

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Σ. ΔΕΛΙΔΗΣ**

**ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ BCL-2 ΚΑΙ MDM2 ΤΟΥ  
ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ P53 ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ  
ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ WAF1 ΣΕ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟ ΜΕ ΤΟΝ  
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟ ΤΥΠΟ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟ ΚΑΙ ΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ  
ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΩΝ ΜΗ-HODGKIN ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ ΚΑΘΩΣ ΕΠΙΣΗΣ ΚΑΙ  
ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΙΟΥ EBV**

**ΜΑΡΙΑ Ν. ΤΖΑΡΔΗ  
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1999**

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Εισαγωγή

Τα λεμφώματα ορίζονται ως κακοήθεις νεοπλασίες του λεμφικού ιστού. Θεωρείται ότι προέρχονται από κακοήθη εξαλλαγή λεμφικών κυττάρων σε διάφορα στάδια λειτουργικής διαφοροποίησης.

Τα λεμφώματα διακρίνονται στη νόσο Hodgkin και στα μη- Hodgkin's λεμφώματα.

Η ταξινόμηση των μη- Hodgkin's λεμφωμάτων κατέχει σημαντική θέση στον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής και της κατανόησης των μηχανισμών παθογένεσης αυτών των νεοπλασιών.

Πολλές ταξινομήσεις έχουν προταθεί, αλλά τα τελευταία 10 χρόνια οι ταξινομήσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι η ταξινόμηση του Κιέλου (Ευρώπη) και η Διεθνής Συμβιβαστική Ταξινόμηση (ΗΠΑ) (1,2).

Οι ταξινομήσεις δεν είναι οριστικές αλλά εξελίσσονται λαμβάνοντας υπόψη τα κλινικά προγνωστικά δεδομένα και ενσωματώνοντας έννοιες των βασικών επιστημών (Ανοσολογίας και Μοριακής Βιολογίας).

Σε αυτά τα πλαίσια προτάθηκε σχετικά πρόσφατα η ταξινόμηση REAL (Revised European American Classification of Lymphomas) (3).

Μια ταξινόμηση, για να είναι χρήσιμη, πρέπει να πληρεί ορισμένες προϋποθέσεις:

- α.** Να βασίζεται σε ακριβή ιστολογικά και κυτταρολογικά κριτήρια για την κατάταξη και περιγραφή των οντοτήτων.
- β.** Να είναι αναπαραγώγιμη.
- γ.** Να έχει σημασία για τον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής και της πρόγνωσης.

Οι σημερινές ταξινομήσεις στηρίζονται στην συνεκτίμηση ιστολογικών και ανοσολογικών κριτηρίων (Κιέλου) ή στην αξιολόγηση μόνο ιστολογικών κριτηρίων ( Διεθνής Συμβιβαστική). Η ταξινόμηση REAL χρησιμοποιεί ιστολογικά και ανοσολογικά κριτήρια και εισάγει, όπου αυτό είναι δυνατόν, επίσης τα γονοτυπικά χαρακτηριστικά

Η ταξινόμηση του Κιέλου όπως και η REAL θεωρούνται πληρέστερες, διότι περιλαμβάνουν και ανοσολογικά κριτήρια χωρίς όμως αυτό να αναιρεί την αξία της Διεθνούς Συμβιβαστικής ταξινόμησης, κυρίως από άποψη ευκολίας στη κλινικομορφολογική προσέγγιση.

Τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη για τη ταξινόμηση των λεμφωμάτων είναι:

**α.** Ιστολογία (αρχιτεκτονική: οζώδης, διάχυτη ή μικτή ).

**β.** Κυτταρολογία ( μέγεθος κυττάρων, χαρακτήρες πυρήνα και πυρηνίσκων, χαρακτήρες κυτταροπλάσματος ).

**γ.** Ανοσοφαινότυπος ( έκφραση αντιγόνων B ή T διαφοροποίησης, έκφραση του αντιγόνου CD30 ).

**δ.** Ο γονότυπος ( ταξινόμηση REAL ).

Με βάση αυτά τα στοιχεία η ταξινόμηση του Κιέλου διαιρεί τα λεμφώματα κατ'αρχήν σε B και T ανάλογα με τον ανοσοφαινότυπο και κατόπιν σε χαμηλής και υψηλής κακοήθειας ανάλογα με την ιστολογική τους εικόνα.

Η κατάταξη των λεμφωμάτων σε υψηλής και χαμηλής κακοήθειας προέκυψε από τη συσχέτιση με τα κλινικά δεδομένα κυρίως σε B-λεμφώματα των λεμφαδένων.

Φαίνεται όμως ότι αυτή η κατάταξη μάλλον αντιπροσωπεύει την αυθόρμητη πορεία της νόσου αλλά ίσως όχι την εξέλιξή της με βάση τα δεδομένα της σύγχρονης θεραπευτικής αγωγής. Κατά συνέπεια για λόγους ακριβέστερης προσέγγισης θα ήταν σκόπιμο να θεωρούμε ότι οι όροι υψηλή / χαμηλή κακοήθεια αναφέρονται κατ'αρχήν στον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

Τα περισσότερα μέχρι τώρα διαθέσιμα δεδομένα για την συσχέτιση ιστολογίας-ανοσοφαινότυπου-πρόγνωσης προέκυψαν από μελέτες στα B-λεμφώματα τα οποία είναι πιο συχνά στο Δυτικό κόσμο (80% του συνόλου των λεμφωμάτων μη-Hodgkin) (1).

Τα δεδομένα για τον ρόλο της ιστολογικής ταξινόμησης επί της κλινικής πορείας των T-λεμφωμάτων δεν είναι ακόμη επαρκή και σαφή.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα T-λεμφώματα, ανεξάρτητα από την ιστολογική τους εικόνα, συμπεριφέρονται ως νεοπλάσματα υψηλής κακοήθειας(3).

Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι από τις αναλύσεις της επιθετικής συμπεριφοράς των T-λεμφωμάτων αποκλείονται τα

T-δερματικά λεμφώματα τα οποία παρουσιάζουν σαφείς κλινικές και βιολογικές ιδιαιτερότητες, οι οποίες τα διαχωρίζουν από τα T-λεμφώματα που εξορμώνται από τους λεμφαδένες ή από άλλα όργανα όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, οι πνεύμονες το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα κλπ.(1,3-6).

Αντίστοιχες σημαντικές διαφορές στη βιολογική συμπεριφορά ανευρίσκονται αν συγκριθούν τα λεμφαδενικά B-λεμφώματα με τα B-λεμφώματα που εξορμώνται από το λεμφικό ιστό των βλεννογόνων (MALT) και τα οποία εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σωλήνα, στους πνεύμονες, στο θυρεοειδή και τους σιελογόνους αδένες(1,3-6).

Τα παραπάνω στοιχεία δείχνουν μία εγγενή αδυναμία των υπαρχουσών ταξινομήσεων οι οποίες δεν λαμβάνουν υπόψη την πρωτοπαθή εστία του λεμφώματος (αν είναι δηλαδή λεμφαδενικό ή εξωλεμφαδενικό) αλλά στηρίζονται κυρίως σε δεδομένα που προκύπτουν από την ανάλυση των λεμφαδενικών λεμφωμάτων.

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν να λαμβάνεται υπόψη και η πρωτοπαθής εστία του λεμφώματος(αν είναι δηλαδή λεμφαδενικό ή εξωλεμφαδενικό) (3).

Πράγματι οι νέες μελέτες αναβαθμίζοντας την έννοια της πρωτοπαθούς εντόπισης του λεμφώματος επέτρεψαν την εξέλιξη της γνώσης για τους μηχανισμούς παθογένεσης και τη βιολογική συμπεριφορά τους ανάλογα με την πρωτοπαθή εντόπιση(3-6).

Η κλασική αντίληψη της ταξινόμησης του Κιέλου θεωρεί ότι τα λεμφώματα είναι νεοπλασματικά ισοδύναμα φυσιολογικών κυτταρικών πληθυσμών του λεμφικού ιστού.

Κατά συνέπεια οι διάφοροι ιστολογικοί τύποι των λεμφωμάτων αντιπροσωπεύουν νεοπλασματικά ισοδύναμα αντίστοιχων φάσεων της φυσιολογικής διαφοροποίησης των B ή T-λεμφοκυττάρων.

Με την εισαγωγή της έννοιας του ιστο-ειδικού εποικισμού των λεμφοκυττάρων (homing),φαινόμενο το οποίο εξαρτάται από ιστο-ειδικά μόρια προσκόλλησης των λεμφοκυττάρων που, αναγνωρίζουν αντίστοιχα

μόρια προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων λεμφικών οργάνων(7-10),φαίνεται τώρα ότι τα λεμφώματα αποτελούν νεοπλασματικά ισοδύναμα ανακυκλοφορούντων ιστο-ειδικών λειτουργικών υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων μετά την επαφή τους με το αντιγόνο ( 4,5,11).

Αυτή η έννοια επιβεβαιώνεται από τις παρατηρήσεις ότι λεμφώματα με την ίδια μορφολογία αλλά με διαφορετική πρωτοπαθή εντόπιση (π.χ. λεμφαδένες,MALT, δέρμα κλπ.) παρουσιάζουν διαφορές στη κλινική συμπεριφορά, στην έκφραση ογκοπρωτεϊνών και στην παρουσία ορισμένων ογκογόνων ιών (π.χ.EBV,HTLV-1) (3-6).

Τα πρωτοπαθή αναπλαστικά CD30 θετικά T-δερματικά λεμφώματα, εκφράζουν το μόριο προσκόλλησης CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen), έχουν καλή πρόγνωση και υπάρχουν ενδείξεις ότι λίγα είναι θετικά για τον ιό HTLV-1(4-6).

Αντίθετα τα λεμφαδενικά αναπλαστικά CD30 θετικά T-λεμφώματα είναι αρνητικά για το μόριο προσκόλλησης CLA, εκφράζουν το μόριο προσκόλλησης L-selectin (11), έχουν επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά και λίγα από αυτά είναι θετικά για τον ιό EBV(4,6).

Επιπλέον υπάρχουν διαφορές ως προς την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την έκφραση ογκοπρωτεϊνών μεταξύ εξωλεμφαδενικών B-λεμφωμάτων και αντιστοίχου ιστολογικού τύπου B-λεμφαδενικών λεμφωμάτων (12,13).

Η χρωμοσωμική διαμετάθεση t(14:18) που ενεργοποιεί το ογκογονίδιο Bcl-2 ανευρίσκεται στο 40% των λεμφαδενικών B-λεμφωμάτων (12).

Αντίστοιχα ευρήματα αναφέρονται ως προς την έκφραση της Bcl-2 ογκοπρωτεΐνης στις παραπάνω κατηγορίες λεμφωμάτων (13).

Σε αντίθεση, το ογκογονίδιο c-myc παρουσιάζει γονιδιακούς ανασυνδυασμούς σε 35% των εξωλεμφαδενικών B-λεμφωμάτων από μεγάλα κύτταρα ενώ το 5% των αντιστοίχων λεμφαδενικών παρουσιάζει γονιδιακούς ανασυνδυασμούς του c-myc (12).

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται σκόπιμο να συμπεριλαμβάνεται σε μελλοντικές ταξινομήσεις λεμφωμάτων και η πρωτοπαθής εντόπιση (primary site of origin). Στα πλαίσια αυτής της λογικής έχουν προταθεί ταξινομήσεις των πρωτοπαθών γαστρεντερικών λεμφωμάτων και των πρωτοπαθών λεμφωμάτων του δέρματος (14,15).

Εκτός από την σημασία της πρωτοπαθούς εντόπισης για τις μελλοντικές ταξινομήσεις των λεμφωμάτων, ευρήματα της Μοριακής Βιολογίας είναι ενδεικτικά της σημασίας ορισμένων μοριακών βλαβών, οι οποίες συνδέονται με ενεργοποίηση ογκογονιδίων και που φαίνεται τουλάχιστον προς το παρόν να χαρακτηρίζουν ειδικές νοσολογικές οντότητες. Για παράδειγμα η διαμετάθεση t( 14:18) που ενεργοποιεί το ογκογονίδιο Bcl-2 ανευρίσκεται στο 60%-80% των οζωδών B-λεμφωμάτων(κεντροβλαστικών / κεντροκυτταρικών ),η διαμετάθεση t( 8:14) που ενεργοποιεί το ογκογονίδιο c-myc ανευρίσκεται σχεδόν σε όλα τα λεμφώματα Burkitt,και η διαμετάθεση t( 11:14) που ενεργοποιεί το γονίδιο της κυκλίνης D1(PRAD1)ανευρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό των B-λεμφοκυττάρων του μανδύα (κεντροκυτταρικά).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 ενέχεται στους μηχανισμούς παθογένεσης ορισμένων τύπων λεμφωμάτων. Η p53 πρωτεΐνη οδηγεί σε αδρανοποίηση της λειτουργίας του ως ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Μεταλλάξεις του p53 γονιδίου έχουν ανευρεθεί σε λεμφώματα Burkitt, B-ΧΛΛ και υψηλής κακοήθειας B και T λεμφώματα (17,18).

Εκτός από τις μεταλλάξεις, αδρανοποίηση της λειτουργίας της p53 πρωτεΐνης μπορεί να προέλθει μέσω σύνδεσης με κυτταρικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες ιών (16).

Εχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη του ογκογονιδίου mdm-2 μπορεί μέσω σύνδεσης με την πρωτεΐνη p53 να οδηγήσει σε αδρανοποίηση της τελευταίας (19).

Πρόσφατα αναφέρθηκε συνέκφραση των πρωτεϊνών mdm-2 και p53 σε μικρή σειρά non-Hodgkin's λεμφωμάτων (20).

Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στη σχέση του ιού EBV με τις κακοήθεις λεμφικές νεοπλασίες(3,6).

Ο ιός EBV είχε συσχετισθεί με το λέμφωμα Burkitt αλλά τα τελευταία χρόνια βρέθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα σε ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων νόσου Hodgkin (40-50%) και σε ένα μικρότερο ποσοστό σε μη- Hodgkin λεμφώματα, κυρίως T-φαινοτύπου(10-30%) (3,6).Ιδιαίτερα έντονη (80-90%)ήταν η συσχέτιση μεταξύ EBV και T/NK λεμφωμάτων της ρινικής κοιλότητας(21,22,23).

Επιπλέον βρέθηκε ότι ο ιός EBV τροποποιεί ή επηρεάζει την έκφραση ογκοπρωτεϊνών,μορίων προσκόλλησης και μορίων ενεργοποίησης με

αποτέλεσμα να αλλάζει τη φυσιολογία του κυττάρου και μέσω αυτού του μηχανισμού να συμμετέχει άμεσα ή έμμεσα στη παθογένεση των λεμφικών νεοπλασιών (6,23,24).

