



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Χημείας
Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.)
με τίτλο «Ιατρική Χημεία»

Θέμα: Η κυτταρική γήρανση (cellular senescence) στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin»

Εκπόνηση εργασίας: Ευάγγελος Τσόλας

Τριμελής επιτροπή

Επιβλέπουσα: Ελευθερία Χατζημιχαήλ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Αιματολογίας

Μέλη: Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη, Επίκουρη Καθηγήτρια
Παθολογικής Ανατομικής, Παναγιώτης Καναβάρος, Καθηγητής
Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής διατριβής μου στο πλαίσιο των σπουδών μου στο Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών με τίτλο «Ιατρική Χημεία» θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσοι συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κύρια επιβλέπουσά μου κ. Ελευθερία Χατζημιχαήλ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την καθοδήγηση καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής και για την υπομονή που επέδειξε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη βοήθεια και την καθοδήγηση καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Λάμπρη Ευαγγελή, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη βοήθεια και την καθοδήγηση.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Παναγιώτη Καναβάρο, Καθηγητή Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία και μέλος της τριμελούς επιτροπής μέχρι να γίνει αντικατάστασή του, για τη βοήθεια και την καθοδήγηση καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

➤ Περιεχόμενα	σελ.
Περίληψη	2
A) Εισαγωγή	3
A.1 Σκοπός.....	3
A.2 Κυτταρική γήρανση.....	3
A.3 Λέμφωμα Hodgkin	9
Επιδημιολογία	9
Διάγνωση.....	9
Σταδιοποίηση και εκτίμηση κινδύνου	10
Θεραπεία.....	11
Θεραπεία κλασικού λεμφώματος Hodgkin.....	11
Νόσος περιορισμένου σταδίου	11
Νόσος ενδιάμεσου σταδίου	12
Νόσος προχωρημένου σταδίου.....	12
Υποτροπιάζουσα/Ανθεκτική νόσος	13
Θεραπεία οξείας λεμφώματος Hodgkin λεμφοκυτταρικής επικράτησης.....	14
Πρόγνωση.....	15
Παρακολούθηση, μακροπρόθεσμες επιπλοκές και επιβίωση	15
Κλασικό λέμφωμα Hodgkin και EBV.....	15
B) Υλικό και μέθοδοι.....	16
B.1 Ασθενείς.....	16
B.2 Μέθοδοι.....	16
B.3 Στατιστική ανάλυση	18
Γ) Αποτελέσματα.....	19
Γ.1 Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.....	19
Γ.2 Ανοσοϊστοχημικά ευρήματα	20
Γ.3 EBV.....	22
Δ) Συζήτηση.....	22
Βιβλιογραφία	25

Περίληψη

Η κυτταρική γήρανση (cellular senescence) είναι η μη αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου, αποτελεί διαδικασία σημαντική για την ομοιόσταση του κυττάρου και έχει συσχετισθεί με την παθογένεση του κλασικού λεμφώματος Hodgkin. Παρόλα αυτά η συσχέτιση του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους και με την κλινική έκβαση ασθενών με κλασικό λέμφωμα Hodgkin χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Στο πλαίσιο αυτό, στην παρούσα μελέτη, η κυτταρική γήρανση μελετήθηκε με τη χρήση της χρώσης SenTraGor™ σε τομές ιστών 59 ασθενών με κλασικό λέμφωμα Hodgkin οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων από το 1999 μέχρι το 2019. Ανιχνεύθηκαν διάφορα πρότυπα κυτταρικής γήρανσης στα Hodgkin και Reed-Sternberg (HRS) κύτταρα, εύρημα συμβατό με τη βιολογική ετερογένεια του κλασικού λεμφώματος Hodgkin. Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ προτύπων κυτταρικής γήρανσης και κλινικών παραμέτρων ασθενών με κλασικό λέμφωμα Hodgkin.

A) Εισαγωγή

A.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων (senescent cells) σε δείγματα ασθενών με κλασικό λέμφωμα Hodgkin με τη χρήση ενός νέου αντιδραστηρίου που ονομάζεται SenTraGor™ [Evangelou, K., et al., (2017)] καθώς και η συσχέτιση των ευρημάτων με κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών.

A.2 Κυτταρική γήρανση

Η κυτταρική γήρανση (cellular senescence) αποτελεί μία κατάσταση στην οποία η ανάπτυξη του κυττάρου έχει σταματήσει και η διαίρεσή του έχει ανασταλεί μη αναστρέψιμα. Υπάρχουν δύο είδη κυτταρικής γήρανσης: η **αντιγραφική** (replicative) γήρανση η οποία συνήθως πυροδοτείται από τη μείωση του μήκους των τελομερών που λαμβάνει χώρα σε κάθε κυτταρική διαίρεση και η οποία οφείλεται σε απενεργοποίηση του γονιδίου της τελομεράσης, και η **πρώιμη** (premature) γήρανση η οποία προκαλείται από πολυάριθμα στρεσογόνα ερεθίσματα όπως π.χ. η ιονίζουσα ακτινοβολία, το οξειδωτικό στρες ή η υπερέκφραση/ενεργοποίηση ογκογονιδίων και η οποία θεωρείται επομένως μία σημαντική αντι-ογκογόνος διαδικασία [Childs, B. G., et al., (2014), Gorgoulis, V., et al., (2019), Rodier, F., Campisi, J. (2011), Tower, J. (2015)]. Στον αντίποδα, η κυτταρική γήρανση εμπλέκει επιπρόσθετες διαδικασίες, όπως η ιστική επιδιόρθωση και η φλεγμονή οι οποίες ενδέχεται να οδηγήσουν σε ογκογένεση, συνιστώντας έτσι ένα βιολογικό φαινόμενο με αντικρουόμενες συνέπειες (ανταγωνιστική πλειοτροπία) [Rodier, F., Campisi, J. (2011), Myrianthopoulos, V., et al., (2019)].

Τα γηρασμένα κύτταρα (senescent cells) παρουσιάζουν διάφορα φαινοτυπικά και μοριακά χαρακτηριστικά τα οποία ενδέχεται είτε να έχουν συμβάλει στη γήρανση είτε να παριστούν το αποτέλεσμα της διαδικασίας. Όσον αφορά τους φαινοτυπικούς δείκτες της γήρανσης, αυτοί περιλαμβάνουν την αύξηση του μεγέθους του κυττάρου, τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση, την απουσία απόκρισης σε αυξητικά ερεθίσματα, την αυξημένη ενεργότητα β-

γαλακτοσιδάσης (β-γαλακτοσιδάση σχετιζόμενη με γήρανση, senescence-associated β-galactosidase, SA-β-gal), σημαντικές μεταβολές στην πρωτεϊνική έκφραση και αύξηση της έκκρισης διαφόρων ιντερλευκινών και μεταλλοπρωτεϊνών (εκκριτικός φαινότυπος σχετιζόμενος με γήρανση, senescence-associated secretory phenotype, SASP), αλλαγές που αφορούν τον πυρήνα του κυττάρου όπως παρουσία πολλών πυρήνων, περιοχές ετεροχρωματίνης σχετιζόμενες με γήρανση (senescence-associated heterochromatic foci, SAHF) ή τμήματα DNA με μεταβολές χρωματίνης ενισχύουσες τη γήρανση (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence, DNA-SCARSs), κατεστραμμένα μιτοχόνδρια, λυσοσώματα με δομικές αλλαγές καθώς και τη συσσώρευση λιποφουσκίνης στο κυτταρόπλασμα. Οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τους αναστολείς κινάσων εξαρτώμενων από κυκλίνη (cyclin-dependent kinase (CDK) αναστολείς) όπως π.χ. p16, p21, τον p53, τους SASP παράγοντες και υποδοχείς (πχ IL-6, IL-8) καθώς και τη μείωση της έκφρασης της λαμίνης B1 [Salama, R., et al., (2014)].

Τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν πληθώρα παραγόντων οι οποίοι περιλαμβάνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες, ρυθμιστές της αύξησης, αγγειογενετικούς παράγοντες και μεταλλοπρωτεϊνάσες. Αυτοί οι παράγοντες συνιστούν συλλήβδην τον εκκριτικό φαινότυπο σχετιζόμενο με γήρανση (SASP) [Corpe, J. P., et al., (2010), Kuilman, P. and Peeper, D. S. (2009)]. Ο SASP συνιστά χαρακτηριστικό γνώρισμα των γηρασμένων κυττάρων και διαμεσολαβεί πολλές από τις παθοφυσιολογικές τους συνέπειες. Για παράδειγμα, ο SASP ενισχύει και εξαπλώνει τη γήρανση με αυτοκρινή και παρακρινή δράση [Acosta, J. C., et al., (2013), Corpe, J. P., et al., (2010), Kuilman, P. and Peeper, D. S. (2009)] και ενεργοποιεί ανοσολογικές αποκρίσεις που εξαλείφουν τα γηρασμένα κύτταρα [Munoz-Espin, D. and Serrano, M. (2014)]. Επίσης διαμεσολαβεί την επούλωση πληγών και την ιστική πλαστικότητα και επιπλέον συμβάλλει στην εμμένουσα χρόνια φλεγμονή [Demaria, M., et al., (2014), Mosteiro, L., et al., (2016), Franceschi, C. and Campisi, J. (2014)]. Ως εκ τούτου, ο SASP μπορεί να εξηγήσει κάποιες από τις επιβλαβείς συνέπειες των γηρασμένων κυττάρων. Επιπλέον, μπορεί να στρατολογεί άωρα ανοσοκατασταλτικά κύτταρα προς προστατικούς και ηπατικούς όγκους και να επάγει ογκογένεση μέσω αγγειογένεσης και μετάστασης [Corpe, J. P., et al., (2010)].

Ο SASP ελέγχεται από την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. NF-κB, C/EBPβ, GATA4) και σηματοδοτικών μονοπατιών (mTOR, p38MAPK) [Ito, Y., et al., (2017), Kuilman, P. and Peeper, D. S. (2009), Salama, R., et al., (2014)]. Τα σήματα που πυροδοτούν την ενεργοποίηση του SASP είναι ποικίλα και διαφέρουν ανάλογα με το αίτιο που επάγει τη γήρανση, περιλαμβάνουν δε τη βλάβη του DNA, τα κυτταροπλασματικά τμήματα χρωματίνης (cytoplasmic chromatin fragments, CCFs) που επάγουν μία τύπου 1 απάντηση ιντερφερόνης, και τα μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με τη βλάβη (damage-associated molecular patterns, DAMPs) που ενεργοποιούν το φλεγμονόσωμα [Acosta, J. C., et al., (2013), Li, T. and Chen, Z. J. (2018)].

Η σύσταση του SASP ποικίλλει και εξαρτάται από τη διάρκεια της γήρανσης, την προέλευση του ερεθίσματος της γήρανσης και τον τύπο του κυττάρου [Childs, B. G., et al., (2015)]. Παρατηρείται αξιοσημείωτη μεταβλητότητα της έκφρασης του SASP μεταξύ των διαφόρων κυττάρων. Τα γηρασμένα κύτταρα επικοινωνούν με το μικροπεριβάλλον τους μέσω NOTCH/JAG1 σηματοδότησης, κυτταροπλασματικών γεφυρών και εξωκυττάρων κυστιδίων όπως π.χ. τα εξωσώματα [Takasugi, M., et al., (2017)].

