,08%, p value: 0,673).

Η πλειοψηφία των φορέων του BRAF αντιμετωπίστηκαν με χειρουργική εκτομή της βλάβης, εκ των οποίων δύο έλαβαν επίσης τοπική ακτινοθεραπεία και ένας ασθενής συνδυασμό τοπικής ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας. Η διακοπή του καπνίσματος συνιστάται σε όλους τους ασθενείς και χρησιμοποιήθηκε ως μονοθεραπεία σε 3 περιπτώσεις (9,68%) με PLCH με ικανοποιητική ανταπόκριση. Στην ομάδα των μη φορέων της μετάλλαξης, 7 ασθενείς έλαβαν χημειοθεραπεία, 5 ασθενείς υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση και 1 ασθενής υποβλήθηκε σε χημειοθεραπεία και τοπική ακτινοθεραπεία. Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά την ανταπόκριση στη θεραπεία και η πλειονότητα των ασθενών και στις δύο ομάδες βελτιώθηκε σημαντικά μετά τη θεραπευτική προσέγγιση που ακολουθήθηκε (Πίνακες 9 και 10). Δύο ασθενείς παρουσίασαν αυτόματη ίαση, εκ των οποίων ένας φορέας της μετάλλαξης και ένας ασθενής με ασαφή (inconclusive) αποτελέσματα. Ένας ασθενής σε κάθε ομάδα εμφάνισε επιδείνωση της νόσου, ενώ 2 φορείς του $BRAF^{V600E}$ και 3 ασθενείς με $BRAF^{V600E-}$ παρέμειναν σταθεροί μετά τη θεραπεία.

Οι περισσότεροι ασθενείς (70,97%) δεν υποτροπίασαν μετά τη θεραπεία και οι φορείς της μετάλλαξης δεν παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό ενεργοποίησης της νόσου (16,67% στους φορείς $BRAF^{V600E}$ έναντι 30,77% στους $BRAF^{V600E-}$, p value: 0,645) (Πίνακας 11).

Πίνακας 9: Απάντηση στη θεραπεία και *BRAF* status

Είδος θεραπείας	Όλοι οι ασθενείς (N=31)			<i>BRAF</i> ^{V600E+} (N=12)			<i>BRAF</i> ^{V600E-} (N=13)		
	Βελτίωση	Σταθερή νόσος	Επιδείνωση	Βελτίωση	Σταθερή νόσος	Επιδείνωση	Βελτίωση	Σταθερή νόσος	Επιδείνωση
Χημειοθεραπεία n (%)	4 (50.00)	2(25.00)	2 (25.00)	0 (0.00)	0(0.00)	1 (100.00)	4 (57.14)	2(28.57)	1 (14.29)
Τοπική ακτινοθεραπεία n (%)	1(100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0(0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
Χειρουργική αντιμετώπιση	10(90.91)	1 (9.09)	0 (0.00)	5(100.00)	0(0.00)	0 (0.00)	4(100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)

n (%)									
Συνδυαστική θεραπεία, n (%)	5 (71.43)	2(28.57)	0 (0.00)	2 (66.67)	1(33.33)	0 (0.00)	1 (50.00)	1(50.00)	0 (0.00)

*το p-value αναφέρεται στη σύγκριση μεταξύ των $BRAF^{V600E+}$ και $BRAF^{V600E-}$ ασθενών

Πίνακας 10: Συνδυαστικές θεραπείες

Είδος θεραπείας	Όλοι οι ασθενείς (N=31)			Φορείς <i>BRAF</i> ^{V600E} (N=12)			<i>BRAF</i> ^{V600E-} (N=13)		
	Βελτίωση n(%)	Σταθερή νόσος, n(%)	Επιδείνωση n(%)	Βελτίωση n(%)	Σταθερή νόσος, n(%)	Επιδείνωση n(%)	Βελτίωση n (%)	Σταθερή νόσος, n(%)	Επιδείνωση n(%)
Συνδυασμός χειρουργικής εκτομής και τοπικής ακτινοθεραπείας	2 (66.66)	1 (33.33)	0	1 (50)	1(50)	0	0	0	0
Συνδυασμός χειρουργικής εκτομής και χημειοθεραπείας	1 (100)	0	0	0	0	0	0	0	0
Συνδυασμός χημειοθεραπείας και τοπικής	0	1 (100)	0	0	0	0	0	1 (100)	0

ακτινοθεραπείας									
Συνδυασμός χειρουργικής εκτομής και διακοπή καπνίσματος	1 (100)	0	0	0	0	0	1 (100)	0	0
Συνδυασμός χημειοθεραπείας, ακτινοθεραπείας και χειρ.εκτομής	1 (100)	0	0	1 (100)	0	0	0	0	0

Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά ασθενών και BRAF status

Χαρακτηριστικά ασθενών	Όλοι οι ασθενείς (n) N=31	BRAF ^{V600E+} (n, %) N=12	BRAF ^{V600E-} (n, %) N=13	P value
Φύλο				0.022 ¹
Θήλυ	19	10 (52.6%)	5 (26.3%)	
Άρρεν	12	2 (16.6%)	8 (66.6%)	
Έκταση νόσου				0.411 ²
Πολυσυστηματική νόσος	20	7 (35%) (95% CI: 15.4% - 59.2%)	10 (50%) (95% CI: 27.2% - 72.8%)	
Μονοσυστηματική νόσος	11	5 (45.5%) (95% CI: 16.7% - 76.6%)	3 (27.2%) (95% CI: 6% - 61%)	
Άλλες κακοήθειες	8	4(50%)	3(37.5%)	0.673 ²
Κάπνισμα	14	9 (64.2%)	4 (28.5%)	0.027 ¹
Ηλικία κατά τη συμμετοχή στη μελέτη (σε έτη)	45.28 (37.56-54.24)	44.19 (38.68-51.53)	45.28 (37.56-52.63)	0.957 ³
Ηλικία κατά τη διάγνωση	32.0 (22.0-47.0)	36.5 (29.5-44.5)	30.0 (21.0-47.0)	0.384 ³
Απάντηση στη θεραπεία	Βελτίωση 24 Σταθερή νόσος 5 Επιδείνωση 2	Βελτίωση 9 (37.5%) Σταθερή νόσος 2 (40%) Επιδείνωση 1 (50%)	Βελτίωση 9 (37.5%) Σταθερή νόσος 3 (60%) Επιδείνωση 1 (50%)	1.000 ²
Υποτροπή	9	2 (22.2%)	4 (44.4%)	0.645 ²
Πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής εντόπιση	Οστό: 18 Πνεύμονες: 4 LNS: 2 Δέρμα: 2 Ήπαρ: 1	Οστό: 8 (44.4%) Πνεύμονες: 3 (75%) LNS: 0 (0) Δέρμα: 0 (0)	Οστό: 6 (33.3%) Πνεύμονες: 1 (25%) LNS: 1 (50%)	0.510 ²

	Παρωτίδα: 1 ΚΝΣ: 2 Βλεννογόνοι: 1	Ήπαρ: 0 (0) Παρωτίδα: 0 (0) ΚΝΣ:1 (50%) Βλεννογόνοι: 0 (0)	Δέρμα: 1 (50%) Ήπαρ: 1 (100%) Παρωτίδα: 1 (100%) ΚΝΣ: 1 (50%) Βλεννογόνοι: 1(100%)	
--	--	--	--	--

*¹Chi-squared test, ²Fisher's exact test, ³Kruskal-Wallis test

Συζήτηση

α) Καταγραφή ετήσιας επίπτωσης

Με τον υπολογισμό της ετήσιας επίπτωσης της LCH στον ενήλικο πληθυσμό στην Ελλάδα στο 1,58 ανά εκατομμύριο πληθυσμού, η μελέτη μας αποτελεί την πρώτη οργανωμένη προσπάθεια καταγραφής της επίπτωσης της LCH σε εθνικό επίπεδο, βασιζόμενη στο gold standard της διάγνωσης, την ιστολογική εξέταση και επιβεβαιώνει τις εκτιμήσεις με βάση τους παιδιατρικούς πληθυσμούς.⁷³