### **Σκοπός της εργασίας**

Μέχρι σήμερα δεν έχουν γίνει μελέτες που να συνδυάζουν την ανοσοϊστοχημική έκφραση των γονιδίων BCL-2, mdm-2, p53, p21 και την παρουσία του ιού EBV με βασικές ιστοπαθολογικές ( ιστολογικός τύπος, βαθμός κακοήθειας, πρωτοπαθής εντόπιση) και ανοσοφαινοτυπικές παραμέτρους( B ή T-κυτταρική προέλευση ) των λεμφωμάτων.

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την ανάλυση της συσχέτισης πρωτεϊνών ογκογονιδίων (BCL-2, mdm-2), ογκοκατασταλτικών γονιδίων (p53), της επαγόμενης από τον φυσικό τύπο του p53, πρωτεΐνης p21/waf-1 καθώς και του ιού EBV με τις βασικές ιστοπαθολογικές (ιστολογικός τύπος, βαθμός κακοήθειας, πρωτοπαθής εντόπιση) και ανοσοφαινοτυπικές (B ή T-κυτταρική προέλευση) παραμέτρους των λεμφωμάτων.

Ο απώτερος στόχος είναι η συνεισφορά στην επεξεργασία μιας συνθετικής μορφολογικής-φαινοτυπικής-μοριακής ταξινόμησης των λεμφωμάτων.

### **Βιβλιογραφία γενικής εισαγωγής**

1. Histopathology of non-Hodgkin's lymphoma Lennet K.,Feller A.C.Springer Verlag: Berlin 1992.
2. Working formulation, Cancer 49:2112, 1982.
3. Real classification. Blood 84, 1361, 1994.
4. Stein H et al. Ann. Oncol. 2: 108, 1991.
5. De Bruin PC et al. Histopathology 23: 127, 1993.
6. Herbst H et al. Critical Reviews in Oncogenesis 4: 191, 1993.
7. Pals S et al. Immunol. Rev. Innunol. 108: 5,1989.
8. Picker LJ et al. Annu Rev.Innunol. 10: 561, 1992.
9. Picker LJ et al. Eur.J.Innunol. 24: 1269,1994.
10. Springer TA. Cell 76:301,1994.
11. Pals S et al Leukemia. 5:628,1991.

12. Raghoebier S et al. Blood 78: 2680,1991.
13. Viluendas R. et al. Am.J.Path 139:989,1991.
14. Isaacson PG.,Norton AJ. Extranodal lymphomas Churchill Livingston 1994.
15. Willemze R. et al.Histopathology 24:405,1994.
16. Lane DP.Nature 358:15,1992.
17. Levine AJ.N.Engl.J.Med.326:1350,1992.
18. Imamura J. et.al Blood 84:2412,1994.
19. Momand J. et al. Cell 69:1237,1992.
20. Martinez et al. J.Pathol.177:27,1995.
21. Kanavaros et.al. Blood 81:2688,1993.
22. Kanavaros et.al. J.Pathol. 178:279,1996.
23. Kanavaros et.al.Leuk. Lymphoma 18:27,1995.
24. Kanavaros et al. Hum.Pathol.24:725,1993.



## ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΙΕΛΟΥ 1988 ( με προσθήκη οντοτήτων της REAL ταξινόμησης)

Πριν γίνει η ανάλυση των πρωτεϊνών των γονιδίων που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία, παρατίθεται συνοπτική περιγραφή των οντοτήτων της ταξινόμησης του Κιέλου με πρόσθεση αυτών της REAL ταξινόμησης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των λεμφωμάτων. (1-21)

### A) Β-ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ

#### 1) ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΧΑΜΗΛΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ

##### α) Λεμφοκυτταρικό λέμφωμα (Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία)

Από κλινική άποψη: Στις περισσότερες περιπτώσεις συνδυάζεται με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.

Παρουσιάζεται με σύνδρομο πολυαδενοπάθειας, μερικές φορές σπληνομεγαλία και διήθηση του μυελού των οστών στις περισσότερες περιπτώσεις.

Ιστολογικά, αποτελείται από ένα μονόμορφο νεοπλασματικό πληθυσμό μικρών λεμφοκυττάρων με ομαλό πυρήνα και λίγο κυτταρόπλασμα. Παρατηρούνται επίσης μερικά μεγάλα κύτταρα, συχνά συγκεντρωμένα σε ομάδες(ονομάζονται κέντρα πολλαπλασιασμού). Η παρουσία πολλών τέτοιων κυττάρων, των οποίων η πλειοψηφία χαρακτηρίζεται μορφολογικά ως ανοσοβλάστες

θέτει την υποψία μετασχηματισμού του λεμφοκυτταρικού λέμφωματος σε ανοσοβλαστικό λέμφωμα ή σε λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα(σύνδρομο Richter).

Αυτός ο μετασχηματισμός συμβαίνει στο 10% των περιπτώσεων.

Φαινότυπος μεμβράνης: IgM +(ασθενής), IgD+/- (ασθενής), CD20+, CD5+, CD19+, CD23+, CD10-, CD25-.

Γονότυπος: ένα ποσοστό B-ΧΛΛ παρουσιάζει τρισωμία 12.

##### β) Ανοσοκύττωμα: Λεμφοπλασματοκυτταροειδές/Λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα

Από κλινική άποψη: παρατηρείται λεμφοαδενοπάθεια (λιγότερο συχνά από το λεμφοκυτταρικό λέμφωμα), συχνή διήθηση του μυελού των οστών και συχνά μονοτυπική IgM στο ορό του αίματος (το λεμφοπλασματοκυτταρικό λέμφωμα

θεωρείται ότι αντιστοιχεί στην νόσο του WALDENSTROM).

Ιστολογικά: το λέμφωμα αποτελείται από λεμφοκύτταρα, λεμφοπλασματοκύτταρα και πλασματοκύτταρα.

Υπάρχουν επίσης 10-15% ανοσοβλαστικά κύτταρα.

Όταν το ποσοστό ανοσοβλαστών υπερβαίνει το 15-20% υπάρχει τάση μετασχηματισμού προς λέμφωμα επιθετικότερης βιολογικής συμπεριφοράς.

Φαινότυπος: IgM/k (στο κυτταρόπλασμα των λεμφοπλασματοκυττάρων και των πλασματοκυττάρων). Ο φαινότυπος μεμβράνης είναι IgM +(συχνά)/k, CD19+, CD20+, στα λεμφοκύτταρα του νεοπλασματικού πληθυσμού.

### **γ) Κεντροβλαστικά-Κεντροκυτταρικά Λεμφώματα**

Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες αντιπροσωπεύουν το 35% του συνόλου των λεμφωμάτων.

Παρατηρούνται κυρίως σε άτομα ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών.

Από κλινική άποψη, το 50% των περιπτώσεων αυτών των λεμφωμάτων παρουσιάζονται με πολυεστιακή (συχνά και εξωλεμφαδενική) αντιστοιχούσα στο στάδιο IV.

Ιστολογικά, διακρίνουμε 3 τύπους: τον θυλακιώδη ή οζώδη, τον διάχυτο και τον μικτό(θυλακιώδη και διάχυτο). Κυτταρολογικά το λέμφωμα αποτελείται από κεντροβλάστες και κεντροκύτταρα σε διάφορες αναλογίες.

Αυτό το ποσοστό των κεντροβλαστών υπερβαίνει το 30% του συνόλου των νεοπλασματικών κυττάρων, αυξάνοντας την πιθανότητα μετασχηματισμού του κεντροβλαστικού/κεντροκυτταρικού λεμφώματος σε κεντροβλαστικό λέμφωμα (υψηλής κακοήθειας). Αυτός ο μετασχηματισμός συμβαίνει στο 10-20% των περιπτώσεων.

Φαινότυπος: Συνήθως IgM και IgG στη μεμβράνη των νεοπλασματικών κυττάρων(σπάνια IgA ή IgD), CD5-, CD10+. Επίσης CD43- και CD20+.

Η ανεύρεση μιας μονοτυπικής (κ ή λ) συνιστά σημαντικό στοιχείο που ευνοεί τη διάγνωση λεμφώματος σε περιπτώσεις όπου οφείλουμε να διαφοροδιαγνώσουμε ένα θυλακιώδες λέμφωμα από μια αντιδραστική υπερπλασία των λεμφικών θυλακίων.

Γονότυπος: Παρουσιάζει t(14:18) με αναδιατάξεις του γονιδίου bcl-2 σε 75-90% των περιπτώσεων.

### **δ) Κεντροκυτταρικό ( Λέμφωμα κυττάρων μανδύα )**

Παρουσιάζει μια χαρακτηριστική ιστολογική εικόνα. Πρόκειται για ένα νεοπλασματικό πληθυσμό λεμφικών κυττάρων μικρού μεγέθους με ομαλό ή ανώμαλο πυρήνα που αναπτύσσονται με μορφή μανδύα γύρω από φυσιολογικά, υπερτροφικά ή ατροφικά λεμφικά θυλάκια.

Ο φαινότυπος αυτού του λεμφώματος είναι CD5+, CD10-, CD20+ , IgM+, IgD+, CD43+, CD23-. Εκτός από την οζώδη παραλλαγή υπάρχει και η διάχυτη μορφή όπου δεν αναγνωρίζονται πλέον τα υπόλοιπα των φυσιολογικών λεμφοζιδίων. Γονότυπος παρουσιάζει t(11:14) με αναδιάταξη και υπερέκφραση του γονιδίου bcl-2 στις περισσότερες περιπτώσεις.

### **ε) Λέμφωμα από κύτταρα μεθοριακής ζώνης**

Εντοπίζεται κυρίως στο σπλήνα και στο βλεννογονοεξαρτώμενο λεμφικό ιστό (MALT: Mucosa Associated Lymphoid tissue) του γαστρεντερικού σωλήνα, του θυρεοειδούς και των σιελογόνων αδένων. Στους λεμφαδένες είναι πιο σπάνιο και συχνά περιγράφεται ως μονοκυτταροειδές λέμφωμα.

Ιστολογία: Παρατηρούνται μικρά λεμφοκύτταρα, κεντροκυτταροειδή κύτταρα και μονοκυτταροειδή κύτταρα. Στον λεμφικό ιστό MALT παρουσιάζει χαρακτηριστικές λεμφοεπιθηλιακές βλάβες.

Η διήθηση μπορεί να είναι διάχυτη, περιθυλακιώδης ή και θυλακιώδης λόγω εποικισμού θυλακίων.

Περιγράφεται ένα ποσοστό 10-15% βλαστικών κυττάρων. Όταν αυτά αυξάνονται πάνω από 20% υπάρχει τάση μετάπτωσης σε λέμφωμα υψηλής κακοήθειας.

Φαινότυπος: CD5-, CD10-, CD23-, CD20+, θετικότητα για μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες και CD43-/+.

## **2) ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΥΨΗΛΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ**

### **α. Κεντροβλαστικό λέμφωμα**

Από κλινική άποψη στα 30-50% των περιπτώσεων η νόσος βρίσκεται σε στάδιο I ή II τη στιγμή της διάγνωσης.

Διήθηση του μυελού των οστών παρατηρείται σε 10-30% των περιπτώσεων.

Ιστολογικά διακρίνουμε 4 τύπους:

- 1) Μονόμορφο κεντροβλαστικό: αποτελείται κυρίως από κεντροβλάστες.

- 2) Πολύμορφο κεντροβλαστικό: αποτελείται από κλασικούς κεντροβλάστες, κεντροκυτταρικούς και πολυλοβώδεις κεντροβλάστες και ανοσοβλάστες.
- 3) Κεντροκυτταροειδές κεντροβλαστικό.
- 4) Πολυλοβώδες κεντροβλαστικό.

Φαινότυπος μεμβράνης: IgM/k ή IgM/λ. Πολύ σπάνια παρατηρούμε κυτταροπλασματικές ανασοσφαιρίνες. Τα CD19 και CD20 αντιγόνα εκφράζονται σε 80-90% των περιπτώσεων και το CD10 σε 10% των περιπτώσεων.

### **β) Ανοσοβλαστικό λέμφωμα**

Από κλινική άποψη: Στο 30-40% των περιπτώσεων η νόσος βρίσκεται σε στάδιο I ή II τη στιγμή της διάγνωσης(όπως και το κεντροβλαστικό λέμφωμα).

Ιστολογικά: διακρίνουμε 3 τύπους:

- 1) Ανοσοβλαστικό χωρίς πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση, αποτελούμενο κυρίως από ανοσοβλάστες
- 2) Ανοσοβλαστικό με πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση, αποτελούμενο από ανοσοβλάστες πλασμαβλάστες και μερικά πλασματόκυτταρα.
- 3) Ανοσοβλαστικό με έντονη διήθηση από μικρά αντιδραστικά λεμφοκύτταρα.

Φαινότυπος: Κυρίως IgM/k ή IgM/λ στη μεμβράνη των νεοπλασματικών κυττάρων (50-60% των περιπτώσεων).Επίσης CD20+ στις περισσότερες περιπτώσεις. Στο ανοσοβλαστικό με πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση μπορούμε να παρατηρήσουμε συχνά κυτταροπλασματικές ανασοσφαιρίνες κυρίως στους πλασμαβλάστες.

### **γ) Λέμφωμα Burkitt**

Περιγράφονται δύο τύποι:

- Ενδημικός (Αφρικής) στον οποίο ανευρίσκεται ο ιός του EBV 90-100% των περιπτώσεων.
- Σποραδικός (Δυτικές χώρες) όπου ο ιός του EBV ανευρίσκεται σε 10-15% των περιπτώσεων.

Από κλινική άποψη: Ο ενδημικός τύπος εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά 5-10 ετών, εντοπίζεται κυρίως στη περιοχή ΩΡΛ ενώ ο δυτικός τύπος εμφανίζεται κυρίως σε εφήβους νέους και ενήλικες 10-20 ετών και εντοπίζεται κυρίως στη κοιλιακή χώρα.

Ιστολογικά: Σχετικά μονόμορφος νεοπλασματικός πληθυσμός από μεσαίου μεγέθους κύτταρα με εμφανείς πυρηνίσκους, πολλές μιτώσεις, εικόνα «έναστρου ουρανού».

Φαινότυπος: CD10+,CD5-, θετικότητα για μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες IgM και CD20.

Γονότυπος: παρατηρούνται t (8:14) και t (8:22) με αναδιάταξη του γονιδίου c-myc.