Τα γηρασμένα κύτταρα περιέχουν μόνιμες πυρηνικές περιοχές με βλάβη του DNA, γνωστές ως τμήματα DNA με μεταβολές χρωματίνης ενισχύουσες τη γήρανση (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence, DNA-SCARSs). Τα DNA-SCARSs διαφέρουν από τις παροδικές περιοχές βλάβης του DNA: σε αντίθεση με τις παροδικές περιοχές βλάβης, τα DNA-SCARSs σχετίζονται ειδικώς με τα πυρηνικά σωμάτια PML, δεν διαθέτουν τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNARPA και RAD51 και περιέχουν ενεργοποιημένες μορφές των διαμεσολαβητών απόκρισης σε βλάβη του DNACHK2 και p53 [Rodier, F., Campisi, J. (2011)]. Τα DNA-SCARSs αποτελούν δυναμικές δομές που μπορούν να ρυθμίζουν πολλαπλές πτυχές του γηρασμένου κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων της αναστολής της αύξησης και του SASP. Παρόλα αυτά, τα DNA-SCARSs δεν αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των γηρασμένων κυττάρων μιας και δεν πυροδοτείται μόνιμη βλάβη του DNA από όλα τα ερεθίσματα που επάγουν γήρανση [Ivanov, A., et al., (2013)].

Οι κύριοι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην κυτταρική γήρανση είναι το μονοπάτι p16/pRb και το μονοπάτι p53/p21 [Becker, T., Haferkamp, S. (2013),

Carnero, A. (2013)]. Η πρωτεΐνη p16 είναι ένας CDK αναστολέας που διατηρεί την πρωτεΐνη pRb (πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος) σε κατάσταση μειωμένης φωσφορυλίωσης και έτσι δεν επιτρέπει στο μεταγραφικό παράγοντα E2F1 να απελευθερωθεί και να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου. Συνεπώς, η μεταγραφή των γονιδίων στόχων του τα οποία είναι απαραίτητα για τη μετάβαση από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου αναστέλλεται. Όσον αφορά την πρωτεΐνη p53, η ενεργοποίησή της μπορεί να πυροδοτηθεί από διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα όπως η βλάβη του DNA, το μεταβολικό στρες, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή η υποξία. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53 ακολουθείται από τη ρύθμιση διαφόρων γονιδίων στόχων, ένα εκ των οποίων κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p21 που αναστέλλει τη δραστηριότητα των συμπλόκων κυκλίνης-CDK2, κυκλίνης-CDK1 και κυκλίνης-CDK4/6, διακόπτοντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1.

Τα μιτοχόνδρια είναι τα κυτταρικά οργανίδια στα οποία λαμβάνει χώρα η παραγωγή ενέργειας μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και παραγωγής ATP και φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά τόσο την εγκαθίδρυση όσο και τη διατήρηση της κυτταρικής γήρανσης [Correia-Melo, C., Passos, J. F. (2015)]. Η απορρύθμιση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων ενδέχεται να οφείλεται σε υπερβολική παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, σε δυσαναλογία μεταξύ μιτοχονδριακής σχάσης και σύντηξης, σε ελαττωματική μεταφορά ηλεκτρονίων στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, σε μειωμένη ενεργοποίηση AMPK και ελαττωμένη συγκέντρωση μιτοχονδριακού NAD⁺, καθώς και σε συσσώρευση ιόντων ασβεστίου στο μιτοχόνδριο. Όλα αυτά τα ερεθίσματα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα κυτταρικά μονοπάτια p16/pRb και p53/p21 που αναφέρθηκαν ανωτέρω και επομένως να πυροδοτήσουν το φαινόμενο της κυτταρικής γήρανσης [Ziegler, D. V., et al., (2015)].

Τα λυσοσώματα στα γηρασμένα κύτταρα αυξάνονται σε αριθμό και μέγεθος, γεγονός που καθίσταται εμφανές από την παρατηρούμενη στο μικροσκόπιο κυτταροπλασματική κοκκίωση. Ο αυξημένος αριθμός λυσοσωμάτων ενδέχεται να αντανakλά προσπάθεια εξισορρόπησης της σταδιακής συσσώρευσης δυσλειτουργικών λυσοσωμάτων μέσω παραγωγής νέων λυσοσωμάτων. Έτσι, η ισορροπία μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού η οποία είναι σημαντική για την έκκριση επεκτείνεται. Αυτή η ισορροπία διατηρείται κατά τη γήρανση την

επαγόμενη από ογκογόνα ερεθίσματα (oncogene-induced senescence, OIS) κατά την οποία παράγονται και εκκρίνονται οι SASP παράγοντες [Salama, R., et al., (2014)]. Η αυξημένη λυσοσωμική μάζα έχει συνδεθεί με τη δραστικότητα της σχετιζόμενης με γήρανση β-γαλακτοσιδάσης (SA-β-gal), που είναι βιοδείκτης της γήρανσης. Παρόλα αυτά, αν και η SA-β-gal είναι διακριτή στα γηρασμένα κύτταρα, δεν εμφανίζει απόλυτη ευαισθησία και ειδικότητα για τα κύτταρα αυτά [Hernandez-Segura, A., et al., (2018)]. Ένα άλλο γνώρισμα της γήρανσης σχετιζόμενο με τη λυσοσωμική δυσλειτουργία είναι η ενδολυσοσωμική συσσώρευση κοκκίων λιποφουσκίνης. Έχει αναφερθεί ότι η λιποφουσκίνη ευοδώνει την έκφραση του αντιαποπτωτικού παράγοντα Bcl-2, προσδίδοντας αντίσταση στην απόπτωση, που είναι ακόμη ένα χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων [McHugh, D. and Gil, J. (2018)].

Σε αντίθεση με την παροδική κυτταρική γήρανση, η μη αναστρέψιμη γήρανση έχει πρωτίστως επιβλαβείς επιπτώσεις στα κύτταρα και έχει συσχετιστεί με πληθώρα νόσων σχετιζόμενων με την πάροδο της ηλικίας όπως επίσης και με τον καρκίνο. Η καρδιακή ανεπάρκεια, η νεφρική νόσος, η αθηροσκλήρωση, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, το μεταβολικό σύνδρομο, η οστεοαρθρίτιδα και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι αποτελούν μόνο μερικά σχετικά παραδείγματα [Myrianthopoulos, V., et al., (2019)].

Προσφάτως, ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν παράγοντες οι οποίοι είτε προκαλούν το θάνατο των γηρασμένων κυττάρων (senolytics) είτε αποτρέπουν την ενεργοποίηση της SASP-εξαρτώμενης σηματοδότησης αναστέλλοντας έτσι την κυτταρική γήρανση εμμέσως (senomorphics). Ουσίες που έχουν μελετηθεί ως τώρα όσον αφορά τη δράση τους ως παραγόντων που θα μπορούσαν να αναστείλουν την κυτταρική γήρανση περιλαμβάνουν φυσικά ή ενδογενή συστατικά (π.χ. κουερσετίνη, φισετίνη), μόρια υπό έρευνα (π.χ. ναβιτοκλάξη) και φάρμακα που ήδη χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη (π.χ. ντασατινίμπη, πανομπινοστάτη) [Myrianthopoulos, V. et al., (2019)].

Καθότι η κυτταρική γήρανση αποτελεί βασική βιολογική διαδικασία η οποία εμπλέκεται τόσο στη φυσιολογική εμβρυική και ενήλικη ζωή όσο και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, είναι επιθυμητή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των γηρασμένων κυττάρων σε βιολογικά υλικά με μία ευαίσθητη μέθοδο με υψηλή ακρίβεια. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος με την οποία μετράται η

δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης της σχετιζόμενης με γήρανση (SA-β-gal) μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε φρέσκα δείγματα. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η μέθοδος αυτή δίδει ψευδώς θετικά αποτελέσματα υπό συγκεκριμένες συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας καθώς και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε κύτταρα τα οποία, αν και υφίστανται γήρανση, δεν παρουσιάζουν SA-β-gal δραστηριότητα [Georgakopoulou, E.A., et al, 2013, Munoz-Espin, D. and Serrano, M., 2014]. Οι περιορισμοί αυτοί παρακάμπτονται με την εφαρμογή της ιστοχημικής χρώσης SudanBlackB (SBB) με την οποία καθίσταται εφικτή η αναγνώριση γηρασμένων κυττάρων σε βιολογικά υλικά μεταξύ των οποίων καλλιεργημένα κύτταρα, φρέσκοι/κατεψυγμένοι ιστοί καθώς και αρχειακό (καθλωμένο σε φορμαλίνη και ενσωματωμένο σε παραφίνη, formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE) υλικό [Georgakopoulou, E.A., et al, 2013, Galanos, et al, 2016]. Η SBB αντιδρά με τη λιποφουσκίνη η οποία είναι ένα μη αποικοδομήσιμο σύνολο οξειδωμένων πρωτεϊνών, λιπιδίων και μετάλλων που συσσωρεύεται στα γηρασμένα κύτταρα ως παραπροϊόν της διαδικασίας γήρανσης [Jung, T. et al, 2007, Georgakopoulou, E.A., et al, 2013, Galanos, P., et al, 2016]. Παρότι αυτή η μέθοδος είναι εύκολη και ταχεία, παρουσιάζει κάποια τεχνικά ζητήματα που μειώνουν την ευαισθησία της όταν εφαρμόζεται από μη ειδικούς [Georgakopoulou, E.A., et al, 2013]: πρώτον, η οπτικοποίηση των SBB-θετικών κοκκίων λιποφουσκίνης που εμφανίζονται ως μπλε-μαύρα ή καφέ κυτταροπλασματικά κοκκία δεν είναι πάντα εύκολη και απαιτεί μεγάλες μεγεθύνσεις (έως και x1000) σε οπτικό μικροσκόπιο. Ειδικά σε FFPE τομές τα κοκκία λιποφουσκίνης μπορεί να είναι πολύ μικρά εξαιτίας της προετοιμασίας του δείγματος, και επομένως δύσκολο να ανιχνευθούν. Έτσι, αν η αναλογία των γηρασμένων κυττάρων εντός του ιστού είναι μικρή και αυτά τα κύτταρα είναι διασκορπισμένα, η αναγνώρισή τους ενδέχεται να είναι δυσχερής. Δεύτερον, η χρώση SBB απαιτεί μεγαλύτερη εμπειρία για εξοικείωση με την ανίχνευση θετικών κυττάρων ειδικά όταν η εκτίμηση γίνεται υπό το οπτικό μικροσκόπιο. Εξίσου σημαντική είναι η απόκτηση εμπειρίας στη διάκριση των SBB-θετικών κοκκίων από τον “θόρυβο” του υποστρώματος που μπορεί να συνιστά μη ειδική διασπορά της χρώσης. Προκειμένου να παρακαμφθούν τα ανωτέρω τεχνικά εμπόδια, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν de novo ουσίες που παρουσιάζουν δομική ομοιότητα με την SBB, οι οποίες όμως είναι πιο καθαρές, αποφεύγοντας έτσι τα μειονεκτήματα

που σχετίζονται με τα πολυάριθμα παραπροϊόντα που είναι παρόντα στην εμπορικά διαθέσιμη SBB χρώση [Evangelou, K., et al., 2017]. Στη συνέχεια οι ουσίες αυτές συζεύχθηκαν χημικά με βιοτίνη, ένα μόριο που μπορεί εύκολα να οπτικοποιηθεί με διάφορες ανοσοϊστοχημικές, ενζυματικές διεργασίες, διευρύνοντας ουσιαστικά την εφαρμοσιμότητα και ευαισθησία της μεθόδου. Μία από τις ουσίες αυτές είναι η GL13 (SenTraGor™) που παρουσιάζει την ίδια ειδικότητα με την SBB στην ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων αλλά πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία και βελτιωμένη αναλογία σήματος προς θόρυβο. Επομένως, αυτή η καινοτόμος μεθοδολογία παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων χρησιμοποιούμενων μεθόδων, καθότι είναι ευαίσθητη, ειδική και ευρέως εφαρμόσιμη ακόμη και από μη εξειδικευμένους χρήστες σε οποιοδήποτε βιολογικό υλικό (και σε αρχειακό υλικό).