Καθώς η LCH αποτελεί μία σπάνια ιστοκυτταρική διαταραχή, η επίπτωση της θεωρούταν άγνωστη. Μεγάλες μελέτες αφορούν συνήθως κέντρα αναφοράς της νόσου και ως εκ τούτου η υποεκτίμηση της διάγνωσης είναι πιθανή στο γενικό πληθυσμό. Η LCH έχει διαγνωσθεί σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, αλλά παγκοσμίως συναντάται συχνότερα στα παιδιά με μέση ηλικία διάγνωσης τα 3 έτη, με μία εκτιμώμενη ετήσια επίπτωση έως 8.9 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού σε παιδιά κάτω των 15 ετών και μία αναλογία αρρένων / θηλέων 2:1.^{74,75} Στους ενήλικες η νόσος είναι σπανιότερη εν συγκρίσει με τα παιδιά και θεωρείται ορφανή νόσος ("orphan disease"), με εκτιμώμενη επίπτωση από τα παιδιατρικά δεδομένα 1-2 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού ετησίως και μέση ηλικία διάγνωσης τα 33 έτη, αν και μία επίπτωση παρόμοια με αυτή των παιδιών έχει προταθεί.^{74,76}

Ένα ευρύ φάσμα ιατρικών ειδικοτήτων ασχολείται με τη διάγνωση και τη διαχείρισή της LCH, γεγονός που καθιστά τον υπολογισμό της ετήσιας επίπτωσης μία πρόκληση και συμβάλλει στο χαρακτηρισμό της ως "ορφανή νόσος". Επίσης ασθενείς που είχαν εκδηλώσει τη νόσο σε

νεαρή ηλικία μπορεί να υποτροπιάσουν στην ενήλικη ζωή οδηγώντας σε διάχυση παιδιατρικών περιστατικών στην ενήλικη ζωή. Στην Ελλάδα, οι περιπτώσεις LCH ενηλίκων δεν περιλαμβάνονται σε εθνικό μητρώο (registry). Ως εκ τούτου, για τον υπολογισμό της ετήσιας επίπτωσης αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε ιστοπαθολογικές αναφορές απευθείας από τα παθολογοανατομικά εργαστήρια ως κύρια μέθοδο καταγραφής αντί για την ενεργό παρακολούθηση μέσω ενός συγκεκριμένου δικτύου ιατρικών ειδικοτήτων. Η συνεχής επικοινωνία με τα παθολογοανατομικά εργαστήρια της χώρας, η κάλυψη της πλειοψηφίας αυτών (85%), η προοπτική φύση της μελέτης καθώς και η παραπομπή περιστατικών από το σύλλογο Άρτεμις και ιατρούς άλλων ειδικοτήτων στην κλινική ενηλίκων με LCH αποτελούν επιπλέον πλεονεκτήματα της παρούσας μελέτης.

Η επίπτωση φαίνεται να είναι υψηλότερη σε άτομα με καταγωγή από την Βόρεια Ευρώπη.⁷⁷ Η LCH με αποκλειστική προσβολή των πνευμόνων είναι μία σπάνια διαταραχή που προσβάλλει τους ενήλικες με επίπτωση σχεδόν αποκλειστικά τους καπνιστές. Δεν υπάρχει ένδειξη ότι οι συγγενείς των ασθενών με LCH έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν τη νόσο. Πολύ σπάνια δίδυμοι ή αδέρφια έχουν προσβληθεί εκτός από λίγες περιπτώσεις με εκδηλώσεις της νόσου νωρίς κατά την παιδική ηλικία και παρόμοια προσβολή οργάνων σε μονοζυγωτικούς διδύμους.⁷⁸ Μία αναφορά στη βιβλιογραφία περιγράφει επίσης 3 περιπτώσεις με προσβολή του δέρματος και των οστών σε μία οικογένεια Ιρανών.⁷⁹ Στην παρούσα μελέτη δεν αναφέρθηκε οικογενειακό ιστορικό της νόσου, ενώ δεν μπορέσαμε να διερευνήσουμε την επίπτωση της νόσου σε σχέση με τη φυλή και την εθνικότητα καθώς η Ελλάδα είναι χώρα με σχετικά μικρό πληθυσμό και ποσοστό μη καυκάσιων κατοίκων. Επιπλέον, δεν διαπιστώσαμε εποχικότητα όσον αφορά το μήνα διάγνωσης, παρά το γεγονός ότι έχει αναφερθεί σε μελέτες παιδιών.⁸⁰

Λόγω του σχεδιασμού της μελέτης, ο χρόνος από την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων μέχρι τη διάγνωση δεν είναι γνωστός στις περισσότερες περιπτώσεις, αν και αναμένεται να ποικίλει πολύ όπως σε οποιαδήποτε άλλη σπάνια ασθένεια. Όπως αναμενόταν η νόσος αφορούσε ένα ευρύ ηλικιακό φάσμα με την ηλικία διάγνωσης να κυμαίνεται από 19 έως 76 ετών και με τη μέση ηλικία κατά τη διάγνωση να είναι παρόμοια και στα δύο φύλα (43,6 έτη στις γυναίκες και 43,3 έτη στους άνδρες). Ο σκελετός και οι πνεύμονες ήταν οι πιο συχνά εμπλεκόμενοι ιστοί και στα δύο φύλα, ενώ αν και η νόσος αναφέρθηκε ως μονοσυστηματική στην πλειονότητα των περιπτώσεων (8 περιπτώσεις, 57%), αυτό μπορεί να σχετίζεται με την διάγνωση της νόσου στα αρχικά στάδια ή με τη διενέργεια της βιοψίας πριν τον τελικό

απεικονιστικό έλεγχο. Επιπλέον, δεν ήταν δυνατή η παροχή κλινικών πληροφοριών σχετικά με την έκταση της νόσου σε 4 περιστατικά.

Ένας πιθανός περιορισμός της επιδημιολογικής μελέτης θα μπορούσε να είναι ο αποκλεισμός των νέων περιπτώσεων που βασίζονται αποκλειστικά στο ποσοστό των κυττάρων CD1a (+) στο BAL. Όταν το BAL αποδίδει $\geq 5\%$ του CD1a (+) υποστηρίζει τη διάγνωση της νόσου με υψηλή εξειδίκευση, αν και στερείται ευαισθησίας.⁸¹ Αποφασίσαμε να μην συμπεριλάβουμε αυτές τις περιπτώσεις λόγω της τυφλής συλλογής ιστολογικών δεδομένων σύμφωνα με τον κανονισμό προστασίας προσωπικών δεδομένων, αποκλείοντας έτσι παράλληλα σημαντικές ακτινολογικές και κλινικές πληροφορίες που θα υποστήριζαν σε ένα αποδεκτό επίπεδο βεβαιότητας την τελική διάγνωση. Επιπλέον, τα 18 παθολογοανατομικά εργαστήρια που δεν συμμετείχαν στη μελέτη μας ήταν όλα μικρές ιδιωτικές μονάδες. Ως εκ τούτου, η πιθανότητα να μην έχει καταγραφεί ένα νεοδιαγνωσθέν περιστατικό από τις εν λόγω πηγές είναι χαμηλή. Ωστόσο, μπορεί να μην έχουν καταγραφεί ήπιες περιπτώσεις που δεν έχουν φτάσει ποτέ σε ιστολογική διάγνωση και έτσι είναι πιθανό τα αποτελέσματά μας να υποτιμήσουν σε μικρό βαθμό την πραγματική ετήσια επίπτωση της νόσου μεταξύ των ενηλίκων.