**δ) Αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα Ki-1 (CD30) θετικά** (βλέπε T-Λεμφώματα).

## **B) T-ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ**

Διακρίνονται σε **λεμφοβλαστικά** και **περιφερικά**

**α) Λεμφοβλαστικό λέμφωμα**: θεωρείται ότι προέρχεται από θυμικά T-λεμφοκύτταρα.

Από κλινική άποψη: Εμφανίζεται στη παιδική ηλικία και νέους ενήλικες ως μάζα μεσοθωρακίου (>70% των περιπτώσεων).

Ιστολογικά: Μονόμορφος νεοπλασματικός πληθυσμός από μεσαίου μεγέθους κύτταρα χωρίς εμφανείς πυρηνίσκους και πολλές μιτώσεις.

Φαινότυπος: CD+(>80% των περιπτώσεων),CD4+/CD8+ή CD4-/CD8- και παρουσία άλλων T-αντιγόνων (CD2,CD3,CD5,CD7).

**β) Τα περιφερικά T-λεμφώματα** που θα περιγραφούν αντιστοιχούν σε ένα ετερογενές κλινικά και μορφολογικά σύνολο λεμφωμάτων που παρουσιάζουν λεμφαδενική και συχνά εξω-λεμφαδενική εντόπιση (κυρίως στο δέρμα, αλλά χωρίς επιδερμοτροπισμό).Η συχνότητα τους στις δυτικές χώρες δεν φαίνεται να υπερβαίνει το 15%. Η κατανομή τους κατά φύλο είναι άνδρας/γυναίκα=2/1.

Τα περιφερικά T-λεμφώματα θεωρούνται ότι προέρχονται από τα μεταθυμικά T-λεμφοκύτταρα και αναγνωρίζονται με βάση ανοσοϊστοχημικά κριτήρια:

Ιστολογικό κριτήριο: απουσία ιστολογικών χαρακτηριστικών λεμφοβλαστικού

λεμφώματος.

Ανοσοϊστοχημικό κριτήριο: απουσία του αντιγόνου CD1(αντιγόνο των κυττάρων Τ της φλοιώδους ζώνης του θύμου) και παρουσία ενός ή περισσότερων αντιγόνων Τ διαφοροποίησης( CD3,CD2,CD5,CD7,CD4,CD8).

Από τον ορισμό των περιφερικών Τ-λεμφωμάτων αποκλείονται οι παρακάτω, κλινικά οντότητες:

- α) Σπογγοειδής μυκητίαση και σύνδρομο Sézary. Πρόκειται για Τ-δερματικό λέμφωμα από CD4+/CD8- λεμφοκύτταρα με χαρακτηριστικό επιδερμοτροπισμό και χαρακτηριστικό εγκεφαλοειδή πυρήνα στις περισσότερες περιπτώσεις.
- β) Λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο των μεγάλων κοκκιωδών λεμφοκυττάρων (Large granular lymphocyte proliferation).
- γ) Η Τ λευχαιμία /λέμφωμα που αναπτύσσεται σε άτομα μολυσμένα από τον ιό HTLV-1(παρουσιάζεται στην Ιαπωνία).

#### **Γενικά κλινικά χαρακτηριστικά**

α) Στο 70-80% των περιπτώσεων τα περιφερικά Τ-λεμφώματα παρουσιάζονται με πολυεστιακή εντόπιση (στάδιο 4) τη στιγμή της διάγνωσης.

β) Σε περιορισμένες περιπτώσεις το κύριο χαρακτηριστικό της κλινικής εικόνας είναι η συχνή ταυτόχρονη λεμφαδενική και εξω-λεμφαδενική εντόπιση (δέρμα 50%,μυελός των οστών 10-30%, ήπαρ 10-50%, πνεύμονες 10-20%,πεπτικό 5-10%,ρινοφάρυγγας 2-5%).

γ) Η διήθηση του μυελού των οστών μπορεί να είναι μαζική ή διακριτική οπότε δύσκολα ανιχνεύεται κατά την ιστολογική εξέταση. Σε αυτό το σημείο η συνεισφορά της ανοσοϊστοχημείας μπορεί να είναι σημαντική (αποκάλυψη ενός «ανώμαλου» Τ-φαινοτύπου δηλαδή απουσία ενός ή περισσότερων αντιγόνων Τ-διαφοροποίησης όπως CD3,CD5, CD2, CD7, TCRαβ).

#### **Αναλυτική περιγραφή**

Θα περιγραφούν συνοπτικά τα βασικά κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των περιφερικών Τ-λεμφωμάτων.

## **1. ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΧΑΜΗΛΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ**

### **1<sup>α</sup>) Λεμφοκυτταρικό λέμφωμα (πολύ σπάνιο)**

Από κλινική άποψη: πολυλεμφαδενοπάθεια, και συνδυασμός με χρόνια λεμφογενή λευχαιμία τύπου T.

Ιστολογικά: αποτελείται από μικρά λεμφοκύτταρα με ανώμαλο πυρήνα. Συχνά συνοδεύεται από υπερπλασία των φλεβιδίων που παρουσιάζουν υπερτροφικά ενδοθηλιακά κύτταρα.

Ο φαινότυπος: είναι συνήθως CD3+, CD4+, CD8-.

### **1<sup>β</sup>) Λεμφοεπιθηλιοειδές λέμφωμα (λέμφωμα Lennert)**

Από κλινική άποψη: Πολυλεμφαδενοπάθεια, προσβολή των αμυγδαλών, συχνή προσβολή του μυελού των οστών,σπάνια προσβολή δέρματος.

Ιστολογικά αποτελείται από:

- μικρά λεμφοκύτταρα με στρογγυλό ή ελαφρά ανώμαλο πυρήνα και λίγο κυτταρόπλασμα.
- μερικά μετρίου ή μεγάλου μεγέθους λεμφικά κύτταρα (κυρίως ανοσοβλάστες)
- επιθηλιοειδή κύτταρα είτε μεμονωμένα είτε οργανωμένα σε ομάδες
- μερικά ηωσινόφιλα και πλασματοκύτταρα
- Reed Sternberg ή Hodgkin's κύτταρα απουσιάζουν αλλά μερικές φορές αναγνωρίζονται σε πολύ μικρό αριθμό (μέχρι 2).

Περισσότερα από δύο τέτοια κύτταρα ευνοούν τη διάγνωση της νόσου Hodgkin's (μικτού τύπου με μεγάλο αριθμό επιθηλιοειδών κυττάρων).

Ο φαινότυπος του λεμφοεπιθηλιοειδούς λεμφώματος είναι CD3+,CD4+,CD8-.

### **1<sup>γ</sup>) T-λεμφώματα τύπου Αγγειοανοσοβλαστικής λεμφαδενοπάθειας (AILD)**

Οι βλάβες με ιστολογικά χαρακτηριστικά αυτού του τύπου είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί ως ανώμαλες αντιδράσεις του ανοσολογικού συστήματος, αλλά συστηματικές γονοτυπικές μελέτες έδειξαν ότι η σημαντική πλειοψηφία από αυτές είναι T-λεμφώματα.

Από κλινική άποψη: πολυλεμφαδενοπάθεια, πυρετός,ηπατοσπλενομεγαλία, δερματικές βλάβες, υπεργαμμασφαιριναιμία, αιμολυτική αναιμία (Coombs θετική)

Ιστολογικά χαρακτηρίζονται από:

- μικρού και μεσαίου μεγέθους λεμφικά κύτταρα με ανώμαλο πυρήνα και λίγο, συχνά διαυγές κυτταρόπλασμα.
  - μερικά μεγάλα λεμφικά κύτταρα και T-ανοσοβλάστες.
  - ομάδες από B-ανοσοβλάστες και πλασματοκύτταρα.
  - επιθηλιοειδή κύτταρα
  - έντονη υπερπλασία των φλεβιδίων με υπερτροφικά ενδοθηλιακά κύτταρα (μερικές φορές τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι επίπεδα). Τα χαρακτηριστικά αυτής της υπερπλασίας των φλεβιδίων είναι η έντονη διακλάδωση τους και η πάχυνση της βασικής μεμβράνης λόγω εναπόθεσης υαλίνης ουσίας PAS+.
- Ο φαινότυπος της AILD-T λεμφώματος είναι CD3+, CD4+, CD8+/-.

Διαφορική διάγνωση: Σε ορισμένες περιπτώσεις, κυρίως όταν οι πυρηνικές και κυτταροπλασματικές ατυπίες είναι σπάνιες, η διάκριση μεταξύ μιας AILD,

T- λεμφώματος και μιας λεμφαδενοπάθειας οφειλομένης κυρίως σε λήψη φαρμάκων, μπορεί να είναι δύσκολη. Επίσης διαφορική διάγνωση οφείλει να γίνει και με μερικές βλάβες τύπου λεμφαδενοπάθειας που παρατηρούνται σε αυτοάνοσες νόσους, με λέμφωμα Lennert και νόσο Hodgkin πλούσια σε επιθηλιοειδή κύτταρα. Εξέλιξη: 10-25% των AILD εξελίσσονται σε ανοσοβλαστικό λέμφωμα.

### **1<sup>δ</sup>) Λέμφωμα των T-ζωνών (πολύ σπάνιο)**

Από κλινική άποψη: χαρακτηρίζεται από έκπτωση της γενικής φυσικής κατάστασης, πυρετό και συχνή πνευμονική προσβολή.

Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από:

- Πολλαπλασιασμό των συστατικών των T-ζωνών του λεμφαδένα (μικρά και μεσαίου μεγέθους T-λεμφοκύτταρα με ανώμαλο πυρήνα, τα οποία συνοδεύονται από μερικά μεγάλα βλαστικά κύτταρα και υπερπλασία των φλεβιδίων με υπερτροφικά ενδοθηλιακά κύτταρα).
- Διατήρηση, ή και υποπλασία των B-ζωνών του λεμφαδένα (λεμφικά θυλάκια)

Φαινότυπος: Οι υπερπλαστικές T-ζώνες αυτών των λεμφωμάτων χαρακτηρίζονται από κύτταρα CD3+, CD4+, CD8+.

### **1<sup>ε</sup>) Πολύμορφο από μικρά κύτταρα (πολύ σπάνιο)**

Χαρακτηρίζεται ιστολογικά από ένα διάχυτο, πληθυσμό μικρού και μεσαίου μεγέθους λεμφικών κυττάρων με πυρηνικές ανωμαλίες.



Μεγάλου μεγέθους λεμφικά κύτταρα είναι απόντα ή σπάνια (σε αντίθεση με το λέμφωμα των Τ-ζωνών όπου αυτά τα κύτταρα είναι πιο συχνά.

Ο φαινότυπος είναι CD3+, CD4+, CD8-.

## **2)ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΥΨΗΛΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ**

### **2<sup>α</sup>) Πολύμορφο από μεσαία και μεγάλα κύτταρα**

Αποτελείται από μεσαίου και μεγάλου μεγέθους λεμφικά κύτταρα με έντονες πυρηνικές ανωμαλίες. Σε αυτόν τον τύπο ανήκει και η Τ-λευχαιμία/λέμφωμα που αναπτύσσεται σε έδαφος μόλυνσης από τον ιό HTLV-1.

### **2<sup>β</sup>) Ανοσοβλαστικό λέμφωμα ( Το συχνότερο περιφερικό Τ-λέμφωμα )**

Χαρακτηρίζεται από ομοιόμορφα μεγάλα κύτταρα με μεγάλο (10-12μm), στρογγυλό ή ωοειδή πυρήνα που περιέχει 1-2 μεγάλους ευδιάκριτους πυρηνίσκους. Το κυτταρόπλασμα είναι άφθονο. Ο φαινότυπος είναι συνήθως CD3+, CD4+,CD8-. Από κλινική άποψη οι κατηγορίες 2<sup>α</sup> και 2<sup>β</sup> χαρακτηρίζονται από συχνή εξωλεμφαδενική εντόπιση (30-40% των περιπτώσεων). Στο 30-40% των περιπτώσεων η νόσος βρίσκεται σε στάδιο I ή II τη στιγμή της διάγνωσης. Διήθηση του μυελού των οστών παρατηρείται σε 10-30% των περιπτώσεων.

### **2<sup>γ</sup>) Λέμφωμα από μεγάλα αναπλαστικά κύτταρα.**

Αυτό το λέμφωμα περιγράφηκε το 1982 χάρη στην χρησιμοποίηση του αντισώματος Ki-1/CD30, το οποίο αναγνωρίζει ένα αντιγόνο παρόν στα ενεργοποιημένα Β και Τ λεμφοκύτταρα. Περιγράφονται δύο τύποι, ο πρώτος με συστηματική προσβολή λεμφαδένων ή/ και εξωλεμφαδενικών εστιών και ο δεύτερος με παρουσία μόνο δερματικής εντόπισης κατά την εμφάνιση της νόσου.

Χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολύ μεγάλων νεοπλασματικών κυττάρων με άφθονο, ελαφρά ή μέτρια βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Συχνά παρατηρούνται πολλά γιγαντοκύτταρα και κύτταρα που μοιάζουν με Reed-Sternberg κύτταρα.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα διατάσσονται συχνά σε συμπαγείς δοκίδες, ή διακριτά οζίδια, γεγονός που μπορεί να δημιουργήσει σύγχυση με μεταστατικό καρκίνωμα ή μελάνωμα.

Επιπλέον τα κύτταρα του αναπλαστικού λεμφώματος διηθούν τις ζώνες T και τα κολποειδή των λεμφαδένων και μπορεί να συνοδεύονται από μακροφάγα. Αυτά τα χαρακτηριστικά θέτουν το πρόβλημα της διαφορικής διάγνωσης με την κακοήγη ιστοκυττάρωση. Επίσης η διαφορική διάγνωση οφείλει να γίνει και από τη νόσο Hodgkin's τύπου IV.

Ο φαινότυπος του αναπλαστικού λεμφώματος είναι συνήθως T:CD3+/-,CD2+/-, CD30+/- Ki-1+,CD25+, HLA-DR+,EMA+/-,LCA-/+ και CD15-/+ . Μερικές φορές (σπάνια) παρατηρείται B-φαινότυπος ή συχνότερα απουσία δεικτών T ή B διαφοροποίησης. Το λέμφωμα από μεγάλα αναπλαστικά κύτταρα φαίνεται, παρά την επιθετική ιστολογική εικόνα, να έχει καλύτερη πρόγνωση από τα υπόλοιπα περιφερικά T-λεμφώματα.

Γονότυπος: Σε ένα ποσοστό αναφέρεται η t(2:5) η οποία οδηγεί στη συγχώνευση του γονιδίου της νουκλεοφωσμίνης( NPM) με το γονίδιο (ALK) του αναπλαστικού λεμφώματος.