A.3 Λέμφωμα Hodgkin

Επιδημιολογία

Το λέμφωμα Hodgkin είναι νεοπλασματική νόσος Β-κυτταρικής αρχής. Οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται σε ηλικία μεταξύ 15 και 30 ετών, ενώ η δεύτερη σε συχνότητα ηλικιακή ομάδα ασθενών είναι ≥ 55 ετών. Όσον αφορά το φύλο, παρατηρείται μικρή επικράτηση των ανδρών. Το λέμφωμα Hodgkin συνιστά περίπου το 10% όλων των λεμφωμάτων στο δυτικό κόσμο και σύμφωνα με την ταξινόμηση WHO κατατάσσεται ως α) κλασικό λέμφωμα Hodgkin και β) οζώδες λέμφωμα Hodgkin λεμφοκυτταρικής επικράτησης. Στο δυτικό κόσμο η πρώτη κατηγορία αποτελεί το 95% και η δεύτερη κατηγορία το 5% όλων των λεμφωμάτων Hodgkin.

Διάγνωση

Η διάγνωση του λεμφώματος Hodgkin απαιτεί βιοψία λεμφαδένα (ή βιοψία από άλλο όργανο με πιθανή προσβολή). Στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin, παρατηρούνται σπάνια κακοήγη κύτταρα που ονομάζονται Hodgkin και Reed-Sternberg (HRS) κύτταρα τα οποία περιβάλλονται από άφθονο αντιδραστικό μικροπεριβάλλον [Cirillo, M., et al., (2019), Piris, M. A., et al., (2020), Weniger, M. A., Kuppers, R.

(2021), Panico, L., et al., (2015), Touati, M., et al., (2015), Ferrarini, I., et al., (2019)], ενώ στο οζώδες λέμφωμα Hodgkin λεμφοκυτταρικής επικράτησης ανιχνεύονται διάσπαρτα μεγάλα lymphocyte predominant (LP) κύτταρα σε ένα μικρό κυτταρικό υπόστρωμα [Seliem, R. et al., 2011]. Ο ανοσοφαινότυπος των νεοπλασματικών κυττάρων στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin και στο οζώδες λέμφωμα Hodgkin λεμφοκυτταρικής επικράτησης διαφέρει σημαντικά. Σε αντίθεση με τα HRS κύτταρα που τυπικά εκφράζουν τους δείκτες CD30 και CD15, περιστασιακά είναι θετικά για CD20 και συνήθως αρνητικά για CD45, τα LP κύτταρα χαρακτηρίζονται από την έκφραση CD20 και CD45 αλλά είναι αρνητικά για CD15 και CD30 [Seliem, R. et al., 2011].

Σταδιοποίηση και εκτίμηση κινδύνου

Απαραίτητη είναι η λεπτομερής καταγραφή του ιατρικού ιστορικού συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας Β-συμπτωμάτων (πυρετός, νυκτερινές εφιδρώσεις, ανεξήγητη απώλεια βάρους πάνω από 10% τους τελευταίους 6 μήνες) και άλλων συμπτωμάτων σχετιζόμενων με τη νόσο όπως κόπωση ή κνησμός καθώς και των αποτελεσμάτων της κλινικής εξέτασης [Cheson, B. D., et al., 2014]. Η απλή ακτινογραφία θώρακος και η αξονική τομογραφία τραχήλου, θώρακος και κοιλίας πρέπει να γίνονται σε όλες τις περιπτώσεις. Επιπλέον πρέπει να διενεργείται ολοσωματική τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron Emission Tomography, PET) σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες για τη σταδιοποίηση και την εκτίμηση απόκρισης στη θεραπεία [Cheson, B. D., et al., 2014, Barrington, S. F., et al., 2014]. Η σταδιοποίηση του νοσήματος γίνεται σύμφωνα με το σύστημα Ann Arbor λαμβάνοντας υπόψη και κλινικές παραμέτρους (π.χ. Β-συμπτώματα). Μετά την ολοκλήρωση της σταδιοποίησης η νόσος χαρακτηρίζεται ως περιορισμένου, ενδιάμεσου ή προχωρημένου σταδίου.

Προκειμένου να καθοριστεί ποιος ασθενής διατρέχει αυξημένο κίνδυνο για βραχυπρόθεσμες ή/και απώτερες επιπλοκές και προκειμένου να υπάρχουν baselinetιμές για μελλοντικές μετρήσεις, θα πρέπει σε κάθε περίπτωση να διενεργούνται προ έναρξης θεραπείας λειτουργικές δοκιμασίες καρδιάς και πνευμόνων.

Καθότι η χημειοθεραπεία και η κοιλιακή ακτινοβολία ενδέχεται να προκαλέσουν μη αναστρέψιμη υπογονιμότητα, συνιστάται να προσφέρεται στους ασθενείς αναπαραγωγικής ηλικίας η δυνατότητα αποθήκευσης σπέρματος ή συλλογής ωοκυττάρων προ έναρξης θεραπείας.

Θεραπεία

Οι ασθενείς με λέμφωμα Hodgkinθα έπρεπε να αντιμετωπίζονται στο πλαίσιο κλινικών δοκιμών όποτε αυτό είναι εφικτό.

Θεραπεία κλασικού λεμφώματος Hodgkin

Η θεραπεία πρώτης γραμμής συνήθως συνίσταται σε συνδυασμό χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας (όταν πρόκειται για νόσο περιορισμένου ή ενδιάμεσου σταδίου) ή σε χημειοθεραπεία μόνο (όταν πρόκειται για νόσο προχωρημένου σταδίου). Η ένταση της θεραπείας εξαρτάται από το προφίλ κινδύνου του ασθενούς στη διάγνωση και από το αποτέλεσμα της ενδιάμεσης PET-CT (όταν η PET είναι διαθέσιμη).

Νόσος περιορισμένου σταδίου

Έχει δειχθεί ότι ο συνδυασμός θεραπειών (2 ή 3 κύκλοι χημειοθεραπείας ακολουθούμενοι από ακτινοθεραπεία) έχει ως αποτέλεσμα καλύτερο έλεγχο της νόσου σε σύγκριση με ακτινοθεραπεία μόνο [Engert, A., et al., 2007, Ferme, C., et al., 2007]. Δύο ή τρεις κύκλοι του χημειοθεραπευτικού σχήματος ABVD (δοξορουμπικίνη/ μπλεομυκίνη/ βινμπλαστίνη/ ντακαρμπαζίνη) ακολουθούμενοι από κλασματοποιημένη συμβατική ακτινοθεραπεία συνιστούν το standard of care για νόσο περιορισμένου σταδίου. Συνιστάται η ακτινοθεραπεία εμπλεκόμενης περιοχής (involved-site radiation therapy, ISRT) έναντι της ακτινοθεραπείας εμπλεκόμενου πεδίου (involved-field radiation therapy, IFRT) [Specht, L., et al., 2014]. Στις περιπτώσεις που διενεργείται ενδιάμεση PET μετά 2 κύκλους ABVD και είναι θετική, θα πρέπει να χορηγούνται 2 κύκλοι του χημειοθεραπευτικού σχήματος BEACOPPesc (μπλεομυκίνη/ ετοποσίδη/ δοξορουμπικίνη/ κυκλοφωσφαμίδη/ βινκριστίνη/ προκαρβαζίνη/ πρεδνιζόνη σε κλιμακούμενη δόση) πριν την ISRT. Η μπλεομυκίνη δεν πρέπει να δίνεται για πλέον των 2 κύκλων σε ασθενείς ηλικίας

άνω των 60 ετών. Χημειοθεραπεία μόνο (χωρίς να συνδυαστεί με ακτινοθεραπεία) μπορεί να προσφερθεί σε ασθενείς όταν ο κίνδυνος απώτερων επιπλοκών οφειλόμενων στην ακτινοθεραπεία θεωρείται ότι υποσκελίζει το βραχυπρόθεσμο όφελος της βελτίωσης του ελέγχου της νόσου [Eichenauer, D. A., et al., 2018].

Νόσος ενδιάμεσου σταδίου

Τέσσερις κύκλοι ABVD ακολουθούμενοι από κλασματοποιημένη συμβατική ακτινοθεραπεία στα 30 Gy θεωρούνται ευρέως το standard of care για νόσο ενδιάμεσου σταδίου [Ferme, C., et al., 2007]. Δύο κύκλοι BEACOPPesc ακολουθούμενοι από 2 κύκλους ABVD και ακτινοθεραπεία στα 30 Gy μπορούν να χορηγηθούν σε ασθενείς ηλικίας ≤60 ετών που είναι επιλέξιμοι για πιο εντατική θεραπεία. Συνιστάται η ISRT έναντι της IFRT. Στις περιπτώσεις που διενεργείται ενδιάμεση PET μετά 2 κύκλους ABVD και είναι θετική, θα πρέπει να χορηγούνται 2 κύκλοι του χημειοθεραπευτικού σχήματος BEACOPPesc (μπλεομυκίνη/ ετοποσίδη/ δοξορουμπικίνη/ κυκλοφωσφαμίδη/ βινκριστίνη/ προκαρβαζίνη/ πρεδνιζόνη σε κλιμακούμενη δόση) πριν την ISRT. Η μπλεομυκίνη δεν πρέπει να δίνεται για πλέον των 2 κύκλων σε ασθενείς ηλικίας άνω των 60 ετών. Χημειοθεραπεία μόνο (χωρίς να συνδυαστεί με ακτινοθεραπεία) μπορεί να προσφερθεί σε ασθενείς όταν ο κίνδυνος απώτερων επιπλοκών οφειλόμενων στην ακτινοθεραπεία θεωρείται ότι υποσκελίζει το βραχυπρόθεσμο όφελος της βελτίωσης του ελέγχου της νόσου [Eichenauer, D. A., et al., 2018].