β) Καταγραφή επίπτωσης της μετάλλαξης στους ενήλικες με LCH στον Ελληνικό πληθυσμό

Η ετήσια συχνότητα εμφάνισης της LCH σε ενήλικες στη μελέτη μας, όπως προαναφέρθηκε, είναι χαμηλότερη από αυτή των παιδιών. Παρομοίως, ο επιπολασμός και το αντίκτυπο της παρουσίας της μετάλλαξης *BRAF*^{V600E} στις κλινικές εκδηλώσεις της LCH στους ενήλικες φαίνεται να διαφέρουν σε σύγκριση με τα παιδιατρικά δεδομένα. Αν και η μετάλλαξη ανιχνεύεται σε έως και 70% των περιπτώσεων σε παιδιά, εντοπίστηκε μόνο στο 38,71% των περιπτώσεων στη μελέτη μας [48% των επαρκώς genotyped δειγμάτων (12 από τα 25)] και παρά την πιθανή επίδραση στον ακριβή προσδιορισμό της επίπτωσης λόγω των έξι ασαφών αποτελεσμάτων, αυτή η χαμηλότερη συχνότητα είναι σύμφωνη με τα δεδομένα που προέρχονται από άλλες μελέτες που αφορούν παρουσία της μετάλλαξης *BRAF*^{V600E} σε ενήλικες.⁶⁰

Συγκεκριμένα, ακόμη και αν όλα τα ασαφή δείγματα μας κατέληγαν να είναι θετικά για τη μετάλλαξη *BRAF*^{V600E}, το συνολικό ποσοστό θα είχε φτάσει το 58%. Τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν από τον Selway και τους συνεργάτες του διαπίστωσαν μια συχνότητα της μετάλλαξης στο 38% στους ενήλικες χωρίς να αποδείξουν κάποια σχέση μεταξύ της παρουσίας της και της εντόπισης της βλάβης ή της έκτασης της νόσου.⁶¹ Ομοίως ο Alayed και οι

συνεργάτες του ανέφεραν ακόμη χαμηλότερη συχνότητα (16%) της μετάλλαξης του BRAF στους ασθενείς που μελέτησαν, καθώς η πλειοψηφία των ασθενών ήταν ενήλικες,⁸² ενώ συγκρίσιμα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί από μελέτες που επικεντρώνονται σε πληθυσμούς ενηλίκων στην Ασία, με το ποσοστό της μετάλλαξης *BRAF*^{V600E} να κυμαίνεται μεταξύ 0% και 43% σε μελέτες με διψήφιο αριθμό περιπτώσεων.^{49,90}

Η παρουσία της μετάλλαξης έχει συσχετιστεί με νόσο υψηλού κινδύνου σε παιδιά, συμπεριλαμβανομένης της πολυσυστηματικής LCH, της συμμετοχής οργάνων υψηλού κινδύνου, της παρουσίας μη αναστρέψιμης βλάβης (όπως νευρολογικές βλάβες), της αντοχής στη χημειοθεραπεία και του υψηλότερου ποσοστού επανενεργοποίησης της νόσου. Σε ενήλικες έχει παρατηρηθεί υψηλότερος επιπολασμός της μετάλλαξης σε όργανα υψηλού κινδύνου αν και δεν έχει υπάρξει συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας της και της σοβαρότητας της νόσου ή/ και της έκτασης της, του φύλου, της ηλικίας, της ανάπτυξης άποιου διαβήτη, του κινδύνου προσβολής του ΚΝΣ ή της επιβίωσης.^{61,82}

Ομοίως, στη μελέτη μας δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της παρουσίας της μετάλλαξης με την ηλικία κατά τη διάγνωση, τη συμμετοχή συγκεκριμένων οργάνων, την έκταση της νόσου (μονοσυστηματική ή πολυσυστηματική), την ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία (είτε χημειοθεραπεία, χειρουργική εξαίρεση, διακοπή καπνίσματος, τοπική ακτινοθεραπεία ή συνδυαστική θεραπεία), την ανάπτυξη άποιου διαβήτη και τον κίνδυνο υποτροπής.

Σε αντίθεση όμως με προηγούμενες αναφορές, παρατηρήθηκε διαφορά στο φύλο με περισσότερες γυναίκες να είναι φορείς της μετάλλαξης ($p < 0.022$) και αυτή η πιθανή συσχέτιση πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, καθώς δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε ένα βέβαιο συμπέρασμα λόγω της παρουσίας 4 γυναικών και 2 ανδρών στα δείγματα με ασαφές αποτέλεσμα BRAF.

Η συσχέτιση με τη συμμετοχή οργάνων υψηλού κινδύνου δεν μπορεί να τεκμηριωθεί στην παρούσα μελέτη λόγω της απουσίας ασθενών με προσβολή οργάνων, όπως το ήπαρ, ο σπλήνας ή ο μυελός των οστών.

Μια σημαντική συσχέτιση της παρουσίας της μετάλλαξης με την ηλικία με μια υπεροχή στα παιδιά μικρότερης ηλικίας (<2 ετών), καθώς και με προέχουσα δερματική νόσο και προσβολή οργάνων υψηλού κινδύνου έχει επίσης αναφερθεί.⁸³ Σε αντίθεση με τα παιδιά, δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποστηρίζουν συσχέτιση της μετάλλαξης με την εντόπιση στο δέρμα και τη

συμμετοχή οργάνων υψηλού κινδύνου καθώς και τη χρήση της ως δείκτη παρακολούθησης της νόσου. Το αντίκτυπο της νόσου στα παιδιά είναι ξεκάθαρα μεγαλύτερο, ειδικά αν λάβουμε υπόψη μελέτες στις οποίες όλοι οι φορείς είχαν πολυσυστηματική νόσο με την μειοψηφία αυτών να επιβιώνουν χωρίς επεισόδια υποτροπής της νόσου και μικρότερα ποσοστά επιβίωσης στους 36 μήνες (17% και 32.5% των φορέων αντίστοιχα).⁸⁴ Επιπλέον, η μετάλλαξη έχει ανευρεθεί στο circulating cell-free (ccf) DNA στο 100% των παιδιών με πολυσυστηματική νόσο με προσβολή οργάνων υψηλού κινδύνου, σε 42% με πολυσυστηματική νόσο χωρίς προσβολή οργάνων υψηλού κινδύνου και 14% με μονοσυστηματική νόσο με το φορτίο να είναι μεγαλύτερο στους ασθενείς με εμπλοκή οργάνων υψηλού κινδύνου. Όλα τα παιδιά που δεν απάντησαν στο πρωτόκολλο βιμπλαστίνης-στεροειδών παρέμειναν θετικά όσον αφορά την παρουσία της μετάλλαξης στο ccf συγκριτικά με το 50% των ατόμων με μερική ανταπόκριση και το 0% των ατόμων που απάντησαν πλήρως, ένα εύρημα που προτείνει ότι το ccf *BRAF*^{V600E} θα μπορούσε να είναι ένας υποσχόμενος βιοδείκτης όσον αφορά την απάντηση στη θεραπεία.⁸⁴ Δεν υπάρχουν ωστόσο στοιχεία που να υποστηρίζουν παρόμοιο αντίκτυπο της μετάλλαξης στους ενήλικες ή τη χρήση της σαν δείκτη εξέλιξης της νόσου.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όσον αφορά το κάπνισμα υπήρξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (75% το *BRAF*^{V600E+} έναντι 30,77% το *BRAF*^{V600E-}, p value: 0,047). Αν και το κάπνισμα προάγει την παθογένεια της PLCH, δεν υπάρχει καμία καθιερωμένη σχέση μεταξύ του καπνίσματος και της μετάλλαξης *BRAF*^{V600E} στην LCH. Ωστόσο, υπάρχει σαφής συσχέτιση μεταξύ της χρήσης καπνού και της μετάλλαξης *BRAF*^{V600E} σε άλλα νεοπλάσματα, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου, μέσω μηχανισμών όπως η μικροδορυφορική αστάθεια, επομένως απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση της συσχέτισης.^{85,86}

Επιπλέον, το ένα τέταρτο των ασθενών στη μελέτη μας (25,81%) είχε ιστορικό κακοήθειας πριν ή μετά τη διάγνωση της LCH σύμφωνα με τον υψηλό επιπολασμό αιματολογικών και συμπαγών κακοηθειών που έχει αναφερθεί από προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς με LCH, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω.⁷¹

Αν και το ιστορικό προηγούμενης χημειοθεραπείας μπορεί δυνητικά να συμβάλει στην κλωνική αιμοποίηση και έτσι να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης της LCH, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά όσον αφορά αυτή την παράμετρο μεταξύ των φορέων και μη της μετάλλαξης στη παρούσα μελέτη. Ωστόσο, η ομάδα μελέτης είναι μάλλον μικρή για να αναδείξει αν υπάρχει

συσχέτιση της παρουσίας της μετάλλαξης *BRAF^{V600E}*, της παθογένεσης της LCH και της ογκογένεσης. Μία κοινή οδός μεταξύ της LCH και άλλων όγκων φαίνεται λογική από παθοφυσιολογικής άποψης, δεδομένου του σχετικά υψηλού επιπολασμού άλλων κακοηθειών μεταξύ των ασθενών με τη νόσο.