### 3) Ειδικές κατηγορίες περιφερικών T-λεμφωμάτων

#### 3<sup>α</sup>) Ηπατοσπληνικά Τγδ Λεμφώματα

Πρόκειται για μια οντότητα που περιγράφηκε πρόσφατα και έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

Κλινικά : Ηπατοσπληνομεγαλία χωρίς περιφερική ή εν τω βάθει λεμφαδενοπάθεια (συνήθως).

Ιστολογικά: Διήθηση των κολποειδών του ήπατος, του σπληνός και του μυελού των οστών από λεμφικά κύτταρα μεσαίου μεγέθους με σχετικά ομαλό πυρήνα που παρουσιάζουν φαινότυπο: CD3+,BF1+, TCRδ-1+,δTCS1+/-,CD2+,CD5-CD4-, CD8-,CD56+/-.

#### 3<sup>β</sup>) T-λεμφώματα του εντέρου (Enteropathy-associated T cell lymphoma)

Πρόκειται για υψηλής κακοήθειας T-λέμφωμα που εντοπίζεται κυρίως στο λεπτό έντερο και σε αρκετές περιπτώσεις συνδυάζεται με προηγούμενο ιστορικό κοιλιοκάκης τύπου ενηλίκων. Ο φαινότυπος είναι CD3+, CD4-, CD8+/- και CD103+(HML-1).

### 3<sup>Υ</sup>) Λεμφωματώδης κοκκιωμάτωση και πολύμορφη δικτύωση

Αυτές οι νοσολογικές οντότητες αναφέρθηκαν συχνά ως προ-λεμφωματώδεις καταστάσεις και παρουσιάζουν ένα ιδιαίτερο τροπισμό στο αναπνευστικό σύστημα.

Ιστολογικά, ορίζεται με βάση την παρουσία ενός πολύμορφου κοκκιώματος (λεμφοκύτταρα, ιστιοκύτταρα, ηωσινόφιλα πολυμορφοπύρρηνα)

που συνδυάζεται με περιοχές νέκρωσης και βλάβες τύπου αγγειίτιδας οφειλόμενες στη διήθηση των αγγείων από λεμφικά κύτταρα. Πρόσφατες ανοσοϊστοχημικές και γονοτυπικές μελέτες έδειξαν ότι η εν λόγω βλάβη είναι εξαρχής στις περισσότερες περιπτώσεις πολύμορφης δικτύωσης ένα NK-λέμφωμα ( εντόπιση κυρίως στη ρινική κοιλότητα), ενώ σε αρκετές περιπτώσεις λεμφωματώδους κοκκιωμάτωσης είναι T-λέμφωμα ( κυρίως πνευμονική εντόπιση)

αν και πρόσφατα παρουσιάστηκαν ενδείξεις ότι ένα ποσοστό αυτών των βλαβών είναι B-λέμφωμα.

### 4) ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΛΕΜΦΩΜΑΤΩΝ

- **Ανοσοϊστοχημεία σε τομές κατεψυγμένου ιστού**

Από τη στιγμή που η ιστολογική και ανοσοϊστοχημική διάγνωση του λεμφώματος τεθεί, το επόμενο βήμα θα είναι η τυποποίηση του λεμφώματος δηλαδή το αν παρουσιάζει B ή T φαινότυπο.

Για αυτή την τυποποίηση χρησιμοποιούμε σε τομές κατεψυγμένου ιστού τα παρακάτω αντισώματα:

**α)** T- διαφοροποίησης: αντι-CD1, CD2, CD3, CD5, CD7, CD4, CD8.

**β)** B- διαφοροποίησης: αντι-CD19, CD22 και αντισώματα για την αναγνώριση των ανοσοσφαιρινών της κυτταρικής μεμβράνης των B-λεμφωμάτων (αντι-slg).

Για τη διάγνωση B-λεμφώματος απαιτείται θετικότητα για slg ή κυτταροπλασματικές Ig ή ενός των CD19, CD20, CD22 και αρνητικότητα για

T-δείκτες CD1, CD2, CD3, CD7, CD4, CD8. Ο δείκτης CD5 είναι θετικός στις B-ΧΛΛ και λέμφωμα του μανδύα.

Για τη διάγνωση ενός περιφερικού T-λεμφώματος απαιτείται ο παρακάτω συνδυασμός φαινοτυπικών χαρακτηριστικών:

1Αρνητική αντίδραση του λεμφώματος για όλα τα αντισώματα B-διαφοροποίησης

2Θετική αντίδραση του λεμφώματος για ένα ή περισσότερα αντισώματα T-διαφοροποίησης (CD2,CD3,CD5,CD7,CD8) και αρνητική αντίδραση για το T-αντιγόνο του θύμου CD1.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων παρατηρούμε ότι τα περιφερικά T-λεμφώματα παρουσιάζουν «ανώμαλο» T-φαινότυπο σε σχέση με εκείνο των μη νεοπλασματικών αντιδραστικών T-λεμφοκυτταρικών πληθυσμών. Αυτός ο «ανώματος» φαινότυπος συνίσταται στην απουσία ενός ή περισσότερων αντιγόνων T-διαφοροποίησης (CD3,CD2,CD5,CD7) ή στην παρουσία ενός φαινότυπου CD4+/CD8+ ή CD4-/CD8-.

Σε αντίθεση με τους νεοπλασματικούς, οι αντιδραστικοί T-πληθυσμοί είναι θετικοί για όλα τα T-αντιγόνα (CD2,CD3,CD5,CD7,CD4,CD8) εκτός από μερικές περιπτώσεις όπου το CD7 δεν εκφράζεται σε 10-30% των μη νεοπλασματικών T-λεμφοκυττάρων.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να τονισθούν ότι η παρουσία ενός «ανώμαλου» T-φαινοτύπου αποτελεί πολύ χρήσιμο στοιχείο διαφορικής διάγνωσης μεταξύ περιφερικού T-λεμφώματος και αντιδραστικής υπερπλασίας μη νεοπλασματικών T-λεμφοκυττάρων.

Πρόσφατα παρασκευάστηκαν αντισώματα που αναγνωρίζουν τους υποδοχείς αβ και γδ των λεμφοκυττάρων T.Αυτά τα αντισώματα μας επιτρέπουν την τυποποίηση των περιφερικών T-λεμφωμάτων ανάλογα με την έκφραση των υποδοχέων αβ και γδ. Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα μελέτες φαίνεται ότι η πλειοψηφία των περιφερικών T-λεμφωμάτων (79-80%) εκφράζουν τον υποδοχέα αβ ενώ πολύ λίγες περιπτώσεις εκφράζουν τον υποδοχέα γδ. Επιπλέον, 10-20% των περιπτώσεων δεν εκφράζουν τους υποδοχείς αβ ή γδ, και ονομάζονται TRC silent T-λεμφώματα. Επίσης πρόσφατα παρασκευάστηκαν αντισώματα που αναγνωρίζουν το μοριακό σύμπλεγμα CD79A/CD79B το οποίο βρίσκεται, συνδεδεμένο με τα μόρια των Ig στη μεμβράνη των B-λεμφοκυττάρων. Αυτά τα αντισώματα είναι ειδικά για B-λεμφώματα.

- **Ανοστοϊστοχημεία σε τομές παραφίνης**

Τελευταία παρασκευάσθηκε μια σειρά από μονοκλωνικά αντισώματα που επιτρέπουν την αναγνώριση των B και T-λεμφοκυττάρων σε τομές παραφίνης.

Αυτά τα αντισώματα αναγνωρίζουν αντιγόνα των Β και Τ-λεμφοκυττάρων που δεν καταστρέφονται κατά τη διαδικασία μονιμοποίησης του ιστού. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιΤ-αντισώματα είναι τα CD3 και CD45RO (UCHL-1) και τα αντι-B είναι τα L26/CD20 4KB5/CD45RA και MB-1/CD79α.

### **Βιβλιογραφία ταξινομήσεων**

1. Histopathology of non-Hodgkin's lymphoma Lennert K., Feller A.C. Springer Verlag: Berlin 1992.
2. Working formulation. Cancer 49:2112, 1982.
3. Stein H et al. Ann. Oncol. 2:108, 1991.
4. De Bruin PC et al. Histopathology 23:127, 1993.
5. Noorduyt LA et al. Histopathology 21:59, 1992.
6. Herbst H et al. Critical Reviews in Oncogenesis 4:191, 1993.
7. Pals S et al. Immunol. Rev. 108:5, 1989.
8. Picker LJ et al. Annu Rev. Immunol. 10:561, 1992.
9. Picker LJ et al. Eur. Rev. Immunol. 24:1269, 1994.
10. Springer TA. Cell 76:301, 1994.
  11. Pals S et al. Leucemia 5:628, 1991.
  12. Raghoebier S et al. Blood 78:2680, 1991.
  13. Villuendas R et al. Am. J. Path. 139: 989, 1991.
  14. Isaacson PG., Norton AJ., Extranodal lymphomas Churchill Livingstone 1994.
  15. Willemze R et al. Histopathology 24:405, 1994.
  16. Gaulard P et al. Am. J. Pathology 137:617, 1990.
  17. Kanavaros P et al. J. Clin. Investigation 87:666, 1991.
  18. Gaulard P et al. Cancer 62:705, 1998.
  19. Kanavaros P et al. Blood 81:2688, 1993.
  20. Sabourin JC. et al. Am. J. Surg. Pathology 17:995, 1993.
  21. Lipford EH et al. Blood 72:1674, 1988.

## ΕΞΩΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ

### ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ (1-12)

Επειδή, όπως αναφέρθηκε πριν, τα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες, είναι σκόπιμο να περιγραφούν συνοπτικά τα κύρια χαρακτηριστικά τους.

#### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως πρωτοπαθή λεμφώματα του γαστρεντερικού (γ/ε) σωλήνα ορίζονται εκείνα τα λεμφώματα που παρουσιάζονται με κύρια ή αποκλειστική εντόπιση στο γαστρεντερικό σωλήνα και με αρχικές εκδηλώσεις προερχόμενες από τον γ/ε σωλήνα, χωρίς περιφερική λεμφαδενοπάθεια.

Μέχρι την εμφάνιση της έννοιας MALT (βλεννογονοεξαρτώμενος λεμφικός ιστός- mucosa associated lymphoid tissue), η οποία προτάθηκε από τους Issacson και Wright,(1) τα λεμφώματα του γ/ε σωλήνα ταξινομούντο σύμφωνα με την ταξινόμηση του Κιέλου και την Διεθνή Συμβιβαστική Ταξινόμηση.

Οι Issacson και συν. (1) πρότειναν μια κατ' αρχή ειδική ταξινόμηση των λεμφωμάτων του γ/ε σωλήνα η οποία περιλαμβάνει την έννοια λέμφωμα MALT. Τα πρωτοπαθή λεμφώματα του γ/ε σωλήνα παρουσιάζουν στη μεγάλη τους πλειοψηφία φαινότυπο Β-λεμφοκυττάρων ενώ τα Τ-λεμφώματα είναι πολύ σπάνια.

Γενικότερα μπορούν να διακριθούν τα πρωτοπαθή λεμφώματα του γ/ε σωλήνα σε 2 κατηγορίες:

- α) Τα λεμφώματα «δυτικού» τύπου που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μονήρους ή πολλαπλών νεοπλασματικών μαζών μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται μη νεοπλασματικός ιστός.
- β) Τα λεμφώματα «μεσογειακού» τύπου ή Ανοσοϋπερπλαστική νόσος λεπτού εντέρου (Immunoproliferative Small Intestinal Disease ) IPSID τα οποία χαρακτηρίζονται από μία διάχυτη προσβολή, κυρίως του λεπτού εντέρου, από τα

νεοπλασματικά κύτταρα.

## 2. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΝΤΟΠΙΣΗ

Τα πρωτοπαθή λεμφώματα αντιπροσωπεύουν ένα μικρό ποσοστό των πρωτοπαθών κακοήθων νεοπλασμάτων του γ/ε σωλήνα ( στο στομάχι 3%,στο λεπτό έντερο 12-18% και στο παχύ έντερο 0,5-1%).

Όσον αφορά στην κατανομή τους στον γ/ε σωλήνα, 53% των πρωτοπαθών λεμφωμάτων ανευρίσκονται στο στομάχι,29% στο ανώτερο λεπτό έντερο,7% στην περιοχή του ειλεού και του ανιόντος κόλου και 11% στο υπόλοιπο του παχέος εντέρου.

Πολυεστιακές εντοπίσεις( συμπεριλαμβανομένης και της λεμφωματώδους πολυποδιάσεως) παρατηρούνται στο 10-20% των περιπτώσεων.

Τα λεμφώματα «δυτικού» τύπου παρατηρούνται συχνότερα μετά το 40<sup>ο</sup> έτος, ενώ εκείνα του «μεσογειακού» τύπου κυρίως πριν το 35<sup>ο</sup> έτος.

Η επιδημιολογική σχέση άνδρας/γυναίκα είναι 1.6/1.

Η κλινική συμπτωματολογία εξαρτάται από την εντόπιση και το βαθμό προσβολής του γ/ε από το λέμφωμα. Τα πιο συχνά συμπτώματα είναι ανορεξία, απώλεια βάρους, κοιλιακοί πόνοι, ναυτία, έμετοι, διάρροια, αιμορραγία. Πιθανές επιπλοκές όπως απόφραξη ή διάτρηση του γ/ε σωλήνα αποτελούν σε μερικές περιπτώσεις τα πρώτα συμπτώματα.

Τα «μεσογειακά» λεμφώματα παρουσιάζονται συχνότερα με σύνδρομο δυσαπορρόφησης.

Η διάγνωση του λεμφώματος τίθεται με βιοψία του γ/ε σωλήνα, ή με παθολογοανατομική εξέταση παρασκευασμάτων χειρουργικής εκτομής.

## 3. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

### 3.1 Η έννοια του βλεννογονοεξαρτώμενου λεμφικού ιστού (MALT)

Η έννοια MALT (mucosa associated lymphoid tissue), γνωστή εδώ και αρκετά χρόνια, αναπτύχθηκε ιδιαίτερα από τους Issacson και Wright στο ανοσολογικό πλαίσιο των λεμφωμάτων MALT του γ/ε σωλήνα, του θυρεοειδούς, του πνεύμονα

και των σιελογόνων αδένων.

Το φυσιολογικό MALT του γ/ε σωλήνα περιλαμβάνει **α)** τις πλάκες Peyer στο ειλέο **β)** τα πλασματοκύτταρα, τα B και T λεμφοκύτταρα του χορίου **γ)** τα ενδοεπιθηλιακά T λεμφοκύτταρα και **δ)** τα μακροφάγα.