Νόσος προχωρημένου σταδίου

Το λέμφωμα Hodgkin προχωρημένου σταδίου συνήθως θεραπεύεται μόνο με χημειοθεραπεία. Συμπληρωματική ακτινοθεραπεία χορηγείται μόνο σε ασθενείς με υπολειμματική νόσο μετά τη χημειοθεραπεία. Ασθενείς ηλικίας ≤60 ετών θεραπεύονται είτε με ABVD (έξι κύκλους) είτε με BEACOPPesc (τέσσερις έως έξι κύκλους), προαιρετικά ακολουθούμενους από τοπική ακτινοθεραπεία [Canellios, G. P., et al., 2009, Engert, A., et al., 2012]. Μετά από 2 κύκλους χημειοθεραπείας πρέπει να διενεργείται ενδιάμεση PET. Στην περίπτωση αρνητικής PET μετά από 2 κύκλους ABVD, θα πρέπει για τους επόμενους κύκλους να εξετάζεται η διακοπή της μπλεομυκίνης ειδικά σε ηλικιωμένους ασθενείς και σε όσους διατρέχουν αυξημένο

κίνδυνο πνευμονικής τοξικότητας. Στην περίπτωση θετικής PET μετά από 2 κύκλους ABVD, θα πρέπει να εξετάζεται η αλλαγή χημειοθεραπευτικού σχήματος από ABVD σε BEACOPPesc [Johnson, P., et al., 2016]. Στην περίπτωση αρνητικής PET μετά από 2 κύκλους BEACOPPesc ακολουθούν ακόμη 2 κύκλοι BEACOPPesc, ενώ στην περίπτωση θετικής PET μετά από 2 κύκλους BEACOPPesc ακολουθούν ακόμη 4 κύκλοι BEACOPPesc [Borchmann, P., et al., 2017]. Σε νόσο προχωρημένου σταδίου ακτινοθεραπεία χορηγείται σε ασθενείς με PET-θετική υπολειμματική νόσο $\geq 2,5$ εκ. μετά από 4 ή 6 κύκλους BEACOPPesc [Engert, A., et al., 2012, Borchmann, P., et al., 2017]. Το χημειοθεραπευτικό σχήμα BEACOPP δεν πρέπει να χορηγείται σε ασθενείς ηλικίας >60 ετών. Για ασθενείς πιο προχωρημένης ηλικίας με κατάσταση ικανότητας που τους επιτρέπει να λάβουν πολυπαραγοντική χημειοθεραπεία, η βασισμένη στο σχήμα ABVD χημειοθεραπεία αποτελεί το standard of care (η μπλεομυκίνη πρέπει να διακόπτεται μετά το δεύτερο χημειοθεραπευτικό κύκλο) [Eichenauer, D. A., et al., 2018].

Υποτροπιάζουσα/Ανθεκτική νόσος

Για την πλειονότητα των ασθενών αυτής της κατηγορίας, η θεραπεία εκλογής είναι οι υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας ακολουθούμενες από αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων [Schmitz, N., et al., 2002]. Οι ασθενείς υψηλού κινδύνου ενδέχεται να ωφεληθούν από διπλή αυτόλογη μεταμόσχευση. Σε ασθενείς με συγκεκριμένους παράγοντες υψηλού κινδύνου συνιστάται η θεραπεία σταθεροποίησης με brentuximab vedotin μετά τις υψηλές δόσεις χημειοθεραπείας και την αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων [Moskowitz, C. H., et al., 2015]. Σχήματα διάσωσης που μπορούν να χορηγηθούν προ των υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας και της αυτόλογης μεταμόσχευσης είναι τα DHAP (δεξαμεθαζόνη, κυταραβίνη, σισπλατίνη), IGEV (ιφωσφαμίδη, γεμισιταμπίνη, βινορελμπίνη) ή ICE (ιφωσφαμίδη, καρβοπλατίνη, ετοποσίδη). Σε μερικούς ασθενείς η μονοθεραπεία με brentuximab vedotin ενδέχεται να είναι επαρκής ως θεραπεία διάσωσης πριν τη μεταμόσχευση [Moskowitz, A. J., et al., 2015]. Ο στόχος της θεραπείας διάσωσης ανεξαρτήτως του χρησιμοποιούμενου σχήματος είναι η επίτευξη αρνητικής PET. Σε ασθενείς με μεμονωμένους PET-θετικούς λεμφαδένες μετά τη θεραπεία διάσωσης, μπορεί να συζητηθεί η χορήγηση ακτινοθεραπείας προ

των υψηλών δόσεων χημειοθεραπείας και της αυτόλογης μεταμόσχευσης [Rimner, A., et al., 2017]. Σε ασθενείς με αποτυχία της αυτόλογης μεταμόσχευσης η μονοθεραπεία με brentuximab vedotin αποτελεί μία επιλογή [Chen, R., et al., 2016]. Σε ασθενείς με υποτροπή νόσου μετά από αυτόλογη μεταμόσχευση και θεραπεία με brentuximab vedotin, μπορούν να χορηγηθούν τα φάρμακα νιβολουμάμπη και πεμπρολιζουμάμπη. Η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων συνιστά θεραπευτική επιλογή που δυνητικά μπορεί να προσφέρει ίαση σε ασθενείς στους οποίους έχει αποτύχει η αυτόλογη μεταμόσχευση. Η επιλογή της αλλογενούς μεταμόσχευσης πρέπει να εξετάζεται σε νέους, χημειοευαίσθητους ασθενείς σε καλή γενική κατάσταση μετά από προσεκτική στάθμιση κινδύνου-οφέλους. Σε ασθενείς με πολλαπλές υποτροπές χωρίς άλλες διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές, συνιστώνται παρηγορική χημειοθεραπεία με σχήμα βασισμένο στη γεμισιταμπίνη και/ή τοπική ακτινοθεραπεία [Eichenauer, D.A., et al., 2018].

Θεραπεία οζώδους λεμφώματος Hodgkin λεμφοκυτταρικής επικράτησης

Η θεραπεία είναι όμοια με τη θεραπεία του κλασικού λεμφώματος Hodgkin σε όλους τους ασθενείς εκτός από εκείνους με νόσο σταδίου ΙΑ χωρίς κλινικούς παράγοντες κινδύνου. Στους ασθενείς με νόσο σταδίου ΙΑ χωρίς κλινικούς παράγοντες κινδύνου η θεραπεία είναι η ακτινοθεραπεία εμπλεκόμενης περιοχής (ISRT) στα 30 Gy [Eichenauer, D. A., et al., 2015]. Σε ασθενείς με υπόνοια υποτροπής πρέπει να διενεργείται νέα βιοψία προ της έναρξης χορήγησης θεραπείας διάσωσης. Οι εντοπισμένες υποτροπές μπορούν να θεραπευθούν επιτυχώς με anti-CD20 μονοκλωνικά αντισώματα όπως η ριτουξιμάμπη ή η οφατουμουμάμπη χορηγούμενα ως μονοθεραπεία [Schulz, H., et al., 2008, Eichenauer, D. A., et al., 2016]. Ασθενείς με πιο εκτεταμένη νόσο στην υποτροπή και με επιπρόσθετα χαρακτηριστικά υψηλού κινδύνου μπορεί να χρειαστούν πιο επιθετική χημειοθεραπεία διάσωσης, πιθανώς σε συνδυασμό με ένα anti-CD20 μονοκλωνικό αντίσωμα [Akhtar, S., et al., 2018]. Η επιλογή της θεραπείας διάσωσης πρέπει να είναι εξατομικευμένη και να βασίζεται σε παράγοντες όπως το χρονικό διάστημα έως την υποτροπή, η έκταση της νόσου στην υποτροπή και προηγούμενες θεραπείες.

Πρόγνωση

Το λέμφωμα Hodgkin κατατάσσεται μεταξύ των πλέον ιάσιμων νόσων με τις σύγχρονες θεραπείες. 80-90% των ασθενών επιτυγχάνουν μόνιμη ύφεση και θεωρούνται θεραπευμένοι.

Παρακολούθηση, μακροπρόθεσμες επιπλοκές και επιβίωση

Η παρακολούθηση των ασθενών πρέπει να είναι τακτική για να ανιχνεύονται τυχόν υποτροπές της νόσου και απώτερες επιπλοκές σχετιζόμενες με τη θεραπεία. Λήψη ιατρικού ιστορικού, κλινική εξέταση και εργαστηριακός έλεγχος πρέπει να διενεργούνται κάθε 3 μήνες για τους πρώτους 6 μήνες, κάθε 6 μήνες μέχρι το 4^ο έτος και κάθε 1 έτος εν συνεχεία. Η θυρεοειδική λειτουργία πρέπει να εκτιμάται ανά έτος αν είχε γίνει ακτινοβολήση του τραχήλου. Τα επίπεδα τεστοστερόνης και οιστρογόνων πρέπει να ελέγχονται, ειδικά σε νεότερους ασθενείς που είχαν λάβει εντατική χημειοθεραπεία. Έλεγχος για άλλους καρκίνους πρέπει να διενεργείται τακτικά μετά από θεραπεία για λέμφωμα Hodgkin. Γυναίκες ασθενείς που ήταν ≤ 40 ετών όταν ακτινοβολήθηκαν στο θώρακα ή στις μασχάλες πρέπει να υποβάλλονται σε μαστογραφία ανά έτος αρχίζοντας 8-10 έτη μετά την ακτινοθεραπεία. Γυναίκες ασθενείς που ήταν ≤ 30 ετών πρέπει να υποβάλλονται τόσο σε μαστογραφία όσο και σε μαγνητική τομογραφία μαστών [Eichenauer, D. A., et al., 2018].

Κλασικό λέμφωμα Hodgkin και EBV

Στο 30-40% των περιπτώσεων κλασικού λεμφώματος Hodgkin, τα HRS κύτταρα μολύνονται από τον ιό Epstein-Barr (EBV), γεγονός το οποίο ενδέχεται να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση των περιπτώσεων που σχετίζονται με EBV [Cirillo, M., et al., (2019), Piris, M. A., et al., (2020), Weniger, M. A., Kuppers, R. (2021), Jiwa, N.M., et al., (1993)]. Υπάρχουν στοιχεία σύμφωνα με τα οποία τα HRS κύτταρα παρουσιάζουν χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων, όπως π.χ. το μεγάλο μέγεθος, η παρουσία πολλών πυρήνων, η θετικότητα για SA- β -gal, η έκφραση των p21 και p16 και η απουσία έκφρασης του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 [Gopas, J. et al., 2016].