Η ανακάλυψη της μετάλλαξης *BRAF^{V600E}* και αρκετών άλλων οδηγών μεταλλάξεων έχει οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της LCH και της ανάπτυξης θεραπειών που στοχεύουν στο μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK. Η χρήση αναστολέων BRAF, όπως το vemurafenib και το dabrafenib, συνήθως περιορίζεται στην ανθεκτική ή συχνά υποτροπιάζουσα νόσο, αν και έχουν αναφερθεί πρόσφατα θετικά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε περιστατικά με συμμετοχή οργάνων υψηλού κινδύνου ή σοβαρή συμπτωματική νόσο που θα μπορούσε να ωφεληθεί από μια γρήγορη ανταπόκριση.⁸⁷ Επιπλέον, ο αναστολέας του MEK 1/2 cobimetinib έδειξε υψηλό ποσοστό ανταπόκρισης σε ασθενείς με ιστοκυττάρωση (ηλικίας 16 ετών και άνω) ανεξάρτητα από τον γονότυπο τους.⁸⁸ Καθώς αποκρυσταλλώνονται τις μοριακές διαταραχές που οδηγούν στη νόσο, αναμένεται να προκύψουν πιο στοχευμένες θεραπείες βελτιώνοντας την πορεία της νόσου και την ποιότητα ζωής των ασθενών με LCH.

Αναφορικά με τους περιορισμούς της μελέτης μας, σημαντική είναι παρουσία των έξι ασαφών δειγμάτων που μας εμποδίζουν να προσφέρουμε ένα σαφή επιπολασμό του *BRAF^{V600E}* στα δείγματα που αναλύθηκαν. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας επιτρέπουν μια εκτίμηση ενός επιπολασμού περίπου στο 40-50% των ενηλίκων. Η κλινική ενηλίκων με LCH έχει αναγνωρισθεί ως το μοναδικό κέντρο εμπειρογνωμοσύνης σε εθνικό επίπεδο από τον Νοέμβριο του 2019 (Εφημερίδα της Κυβέρνησης, No 4269, εκδόθηκε στις 22 Νοεμβρίου του 2019). Με βάση την εκτίμηση της ετήσιας επίπτωσης της νόσου και την τελευταία εκτίμηση του ελληνικού πληθυσμού στα 10,423,054, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι οι 162 ασθενείς της βάσης δεδομένων αντιστοιχούν στον αριθμό των διαγνωσθέντων ενηλίκων με τη νόσο στην Ελλάδα τα τελευταία 10 έτη. Επομένως, πιστεύουμε ότι η βάση δεδομένων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι αντιπροσωπευτική του ελληνικού πληθυσμού παρόλο που περιλαμβάνει και περιστατικά με διάγνωση εκτός των τελευταίων 10 ετών.

Ένας δεύτερος περιορισμός είναι το χαμηλό ποσοστό (19,1%) των δειγμάτων από το σύνολο των 162 ασθενών της κλινικής ενηλίκων με LCH, γεγονός που οφείλεται στην περιορισμένη διαθεσιμότητα δειγμάτων ιστού, όπως συμβαίνει σε όλες τις αναδρομικές γενετικές μελέτες.

Αν και δεν μπορούμε σίγουρα να αποκλείσουμε το συστηματικό σφάλμα επιλογής λόγω ζητημάτων σχετικά με τη μεθοδολογία της βιοψίας και την ικανότητά μας να αποκτήσουμε ποιοτικό DNA, το δείγμα μας είναι αντιπροσωπευτικό της κλινικής ενήλικων όσον αφορά την ηλικία, το φύλο, τη συμμετοχή των συστημάτων, τη θεραπεία και την πορεία της νόσου όπως παρουσιάζεται στους πίνακες 1 και 2.

Συμπεράσματα

Η ιστοκυττάρωση Langerhans είναι μια σπάνια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μονήρεις ή πολλαπλές βλάβες με διήθηση των ιστών από παθολογικά κύτταρα που προσομοιάζουν με τα κύτταρα Langerhans, τα οποία αποτελούν μια υποκατηγορία των δενδριτικών κυττάρων που βρίσκονται στο δέρμα και τους βλεννογόνους. Η νόσος περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος εκδηλώσεων και μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε όργανο εκτός από την καρδιά και τους νεφρούς. Στους ενήλικες θεωρείται "ορφανή νόσος" λόγω της σπανιότητάς της και των ποικίλων κλινικών εκδηλώσεων που συνεπάγεται τη διάγνωση και διαχείριση της από ευρύ φάσμα των ιατρικών ειδικοτήτων. Επιπλέον, παρατηρείται διάχυση παιδιατρικών περιστατικών στην ενήλικη ζωή, καθώς ασθενείς που είχαν εκδηλώσει τη νόσο σε νεαρή ηλικία μπορεί να υποτροπιάσουν στην ενήλικη ζωή συμβάλλοντας έτσι στον μη ακριβή υπολογισμό της επίπτωσης στους ενήλικους.

Η LCH διαγιγνώσκεται με βάση την ιστολογική εξέταση είτε με θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για CD1a και CD207 είτε με την ταυτοποίηση των κοκκίων Birbeck στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, κατηγοριοποιείται πλέον ως μυελογενές νεόπλασμα και σε μοριακό επίπεδο χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση του μονοπατιού RAS-RAF-MEK-ERK μέσω μεταλλάξεων, η συχνότερη εκ των οποίων είναι η μετάλλαξη του γονιδίου *BRAF*^{V600E}.

Η μελέτη μας αποτελεί την πρώτη επιδημιολογική μελέτη που εξετάζει την ετήσια επίπτωση της LCH ενήλικων σε εθνικό επίπεδο με βασικότερο πλεονέκτημα της το γεγονός ότι έγκειται στην προοπτική ιστολογική εξακρίβωση των περιπτώσεων, η οποία είναι το τελικό στάδιο κατά τη διαδικασία της διάγνωσης. Η ετήσια επίπτωση της LCH μεταξύ των ενήλικων στην Ελλάδα υπολογίστηκε σε 1,58 ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος, αποτέλεσμα το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με υπολογισμούς βάση παιδιατρικών δεδομένων. Λόγω της σπανιότητας της νόσου και των ποικίλων κλινικών εκδηλώσεων, για τη βέλτιστη διαχείριση των

ασθενών, απαιτείται επειγόντως ένα εθνικό καθώς και ένα διεθνές μητρώο καταχώρησης των περιστατικών, καθώς και το κίνητρο των ιατρών να συμβάλλουν στις βάσεις καταγραφής.

Το δεύτερο σκέλος της μελέτης μας αφορούσε την διερεύνηση της συχνότητας της μετάλλαξης $BRAF^{V600E}$ στον ελληνικό πληθυσμό και τη συσχέτιση της με κλινικές παραμέτρους της νόσου. Στην μελέτη μας, ο επιπολασμός της μετάλλαξης $BRAF^{V600E}$ ήταν 39% και με εξαίρεση την επικράτηση στις γυναίκες δεν βρέθηκε άλλη συσχέτιση της μετάλλαξης με τις παραμέτρους της νόσου όπως ηλικία κατά τη διάγνωση, συμμετοχή οργάνων, έκταση της νόσου, ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία, ανάπτυξη άποιου διαβήτη, κίνδυνο υποτροπής, ιστορικό κακοήθειας. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας, σε συνδυασμό με την τρέχουσα βιβλιογραφία και δεδομένης της ύπαρξης 6 δειγμάτων με ασαφές αποτέλεσμα, υποστηρίζουν ότι θα μπορούσε να αναμένεται επιπολασμός της μετάλλαξης σε έως και 50% μεταξύ των ενηλίκων με LCH, ποσοστό χαμηλότερο από αυτό των παιδιών.