**α)** Οι πλάκες Peyer στον ειλέο αποτελούνται από τα λεμφικά θυλάκια (βλαστικό κέντρο και λεμφοκύτταρα του μανδύα) και από την παραθυλακιώδη ζώνη η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία των κεντροκυτταροειδών (centrocyte-like) κυττάρων. Η ζώνη αυτή καλύπτει τα λεμφικά θυλάκια και φθάνει μέχρι το υπερκείμενο επιθήλιο. Σύμφωνα με τις μελέτες των Spencer και Isaacson τα κύτταρα B της παραθυλακιώδους ζώνης παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο (IgM+ή IgA+, IgD-, CD5-, CD22+, CD23-) από εκείνα του βλαστικού κέντρου και του μανδύα και θεωρούνται ως ο κυτταρικός πληθυσμός από τον οποίο αναπτύσσονται τα B-λεμψώματα MALT του γ/ε σωλήνα. Το επιθήλιο που υπέρκειται της παραθυλακιώδους ζώνης περιέχει τα επιθηλιακά κύτταρα M τα οποία διακρίνονται από τα γειτονικά απορροφητικά επιθηλιακά κύτταρα διότι παρουσιάζουν στο Η.Μ μικρές και ανώμαλες μικρολάχνες και άφθονα σωματίδια πινοκύττωσης. Αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό να φιλοξενούν λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και μακροφάγα στις πτυχές της κυτταρικής τους μεμβράνης. Φαίνεται ότι τα κύτταρα M αποτελούν τον προνομιακό χώρο απορρόφησης και μεταφοράς διαφόρων αντιγονικών ουσιών, βακτηριδίων και ιών. Αυτοί οι αντιγονικοί παράγοντες παρουσιάζονται κατόπιν στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

**β)** Όσον αφορά στα λεμφικά κύτταρα του στρώματος του βλεννογόνου διακρίνουμε:

- 1) Τα B-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν στη μεμβράνη τους κυρίως IgM ανοσοσφαιρίνες.
- 2) Τα πλασματοκύτταρα που εκφράζουν στην πλειοψηφία τους (80%) και σε αντίθεση με εκείνα των άλλων ιστών, κυτταροπλασματικές IgA ανοσοσφαιρίνες.
- 3) Τα T-λεμφοκύτταρα, που είναι κυρίως CD4+.

**γ)** Τα ενδοεπιθηλιακά T-λεμφοκύτταρα, σε αντίθεση με εκείνα του στρώματος, εκφράζουν κυρίως το αντιγόνο CD8 και 20-40% αυτών των κυττάρων περιέχει αζουρόφιλα ενδοκυτταροπλασματικά κοκκία πλούσια σε θειούχους βλεννοπολυσακχαρίτες. Ένα τμήμα των ενδοεπιθηλιακών T-λεμφοκυττάρων



(5-20%) εκφράζει τον φαινότυπο CD3-,CD4-,CD8-,CD7+ και θεωρείται ότι δεν εξαρτάται από τον θύμο, διότι ανευρίσκεται σε ποντίκια που υπέστησαν θυμεκτομή. Τα ενδοεπιθηλιακά T-λεμφοκύτταρα δεν εκφράζουν αντιγόνα ενεργοποίησης (HLA-DR, CD25) ούτε αντιγόνα σχετιζόμενα με τα NK (Natural Killer cells) κύτταρα.

Αυτό το τελευταίο χαρακτηριστικό επιτρέπει την διάκριση εκείνων των T-ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων, που περιέχουν αζουρόφιλα κυτταροπλασματικά κοκκία από τα μεγάλα κοκκιώδη κύτταρα (Large granular lymphocytes) του περιφερικού αίματος τα οποία εκφράζουν δείκτες NK κύτταρων (CD56,CD57).Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα T-ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα εκφράζουν ένα ειδικό μεμβρανικό αντιγόνο που αναγνωρίζεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα HML-1(CD103), το οποίο δίνει επίσης θετική αντίδραση με T-ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα των βρόγχων, του θυρεοειδούς και της επιδερμίδας.

## 3.2 Β-ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ MALT

### 3.2.1 Λεμφώματα «δυτικού» τύπου

Στην ιστολογική εικόνα των Β-λεμφωμάτων MALT του γ/ε σωλήνα (όπως και εκείνων του θυρεοειδούς, των σιελογόνων αδένων και του πνεύμονα) παρατηρούνται 3 στοιχεία :

**α)** Τα κεντροκυτταροειδή (centrocyte-like) κύτταρα τα οποία σχηματίζουν την παθολογική εικόνα του λεμφώματος MALT τη λεμφοεπιθηλιακή βλάβη. Βλαστικές μορφές των centrocyte-like κυττάρων ανευρίσκονται σε όλες τις περιπτώσεις αυτών των λεμφωμάτων αλλά σπάνια σχηματίζουν λεμφοεπιθηλιακές βλάβες. **β)** Τα αντιδραστικά λεμφικά θυλάκια. **γ)** Τα πλασματοκύτταρα που εκφράζουν μερικές φορές μονοτυπική κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και χαρακτηρίζονται ως νεοπλασματικός πληθυσμός.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι τα νεοπλασματικά κεντροκυτταροειδή centrocyte-like κύτταρα εκφράζουν μονοτυπική μεμβρανική ή κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Λεπτομερέστερες έρευνες χρησιμοποιώντας τα μονοκλωνικά αντι-B αντισώματα L26/CD20 και CD45RA έδειξαν ότι τα κεντροκυτταροειδή κύτταρα εκφράζουν

B-φαινότυπο. Οι βλαστικές μορφές των κεντροκυτταροειδών centrocyte-like κυττάρων είναι θετικές για τα παραπάνω αντισώματα. Η αντιδραστική, μη νεοπλασματική φύση των λεμφικών θυλακίων αποδεικνύεται μέσω της πολυτυπικής τους αντίδρασης με τα αντισώματα αντι-ανοσφαιρίνης.

Με τη χρήση του αντι-CD35 που αναγνωρίζει τα δενδριτικά δικτυωτά κύτταρα των λεμφικών θυλακίων μπορούμε να αναγνωρίσουμε διάφορα στάδια διήθησης αυτών των θυλακίων από τα νεοπλαστικά κεντροκυτταροειδή centrocyte-like cells.

Σε πρακτικό επίπεδο η σημασία της έννοιας B-λέμφωμα MALT του γ/ε σωλήνα εντοπίζεται σε 3 σημεία:

**1)** Στη δυνατότητα να θέσουμε τη διάγνωση του λεμφώματος με βάση ιστολογικά δεδομένα (την λεμφοεπιθηλιακή βλάβη) σε ορισμένες περιπτώσεις λεμφοκυτταρικών διηθήσεων που προηγουμένως είχαν προσδιορισθεί ως ψευδολεμφώματα. Αυτός ο τελευταίος όρος τείνει να εγκαταλειφθεί.

**2)** Στη καλύτερη πρόγνωση αυτών των λεμφωμάτων σε σχέση με τους αντίστοιχους ιστολογικούς τύπους που συναντώνται στα λεμφώματα των λεμφαδένων.

**3)** Στη πιθανότητα να χρησιμοποιηθούν λιγότερο επιθετικά θεραπευτικά σχήματα λόγω του γεγονότος ότι συχνά τα λεμφώματα MALT παραμένουν εντοπισμένα στην πρωτοπαθή εστία και μερικές φορές στους επιχώριους λεμφαδένες. Εν τούτοις η θεραπευτική αντιμετώπιση των λεμφωμάτων MALT του γ/ε σωλήνα παραμένει ακόμα αντικείμενο συζητήσεων και διαφωνιών. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι πρόσφατες ενδείξεις συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι το *Helicobacter pylori* συμμετέχει στη παθογένεση των γαστρικών MALT λεμφωμάτων.

### **Προγνωστικοί παράγοντες**

**A)** Σταδιοποίηση.

**B)** Ιστολογικός τύπος σύμφωνα με τις ταξινομήσεις του Κιέλου, την Διεθνή Συμβιβαστική και την πρόταση ταξινόμησης των γ/ε λεμφωμάτων Issacson et al 1988.

**Γ)** Ο βαθμός προσβολής του τοιχώματος του γ/ε σωλήνα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ η σταδιοποίηση των γ/ε λεμφωμάτων εμφανίζεται ως προγνωστικός παράγοντας σε όλες τις μελέτες, ορισμένες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ ιστολογικού τύπου και πρόγνωσης.

### 3.2.2 Μεσογειακό λέμφωμα (Ανοσοϋπερπλαστική Νόσος Λεπτού Εντέρου)

Αυτός ο τύπος παρουσιάζεται σε νεαρούς ενήλικες των χωρών της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής και συνήθως συνδυάζεται με σύνδρομο δυσαπορροφήσεως το οποίο εμφανίζεται αρκετό καιρό πριν από το λέμφωμα.

Το Μεσογειακό λέμφωμα εντοπίζεται κυρίως στη νήσιδα και τα 2/3 των περιπτώσεων χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας «ανώμαλης» α-βαρείας αλυσίδας (α1-heavy chain immunoglobulin) στον ορό του αίματος, στα ούρα και στα εξωκρινή εκκρίματα του γ/ε σωλήνα. Εν τούτοις μορφές της νόσου που δεν εμφανίζουν την παραπάνω παρουσία περιγράφονται στο 1/3 των περιπτώσεων. Ιστολογικά: το στρώμα του βλεννογόνου παρουσιάζει πλασματοκυτταρική διήθηση σε τμήμα ή και ενίοτε καθ' όλο το μήκος του λεπτού εντέρου, χωρίς παρεμβολή περιοχών μη προσβεβλημένων από νεοπλασματικά κύτταρα.

Σε πιο προχωρημένα στάδια παρατηρούνται προσβολή του υποβλεννογόνου, αντιδραστικά λεμφικά θυλάκια και κεντροκυτταροειδή κύτταρα τα οποία προκαλούν λεμφοεπιθηλιακές βλάβες. Όταν κατά την εξέλιξη της νόσου σχηματίζονται μάζες από νεοπλασματικό ιστό και προσβάλλονται οι μεσεντέριοι λεμφαδένες, παρατηρούνται μικτές διηθήσεις αποτελούμενες από πλασματοκύτταρα, ανοσοβλάστες, κύτταρα των βλαστικών κέντρων (κεντροβλάστες, κεντροκύτταρα) και κεντροκυτταροειδή (centrocyte-like)

κύτταρα. Τελικά σε αρκετές περιπτώσεις η νόσος μετατρέπεται σε ανοσοβλαστικό λέμφωμα.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες επιτρέπουν την αναγνώριση πλασματοκυττάρων τα οποία περιέχουν α1-βαρεία αλυσίδα. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν ανευρίσκονται μέσω ανοσοϊστοχημείας, ελαφριές αλυσίδες αλλά σε μερικά περιστατικά αναγνωρίστηκε μονοτυπική κυτταροπλασματική ελαφριά αλυσίδα επιβεβαιώνοντας με αυτό τον τρόπο την νεοπλασματική φύση των πλασματοκυττάρων.

### 3.2.3. Λεμφωματούδης πολυποδίαση

Είναι ένας ιδιαίτερος τύπος λεμφώματος, ο οποίος σχηματίζει πολύποδες στο λεπτό και παχύ έντερο. Αργότερα οι Issacson και συν. (1) έδειξαν ότι το λέμφωμα αυτό αντιστοιχεί μορφολογικά στα κεντροκυτταρικού τύπου λεμφώματα και έχει Β-φαινότυπο. Ως γνωστό τα κεντροκυτταρικά λεμφώματα (που τώρα ονομάζονται λεμφώματα από κύτταρα μανδύα λεμφοζιδίου) αναπτύσσονται σε περιφερικούς λεμφαδένες και παρουσιάζουν σπανίως εντόπιση στον γ/ε σωλήνα.

Από την άλλη πλευρά η λεμφωματώδης πολυποδίαση αναπτύσσεται πρωτοπαθώς στη περιοχή του ειλεού και του τυφλού.

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα γνωστά λεμφώματα MALT του γ/ε συστήματος ή λεμφωματώδης πολυποδίαση παρουσιάζει πολύ συχνά και σε πρώιμα στάδια της νόσου, εντοπίσεις εκτός του γ/ε συστήματος (περιφερικοί λεμφαδένες, μυελός των οστών).

Ιστολογικά το νεόπλασμα αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από κεντροκύτταρα. Μερικά μεγάλα λεμφικά κύτταρα (βλάστες) με ανώμαλο πυρήνα και ευδιάκριτο πυρηνίσκο διακρίνονται επίσης μεταξύ των κεντροκυτταρών. Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους τύπους των MALT λεμφωμάτων του γ/ε σωλήνα,

η λεμφωματώδης πολυποδίαση δεν παρουσιάζει λεμφοεπιθηλιακές βλάβες.

Τα κεντροκύτταρα του κεντροκυτταρικού λεμφώματος και της λεμφωματώδους πολυποδίασης παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο από εκείνα του βλαστικού κέντρου και τα κεντροκυτταροειδή centrocyte-like κύτταρα.

Πιο συγκεκριμένα, ο φαινότυπος των κεντροκυττάρων της λεμφωματώδους πολυποδίασης είναι IgM+, IgD+, C3b+, CD5+ και φαίνεται να αντιστοιχεί σύμφωνα με τους Isaacson, Norton (1) σε ένα πληθυσμό λεμφοκυττάρων που προέρχεται από τα κύτταρα του μανδύα των δευτερογενών λεμφοζιδίων.

### **3.3. Πρωτοπαθή Τ-λεμφώματα MALT του γαστρεντερικού σωλήνα**

Τα πρωτοπαθή Τ-λεμφώματα του γ/ε σωλήνα (ΠΤΛ-ΓΣ) είναι πολύ σπάνια νεοπλασμάτα. Τα περισσότερα από αυτά εντοπίζονται στο λεπτό έντερο, ενώ οι εντοπίσεις στα υπόλοιπα τμήματα του γ/ε σωλήνα είναι σπανιότητες. Ένα τμήμα από τα πρωτοπαθή Τ-λεμφώματα του εντέρου είχε περιγραφεί ως κακοήθης ιστοκυττάρωση του εντέρου (Issacson et Wright 1983). Το 1987 οι ίδιοι συγγραφείς

μέσω τεχνικών Μοριακής Βιολογίας έδειξαν ότι οι περιπτώσεις που περιγράφηκαν ως κακοήθης ιστοκυττάρωση είναι Τ-λεμφώματα διότι παρουσιάζουν μονοκλωνικές αναδιατάξεις (clonal rearrangements) των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση της β-αλυσίδας του μεμβρανικού υποδοχέα των λεμφοκυττάρων Τ (TCR). Τα πρωτοπαθή Τ-λεμφώματα του εντέρου παρουσιάζονται σε ασθενείς ηλικίας 50-70 ετών και ένα μέρος από αυτά εμφανίζεται στο έδαφος ενός συνήθως μακροχρόνιου ιστορικού κοιλιοκάκης. Πρόκειται κυρίως για κοιλιοκάκη τύπου ενηλίκων αλλά ορισμένες περιπτώσεις κοιλιοκάκης παιδικού τύπου αναφέρθηκαν επίσης στη βιβλιογραφία.