B) Υλικό και μέθοδοι

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων σε δείγματα ασθενών με κλασικό λέμφωμα Hodgkin με τη χρήση ενός νέου αντιδραστηρίου που ονομάζεται SenTraGor™ [Evangelou, K., et al., 2017] καθώς και η συσχέτιση των ευρημάτων με κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών. Το SenTraGor™ είναι ένα βιοτινυλιωμένο Sudan Black B ανάλογο που συνδέεται στη λιποφουσκίνη (η οποία συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα των γηρασμένων κυττάρων) και μπορεί να οπτικοποιηθεί με ανοσοϊστοχημεία. Η μεθοδολογία SenTraGor™ έχει προσφάτως χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γηρασμένων κυττάρων τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις (υποστροφή θύμου αδένος) [Barbouti, A., et al., 2020] όσο και σε παθολογικές καταστάσεις (π.χ. παγκρεατικές ενδοεπιθηλιακές βλάβες, κλασικό λέμφωμα Hodgkin, ιστιοκυττάρωση Langerhans και συμπαγείς όγκοι [Myrianthopoulos, V., et al., 2019]).

B.1 Ασθενείς

Αυτή η μονοκεντρική αναδρομική μελέτη κοόρτης περιέλαβε 59 ασθενείς με νέα διάγνωση κλασικού λεμφώματος Hodgkin (48 με οζώδη σκλήρυνση και 11 με μικτή κυτταροβρίθεια) που αντιμετωπίστηκαν στην Αιματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων μεταξύ 1999 και 2019. Έγινε καταγραφή των χαρακτηριστικών και των κλινικών δεδομένων των ασθενών, συμπεριλαμβανομένων των στοιχείων της νόσου, των εργαστηριακών τιμών, της απόκρισης στη θεραπεία και της κλινικής έκβασης. Δείγματα ιστών των ασθενών συνελέγησαν από τα αρχεία του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

B.2 Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο-μεθοδολογία SenTraGor™ για ανοσοϊστοχημεία [Evangelou, K., et al., 2017].

Το βιολογικό υλικό στο οποίο εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο SenTraGor™ είναι καθηλωμένα σε φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη (formalin-fixed

paraffin-embedded, FFPE) ιστικά δείγματα ασθενών με κλασικό λέμφωμα Hodgkin (οξώδης σκλήρυνση, μικτή κυτταροβρίθεια).

Λεπτές τομές (4 μm) κόπηκαν από τους ιστούς αυτούς και ετέθησαν σε θετικά φορτισμένες γυάλινες επιφάνειες οι οποίες επώαστηκαν στους 37°C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Όσον αφορά την προετοιμασία του διαλύματος του αντιδραστήριου SenTraGor™, συγκεκριμένος όγκος 100% αιθυλικής αλκοόλης προστέθηκε στο φιαλίδιο με το αντιδραστήριο (ο όγκος της αιθυλικής αλκοόλης εξαρτάται από την ποσότητα του SenTraGor™): 3,5-3,75 mL στο φιαλίδιο των 20 mg, 7-7,5 mL στο φιαλίδιο των 40 mg, 14-15 mL στο φιαλίδιο των 80 mg. Τα φιαλίδια επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 56°C για 120 λεπτά μέχρι το αντιδραστήριο να διαλυθεί πλήρως και εν συνεχεία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

Αναφορικά με τη διαδικασία της χρώσης, οι τομές αρχικά αποπαραφινίστηκαν με επώαση στους 60°C για 20 λεπτά της ώρας και στη συνέχεια πλύση σε ξυλόλιο για 15 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως οι τομές εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης σταδιακά μειούμενων συγκεντρώσεων (100% αιθυλική αλκοόλη για 15 λεπτά, 96% για 10 λεπτά, 80% για 5 λεπτά, 70% για 3 λεπτά και 50% για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Ακολούθησε πλύση σε TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης του υδρογόνου. Μετά από σειρά πλύσεων σε TBS και αιθυλική αλκοόλη οι τομές επώαστηκαν με το αντιδραστήριο SenTraGor™ σε θερμοκρασία δωματίου: μία σταγόνα διαλύματος του αντιδραστήριου τοποθετήθηκε με σύριγγα πάνω στην τομή και στη συνέχεια γυάλινη καλυπτρίδα εφαρμόστηκε πάνω στην τομή. Η αντίδραση της χρώσης παρατηρήθηκε υπό το οπτικό μικροσκόπιο μέχρι να ανιχνευθεί το σήμα. Ακολούθησε επώαση για 5-8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια η καλυπτρίδα απομακρύνθηκε προσεκτικά. Ενδεχόμενη περίσσεια αντιδραστήριου SenTraGor™ απομακρύνθηκε με μαλακό χαρτί. Μετά από σειρά πλύσεων σε 50% αιθυλική αλκοόλη και σε TBS και επώαση με 0,5% TritonX/TBS για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, οι τομές επώαστηκαν με το πρωτογενές αντιβιοτινικό αντίσωμα διαλυμένο σε TBS 1/300-1/500 για 60 λεπτά στους 37°C. Μετά από τρεις πλύσεις σε TBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου οι τομές επώαστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα έναντι του αντιβιοτινικού αντισώματος

για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από ακόμη τρεις πλύσεις σε TBS εφαρμόστηκε το χρωμογόνο DAB και η αντίδραση της χρώσης παρατηρήθηκε υπό το οπτικό μικροσκόπιο μέχρι να ανιχνευθεί το βαθύ καφέ σήμα. Ακολούθησε πλύση των τομών σε νερό βρύσης για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια χρώση τους με αιματοξυλίνη. Μετά από ακόμη μία πλύση σε νερό βρύσης για 5 λεπτά και εφαρμογή των μονιμοποιητικών μέσων, οι τομές παρατηρήθηκαν υπό το οπτικό μικροσκόπιο. Τομές από ιστούς θύμου αδένος χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες [Barbouti, A., et al (2019)].

Αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών p16 και Ki67 χρησιμοποιήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία και κύτταρα του αντιδραστικού μικροπεριβάλλοντος χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης αρνητικοί μάρτυρες. Ο EBER1/2 in situ υβριδισμός για την ανίχνευση EBV χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με πρότυπες διαδικασίες [Papoudou-Bai, A., et al., (2015)]. Διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση για ταυτόχρονη ανίχνευση p16 και Ki67 εφαρμόστηκε σύμφωνα με προηγούμενη περιγραφή [Papoudou-Bai, A., et al (2012)].

B.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με χρήση του λογισμικού StatView [Karpathiou, G., et al., (2021)]. Εν συντομία, η δοκιμασία χ^2 χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί η σχέση μεταξύ δύο ομάδων διακριτών μεταβλητών. Η ανάλυση διακύμανσης και η δοκιμασία Mann-Whitney U χρησιμοποιήθηκαν για να ερευνηθεί η σχέση μεταξύ μίας διακριτής και μίας συνεχούς μεταβλητής. Οι συντελεστές συσχέτισης Pearson και Spearman χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ερευνηθεί η σχέση μεταξύ δύο ομάδων συνεχών μεταβλητών. Οι παράμετροι αναλύθηκαν τόσο ως συνεχείς όσο και ως διακριτές μεταβλητές χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή τους ως κατώφλι [Karpathiou, G., et al., (2021)]. Η πιθανότητα επιβίωσης εκτιμήθηκε με ανάλυση Kaplan-Meier. Τιμή $p < 0,05$ θεωρήθηκε ως σημαντική.

Γ) Αποτελέσματα

Γ.1 Κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα

Όσον αφορά τα κλινικά χαρακτηριστικά των 59 ασθενών στη διάγνωση, η διάμεση ηλικία ήταν $48 \pm 19,9$ έτη, η μέση ηλικία ήταν 47 έτη, το ηλικιακό εύρος 16-90 έτη και η πλειονότητά τους ήταν άρρενες (54%). 52% των ασθενών είχαν Β-συμπτώματα, 32% παρουσίαζαν εξωλεμφαδενική νόσο (κυρίως προσβολή σπλήνα, πνεύμονα και ήπατος) και 36% είχαν μάζα μεσοθωρακίου. 88% των ασθενών είχαν κατάσταση ικανότητας (performance status) 0-1, 64% παρουσίαζαν νόσο προχωρημένου σταδίου, 29% νόσο περιορισμένου σταδίου και 7% είχαν σταδίου II ογκώδη νόσο. Η διάμεση ολική επιβίωση των ασθενών ήταν 196 μήνες (πίνακας 1).

Όσον αφορά τα εργαστηριακά ευρήματα στη διάγνωση, 12% των ασθενών είχαν λευκά αιμοσφαίρια πάνω από $15 \times 10^9/L$, 18% είχαν αιμοσφαιρίνη κάτω από 10,5 g/dL, 8% είχαν λεμφοκύτταρα κάτω από $600 \times 10^9/L$, 18% θρομβοκυττάρωση ή θρομβοπενία, 49% τιμή ταχύτητας καθίζησης ερυθρών (ΤΚΕ) πάνω από 30, 64% αυξημένη τιμή C αντιδρώσας πρωτεΐνης (CRP), 56% αλβουμίνη κάτω από 4 g/dL, 49% αυξημένη τιμή γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) και 17% είχαν αυξημένη τιμή β_2 -μικροσφαιρίνης.

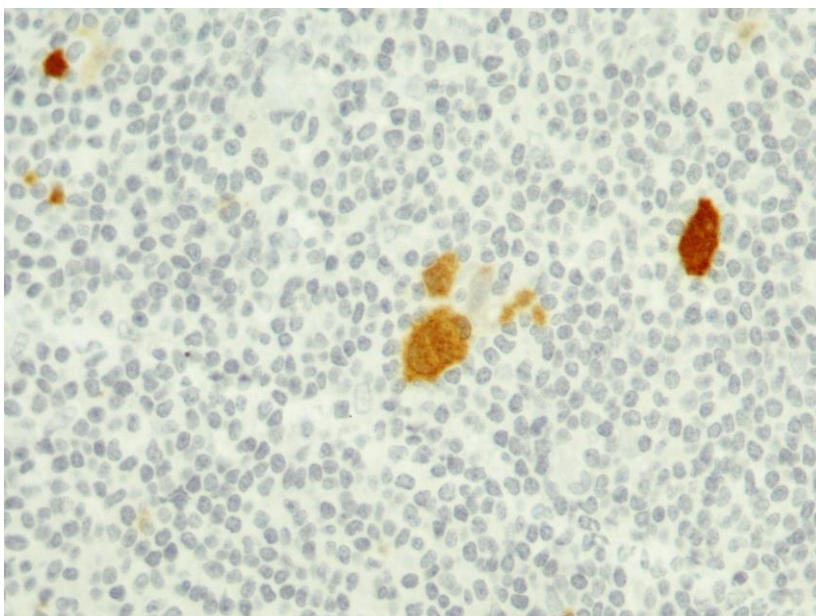
Φύλο	Άντρες: 32
	Γυναίκες: 27
Ηλικία (έτη)	Διάμεση τιμή: $48 \pm 19,9$
	Μέση τιμή: 47
	Εύρος: 16-90
<u>Κατάσταση ικανότητας</u>	
0-1	52 (88%)
≥ 2	7 (12%)
<u>Ταξινόμηση Lugano</u>	
Προχωρημένο στάδιο	38 (64%)
Περιορισμένο στάδιο	17 (29%)
Στάδιο II ογκώδους νόσου	4 (7%)