Απαιτούνται, ωστόσο, περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών για τον εντοπισμό ολόκληρου του φάσματος μεταλλάξεων στα γονίδια που σχετίζονται με την παθογένεια της νόσου και τον εντοπισμό πιθανών κλινικών συσχετισμών που θα οδηγήσουν σε μια πιο εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση. Οι θεραπευτικές παρεμβάσεις που στοχεύουν στο μονοπάτι RAS-RAF-MEK-ERK, μεταξύ αυτών οι αναστολείς του BRAF και MEK 1/2, εισήχθησαν πρόσφατα στη θεραπευτική φάρετρα με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Η αποκρυπτογράφηση των μοριακών διαταραχών που οδηγούν στη νόσο αναμένεται να οδηγήσει σε πιο στοχευμένες θεραπείες βελτιώνοντας την πορεία της νόσου και την ποιότητα ζωής των ασθενών με LCH.

Περίληψη

Η ιστοκυττάρωση Langerhans (LCH) αποτελεί μία σπάνια διαταραχή που χαρακτηρίζεται από διήθηση των ιστών από κύτταρα που προσομοιάζουν στα κύτταρα Langerhans, μία υποκατηγορία δενδριτικών κυττάρων που βρίσκεται στο δέρμα και τους βλεννογόνους. Η νόσος μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε όργανο και κατηγοριοποιείται ως φλεγμονώδες μυελοειδές νεόπλασμα με μεταλλάξεις στο μονοπάτι MAPK/ERK να ανευρίσκονται στο σύνολο των ιστολογικών διαγνώσεων της νόσου. Η μετάλλαξη $BRAF^{V600E}$ αποτελεί την συχνότερα εντοπιζόμενη με τη συχνότητα της να φτάνει το 60% στους παιδιατρικούς πληθυσμούς, στους οποίους αναφέρεται συσχέτιση της με την εντόπιση, την έκταση και την βαρύτητα της νόσου.

Η LCH έχει διαγνωσθεί σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, αλλά παγκοσμίως συναντάται συχνότερα στα παιδιά με μέση ηλικία διάγνωσης τα 3 έτη, με μία εκτιμώμενη ετήσια επίπτωση έως 8.9 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού σε παιδιά κάτω των 15 ετών. Στους ενήλικες η νόσος είναι σπανιότερη και θεωρείται "ορφανή νόσος" με εκτιμώμενη επίπτωση από τα παιδιατρικά δεδομένα 1-2 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού ετησίως και μέση ηλικία διάγνωσης τα 33 έτη χωρίς οι ανωτέρω εκτιμήσεις να έχουν επιβεβαιωθεί μέσω μιας οργανωμένης επιδημιολογικής μελέτης στον ενήλικο πληθυσμό.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η προοπτική καταγραφή, για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, της ετήσιας επίπτωσης της LCH στους ενήλικες και η διερεύνηση του επιπολασμού της μετάλλαξης *BRAF*^{V600E} στον ενήλικο Ελληνικό πληθυσμό καθώς και η συσχέτιση αυτής με κλινικό-εργαστηριακά δεδομένα, όπως η έκταση της νόσου, η ηλικία κατά τη διάγνωση, το φύλο, η προσβολή οργάνων, η ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία (χημειοθεραπεία, χειρουργική εκτομή, διακοπή καπνίσματος, τοπική ακτινοθεραπεία ή συνδυαστική θεραπεία), η παρουσία άποιου διαβήτη, το ιστορικό κακοήθειας και ο κίνδυνος υποτροπής.

Η καταγραφής των νέων περιπτώσεων LCH πραγματοποιήθηκε από την 1η Σεπτεμβρίου 2018 έως τις 31 Αυγούστου 2019 μέσω τακτικής επικοινωνίας με τα παθολογοανατομικά εργαστήρια που λειτουργούν στο Ελληνικό Σύστημα Υγείας, φθάνοντας συνολικά σε ποσοστό κάλυψης το 85%. Η ετήσια επίπτωση της LCH μεταξύ των ενηλίκων στην Ελλάδα υπολογίστηκε σε 1,58 ανά εκατομμύριο πληθυσμού ανά έτος, με μέση ηλικία διάγνωσης τα 43,5 έτη και αναλογία θήλεων / αρρένων 1.34.

Η μετάλλαξη *BRAF*^{V600E} ανευρέθηκε στο 39% των ασθενών της κλινικής ενηλίκων με LCH που έλαβαν μέρος στη μελέτη. Συγκεκριμένα, κατόπιν έγγραφης συγκατάθεσης, απομονώθηκε DNA από 40 κύβους παραφίνης, εκ των οποίων 31 απέδωσαν επαρκές υλικό για περαιτέρω ανάλυση με PCR. Η μετάλλαξη *BRAF*^{V600E} εντοπίστηκε σε 12 ασθενείς (38.71%) με επικράτηση των γυναικών (83.3%), ενώ 13 ασθενείς (41.94%) δεν έφεραν τη μετάλλαξη. Σε 6 ασθενείς (2 άνδρες), (19.35%), η qPCR μελέτη του *BRAF*^{V600E} δεν πληρούσε τα τεχνικά πρότυπα που απαιτούνται για την οριστική ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της παρουσίας της μετάλλαξης με την ηλικία κατά τη διάγνωση, τη συμμετοχή συγκεκριμένων οργάνων, την έκταση της νόσου (μονοσυστηματική

ή πολυσυστηματική), την ανταπόκριση στην αρχική θεραπεία, την ανάπτυξη άποιου διαβήτη και τον κίνδυνο υποτροπής.

Καθώς οι νεότερες θεραπευτικές παρεμβάσεις στοχεύουν σε μοριακά μονοπάτια της νόσου απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον εντοπισμό ολόκληρου του φάσματος μεταλλάξεων που σχετίζονται με την παθογένεια της νόσου και τις κλινικές της εκδηλώσεις.

Summary

Langerhans cell histiocytosis (LCH) is a rare condition, characterized by tissue infiltration with cells that resemble Langerhans cells, a specialized subset of dendritic cells, which populates the epidermal layer of the skin and the mucosal tissues. LCH can affect any organ and is considered an inflammatory myeloid neoplasm with mutations in the MAPK/ERK pathway being found in all histological examinations. The *BRAF*^{V600E} is the most common mutation, with a frequency of up to 60% in pediatric studies and an association with the disease extent, number of affected systems and severity of clinical manifestations.

LCH is diagnosed in all age groups, but is most commonly seen in children with a mean age of diagnosis at 3 years old and an estimated annual incidence of up to 8.9 cases per million population in children under 15 years old. In adults the disease is rarer and is considered an "orphan disease" with an estimated incidence of 1-2 cases per million population and mean age at diagnosis at 33 years old. However, this estimated annual incidence hasn't been further investigated through an organized epidemiological study in the adult population.

The aim of this research study is the prospective recording of the annual incidence of LCH in adults for the first time in literature and the investigation of the presence of the *BRAF*^{V600E} mutation in Greek adults with LCH as well as its association with clinical parameters, such as the disease extent, age at diagnosis, gender, organ involvement, response to initial treatment (chemotherapy, surgical excision, smoking cessation, local radiotherapy or combination therapy), presence of diabetes insipidus, history of malignancy and relapse risk.

The recording of new cases took place from the 1st of September 2018 until the 31st of August 2019 after frequent communication with the vast majority of pathology laboratories in the National Health System in Greece (85%). The annual incidence of the disease in adults in Greece

was estimated at 1.58 per million population with a mean age at diagnosis at 43.5 years and a female to male ratio of 1.34.

The *BRAF*^{V600E} mutation was found in 39% of the patients who are followed up in the LCH adult clinic and agreed to take part in the study. Upon written consent, DNA was isolated from 40 formalin fixed, paraffin-embedded tissue blocks, of which 31 yielded sufficient DNA for molecular analysis with PCR. The *BRAF*^{V600E} mutation was found in 12 patients (38,71%) with the majority being females (83.3%), while 13 patients (41,94%) did not carry the mutation. In 6 patients (2 men), (19,35%), genotyping qPCR studies failed to meet the technical standards required for definitive interpretation of results.

There was no statistically significant association of the presence of the mutation with age at diagnosis, organ involvement, disease extent (single system or multi-system), response to initial treatment, development of diabetes insipidus and relapse risk.

As targeted therapies become more widespread in the management of LCH, further studies are needed for the discovery of the full spectrum of mutations implicated in disease pathogenesis.