Εκτός από τα ΠΤΛ που αναπτύσσονται στο έδαφος προηγούμενης ιστολογικά διαγνωσμένης κοιλιοκάκης, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μερικά από αυτά τα λεμφώματα συνδέονται με μια μορφή εντεροπάθειας που ιστολογικά και κλινικά δεν διακρίνεται από την κοιλιοκάκη αλλά σε βιολογικό επίπεδο δεν ανευρίσκονται αντισώματα αντι-β-γλοιαδίνης που ενοχοποιούνται στην παθογένεση της κοιλιοκάκης.

Με βάση αυτά τα δεδομένα θεωρείται ότι ασθενείς αυτής της κατηγορίας ΠΤΛ του εντέρου δεν πάσχουν από κοιλιοκάκη αλλά από κάποια ανεπάρκεια των Τ-λεμφοκυττάρων που προκαλεί σύνδρομο δυσαπορρόφησης. Αυτή η κατηγορία ΠΤΛ-ΓΣ ονομάστηκε Εντεροπάθεια συνδυαζομένη με Τ-λέμφωμα «Enteropathy associated T-cell lymphoma».

Ιστολογικά, τα πρωτοπαθή Τ-λεμφώματα αποτελούνται από μεγάλα κύτταρα με άφθονο κυτταρόπλασμα και ανωμάλου σχήματος μεγάλους πυρήνες που περιέχουν ευδιάκριτους πυρηνίσκους. Σε μερικές περιπτώσεις αναγνωρίζονται νεοπλασματικά κύτταρα που μοιάζουν με ανοσοβλάστες. Αρκετές φορές παρατηρούνται γιγαντοκύτταρα μερικά εκ των οποίων παρουσιάζουν ερυθροφαγοκυττάρωση. Στο 50% των περιπτώσεων παρατηρούνται ενδοεπιθηλιακά νεοπλασματικά κύτταρα. Συχνά ανευρίσκεται μια φλεγμονώδης διήθηση αποτελούμενη από μικρά λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και ηωσινόφιλα, η οποία μπορεί να είναι τόσο έντονη ώστε να μην επιτρέπει την αναγνώριση των νεοπλασματικών κυττάρων. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε κατεψυγμένο ιστό δείχνουν ότι τα μεγάλα νεοπλασματικά κύτταρα εκφράζουν επιφανειακά αντιγόνα Τ-λεμφοκυτταρικής διαφοροποίησης (CD2,CD3,CD5,CD7). Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες του

Issacson, σε περιπτώσεις πρωτοπαθών T-λεμφωμάτων του εντέρου βρέθηκε ένας πληθυσμός T-ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων ο οποίος, όπως ακριβώς και τα νεοπλασματικά T-κύτταρα, δεν εξέφραζε τα αντιγόνα επιφανείας CD4 και CD8. Κατά συνέπεια σύμφωνα με τον Issacson αυτός ο πληθυσμός θα μπορούσε να δώσει γένεση τουλάχιστον σε ένα τμήμα των πρωτοπαθών T-λεμφωμάτων του εντέρου.

Πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιώντας το αντίσωμα HML1(CD103) το οποίο αναγνωρίζει το σύνολο των φυσιολογικών T-ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων, έδειξαν ότι σχεδόν όλα τα πρωτοπαθή T-λεμφώματα του εντέρου αντιδρούν θετικά με αυτό το αντίσωμα, προσφέροντας έτσι ένα ισχυρό επιχείρημα στην άποψη ότι αυτά τα λεμφώματα προέρχονται από τα T-ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα.

#### **4. Η συνεισφορά της Μοριακής Βιολογίας και της Κυτταρογενετικής (4-9)**

Παρακάτω αναφέρονται επιγραμματικά μερικά βασικά ερευνητικά προγράμματα που εφαρμόστηκαν στα λεμφώματα του γαστρεντερικού σωλήνα.

**4.1.** Η μελέτη του γονιδίου *bcl-2*, το οποίο παρουσιάζει γενετικές αναδιατάξεις στο 75-90% των θυλακιωδών B-λεμφωμάτων MALT. Οι ανασυνδυασμοί του *bcl-2* οφείλονται σε μια χρωμοσωμική αντιμετάθεση 14:18 κατά την οποία το υποψήφιο πρωτο-ογκογονίδιο *bcl-2* (18q21) παρατίθεται στο γονίδιο *JH* (14q32) της βαρείας αλυσίδας των ανοσφαιρινών.

Η απουσία ανασυνδυασμών του γονιδίου *bcl-2* στις μέχρι τώρα μελετηθείσες περιπτώσεις B-γαστρικών λεμφωμάτων MALT προσφέρει ένα ισχυρό επιχείρημα στην προηγουμένως διατυπωθείσα, με βάση ιστολογικά και εν μέρει ανοσοϊστοχημικά δεδομένα υπόθεση, ότι αυτά τα λεμφώματα δεν προέρχονται από κύτταρα του βλαστικού κέντρου των λεμφικών θυλακίων.

**4.2.** Η χρησιμοποίηση των μεθόδων Southern και Northern blot σε περιπτώσεις *a-chain disease* οδήγησαν σε δύο βασικά συμπεράσματα:

**α)** Ότι ο μονοκλωνικός πληθυσμός των πλασματοκυττάρων που παρατηρείται στα αρχικά στάδια της νόσου και εκείνος των ανοσοβλαστών που ανευρίσκεται στα τελικά στάδια της εξέλιξης έχουν την ίδια προέλευση. Το συμπέρασμα αυτό στηρίζεται στη

διαπίστωση ότι και οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί παρουσιάζουν αφενός τον ίδιο τύπο μονοκλωνικών αναδιατάξεων των γονιδίων της α-αλυσσίδας και της κ-αλυσσίδας και αφετέρου το αυτό ανώμαλα μικρού μεγέθους mRNA της α-αλυσσίδας.

**β)** Οτι το ανώμαλα μικρό mRNA της α-αλυσσίδας προκύπτει από την απάλειψη (deletion) των αλληλουχιών (sequences) του DNA που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της περιοχής CH1 της βαρείας αλυσσίδας. Κατά συνέπεια, μέσω αυτής της ανάλυσης αποδείχθηκε ότι η έκφραση της α1-heavy chain οφείλεται σε μια απάλειψη γονιδίων που κωδικοποιούν ένα τμήμα της α1 βαρείας αλυσσίδας (deletion of coding sequences) στο γενετικό υλικό των νεοπλασματικών κυττάρων.

**4.3.** Η μελέτη του γονιδίου c-myc έδειξε αναδιατάξεις στο 50% περίπου των λεμφωμάτων MALT υψηλής κακοήθειας και η μελέτη του γονιδίου p53 έδειξε σημειακές μεταλλάξεις στο 20% με 30% αυτών των λεμφωμάτων. Σε αντίθεση τα λεμφώματα MALT χαμηλής κακοήθειας εμφάνιζαν ανωμαλίες των c-myc και p53 σε ποσοστό 1-3%.

**4.4.** Κυτταρογενετικές μελέτες έδειξαν τη παρουσία τρισωμίας 3 στο 50% περίπου των B- MALT λεμφωμάτων του γαστρεντερικού σωλήνα.

## **ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ (1,2,3,13,14)**

**1. Επιδερμοτρόπα** (Σπογγοειδής μυκητίαση/ σύνδρομο Sézary :

T-λεμφώματα)

**2. Μη-επιδερμοτρόπα** ( B και T non-Hodgkin λεμφώματα)

**3. Ειδικές οντότητες λεμφοϋπερπλαστικών συνδρόμων δέρματος:**

Παζετοειδής δικτύωση, λεμφωματοειδής βλατίδωση ,υποστρέφουσα άτυπη ιστοκυττάρωση, ενδαγγειακό λέμφωμα από μεγάλα κύτταρα, αγγειοκεντρικά λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα.

**1. ΕΠΙΔΕΡΜΟΤΡΟΠΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ**

Σπογγοειδής μυκητίαση (ΣΜ), Σύνδρομο Sézary (SS)

## A. Κλινική εικόνα

**ΣΜ: Στάδιο I:** Βλάβες υπό τη μορφή πλακών (<10% της επιφάνειας του δέρματος)

**Στάδιο II:** Γενικευμένες βλάβες υπό τη μορφή πλακών (>10% της επιφάνειας του δέρματος)

**Στάδιο III:** Ογκοί δέρματος ή/ και ελκωτικές βλάβες

**Στάδιο IV:** Γενικευμένο ερυθρόδερμα

**SS:** Κνησμώδες ερυθρόδερμα, λεμφαδενοπάθεια, κερατόδερμα παλάμης και πέλματος, άτυπα (SS)κύτταρα στο περιφερικό αίμα.

## B. Ιστολογία

Τα παρακάτω κριτήρια χρησιμοποιούνται για την διάγνωση της ΣΜ:

**1.** Παρουσία ζωνοειδούς διηθήσεως των ανωτέρων στιβάδων του δέρματος, που συνήθως εφάπτονται της βασικής μεμβράνης της επιδερμίδας, αποτελούμενης κυρίως από άτυπα λεμφικά κύτταρα με ανώμαλο ή αναδιπλωμένο πυρήνα, μερικές φορές γύρω από αγγεία, νεύρα και εξαρτήματα του δέρματος (ιδρωτοποιοί αδένες, τριχοθυλάκια).

**2.** Παρουσία μέσα στη επιδερμίδα, λεμφικών κυττάρων παρομοίων με αυτά που παρατηρούνται στο χόριο. Αυτά τα κύτταρα μερικές φορές οργανώνονται σε ομάδες (ψευδοαποστημάτια του Pautrier ).

**3.** Παρουσία εντός του δέρματος μεγάλων λεμφικών κυττάρων (mucosis cells) με ανώμαλο πυκνοχρωματικό πυρήνα. Μερικές φορές δεν ανευρίσκονται σε βιοψίες δέρματος, αλλά η ταυτοποίηση τους έχει διαγνωστική αξία σε εξωδερματικές εντοπίσεις της ΣΜ.

Στο επίπεδο των λεμφαδένων οι βλάβες της ΣΜ ταξινομούνται ιστολογικά σε 3 κατηγορίες:

**1)** Λεμφαδένες με φυσιολογική αρχιτεκτονική, οι οποίοι περιέχουν στις ζώνες T λίγα άτυπα λεμφοκύτταρα με εγκεφαλοειδή ανώμαλο πυρήνα.

**2)** Λεμφαδένες με φυσιολογική αρχιτεκτονική και σημαντικό αριθμό ατύπων κυττάρων, τα οποία μερικές φορές οργανώνονται σε οζώδεις σχηματισμούς.

**3)** Λεμφαδένες με μερική ή ολική διήθηση από άτυπα κύτταρα.

Σε αντίθεση, οι λεμφαδένες του SS παρουσιάζουν πάντοτε μονότονη και διάχυτη διήθηση από κύτταρα με εγκεφαλοειδή, ανώμαλο πυρήνα.

Επίσης οι λεμφαδένες στη ΣΜ παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό πολλαπλώς



διαπλεκόμενων δικτυωτών κυττάρων(interdigitating reticulum cells:CD1+,S100+) σε αντίθεση με την απουσία αυτών των κυττάρων στο SS.

Επιπλέον, σε λεμφαδένες από προχωρημένα στάδια ΣΜ, η παρουσία βλαστών με έκδηλες πυρηνικές ατυπίες, είναι πιο έντονη από εκείνη που παρατηρείται σε λεμφαδένες του SS.

### **Γ. Ανοσοφαινότυπος**

Στις περισσότερες περιπτώσεις ΣΜ (90-95%), τα άτυπα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν φαινότυπο CD4+/ CD8- ενώ ο φαινότυπος CD8+/CD4- είναι σπάνιος. CD8+ μη νεοπλασματικά κύτταρα αποτελούν το 10-30% της δερμικής κυτταρικής διήθησης και ο αριθμός τους είναι μειώμενος σε περιπτώσεις ΣΜ με κακή πρόγνωση. CD1+ κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο (antigen presenting cells) ανευρίσκονται σε στενή συσχέτιση με τα αποστημάτια Pautrier της επιδερμίδας και αποτελούν το 5-20% της δερμικής διήθησης.

Το SS παρουσιάζει ορισμένες ανοσοφαινοτυπικές διαφορές σε σχέση με τη ΣΜ, π.χ. Τα CD8+ και CD1+ κύτταρα της δερμικής διήθησης είναι σπάνια και τα αποστημάτια Pautrier είναι σπάνια.

Στις περισσότερες περιπτώσεις ΣΜ και SS τα T κύτταρα εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης (CD25,HLA-DR) και πολλαπλασιασμού (Ki67). Επιπρόσθετα το CD30 αντιγόνο εκφράζεται σε περιπτώσεις υψηλής κακοήθειας. Απώλεια ενός ή περισσοτέρων T δεικτών (π.χ. CD2,CD3,CD3,CD5,TCR) έχει επίσης αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις και συνιστά έμμεσο κριτήριο αναγνώρισης νεοπλασματικής T-λεμφικής διήθησης(όπως σε όλα τα T-λεμφώματα γενικότερα).

Σε μερικές περιπτώσεις ΣΜ ο φαινότυπος των T-λεμφοκυττάρων στην επιδερμίδα είναι διαφορετικός από εκείνο του δέρματος.

Τέτοιο εύρημα δεν αναφέρεται σε μη νεοπλασματικές κυτταρικές διηθήσεις από T-λεμφοκύτταρα και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως έμμεση ένδειξη παρουσίας νεοπλασματικών Tλεμφοκυττάρων.

Ανοσοϊστολογικές μελέτες που συνέκριναν λεμφαδένες ιστολογικού τύπου III από ΣΜ λεμφαδένες από SS έδειξαν ορισμένες διαφορές:π.χ. οι λεμφαδένες στη ΣΜ παρουσιάζουν βλάστες με ανώμαλο φαινότυπο(απώλεια ενός ή περισσοτέρων T-δεικτών) ενώ οι λεμφαδένες στο SS παρουσιάζουν λεμφικά κύτταρα

που διατηρούν τον ώριμο T-φαινότυπο (CD3+,CD4+,CD5+) και έχουν λιγότερα CD1+,CD8+ και HLA-DR+ από εκείνα που ανευρίσκονται σε λεμφαδένες ΣΜ.