Β-συμπτώματα	31 (52%)
Προσβολή πνεύμονα	9 (15%)
Προσβολή ήπατος	6 (10%)
Προσβολή σπλήνα	19 (32%)
Μεσοθωρακική μάζα	21 (35%)

Πίνακας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

Γ.2 Ανοσοϊστοχημικά ευρήματα

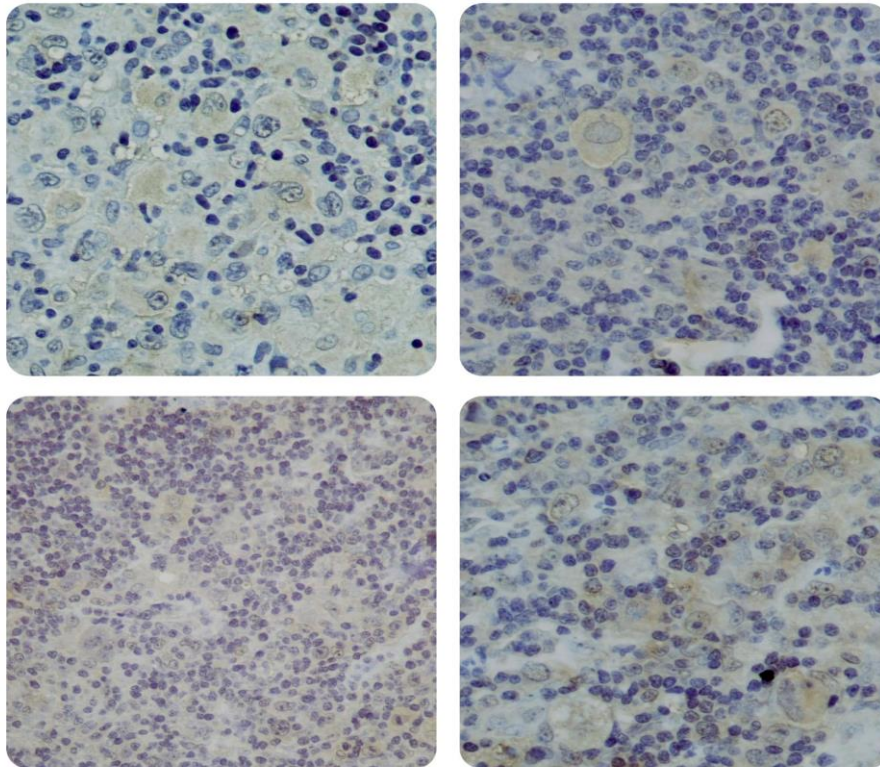
Στο 49% των περιπτώσεων (στις 29 από τις 59) ανιχνεύθηκε θετικότητα για p16 ανοσοχρώση (πυρηνική και κυτταροπλασματική) (εικόνα 1) σε ποικίλα ποσοστά των HRS κυττάρων (εύρος 5-90%). Χρησιμοποιώντας ως επίπεδο cut-off τη μέση χρώση στα HRS κύτταρα, υψηλή έκφραση p16 παρατηρήθηκε στις 19 από τις 59 περιπτώσεις.



Εικόνα 1. p16 ανοσοχρώση σε HRS κύτταρα (μεγέθυνση x 600)

Μόνο λίγα κύτταρα (<5%) του αντιδραστικού (μη-νεοπλασματικού) κυτταρικού υποστρώματος ήταν p16 θετικά σε όλες τις περιπτώσεις. Η διπλή ανοσοϊστοχημική χρώση με p16 και Ki67 ανέδειξε ότι ένα σημαντικό ποσοστό των p16 θετικών κυττάρων ήταν Ki67 αρνητικά.

Στο 14% των περιπτώσεων (στις 8 από τις 52) ανιχνεύθηκε θετικότητα για τη χρώση SenTraGor™ (εικόνα 2) σε ποσοστά HRS κυττάρων κυμαινόμενα μεταξύ 5% και 20%. Σε 3 περιπτώσεις <10% των HRS κυττάρων ήταν SenTraGor™ θετικά και στις υπόλοιπες 5 περιπτώσεις 10-20% των HRS κυττάρων επέδειξαν θετικότητα για τη χρώση. Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε SenTraGor™ θετικότητα σε κύτταρα του αντιδραστικού υποστρώματος.



Εικόνα 2. SenTraGor™ χρώσεις σε HRS κύτταρα (μεγεθύνσεις x 400, x 600)

Τα HRS κύτταρα ήταν SenTraGor™ θετικά/p16 θετικά σε 4 περιπτώσεις, ενώ στις υπόλοιπες 4 περιπτώσεις ήταν SenTraGor™ θετικά/p16 αρνητικά (Πίνακας 2). Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της SenTraGor™ θετικότητας ή αρνητικότητας και του προτύπου της χρώσης p16.

SenTraGor™	p16	Αριθμός περιπτώσεων
+ (10-20%)	+	3
+ (10-20%)	-	2

+ (<10%)	+	1
+ (<10%)	-	2
-	+	20
-	-	24
Σύνολο 8 θετικές περιπτώσεις	Σύνολο 24 θετικές περιπτώσεις	Σύνολο 52 περιπτώσεις

Πίνακας 2. Συνδυασμοί θετικότητας/αρνητικότητας χρώσεων SenTraGor™ και p16

Γ.3 EBV

Έκφραση EBER1/2 μεταγράφων παρατηρήθηκε στο 27% των περιπτώσεων (στις 14 από τις 52) σε ποικίλα ποσοστά HRS κυττάρων. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της EBV θετικότητας ή αρνητικότητας και των χρώσεων p16 ή SenTraGor™.

Δ) Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκαν τα πρότυπα κυτταρικής γήρανσης καθώς και η EBV κατάσταση στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin σε συσχέτιση με κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα.

Βιοπτικά υλικά από λέμφωμα Hodgkin περιέχουν χαρακτηριστικά μεγάλα νεοπλασματικά Reed-Sternberg κύτταρα. Συνήθως τα κύτταρα αυτά είναι πολυπύρρηνα, εύρημα που θα μπορούσε να υπαινίσσεται αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Στο λέμφωμα Hodgkin το μέγεθος των κυττάρων είναι μεγάλο, μορφολογία η οποία επίσης θεωρείται ως ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα της κυτταρικής γήρανσης. Μία πιλοτική μελέτη σε βιοψίες ασθενών με κλασικό λέμφωμα Hodgkin ανέδειξε ανοσοϊστοχημική χρώση με τους δείκτες CD30 και CD15 [Goras, J., et al, 2016]. Οι αναστολείς του κυτταρικού κύκλου και, επιπλέον, δείκτες γήρανσης p16 και p21 όπως επίσης και η υπομονάδα p65 του NF-κΒ ανιχνεύθηκαν στις περισσότερες από τις βιοψίες που εξετάστηκαν. Ανοσοϊστοχημική χρώση θετική για p16 και p21 ανιχνεύθηκε κυρίως στα μεγάλα Reed-Sternberg κύτταρα αλλά όχι στα μικρά πολλαπλασιαζόμενα Hodgkin κύτταρα. Επιπλέον, τα Reed-Sternberg κύτταρα στις περισσότερες βιοψίες ήταν αρνητικά για το δείκτη

πολλαπλασιασμού Ki-67, εύρημα που υποστηρίζει ότι τα κύτταρα αυτά δεν διαιρούνται [Gopas, J., et al, 2016]. Στην ίδια μελέτη δείχθηκε ότι τα μεγάλα Reed-Sternberg-like (RS-like) κύτταρα σε κυτταρικές σειρές προερχόμενες από λέμφωμα Hodgkin εκφράζουν δείκτες κυτταρικής γήρανσης και ότι μπορούν να οδηγηθούν προς κυτταρική γήρανση από παράγοντες που επάγουν οξειδωτικό στρες: Ο δείκτης κυτταρικής γήρανσης SA-β-gal εκφράζεται στα μεγάλα RS-κύτταρα σε L428 κύτταρα και η έκφραση του δείκτη αυτού μετά από χρήση παραγόντων που επάγουν τη γήρανση (H_2O_2) ή παραγόντων που προκαλούν βλάβη στο DNA (ετοποσίδη) αυξάνεται κατά περίπου 7 φορές. Επιπλέον, η χρώση με το φθορίζον υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης C12FDG και εν συνεχεία η ανάλυση με FACS έδειξαν SA-β-gal φθορισμό σε RS-like κύτταρα ο οποίος αυξήθηκε μετά από έκθεση σε παράγοντες που επάγουν οξειδωτικό στρες. Το γεγονός ότι αυτά τα κύτταρα δεν διαιρούνται επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με σήμανσή τους με τη φθορίζουσα χρωστική CFDA-SE η οποία παραμένει σε μη διαιρούμενα κύτταρα αλλά όχι σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Επίσης δείχθηκε ότι και άλλοι δείκτες κυτταρικής γήρανσης (p16 και p21) εκφράζονται στα RS-like κύτταρα και η έκφρασή τους αυξάνεται μετά από χρήση παραγόντων που επάγουν τη γήρανση. Στην ίδια έρευνα μελετήθηκε σε RS-like κύτταρα η δραστικότητα του NF-κΒ ο οποίος αποτελεί κύριο ρυθμιστή της έκκρισης κυτταροκινών στην κυτταρική γήρανση: δείχθηκε αυξημένη δραστικότητα του NF-κΒ στα μεγάλα RS-κύτταρα σε σύγκριση με τα μικρά Hodgkin κύτταρα, ενώ το οξειδωτικό στρες περαιτέρω επέτεινε τη δραστικότητα αυτή. Προκειμένου να διερευνηθεί ποια κύτταρα ήταν κυρίως υπεύθυνα για την έκκριση των κυτταροκινών, έγινε διαχωρισμός τους μέσω FACS σε υποπληθυσμούς Hodgkin κυττάρων και RS-like κυττάρων, πριν και μετά από οξειδωτικό στρες. Τα μεγάλα RS κύτταρα δείχθηκε ότι εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα των κυτταροκινών IL-6, GM-CSF και TNF-α τόσο πριν όσο και μετά τη χρήση οξειδωτικών παραγόντων. Οι ανωτέρω παρατηρήσεις είναι συμβατές με την υπόθεση ότι ένα υποσύνολο των HRS κυττάρων είναι γηρασμένα κύτταρα και έτσι συμβάλλουν στην επαγωγή του προφλεγμονώδους προγράμματος SASP [Gopas, J., et al., 2016].

Στην παρούσα έρευνα SenTraGor™ θετικά και p16 θετικά HRS κύτταρα παρατηρήθηκαν στο 14% και στο 49% των περιπτώσεων κλασικού λεμφώματος Hodgkin που μελετήθηκαν, αντίστοιχα. Το εύρημα αυτό έρχεται σε συμφωνία με

αντίστοιχα ευρήματα προηγούμενων μελετών [Myriantopoulos, V., et al., (2019), Gopas, J., et al., (2016), Calio, A., et al., (2015)]. Σε μία εξ αυτών των μελετών είχαν αναδειχθεί γηρασμένα HRS κύτταρα με ταυτόχρονη ύπαρξη κυτταροπλασματικής SenTraGor™ αντίδρασης και πυρηνικής ανοσοϊστοχημικής θετικότητας για p21 ή p16. [Myriantopoulos, V., et al., (2019)]. Στην ίδια έρευνα είχε φανεί αλληλοαποκλεισμός μεταξύ της κυτταροπλασματικής SenTraGor™ αντίδρασης και του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67, εύρημα που υποδεικνύει ότι αυτά τα HRS κύτταρα δεν διαιρούνται [Myriantopoulos, V., et al., (2019)].

Στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της p16 ή της SenTraGor™ χρώσης και κλινικών παραμέτρων στο κλασικό λέμφωμα Hodgkin. Σε προγενέστερες έρευνες, ωστόσο, είχε φανεί ότι η ανίχνευση γηρασμένων HRS κυττάρων ενδέχεται να έχει κλινικό αντίκτυπο [Myriantopoulos, V., et al., (2019), Calio, A., et al., (2015)]. Σε μία από αυτές τις μελέτες, θετική ανοσοχρώση για p16 ή p21 σε περισσότερα από 30% των HRS κυττάρων είχε συνδεθεί με στατιστικά σημαντική πρόβλεψη για βελτίωση της επιβίωσης χωρίς συμβάματα (event-free survival, EFS) [Calio, A., et al., (2015)]. Πιο συγκεκριμένα, η διαφορά μεταξύ των καμπυλών πιθανότητας EFS ανάλογα με το ποσοστό των HRS κυττάρων που ήταν θετικά στη χρώση p16 ή p21 ήταν στατιστικά σημαντική τόσο για το δείκτη p16 όσο και για το δείκτη p21: η πιθανότητα EFS στο πλατό της καμπύλης Kaplan-Meier ήταν 45% για ποσοστό p16-θετικών HRS κυττάρων < 30% έναντι 89% για ποσοστό p16-θετικών HRS κυττάρων ≥30%, και 40% για ποσοστό p21-θετικών HRS κυττάρων <30% έναντι 90% για ποσοστό p21-θετικών HRS κυττάρων ≥30%. Επιπλέον, η διπλή θετικότητα (τόσο στη χρώση p16 όσο και στη χρώση p21) σε ποσοστό HRS κυττάρων ≥30% συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με αυξημένη πιθανότητα EFS σε σύγκριση τόσο με τη διπλή αρνητικότητα όσο και με τη θετικότητα σε μία μόνο από τις δύο χρώσεις. Στην ίδια έρευνα, τόσο ο δείκτης p16 όσο και ο δείκτης p21 ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες, με την έκφρασή τους σε ποσοστό ≥30% των HRS κυττάρων να είναι προστατευτική έναντι υποτροπής του νοσήματος [Calio, A., et al (2015)]. Σε άλλη μελέτη η ανίχνευση SenTraGor™ θετικών γηρασμένων HRS κυττάρων σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% είχε συσχετιστεί με μη ικανοποιητική απάντηση τόσο στην πρώτη γραμμή θεραπείας όσο και στη θεραπεία διάσωσης [Myriantopoulos, V., et al (2019)]. Δύο

πιθανά σενάρια θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτή τη συσχέτιση: πρώτον, τα γηρασμένα HRS κύτταρα στις πρωτοπαθείς βλάβες, μέσω SASP ενδέχεται να τρέφουν το μικροπεριβάλλον του όγκου οδηγώντας σε ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία [Gordon, R. R., Nelson, P. S. (2012), Schosserer, M., et al (2017)]. Δεύτερον, τα γηρασμένα HRS κύτταρα ενδέχεται τελικά να διαφύγουν της γήρανσης και να επανεισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο, έχοντας αποκτήσει επιθετικά χαρακτηριστικά και ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία.

Συμπεραίνεται ότι απαιτούνται επιπρόσθετες σχετικές μελέτες προκειμένου να ερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος τον οποίο διαδραματίζει η κυτταρική γήρανση στην κλινική έκβαση ασθενών με κλασικό λέμφωμα Hodgkin.

Βιβλιογραφία

1. Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T. W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., Longerich, T., Sansom, O. J., Benitah, S. A., Zender, L., Gil, J. (2013), A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence, *Nat. Cell Biol.*, 15, 978-990.
2. Akhtar, S., Montoto, S., Boumendil, A., Finel, H., Masszi, T., Jindra, P., Nemet, D., Fuhrmann, S., Beguin, Y., Castagna, L., Ferrara, F., Capria, S., Malladi, R., Moraleda, J. M., Bloor, A., Ghesquieres, H., Meissner, J., Sureda, A., Dreger, P. (2018), High dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a retrospective study by the European Society for Blood and Marrow Transplantation-Lymphoma Working Party, *Am. J. Hematol.*, 93, 40-46.
3. Barbouti, A., Evangelou, K., Pateras, I. S., Papoudou-Bai, A., Patereli, A., Stefanaki, K., Rontogianni, D., Munoz-Espin, D., Kanavaros, P., Gorgoulis, V. G. (2019), In situ evidence of cellular senescence in thymic epithelial cells (TECs) during human thymic involution, *Mech. Ageing Dev.*, 177, 88-90.

4. Barbouti, A., Vasileiou, P. V. S., Evangelou, K., Vlasis, K. G., Papoudou-Bai, A., Gorgoulis, V. G., Kanavaros, P. (2020), Implications of oxidative stress and cellular senescence in age-related thymus involution, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 7986071.
5. Barrington, S. F., Mikhaeel, N. G., Kostakoglu, L., Meignan, M., Hutchings, M., Mueller, S. P., Schwartz, L. H., Zucca, E., Fisher, R. I., Trotman, J., Hoekstra, O. S., Hicks, R. J., O'Doherty, M. J., Hustinx, R., Biggi, A., Cheson, B. D. (2014), Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group, *J. Clin. Oncol.*, 32 (27), 3048-3058.
6. Becker, T., Haferkamp, S. (2013), Molecular Mechanisms of Cellular Senescence, *Senescence and Senescence-Related Disorders*, 25-50.
7. Borchmann, P., Goergen, H., Kobe, C., Lohri, A., Greil, R., Eichenauer, D. A., Zijlstra, J. M., Markova, J., Meissner, J., Feuring-Buske, M., Huettmann, A., Dierlamm, J., Soekler, M., Beck, H.-J., Willenbacher, W., Ludwig, W.-D., Pabst, T., Topp, M. S., Hitz, F., Bentz, M., Keller, U. B., Kuehnhardt, D., Ostermann, H., Schmitz, N., Hertenstein, B., Aulitzky, W., Maschmeyer, G., Vieler, T., Eich, H., Baues, C., Stein, H., Fuchs, M., Kuhnert, G., Diehl, V., Dietlein, M., Engert, A. (2017), PET-guided treatment in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma (HD18): final results of an open-label, international, randomized phase 3 trial by the German Hodgkin Study Group, *Lancet*, 390, 2790-2802.
8. Calio, A., Zamo, A., Ponzoni, M., Zanolin, M. E., Ferreri, A. J. M., Pedron, S., Montagna, L., Parolini, C., Fraifeld, V. E., Wolfson, M., Yanai, H., Pizzolo, G., Doglioni, C., Vinante, F., Chilosi, M. (2015), Cellular senescence markers p16/INK4a and p21C1P1/WAF are predictors of hodgkin lymphoma outcome, *Clin. Cancer Res*, 21, 5164-5172
9. Canellos, G. P., Niedzwiecki, D., Johnson, J. L. (2009), Long-term follow-up of survival in Hodgkin's lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, 361, 2390-2391.
10. Carnero, A. (2013), Markers of Cellular Senescence, *Methods in Molecular Biology*, 63-81.
11. Chen, R., Gopal, A. K., Smith, S. E., Ansell, S. M., Rosenblatt, J. D., Savage, K. J., Connors, J. M., Engert, A., Larsen, E. K., Huebner, D., Fong, A., Younes, A.

- (2016), Five-year survival and durability results of brentuximab vedotin in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma, *Blood*, 128, 1562-1566.
12. Cheson, B. D., Fisher, R. I., Barrington, S. F., Cavalli, F., Schwartz, L. H., Zucca, E., Lister, T. A. (2014), Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification, *J. Clin. Oncol.*, 32 (27), 3059-3067.
 13. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., van Deursen, J. M. (2014), Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?, *EMBO reports*, 15, 1139-1153.
 14. Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., van Deursen, J. M. (2015), Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy, *Nat. Med.*, 21, 1424-1435.
 15. Cirillo, M., Reinke, S., Klapper, W., Borchmann, S. (2019), The translational science of Hodgkin lymphoma, *Br. J. Haematol.*, 184 (1), 30-44.
 16. Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A., Campisi, J. (2010), The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression, *Annu. Rev. Pathol.*, 5, 99-118.
 17. Correia-Melo, C., Passos, J. F. (2015), Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence?, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847, 1373-1379.
 18. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dolle, M. E., Hoeijmakers, J. H. J., de Bruin, A., Hara, E., Campisi, J. (2014), An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA, *Dev. Cell*, 31, 722-733.
 19. Eichenauer, D. A., Aleman, B. M. P., Andre, M., Federico, M., Hutchings, M., Illidge, T., Engert, A., Ladetto, M., on behalf of the ESMO Guidelines Committee (2018), Hodgkin lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology*, Suppl. 4, iv19-iv29.
 20. Eichenauer, D. A., Goergen, H., Plutschow, A., Wongso, D., Behringer, K., Kreissl, S. (2016), Ofatumumab in relapsed nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: results of a phase II study from the German Hodgkin study group, *Leukemia*, 30, 1425-1427.

21. Eichenauer, D. A., Plutschow, A., Fuchs, M., von Tresckow, B., Boell, B., BehringerVolker Diehl, K., Eich, H. T., Borchmann, P., Engert, A. (2015), Long-term course of patients with stage IA nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group, *J. Clin. Oncol.*, 33, 2857-2862.
22. Engert, A., Franklin, J., Eich, H. T., Brillant, C., Sehlen, S., Cartoni, C., Herrmann, R., Pfreundschuh, M., Sieber, M., Tesch, H., Franke, A., Koch, P., de Wit, M., Paulus, U., Hasenclever, D., Loeffler, M., Mueller, R. P., Mueller-Hermelink, H. K., Duehmke, E., Diehl, V. (2007), Two cycles of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine plus extended-field radiotherapy is superior to radiotherapy alone in early favorable Hodgkin's lymphoma: final results of the GHSG HD7 trial, *J. Clin. Oncol.*, 25, 3495-3502.
23. Engert, A., Haverkamp, H., Kobe, C., Markova, J., Renner, C., Ho, A., Zijlstra, J., Kral, Z., Fuchs, M., Hallek, M., Kanz, L., Doehner, H., Doerken, B., Engel, N., Topp, M., Klutmann, S., et al., (2012), Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomized, open-label, phase 3 non-inferiority trial, *Lancet*, 379, 1791-1799.
24. Evangelou, K., Lougiakis, N., Rizou, S. V., Kotsinas, A., Kletsas, D., Munoz-Espin, D., Kastrinakis, N. G., Pouli, N., Marakos, P., Townsend, P., Serrano, M., Bartek, J., Gorgoulis, V. G. (2017), Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens, *Aging Cell*, 16, 192-197.
25. Ferme, C., Eghbali, H., Meerwaldt, J. H., Rieux, C., Bosq, J., Berger, F., Girinsky, T., Brice, P., van't Veer, M. B., Walewski, J. A., Lederlin, P., Tirelli, U., Carde, P., Van den Neste, E., Gyan, E., Monconduit, M., Divine, M., et al., (2007), Chemotherapy plus involved-field radiation in early-stage Hodgkin's disease, *N. Engl. J. Med.*, 357, 1916-1927.
26. Ferrarini, I., Rigo, A., Zamo, A., Vinante, F. (2019), Classical Hodgkin lymphoma cells may promote an IL-17-enriched microenvironment, *Leuk. Lymphoma*, 60 (14), 3395-3405.