Γ. Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Emile JF, Ablu O, Fraitag S, Horne A, Haroche J, Donadieu J, Requena-Caballero L, Jordan MB, Abdel-Wahab O, Allen CE, Charlotte F, Diamond EL, Egeler RM, Fischer A, Herrera JG, Henter JI, Janku F, Merad M, Picarsic J, Rodriguez-Galindo C, Rollins BJ, Tazi A, Vassallo R, Weiss LM; Histiocyte Society. Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood*. 2016 Jun 2;127(22):2672-81.
2. Hand A. Polyuria and tuberculosis. *Arch Pediatr*, 10 (1893), p. 673.
3. Schuller A. Uber eigenartige Sch adelfefekte im Jugendalter. *Fortschr Rontgenstrahlen* 1915;23:12-18.
4. Christian H. Defects in membranous bones, exophthalmos and diabetes insipidus; an unusual syndrome of dyspituitarism. *Med Clin North Am*. 1920;3:849-871.
5. Thomson CQ, Keegan JJ, Dunn AD. Defects of membranous bones, exophthalmos and diabetes insipidus: report of a case with necropsy. *Arch Intern Med (Chic)*. 1925;36(5):650-666.
6. Letterer, E. Aleukamische Retikulose, Frankfurt Z Path 30:377, 1924.

7. Siwe, S.A. Die Retikuloendotheliose-ein neues Krankheitsbild unter den Hepatosplenomegalien, *Z Kinderheilk* 55:212-247, 1933.
8. Lichnestein L. Histiocytosis X; integration of eosinophilic granuloma of bone, Letterer-Siwe disease, and Schüller-Christian disease as related manifestations of a single nosologic entity. *AMA Arch Pathol*. 1953 Jul;56(1):84-102.
9. Basset F, Nezelof C, Mallet R, Turiat J. Nouvelle mise en evidence par la microscopie electronique de particules d'allure virale dans une seconde forme clinique de l'histiocytose X: le granulome eosinophile des os. *CR Acad Sci (Paris)* 261:5719-5720, 1965.
10. Nezelof C, Basset F, Rousseau MF . Histiocytosis X. Histogenetic arguments for a Langerhans'cell origin. *Biomedicine* 18:365-371, 1973.
11. Histiocytosis syndromes in children. Writing Group of the Histiocyte Society. *Lancet*. 1987 Jan 24;1(8526):208-9.
12. Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv* 44:325-325, 1868.
13. Niebauer G, Krawczyk W, Wilgram GF. Über die Langerhans-Zellorganelle bei Morbus Letterersiwe. *Arch Klin Exp Dermatol* 239:125-137, 1970.
14. Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol Cell Biol*. 2010 May-Jun;88(4):387-92.
15. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973 May 1;137(5):1142-62.
16. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, Leboeuf M, Low D, Oller G, Almeida F, Choy SH, Grisotto M, Renia L, Conway SJ, Stanley ER, Chan JK, Ng LG, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med*. 2012 Jun 4;209(6):1167-81.
17. Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):935-47.
18. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, Blankenstein T, Henning G, Förster R. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):279-88.

19. Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, Banks P, Campo E, Chan JK, Favera RD, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gascoyne RD, Gaulard P, Gatter KC, Isaacson PG, Jaffe ES, Kluin P, Knowles DM, Mason DY, Mori S, Müller-Hermelink HK, Piris MA, Ralfkiaer E, Stein H, Su IJ, Warnke RA, Weiss LM. Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. *Histopathology*. 2002 Jul;41(1):1-29.
20. Picarsic J, Jaffe R. Nosology and Pathology of Langerhans Cell Histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015 Oct;29(5):799-823
21. Berres ML, Lim KP, Peters T, Price J, Takizawa H, Salmon H, Idoyaga J, Ruzo A, Lupo PJ, Hicks MJ, Shih A, Simko SJ, Abhyankar H, Chakraborty R, Leboeuf M, Beltrão M, Lira SA, Heym KM, Bigley V, Collin M, Manz MG, McClain K, Merad M, Allen CE. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J Exp Med*. 2014 Apr 7;211(4):669-83.
22. Senechal B, Elain G, Jeziorski E, Grondin V, Patey-Mariaud de Serre N, Jaubert F, Beldjord K, Lellouch A, Glorion C, Zerah M, Mary P, Barkaoui M, Emile JF, Boccon-Gibod L, Josset P, Debré M, Fischer A, Donadieu J, Geissmann F. Expansion of regulatory T cells in patients with Langerhans cell histiocytosis. *PLoS Med*. 2007 Aug;4(8):e253.
23. Laman JD, Leenen PJ, Annels NE, Hogendoorn PC, Egeler RM. Langerhans-cell histiocytosis 'insight into DC biology'. *Trends Immunol*. 2003 Apr;24(4):190-6.
24. Egeler RM, Katewa S, Leenen PJ, Beverley P, Collin M, Ginhoux F, Arceci RJ, Rollins BJ; Steering Committee of the Nikolas Symposium. Langerhans cell histiocytosis is a neoplasm and consequently its recurrence is a relapse: In memory of Bob Arceci. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Oct;63(10):1704-12.
25. Hutter C, Kauer M, Simonitsch-Klupp I, Jug G, Schwentner R, Leitner J, Bock P, Steinberger P, Bauer W, Carlesso N, Minkov M, Gadner H, Stingl G, Kovar H, Kriehuber E. Notch is active in Langerhans cell histiocytosis and confers pathognomonic features on dendritic cells. *Blood*. 2012 Dec 20;120(26):5199-208.
26. Allen CE, Li L, Peters TL, Leung HC, Yu A, Man TK, Gurusiddappa S, Phillips MT, Hicks MJ, Gaikwad A, Merad M, McClain KL. Cell-specific gene expression in Langerhans cell histiocytosis lesions reveals a distinct profile compared with epidermal Langerhans cells. *J Immunol*. 2010 Apr 15;184(8):4557-67.

27. Annels NE, Da Costa CE, Prins FA, Willemze A, Hogendoorn PC, Egeler RM. Aberrant chemokine receptor expression and chemokine production by Langerhans cells underlies the pathogenesis of Langerhans cell histiocytosis. *J Exp Med*. 2003 May 19;197(10):1385-90.
28. Broadbent V, Pritchard J, Davies EG, Levinsky RJ, Heaf D, Atherton DJ, Pincott JR, Tucker S. Spontaneous remission of multi-system histiocytosis X. *Lancet*. 1984 Feb 4;1(8371):253-4.
29. Yu RC, Chu C, Buluwela L, Chu AC. Clonal proliferation of Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Lancet*. 1994 Mar 26;343(8900):767-8.
30. Bechan GI, Meeker AK, De Marzo AM, et al. Telomere length shortening in Langerhans cell histiocytosis. *Br J Haematol*. 2008; 428, 140(4):420-8.
31. Willman CL, Busque L, Griffith BB, Favara BE, McClain KL, Duncan MH, Gilliland DG. Langerhans'-cell histiocytosis (histiocytosis X)--a clonal proliferative disease. *N Engl J Med*. 1994 Jul 21;331(3):154-60.
32. Badalian-Very G, Vergilio JA, Degar BA, MacConaill LE, Brandner B, Calicchio ML, Kuo FC, Ligon AH, Stevenson KE, Kehoe SM, Garraway LA, Hahn WC, Meyerson M, Fleming MD, Rollins BJ. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 2010 Sep 16;116(11):1919-23.
33. Kobayashi M, Tojo A. Langerhans cell histiocytosis in adults: Advances in pathophysiology and treatment. *Cancer Sci*. 2018 Dec;109(12):3707-3713.
34. Haroche J, Charlotte F, Arnaud L, von Deimling A, Hélias-Rodzewicz Z, Hervier B, Cohen-Aubart F, Launay D, Lesot A, Mokhtari K, Canioni D, Galmiche L, Rose C, Schmalzing M, Croockewit S, Kambouchner M, Copin MC, Fraitag S, Sahm F, Brousse N, Amoura Z, Donadieu J, Emile JF. High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses. *Blood*. 2012 Sep 27;120(13):2700-3.
35. Hakraborty R, Hampton OA, Shen X, Simko SJ, Shih A, Abhyankar H, Lim KP, Covington KR, Trevino L, Dewal N, Muzny DM, Doddapaneni H, Hu J, Wang L, Lupo PJ, Hicks MJ, Bonilla DL, Dwyer KC, Berres ML, Poulikakos PI, Merad M, McClain KL, Wheeler DA, Allen CE, Parsons DW. Mutually exclusive recurrent somatic mutations in MAP2K1 and BRAF support a central role for ERK activation in LCH pathogenesis. *Blood*. 2014 Nov 6;124(19):3007-15.