#### **Δ. Γονότυπος**

Η γονοτυπική ανάλυση έδειξε την παρουσία κλωνικών αναδιατάξεων του TCR-β στα κλινικά στάδια III/IV της ΣΜ και στο σύνδρομο Sézary. Αντίθετα στα κλινικά στάδια I και II της ΣΜ (early mucosis fungoides) δεν παρατηρούνται τέτοιες κλωνικές αναδιατάξεις (germline configuration).

#### **Ε. Παθογένεση**

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα λεμφοκύτταρα του δέρματος προέρχονται κυρίως από μετανάστευση λεμφοκυτταρικών πληθυσμών που αναγνωρίζουν

α) ειδικά μόρια προσκόλλησης( adhesion molecules) τα οποία εντοπίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του δέρματος, β) ειδικούς T παράγοντες των μαστοκυττάρων.

Ο λεγόμενος «επιδερμοτροπισμός» των CD4 λεμφοκυττάρων της ΣΜ/SS δεν αποτελεί φυσιολογικό φαινόμενο γιατί μόνο τα CD8+ λεμφοκύτταρα έχουν τέτοιες ιδιότητες στο φυσιολογικό δέρμα.

Σύμφωνα με τρέχουσες απόψεις τα CD4+ λεμφοκύτταρα έλκονται από antigen presenting cells και κερατινοκύτταρα που παράγουν IL-1 IL-1 like ουσίες (epidermal cell thymocyte activating factor).Επιπλέον τα κερατινοκύτταρα στη ΣΜ παρουσιάζουν «ανώμαλη» έκφραση HLA-DR και CD1 μορίων και κατά συνέπεια μπορούν να λειτουργούν ως antigen presenting cells (APC) στα CD4 λεμφοκύτταρα. Παράλληλα δείχθηκε ότι τα κερατινοκύτταρα στη ΣΜ παράγουν ένα IL-2 like μόριο (keratinocyte-derived T cell growth factor).

Η συχνή απουσία επιδερμοτροπισμού στα προχωρημένα στάδια ΣΜ μπορεί να αποδοθεί στην απουσία τέτοιων διακυτταρικών δράσεων (μεταξύ κερατινοκυττάρων, APC και CD4 λεμφοκυττάρων).

Η τρέχουσα άποψη για την παθογένεση της ΣΜ υποστηρίζει, σε αναλογία με το ισχύον μοντέλο ογκογένεσης, ότι σε πρώτη φάση αναπτύσσεται ένας πολυκλωνικός πολλαπλασιασμός T λεμφοκυττάρων ο οποίος εξελίσσεται σε μονοκλωνική νεοπλασία.

Ως αρχικός παράγοντας ενοχοποιείται η παρουσία διαρκούς αντιγονικού ερεθισμού π.χ. από κάποιο ιό. Στα πλαίσια αυτής της άποψης παρατηρήθηκε HSV (Herpes Simplex Virus) στο δέρμα και στους λεμφαδένες ασθενών με ΣΜ και υποστηρίχθηκε ότι αυτός ο ιός μέσω του συστήματος IL-2 και R-IL-2 (Receptor IL-2) μπορεί να οδηγεί σε αυτοκρινή ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των CD4 λεμφοκυττάρων. Νεότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι το SS προέρχεται αρχικά από τους λεμφαδένες και κατόπιν τα νεοπλασματικά κύτταρα μεταναστεύουν στο αίμα και στο δέρμα.

## **2.ΜΗ ΕΠΙΔΕΡΜΟΤΡΟΠΑ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ**

- α) Στην πλειοψηφία τους είναι υψηλής κακοηθείας.
- β) Στην πλειοψηφία τους, 70-80%, προερχόμενα από Β λεμφοκύτταρα.

### **2.1 Β-λεμφώματα**

Παρουσιάζουν σε ιστολογικό επίπεδο όμοια εικόνα με εκείνα των λεμφαδένων και ταξινομούνται σε λεμφώματα υψηλής και χαμηλής κακοηθείας με βάση μορφολογικά δεδομένα. Εν τούτοις, φαίνεται ότι αυτή η μορφολογική διάκριση δεν έχει την ίδια κλινική σημασία με εκείνη των λεμφωμάτων που παρουσιάζονται πρωτογενώς στους λεμφαδένες. Πράγματι τα Β δερματικά λεμφώματα η πλειοψηφία των οποίων προέρχεται από κύτταρα μεθοριακής ζώνης (marginal zone) έχουν καλύτερη πρόγνωση από τα αντίστοιχα των λεμφαδένων.

Η διάγνωση των Β-λεμφωμάτων μπορεί να είναι πολλές φορές δύσκολη ή αδύνατη σε ιστολογικό επίπεδο και η συνδρομή της ανοσοϊστοχημείας ή σπανιότερα της μοριακής βιολογίας καθίστανται απαραίτητες. Εν τούτοις ακόμη και με την πραγματοποίηση ανοσολογικών τεχνικών η παρουσία μονοκλωνικού πληθυσμού δεν ταυτοποιείται σε όλες τις περιπτώσεις.

Στη διαγνωστική προσέγγιση θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και το κλινικό ιστορικό π.χ. τσίμπημα εντόμου, τατουάζ, εμβολιασμοί, ενδομυϊκή χορήγηση φαρμάκων προκαλούν εικόνα ψευδολεμφωματούδους λεμφικής υπερπλασίας που παρουσιάζει ομοιότητες με δερματικό λέμφωμα.

### **2.2.Τ-λεμφώματα**

Αποτελούν το 20-30% των μη-επιδερμοτρόπων δερματικών λεμφωμάτων και σε ιστολογικό επίπεδο μπορούν να ταξινομηθούν σε υψηλής και χαμηλής κακοήθειας λεμφώματα, φαίνεται όμως ότι αυτή η ταξινόμηση δεν έχει απόλυτη κλινική αξία.

Άλλες παράμετροι, όπως κλινικό στάδιο και φαινότυπος, μπορούν να συμμετέχουν στην αξιολόγηση της πρόγνωσης (π.χ. τα CD30+ λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα έχουν καλύτερη πρόγνωση από τα CD30 αρνητικά αντίστοιχα). Από κλινικο/παθολογική άποψη τα μη-επιδερμοτρόπα T- λεμφώματα του δέρματος παρουσιάζουν ορισμένες διαφορές από την ΣΜ και το SS.

α) Δεν περιέχουν κύτταρα με τυπικό εγκεφαλοειδή πυρήνα.

β) Εκφράζουν το HLA-DR αντιγόνο.

γ) Μεθίστανται συχνότερα.

δ) Παρουσιάζονται κλινικά ως όζοι και όχι ως πλάκες ή βλατίδες.

Σε σχέση με τα πρωτοπαθή T- λεμφώματα των λεμφαδένων παρουσιάζουν παρόμοιους φαινοτυπικούς χαρακτήρες (δηλ.απώλεια ενός ή περισσοτέρων T-κυτταρικών αντιγόνων).

### 3) ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΑΝΟΣΟΦΑΙΝΟΤΥΠΟ

Η προηγουμένως αναφερθείσα διαίρεση των δερματικών λεμφωμάτων στηρίζεται στη παρουσία ή την απουσία επιδερμοτροπισμού η οποία είναι ένα σημαντικό αλλά ανεπαρκές κριτήριο ταξινόμησης. Πρόσφατα προτάθηκε από τους Willerenz et al.1994 (13) ταξινόμηση με βάση τη συνεκτίμηση ανοσοφαινοτυπικών και ιστολογικών κριτηρίων. Με βάση τα αρχεία του Dutch Cutaneous Lymphoma Group της περιόδου 1986-1993 από το σύνολο των 603 περιπτώσεων πρωτοπαθών

λεμφωμάτων δέρματος το 80% ήταν T-φαινότυπου και το 20% ήταν B-φαινότυπου.

Η κατανομή ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο ήταν:

**α) T-λεμφώματα:** Σπογγοειδής μυκητίαση/ Σύνδρομο Sézary 48%, πολύμορφο από μεγάλα κύτταρα 5% ,ανοσοβλαστικό 2%, CD30 θετικές λεμφοϋπερπλασίες 21% (εκ των οποίων οι CD30 θετικές λεμφοϋπερπλασίες του τύπου της λεμφωματοειδούς βλατίδωσης ήταν 11% και τα CD30 θετικά αναπλαστικά λεμφώματα

ήταν 10%), άλλες δυσταξινόμητες περιπτώσεις 4%. Σε αυτό το σημείο σκόπιμο θα ήταν να γίνει ιδιαίτερη μνεία στις CD30 θετικές T-λεμφοϋπερπλασίες οι οποίες περιλαμβάνουν τα CD30 αναπλαστικά λεμφώματα, τη λεμφωματοειδή βλατίδωση και οριακές μεταξύ των δύο περιπτώσεις(13).

Αυτές οι παθήσεις θεωρείται ότι συνθέτουν ένα συνεχές νοσολογικό-βιολογικό φάσμα και ότι για την ασφαλή διαγνωστική προσέγγιση είναι απαραίτητη η συνεκτίμηση κλινικών και ιστοπαθολογικών παραμέτρων διότι μόνο η ιστολογική/ανοσοϊστοχημική ερμηνεία μπορεί να είναι επισφαλής. Από παθοφυσιολογική άποψη σημαντική θεωρείται η παρουσία του μορίου CD30 το οποίο είναι μέλος της οικογένειας TNF-Receptor και αποτελεί υποδοχέα για το μόριο CD30-Ligand το οποίο είναι μέλος της οικογένειας TNF. Η αλληλεπίδραση αυτών των μορίων μπορεί να είναι σημαντική για τους μηχανισμούς ρύθμισης των CD30 λεμφοϋπερπλασιών.

### **β) Β-λεμφώματα**

Λεμφώματα βλαστικού κέντρου 15%, ανοσοκυττώματα 2%, άλλες δυσταξινόμητες περιπτώσεις 3%. Όσον αφορά στα Β-λεμφώματα υπάρχει πρόσφατη διαφορετική άποψη, ότι δεν προέρχονται από το βλαστικό κέντρο αλλά από τη μεθοριακή ζώνη του λεμφοζιδίου (14).

Σε αυτή τη κατηγορία υπάγονται επίσης τα προαναφερθέντα ανοσοκυττώματα(14).

#### 4. ΑΛΛΕΣ ΟΝΤΟΤΗΤΕΣ

Η πλέον σημαντική είναι η **λεμφωματοειδής βλατίδωση** (υπάγεται στις CD30 θετικές λεμφοϋπερπλασίες ) διότι από ιστολογική άποψη παρουσιάζει μεγάλα άτυπα κύτταρα με εγκεφαλοειδή πυρήνα (ΣΜ κύτταρα) ή Reed-Sternberg like κύτταρα.

Ο φαινότυπος αυτών των κυττάρων είναι πάντα T(CD4) και εκφράζουν δείκτες ενεργοποίησης (CD25,CD30, HLA-DR) και το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67. Σε μερικές περιπτώσεις κλωνικές αναδιατάξεις του TCR-β έχουν αναφερθεί.

Εξέλιξη σε λέμφωμα έχει επίσης περιγραφεί. Εν τούτοις στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η εξέλιξη της νόσου συνηγορεί υπέρ του καλοήθους χαρακτήρα της.

Η **υποστρέφουσα άτυπη ιστοκύτταρωση** φαίνεται να είναι CD30 θετική λεμφοϋπερπλασία. Οι αγγειοκεντρικές ανοσοϋπερπλασίες παθήσεις του δέρματος είναι T-λεμφώματα.

#### Βιβλιογραφία εξωλεμφαδενικών λεμφωμάτων

- 1) Isaacson PG, Norton AJ. Extranodal lymphoma, Churdrill Livingston 1994.
- 2) Lenuert K, Feller AC. Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas. Springer Verlag 1992.
- 3) Real Classification, Blood 84,1361,1994.
- 4) Salhany KE et al. Am. J. Clin. Pathol. 1993 ,99, 472
- 5) Savio A et al. Blood 1996, 87,1255.
- 6) Du M et al. Blood 1995,86,4587.
- 7) Van Krieken J et al. Blood 1990,76,797
- 8) Van Krieken J et al. Am. J.Clin Pathol. 1992,97,170.
- 9) Peng H et al. Am. J. Pathol. 1996, 148, 643.
- 10) Wright DH. J.Pathol. 1996,178, 111.
- 11) Isaacson PG. J.Pathol. 1995,177, 111.
- 12) Isaacson PG et al. J. Clin. Pathol. 1995,48,395.
- 13) Willemze R. et al. Dermatology 1994, 189, 8.
- 14) Slater DN. Br. J. Dermatol. 1994,131,557.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Περιγράφονται παρακάτω τα βασικά χαρακτηριστικά των γονιδίων των οποίων οι πρωτείνες μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία, όπως επίσης και τα βασικά χαρακτηριστικά του ιού EBV και της σχέσης του με τις κακοήθεις νεοπλασίες.

### A) *bcl-2*

Το πρωτοογκογονίδιο *bcl-2* κωδικοποιείται από ένα γονίδιο 230kb σε μέγεθος, το οποίο παράγει μια πρωτεΐνη 24-26kDa που βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (1-3). Αν και υπάρχουν στοιχεία που ενοχοποιούν το *bcl-2* σαν πρωτότυπη GTP-συζευκτική πρωτεΐνη, η κύρια λειτουργία του *bcl-2* είναι να αναστέλλει την απόπτωση με άγνωστο μέχρι τώρα μηχανισμό. (4-7).

Εχει αποδειχθεί με στοιχεία ότι το *bcl-2* απορρυθμίζεται στα νεοπλασματικά κύτταρα, ως αποτέλεσμα μετάθεσης σε θέση της ανοσοσφαιρίνης βαρείας αλύσου, και γι' αυτό βασικά ενεργοποιείται σε κακοήθη νεοπλάσματα Β-κυτταρικής αρχής (λέμφωμα βλαστικού κέντρου). (3,8,9).

Επιπρόσθετα το *bcl-2* φαίνεται ότι προστατεύει τα κύτταρα των θηλαστικών από τους αναστολείς σύνθεσης DNA, RNA και πρωτεϊνών, όπως και από το αζίδιον του νατρίου, κολχικίνη, στεροειδή και τις επιδράσεις θερμοπληξίας και ακτινοβολίας (5). Το *bcl-2* μπορεί να αναστείλει την απόπτωση που προκαλείται από ποικίλα φυσιολογικά και παθολογικά ερεθίσματα (11,12).