27. Franceschi, C. and Campisi, J. (2014), Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 69 Suppl 1: S4-9.
28. Galanos, P., Vougas, K., Walter, D., Polyzos, A., Maya-Mendoza, A., Haagenzen, E. J., Kokkalis, A., Roumelioti, F. M., Gagos, S., Tzetis, M., Canovas, B., Igea, A., Ahuja, A. K., Zellweger, R., Havaki, S., Kanavakis, E., Kletsas, D., Roninson, I.B., Garbis, S. D., Lopes, M., Nebreda, A., Thanos, D., Blow, J.J., Townsend, P., Sorensen, C. S., Bartek, J., Gorgoulis, V. G. (2016), Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing, *Nat. Cell Biol.*, 18, 777-789.
29. Georgakopoulou, E. A., Tsimaratou, K., Evangelou, K., Fernandez Marcos, P. J., Zoumpourlis, V., Trougakos, I. P., Kletsas, D., Bartek, J., Serrano, M., Gorgoulis, V. G. (2013), Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stressed-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues, *Aging*, 5 (1), 37-50.
30. Gopas, J., Stern, E., Zurgil, U., Ozer, J., Ben-Ari, A, Shubinsky, G., Braiman, A., Sinay, R., Ezratty, J., Dronov, V., Balachandran, S., Benharroch, D., Livneh, E. (2016), Reed-Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma present features of cellular senescence, *Cell Death and Disease*, 7 (11), e2457.
31. Gordon, R. R. and Nelson, P. S. (2012), Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance, *Drug Resistance Updates*, 15, 123-131.
32. Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., Schmitt, C. A., Sedivy, J., Vougas, K., von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M., Demaria, M. (2019), Cellular Senescence: Defining a Path Forward, *Cell*, 179, 813-827.
33. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., Demaria, M. (2018), Hallmarks of Cellular Senescence, *Trends Cell Biol.*, 28, 436-453.
34. Ito, Y., Hoare, M., Narita, M. (2017), Spatial and Temporal Control of Senescence, *Trends Cell Biol.*, 27, 820-832.

35. Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L., Adams, P. D. (2013), Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence, *J. Cell Biol.*, 202, 129-143.
36. Jiwa, N.M., Kanavaros, P., De Bruin, P. C., van der Valk, P., Horstman, A., Vos, W., Mullink, H., Walboomers, J. M., Meijer, C. J. (1993), Presence of epstein-barr virus harbouring small and intermediate-sized cells in Hodgkin's disease. Is there a relationship with Reed-Sternberg cells?, *J. Pathol.*, 170 (2), 129-136.
37. Johnson, P., Federico, M., Kirkwood, A., Fossa, A., Berkahn, L., Carella, A., d'Amore, F., Enblad, G., Franceschetto, A., Fulham, M., Luminari, S., O'Doherty, M., Patrick, P., Roberts, T., Sidra, G., Stevens, L., Smith, P., Trotman, J., Viney, Z., Radford, J., Barrington, S. (2016), Adapted treatment guided by interim PET-CT scan in advanced Hodgkin's lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, 374, 2419-2429.
38. Jung, T., Bader, N., Grune, T. (2007), Lipofuscin: formation, distribution and metabolic consequences, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1119, 97-111.
39. Karpathiou, G., Babiuc, S. M., Camy, F., Ferrand, E., Papoudou-Bai, A., Dumollard, J. M., Cornillon, J., Peoc'h, M. (2021), Primary central nervous system lymphomas express immunohistochemical factors of autophagy, *Sci. Rep.*, 11 (1) 22295 15, 11 (1) 22021 15.
40. Kuilman, T. and Peeper, D. S. (2009), Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress, *Nat. Rev. Cancer*, 9, 81-94.
41. Li, T. and Chen, Z. J. (2018), The cGAS-Cgamp-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer, *J. Exp. Med.*, 215, 1287-1299.
42. McHugh, D. and Gil, J. (2018), Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues, *J. Cell Biol.*, 217, 65-77.
43. Moskowitz, A. J., Schoeder, H., Yahalom, J., McCall, S. J., Fox, S. Y., Gerecitano, J., Grewal, R., Hamlin, P. A., Horwitz, S., Kobos, R., Kumar, A., Matasar, M., Noy, A., Palomba, M. L., et al., (2015), PET-adapted sequential salvage therapy with brentuximab vedotin followed by augmented ifosfamide, carboplatin, and etoposide for patients with relapsed and

- refractory Hodgkin's lymphoma: a non-randomised, open-label, single-center, phase 2 study, *Lancet Oncol.*, 16, 284-292.
44. Moskowitz, C. H., Nademanee, A., Masszi, T., Agura, E., Holowiecki, J., Abidi, M. H., Chen, A. I., Stiff, P., Gianni, A. M., Carella, A., Osmanov, D., Bachanova, V., Sweetenham, J., Sureda, A., Huebner, D., Sievers, E. L., Chi, A., Larsen, E. K., Hunder, N. N., Walewski, J., AETHERA Study Group (2015), Brentuximab vedotin as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with Hodgkin's lymphoma at risk of relapse or progression (AETHERA): a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet*, 385, 1853-1862.
 45. Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marion, R. M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P. J., Munoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., Gomez-Lopez, G., De Martino, A., Blasco, M. A., Abad, M., Serrano, M. (2016), Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo, *Science*, 354, aaf4445.
 46. Munoz-Espin, D. and Serrano, M. (2014), Cellular senescence: from physiology to pathology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15 (7), 482-496.
 47. Myrianthopoulos, V., Evangelou, K., Vasileiou, P. V. S., Cooks, T., Vassilakopoulos, T. P., Pangalis, G. A., Kouloukoussa, M., Kittas, C., Georgakilas, A. G., Gorgoulis, V. G. (2019), Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy, *Pharmacology & Therapeutics*, 193, 31-49.
 48. Panico, L., Tenneriello, V., Ronconi, F., Lepore, M., Cantore, N., Dell'Angelo, A. C., Ferbo, L., Ferrara, F. (2015), High CD20+ background cells predict a favorable outcome in classical Hodgkin lymphoma and antagonize CD68+ macrophages, *Leuk. Lymphoma*, 56 (6), 1636-1642.
 49. Papoudou-Bai, A., Bai, M., Doukas, M., Stefanaki, K., Spyridonos, P., Karatzias, G., Barbouti, A., Galani, V., Kanavaros, P. (2012), Immunohistological characterization of thymic dendritic cells, *Vivo*, 26 (6), 985-992.
 50. Papoudou-Bai, A., Hatzimichael, E., Kyriazopoulou, L., Briasoulis, E., Kanavaros, P. (2015), Rare variants in the spectrum of human herpesvirus 8-Epstein-Barr virus-copositive lymphoproliferations, *Hum. Pathol.*, 46 (10), 1566-1571.

51. Piris, M. A., Medeiros, L. J., Chang, K. C. (2020), Hodgkin lymphoma: a review of pathological features and recent advances in pathogenesis, *Pathology*, 52 (1), 154-165.
52. Rimner, A., Lovie, S., Hsu, M., Chelius, M., Zhang, Z., Chau, K., Moskowitz, A. J., Matasar, M., Moskowitz, C. H., Yahalom, J. (2017), Accelerated Total Lymphoid Irradiation-containing Salvage Regimen for Patients With Refractory and Relapsed Hodgkin Lymphoma: 20 Years of Experience, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 97, 1066-1076.
53. Rodier, F., Campisi, J. (2011), Four faces of cellular senescence, *J. Cell Biol.*, 192(4), 547-556.
54. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., Narita, M. (2014), Cellular senescence and its effector programs, *Genes & Development*, 28, 99-114.
55. Schmitz, N., Pfistner, B., Sextro, M., Sieber, M., Carella, A. M., Haenel, M., Boissevain, F., Zschaber, R., Mueller, P., Kirchner, H., Lohri, A., Decker, S., Koch, B., Hasenclever, D., Goldstone, A. H., Diehl, V., German Hodgkin's Lymphoma Study Group (2002), Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: a randomized trial, *Lancet*, 359, 2065-2071.
56. Schosserer, M., Grillari, J., Breitenbach, M. (2017), The dual role of cellular senescence in developing tumors and their response to cancer therapy, *Frontiers in Oncology*, 7, 278.
57. Schulz, H., Rehwald, U., Morschhauser, F., Elter, T., Driessen, C., Ruediger, T., Borchmann, P., Schnell, R., Diehl, V., Engert, A., Reiser, M. (2008), Rituximab in relapsed lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: long-term results of a phase 2 trial by the German Hodgkin Lymphoma Study Group (GHSG), *Blood*, 111, 109-111.
58. Seliem, R., Ferry, J., Hasserjian, R., Harris, N., Zukerberg, L. (2011), Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL) with CD30-positive lymphocyte-predominant (LP) cells, *J Hematop.*, 4(3):175.
59. Specht, L., Yahalom, J., Illidge, T., Berthelsen, A. K., Constine, L. S., Eich, H. T., Girinsky, T., Hoppe, R. T., Mauch, P., Mikhaeel, N. G., Ng, A., ILROG (2014),

- Modern radiation therapy for Hodgkin lymphoma: field and dose guidelines from the International Lymphoma Radiation Oncology Group (ILROG), *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 89, 854-862.
60. Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S., Hara, E. (2017), Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2, *Nat. Commun.*, 8, 15729.
 61. Touati, M., Delage-Corre, M., Monteil, J., Abraham, J., Moreau, S., Remenieras, L., Gourin, M. P., Dmytruk, N., Olivrie, A., Turlure, P., Girault, S., Labrousse, F., Preux, P.-M., Jaccard, A., Bordessoule, D. (2015), CD68-positive tumor-associated macrophages predict unfavorable treatment outcomes in classical Hodgkin lymphoma in correlation with interim fluorodeoxyglucose positron emission tomography assessment, *Leuk.Lymphoma*, 56 (2), 332-341.
 62. Tower, J. (2015), Programmed cell death in aging, *Ageing Res Rev.*, 23, 90-100.
 63. Weniger, M. A., Kuppers, R. (2021), Molecular biology of Hodgkin lymphoma, *Leukemia*, 35 (4), 968-981.
 64. Ziegler, D. V., Wiley, C. D., Velarde, M. C. (2015), Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging, *Aging Cell*, 14(1), 1-7.