36. Satoh T, Smith A, Sarde A, Lu HC, Mian S, Trouillet C, Mufti G, Emile JF, Fraternali F, Donadieu J, Geissmann F. B-RAF mutant alleles associated with Langerhans cell histiocytosis, a granulomatous pediatric disease. *PLoS One*. 2012;7(4):e33891.
37. Berres ML, Lim KP, Peters T, Price J, Takizawa H, Salmon H, Idoyaga J, Ruzo A, Lupo PJ, Hicks MJ, Shih A, Simko SJ, Abhyankar H, Chakraborty R, Leboeuf M, Beltrão M, Lira SA, Heym KM, Bigley V, Collin M, Manz MG, McClain K, Merad M, Allen CE. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J Exp Med*. 2014 Apr 7;211(4):669-83.
38. Hyman DM, Diamond EL, Vibat CR, Hassaine L, Poole JC, Patel M, Holley VR, Cabrilo G, Lu TT, Arcila ME, Chung YR, Rampal R, Lacouture ME, Rosen N, Meric-Bernstam F, Baselga J, Kurzrock R, Erlander MG, Janku F, Abdel-Wahab O. Prospective blinded study of BRAFV600E mutation detection in cell-free DNA of patients with systemic histiocytic disorders. *Cancer Discov*. 2015 Jan;5(1):64-71.
39. Satoh T, Smith A, Sarde A, Lu HC, Mian S, Trouillet C, Mufti G, Emile JF, Fraternali F, Donadieu J, Geissmann F. B-RAF mutant alleles associated with Langerhans cell histiocytosis, a granulomatous pediatric disease. *PLoS One*. 2012;7(4):e33891.
40. Héritier S, Hélias-Rodzewicz Z, Chakraborty R, Sengal AG, Bellanné-Chantelot C, Thomas C, Moreau A, Fraitag S, Allen CE, Donadieu J, Emile JF. New somatic BRAF splicing mutation in Langerhans cell histiocytosis. *Mol Cancer*. 2017 Jul 6;16(1):115.
41. Lee LH, Gasilina A, Roychoudhury J, Clark J, McCormack FX, Pressey J, Grimley MS, Lorsbach R, Ali S, Bailey M, Stephens P, Ross JS, Miller VA, Nassar NN, Kumar AR. Real-time genomic profiling of histiocytoses identifies early-kinase domain BRAF alterations while improving treatment outcomes. *JCI Insight*. 2017 Feb 9;2(3):e89473.
42. Kordes M, Röring M, Heining C, Braun S, Hutter B, Richter D, Geörg C, Scholl C, Gröschel S, Roth W, Rosenwald A, Geissinger E, von Kalle C, Jäger D, Brors B, Weichert W, Grüllich C, Glimm H, Brummer T, Fröhling S. Cooperation of BRAF(F595L) and mutant HRAS in histiocytic sarcoma provides new insights into oncogenic BRAF signaling. *Leukemia*. 2016 Apr;30(4):937-46.
43. Bentel JM, Thomas MA, Rodgers JJ, Arooj M, Gray E, Allcock R, Fermoyle S, Mancera RL, Cannell P, Parry J. Erdheim-Chester disease associated with a novel, complex BRAF p.Thr599_Val600delinsArgGlu mutation. *BMJ Case Rep*. 2017 Apr 28;2017:bcr2017219720.

44. Diamond EL, Durham BH, Haroche J, Yao Z, Ma J, Parikh SA, Wang Z, Choi J, Kim E, Cohen-Aubart F, Lee SC, Gao Y, Micol JB, Campbell P, Walsh MP, Sylvester B, Dolgalev I, Aminova O, Heguy A, Zappile P, Nakitandwe J, Ganzel C, Dalton JD, Ellison DW, Estrada-Veras J, Lacouture M, Gahl WA, Stephens PJ, Miller VA, Ross JS, Ali SM, Briggs SR, Fasan O, Block J, Héritier S, Donadieu J, Solit DB, Hyman DM, Baselga J, Janku F, Taylor BS, Park CY, Amoura Z, Dogan A, Emile JF, Rosen N, Gruber TA, Abdel-Wahab O. Diverse and Targetable Kinase Alterations Drive Histiocytic Neoplasms. *Cancer Discov.* 2016 Feb;6(2):154-65.
45. Nelson DS, Quispel W, Badalian-Very G, van Halteren AG, van den Bos C, Bovée JV, Tian SY, Van Hummelen P, Ducar M, MacConaill LE, Egeler RM, Rollins BJ. Somatic activating ARAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2014 May 15;123(20):3152-5.
46. Chakraborty R, Burke TM, Hampton OA, Zinn DJ, Lim KP, Abhyankar H, Scull B, Kumar V, Kakkar N, Wheeler DA, Roy A, Poulidakos PI, Merad M, McClain KL, Parsons DW, Allen CE. Alternative genetic mechanisms of BRAF activation in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2016 Nov 24;128(21):2533-2537.
47. Mourah S, How-Kit A, Meignin V, Gossot D, Lorillon G, Bugnet E, Mauger F, Lebbe C, Chevret S, Tost J, Tazi A. Recurrent NRAS mutations in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Eur Respir J.* 2016 Jun;47(6):1785-96.
48. Héritier S, Saffroy R, Radosevic-Robin N, Pothin Y, Pacquement H, Peuchmaur M, Lemoine A, Haroche J, Donadieu J, Emile JF. Common cancer associated PIK3CA activating mutations rarely occur in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2015 Apr 9;125(15):2448-9.
49. Kobayashi M, Tojo A. Langerhans cell histiocytosis in adults: Advances in pathophysiology and treatment. *Cancer Sci.* 2018 Dec;109(12):3707-3713.
50. Peckham-Gregory EC, Chakraborty R, Scheurer ME, Belmont JW, Abhyankar H, Sengal AG, Scull BP, Eckstein O, Zinn DJ, Mayer L, Shih A, Merad M, Parsons DW, McClain KL, Lupo PJ, Allen CE. A genome-wide association study of LCH identifies a variant in *SMAD6* associated with susceptibility. *Blood.* 2017 Nov 16;130(20):2229-2232.
51. Peckham-Gregory EC, McClain KL, Allen CE, Scheurer ME, Lupo PJ. The role of parental and perinatal characteristics on Langerhans cell histiocytosis: characterizing increased risk among Hispanics. *Ann Epidemiol.* 2018 Aug;28(8):521-528.
52. Egeler RM, Favara BE, Laman JD, Claassen E. Abundant expression of CD40 and CD40-ligand (CD154) in paediatric Langerhans cell histiocytosis lesions. *Eur J Cancer.* 2000; 36(16):2105–2110.

53. Egeler RM, Favara BE, van Meurs M, Laman JD, Claassen E. Differential In situ cytokine profiles of Langerhans-like cells and T cells in Langerhans cell histiocytosis: abundant expression of cytokines relevant to disease and treatment. *Blood*. 1999 Dec 15;94(12):4195-201.
54. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7.
55. Outtz HH, Wu JK, Wang X, Kitajewski J. Notch1 deficiency results in decreased inflammation during wound healing and regulates vascular endothelial growth factor receptor-1 and inflammatory cytokine expression in macrophages. *J Immunol*. 2010 Oct 1;185(7):4363-73.
56. Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Brèant C, Duarte A, Eichmann A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endo-thelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104:3225–3230.
57. Dishowitz MI, Mutyaba PL, Takacs JD, Barr AM, Engiles JB, Ahn J, Hankenson KD. Systemic inhibition of canonical Notch signaling results in sustained callus inflammation and alters multiple phases of fracture healing. *PLoS One*. 2013 Jul 3;8(7):e68726.
58. Naik SH, Perie L, Swart E, et al. Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors. *Nature*. 2013; 496:229–232.
59. Héritier S, Emile JF, Barkaoui MA, Thomas C, Fraitag S, Boudjemaa S, Renaud F, Moreau A, Peuchmaur M, Chassagne-Clément C, Dijoud F, Rigau V, Moshous D, Lambilliotte A, Mazingue F, Kebaili K, Miron J, Jeziorski E, Plat G, Aladjidi N, Ferster A, Pacquement H, Galambrun C, Brugières L, Leverger G, Mansuy L, Paillard C, Deville A, Armari-Alla C, Lutun A, Gillibert-Yvert M, Stephan JL, Cohen-Aubart F, Haroche J, Pellier I, Millot F, Lescoeur B, Gandemer V, Bodemer C, Lacave R, Hélias-Rodzewicz Z, Taly V, Geissmann F, Donadieu J. BRAF Mutation Correlates With High-Risk Langerhans Cell Histiocytosis and Increased Resistance to First-Line Therapy. *J Clin Oncol*. 2016 Sep 1;34(25):3023-30.
60. Bhatia P, Singh M, Sharma M, Sharma A, Kakkar N, Radhika S, Trehan A, Bansal D. BRAF^{V600E} mutation in childhood Langerhans cell histiocytosis correlates with multisystem disease and poor survival. *Blood Cells Mol Dis*. 2020 May;82:102356.
61. Selway JL, Harikumar PE, Chu A, Langlands K. Genetic homogeneity of adult Langerhans cell histiocytosis lesions: Insights from BRAFV600E mutations in adult populations. *OncolLett*. 2017; 14(4):4449-4454.
62. Grois N, Pötschger U, Prosch H, et al. Risk factors for diabetes insipidus in langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 46:228.

63. www.uptodate.com
64. Odame I, Li P, Lau L, et al. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis: a variable disease in childhood. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47:889.
65. Minkov M, Pötschger U, Grois N, et al. Bone marrow assessment in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 49:694.
66. Grois NG, Favara BE, Mostbeck GH, Prayer D. Central nervous system disease in Langerhans cell histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; 12:287.
67. Makras P, Alexandraki KI, Chrousos GP, Grossman AB, Kaltsas GA. Endocrine manifestations in Langerhans cell histiocytosis. *Trends Endocrinol Metab.* 18 (2007) 6:252-7.
68. Hait E, Liang M, Degar B, et al. Gastrointestinal tract involvement in Langerhans cell histiocytosis: case report and literature review. *Pediatrics* 2006; 118:e1593.
69. Singhi AD, Montgomery EA. Gastrointestinal tract langerhans cell histiocytosis: A clinicopathologic study of 12 patients. *Am J Surg Pathol* 2011; 35:305.
70. Aricò M, Girschikofsky M, Génereau T, Klersy C, McClain K, Grois N, Emile JF, Lukina E, De Juli E, Danesino C. Langerhans cell histiocytosis in adults. Report from the International Registry of the Histiocyte Society. *Eur J Cancer.* 2003 Nov;39(16):2341-8.
71. Ma J, Laird JH, Chau KW, Chelius MR, Lok BH, Yahalom J. Langerhans cell histiocytosis in adults is associated with a high prevalence of hematologic and solid malignancies. *Cancer Med.* 2019 Jan;8(1):58-66.
72. De Young B, Egeler RM, Rollins BJ. Langerhans cell histiocytosis. In: *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*, 4th ed, Fletcher CD, Bridge JA, Hogendoorn PC, Mertens F (Eds), International Agency for Research on Cancer, Lyons 2013. p.356.
73. Baumgartner I, von Hochstetter A, Baumert B, Luetolf U, Follath F. Langerhans'-cell histiocytosis in adults. *Med Pediatr Oncol.* 1997; 28(1):9-14.
74. Salotti JA, Nanduri V, Pearce MS, Parker L, Lynn R, Windebank KP. Incidence and clinical features of Langerhans cell histiocytosis in the UK and Ireland. *Arch Dis Child.* 2009; 94(5):376-380.
75. Stalemark H, Laurencikas E, Karis J, Gavhed D, Fadeel B, Henter JI. Incidence of Langerhans cell histiocytosis in children: a population-based study. *Pediatr Blood Cancer.* 2008; 51(1):76-81.
76. Makras P, Alexandraki KI, Chrousos GP, Grossman AB, Kaltsas GA. Endocrine manifestations in Langerhans cell histiocytosis. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18(6):25

77. Jaffe R, Weiss LM, Facchetti F. Tumours derived from Langerhans cells. In: World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (Eds), IARC Press, Lyon 2008. p.358 2-257.
78. Aricò M, Nichols K, Whitlock JA, Arceci R, Haupt R, Mittler U, Kühne T, Lombardi A, Ishii E, Egeler RM, Danesino C. Familial clustering of Langerhans cell histiocytosis. *Br J Haematol.* 1999 Dec;107(4):883-8.
79. Shahla A, Parvaneh V, Hossein HD. Langerhans cells histiocytosis in one family. *Pediatr Hematol Oncol.* 2004 Jun;21(4):313-20.
80. Chen RL, Lin KS, Chang WH, et al. Childhood Langerhans cell histiocytosis increased during El Nino 1997-98: a report from the Taiwan Pediatric Oncology Group. *Acta Paediatr Taiwan.* 2003; 44(1):14-20.
81. Auerswald U, Barth J, Magnussen H. Value of CD-1-positive cells in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary histiocytosis X. *Lung.* 1991; 169(6):305-309.
82. Alayed K, Medeiros LJ, Patel KP, Zuo Z, Li S, Verma S et al. BRAF and MAP2K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis: a study of 50 cases. *Hum Pathol.* 2016 Jun; 52:61-7.
83. Kobayashi M, Ando S, Kawamata T, Makiyama J, Yokoyama K, Imai Y, Tojo A. Clinical features and outcomes of adult Langerhans cell histiocytosis: a single-center experience. *Int J Hematol.* 2020 Aug; 112(2):185-192.
84. Héritier S, Hélias-Rodzewicz Z, Lapillonne H, Terrones N, Garrigou S, Normand C et al. Circulating cell-free BRAFV600E as a biomarker in children with Langerhans cell histiocytosis. *Br J Haematol.* 2017 Aug; 178(3):457-467.
85. Wade S, Samowitz, Hans Albertsen, Carol Sweeney, Jennifer Herrick, Bette J. Caan, Kristin E. Anderson, Roger K. Wolff, Martha L. Slattery. Association of Smoking, CpG Island Methylator Phenotype, and V600E BRAF Mutations in Colon Cancer, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 98, Issue 23, 6 December 2006, Pages 1731–1738.
86. Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, Herrick J, Caan BJ, Anderson KE, Wolff RK, Slattery ML. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Dec 6; 98(23):1731-8.
87. Hazim AZ, RuanGJ, Ravindran A, Abeykoon JP, Scheckel C, Vassallo R et al. Efficacy of BRAF-Inhibitor Therapy in BRAFV600E-Mutated Adult Langerhans Cell Histiocytosis. *Oncologist.* 2020 Sep 27.

88. Diamond EL, Durham BH, Ulaner GA, Drill E, Buthorn J, Ki M et al. Efficacy of MEK inhibition in patients with histiocytic neoplasms. *Nature*. 2019; 567(7749):521-524.
89. Diamond EL, Subbiah V, Lockhart AC, Blay JY, Puzanov I, Chau I, Raje NS, Wolf J, Erinjeri JP, Torrisi J, Lacouture M, Elez E, Martínez-Valle F, Durham B, Arcila ME, Ulaner G, Abdel-Wahab O, Pitcher B, Makrutzki M, Riehl T, Baselga J, Hyman DM. Vemurafenib for BRAF V600-Mutant Erdheim-Chester Disease and Langerhans Cell Histiocytosis: Analysis of Data From the Histology-Independent, Phase 2, Open-label VE-BASKET Study. *JAMA Oncol*. 2018 Mar 1;4(3):384-388.
90. Tong C, Jia X, Jia Y, He Y. Langerhans cell histiocytosis in Chinese adults: absence of BRAF mutations and increased FOXP3(+) regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(6):3166-3173. Published 2014 May 15.