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι το *bcl-2* μπορεί να λειτουργεί ως προ-οξειδωτικός παράγων που ρυθμίζει τα επίπεδα των μεσολαβητών οξυγονούχων αντιδραστικών ουσιών και ελέγχει την πρόωμη έναρξη της απόπτωσης (13,14).

### Βιβλιογραφία *bcl-2*

- 1) Hockenberry MD. Et al. Proc. Acad. Sci.(USA) 88:6961-6965 1991.
- 2) Reed J.C. et al. Exp. Cell Res. 195: 277-283
- 3) Silverman G.A. et al. Mol. Cell Biol. 13:5469-54781.
- 4) Reed J.C. et al. Mol. Cell Biol. 10:4370-4374

- 5) Vaux D.L. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90:786-789
- 6) Kozopas K.M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 90:3516-3520
- 7) Wagner A.J. et al. Mol. Cell Biol. 13:2432-2440.
- 8) Larsen C.J. et al. Hematol. 35:37-40
- 9) Nunez G. Et al. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 86:4589-4593.
- 10) Pezzella F. Et al. Am.J. Pathol.137:225-232
- 11) Tsujimoto Y. Oncogene 4:1331 1989.
- 12) Hawkins C.J. and Vaux D. Immunol.Rev. 142:127 1994.
- 13) Haldor S et al. Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 92:4307-5411.
- 14) Steinman H.M. J.Biol. Chem. 270:3487-3490.

## **B) p53**

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 είναι απαραίτητο για ορισμένους αλλά όχι όλους τους τύπους της απόπτωσης (1,2,3). Το p53 ασκεί σημαντικό και εξαρτημένο από την ποσότητα αποτέλεσμα στην έναρξη της απόπτωσης αλλά μόνο όταν επάγεται από παράγοντες που προκαλούν τη ρήξη της έλικας του DNA.

Η επαγωγή της απόπτωσης από το p53, αποτελείται από δύο σκέλη.

Το πρώτο είναι η απαίτηση ενεργοποίησης γονιδίων στόχων από το p53 μέσω ειδικής κατ'ακολουθία DNA σύνδεσης, ενώ το δεύτερο είναι μια μάλλον ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση (των γονιδίων στόχων) οδός, που παρακάμπτει τα γονίδια στόχους του p53 (4,5).

Ο κατασταλτικός στην ανάπτυξη ρόλος του p53 συνίσταται στην διενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου Waf-1 γνωστού και ως p21CIP1, το οποίο είναι ισχυρός αναστολέας των G1 και G2 κυκλιοεξαρτώμενων κινασών (6,8).

Οι ενεργοποιημένες κυκλιοεξαρτώμενες κινάσες φωσφορυλιώνουν και αδρανοποιούν την πρωτεΐνη Rb.



Η επαγωγή του Waf-1 από το p53 έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των κινασών οδηγώντας σε αποτυχία φωσφορυλίωσης της Rb και κατά συνέπεια τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.

Τόσο η αναστολή των G1,G2 όσο και η απόπτωση συμβαίνουν σε απάντηση της επαγωγής του Waf-1 από το p53 (9,10). Η αδυναμία επαγωγής του Waf-1 αποκλείει την p53 εξαρτώμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου (πολλ/σμου), ενώ ακύρωση της p53 -εξαρτώμενης αναστολής και της συνεπαγομένης απόπτωσης μπορεί να επισυμβεί είτε λόγω απενεργοποίησης του p53 από μετάλλαξη (12), είτε λόγω απορρύθμισης της έκφρασης του mdm-2 (13).

Τα ευρήματα είναι συμβατά με το τρέχον μοντέλο της λειτουργίας του p53 κατά το οποίο το p53 κατά κάποιο τρόπο αντιλαμβάνεται την καταστροφή του DNA και διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο είτε στο G1 είτε στο G2 (σημείο ελέγχου), για να επιτρέψει την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA. Εάν η επιδιόρθωση είναι ανεπιτυχής, το p53 μπορεί να προωθήσει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, τοιοιυτοτρόπως εμποδίζοντας την αναπαραγωγή γενετικών ατελειών σε διαδοχικές κυτταρικές γενεές.

Το p53 επίσης αποδείχτηκε ότι έχει άμεσο αποτέλεσμα στην απόπτωση, ελέγχοντας αρνητικά την έκφραση του bcl-2 και θετικά την έκφραση του bax (14).

### **Βιβλιογραφία p53**

- 1) Clarke A.R. et al. *Oncogene* 9:1767-1773 1994.
- 2) Strasser A. et al. *Cell* 79:329-339 1994.
- 3) Gotz C and Montenarh M. *Int. J. Oncology* 1129-1135 1995.
- 4) Caelles C. et al. *Nature* 370:220-223 1994.
- 5) Haupt Y. et al. *Genes Dev.* 9:2170-2183 1995.
- 6) El-Deiry W.S. et al. *Cell* 75:817-825 1993.
- 7) Harper J.W. et al. *Cell* 75:805-816 1993.
- 8) Xiong Y. et al. *Nature* 366:701-770 1993.
- 9) El-Deiry W.S. et al. *Cancer Res.* 54:1169-1174 1994

- 10) Argarwal M.L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 92:8493-8497 1995.
- 11) Waldman T. et al. Cancer Res. 55:5187-5190 1995
- 12) Fan S. et al. Cancer Res. 54:5824-5830 1994
- 13) Chen C.Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 91:2684-2688 1994.
- 14) Miyashita T et al. Oncogene 9:1799-1805 1994.

### Γ) mdm2

Το mdm2 γονίδιο είναι ογκογόνο όταν ενισχίζεται και όταν υπερεκφράζεται (1-6). Η 90kda mdm2 πρωτεΐνη σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με το p53 *in vivo*, και αναστέλει την ειδική κατ' ακολουθία σύνδεση του DNA με το p53 (2,7). Ανάλυση των mdm2 και p53 γονιδίων σε σαρκώματα έδειξε ότι το ένα ή το άλλο από αυτά τα γονίδια μεταλλάσσεται στο 70% των όγκων (2,4). Έτσι μεταβολές είτε στο p53 είτε στο mdm2 αντιπροσωπεύουν εναλλακτικούς μηχανισμούς για την απενεργοποίηση της ίδιας οδού καταστολής της αύξησης.

Ο φυσικός τύπος του p53 προκαλεί την έκφραση του mdm2 σαν απάντηση στη βλάβη του DNA (8), ενώ υπερέκφραση του mdm2 αναστέλλει την ικανότητα του φυσικού τύπου του p53 να προκαλέσει την έκφραση των γονιδίων στόχων (2,7,9). Η ρύθμιση της έκφρασης του mdm2 από το p53 αντιπροσωπεύει ένα ανάδρομο μηχανισμό ελέγχου της λειτουργίας του p53 (8). Η λειτουργία του mdm2 είναι σημαντική για την ανάπτυξη, καθώς τα ποντίκια που δεν έχουν mdm2 πεθαίνουν κατά την εμβρυογένεση (10,11). Αυτό μπορεί να αποφευχθεί με την εξάλειψη του p53, γεγονός που δείχνει ότι το mdm2 είναι απαραίτητο για την αρνητική ρύθμιση της ενεργότητας του p53 (10,11).

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η 90mdm2 πρωτεΐνη σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα τόσο με την E2F όσο και με την Rb πρωτεΐνη. Το mdm2 προκαλεί την E2F εξαρτωμένη ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων συνδεδεμένο στην σφαίρα επιρροής της δράσης της E2F (12). Η E2F είναι ενδυνάμει ενεργοποιητής εκ μεταγραφής που συνήθως συνδέεται με/ και αναστέλεται από την υποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη Rb. Το mdm2 προκαλεί την απελευθέρωση του E2F από το Rb και οδηγεί σε εκ μεταγραφής ενεργοποίηση των E2F γονιδίων στόχων(12,13). Σύνδεση του mdm2 με

την Rb πρωτεΐνη, μειώνει την Rb εξαρτώμενη καταστολή της διενεργοποίησης της E2F, με ένα p53 ανεξάρτητο τρόπο (13).

Έτσι το mdm2 μπορεί να υπερπηδήσει την ικανότητα αναστολής (του κύκλου) στα σημεία G1, που έχει τόσο το p53 όσο και η Rb, όπως και να επάγει την διενεργοποίηση του μεταγραφικού ενεργοποιητή E2F, που προάγει την ανάπτυξη. Η ελάφρυνση των λειτουργιών αναστολής της ανάπτυξης τόσο του p53 όσο και της Rb, συμφωνεί με την παρατήρηση ότι το mdm2 μπορεί να προκαλέσει έξοδο από την G1 φάση στα p53+/Rb+ κύτταρα (13) και είναι απαραίτητο για την εμβρυογένεση (10,11).

### **Βιβλιογραφία mdm2**

- 1) Fakharzadeh S.S. et al. EMBO J. 10:1565-1569 1991.
- 2) Oliner J.D. et al. Nature 358:80-83 1992.
- 3) Ladanyi M. et al. Cancer Res. 53:16-18 1993.
- 4) Leach F.S. et al. Cancer Res. 53:2231-2234 1993.
- 5) Cardon-Cardo C. et al. Cancer Res. 54:794-799
- 6) Landers J.E. et al. Oncogene 9:2745-2750 1994.
- 7) Momand J.E. et al Cell 69:1237-1245 1992.
- 8) Barak Y. et al. EMBO J. 12:461-468 1993.
- 9) Oliner J.D. et al. Nature 362:857-860 1993.
- 10) de Oca Luna R.M. et al. Nature 378: 203-206 1995.
- 11) Jones S.N. et al. Nature 378:206-208 1995.
- 12) Martin K. et al. Nature 375:691-694 1995.
- 13) Xiao Z.X. et al. Nature 375:694-698 1995.

### **Δ) Waf1/p21**

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 ενεργοποιεί εκ μεταγραφής έναν αριθμό γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του waf1/CIP1, σε απάντηση της βλάβης του DNA (1-3).

Το 21kda παράγωγο του waf1 βρίσκεται σε ένα σύμπλεγμα κυκλινών κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και PCNA, σε φυσιολογικά αλλά όχι τροποποιημένα κύτταρα και φαίνεται ότι είναι καθολικός (γενικός) αναστολέας της δραστηριότητας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (4-8).

Ένα αποτέλεσμα της σύζευξης και της αναστολής των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDK), του p21waf1, είναι να εμποδίζει την CDK-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση και επακόλουθη αδρανοποίηση της Rb πρωτεΐνης (4) η οποία είναι απαραίτητη για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

Γι' αυτό το p21waf1 είναι ένας ισχυρός (δυναμικός) και αναστρέψιμος αναστολέας του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου G1 και G2 (2,3,9), προφανώς για να δώσει τον απαραίτητο χρόνο στο DNA να ολοκληρώσει την επιδιόρθωσή του.

Η μη αναστρέψιμη διακοπή στα σημεία G1, G2 οδηγεί στην απόπτωση.

Εντούτοις ο ρόλος του p21waf1 στην απόπτωση είναι λιγότερο σαφής, αν και η p53-εξαρτώμενη απόπτωση οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του waf1(2,3).

Η επαγωγή του p21waf1 σε απάντηση της καταστροφής του DNA μπορεί να συμβεί μέσω τόσο p53 εξαρτώμενων όσο και p53 ανεξάρτητων μηχανισμών, σε απάντηση μιτογόνων ερεθισμάτων και ερεθισμάτων διαφοροποίησης, ή σε κύτταρα νεοπλασματικά με μεταλλαγμένο p53 (1-3,10-12).

Το λειτουργικό p21waf1 είναι απαραίτητο για την p53 εξαρτώμενη διακοπή στο σημείο G1(13,14), προφανώς οφειλόμενη στην αναστολή από το waf1 και της δραστηριότητας των CDK και της PCNA-εξαρτώμενης αντιγραφής του DNA (15).

Το Waf1 έχει επίσης αναγνωρισθεί σαν γονίδιο που αναμειγνύεται στην γήρανση του κυττάρου, καλούμενο sdi1 (16).

Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η υπερέκφραση του p21waf1 καταστέλει την ανάπτυξη (1) πράγμα συμβατό με το ρόλο του ως αναστολέα των CDKs.

Αναστέλλοντας την αδρανοποίηση της Rb με ένα p53 εξαρτώμενο τρόπο, το p21waf1 βοηθά στην ολοκλήρωση του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που εξαρτάται από το p53 και την Rb.

### **Βιβλιογραφία waf1**

- 1) El Deiry W.S. et al Cell 75:817-825 1993.
- 2) El Deiry W.S. et al Cancer Res. 54:1169-1174 1994.
- 3) El Deiry W.S. et al Cancer Res. 55:2910-2919 1995.

- 4) Harper J.W. et al. Cell 75:805-816 1993.
- 5) Xiong Y. et al Nature 336:701-704 1993.
- 6) Gu Y. et al. Nature 336:707-710 1993.
- 7) Xiong Y. et al. Cell 71:505-514 1992.
- 8) Xiong Y. et al. Genes Dev. 7:1572-1583 1993.
- 9) Agarwal M.L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8493-8497 1995.
- 10) Michieli P. Et al. Cancer Res. 54:3386-3395 1994
- 11) Elbendary A. et al. Cell Growth Diff. 5:1301-1307 1994.
- 12) Chen, Y.Q. et al. I NT. J. O ncology 7:889-893 1995.
- 13) Deng C. et al. Cell 82:675-684 1995.
- 14) Waldman T. et al. Cancer Res. 55:5187-5190 1995.
- 15) Li R. et al. Nature 371:534-537 1994.
- 16) Noda A. et al. Exp. Cell Res. 211:90-98 1994.

## Ε) ΙΟΣ EBV ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

### Βιολογικά χαρακτηριστικά του ιού

#### Φύση μόλυνσης του ιού

Ο ιός Epstein-Barr είναι μέλος της οικογένειας των ερπητο-ιών (1,2). Ο ιός αυτός διαφέρει από τα άλλα μέλη της οικογένειας ως προς την ικανότητα του να προκαλεί λανθάνουσα και εμμένουσα μόλυνση στον ξενιστή. Δύο ανοσολογικά διαχωριζόμενοι τύποι του EBV (A και B strains) με διαφορετική γεωγραφική κατανομή έχουν βρεθεί στον άνθρωπο. Οι περισσότεροι από τους ανθρώπους που έχουν μολυνθεί φέρουν τον A ή και το B τύπο του ιού στα επιθηλιακά κύτταρα της στοματικής κοιλότητας, αλλά περιέχουν κυρίως τον A τύπο στα περιφερικά B λεμφοκύτταρα. Ανοσοκατασταλμένοι ξενιστές, ειδικά αυτοί με AIDS δείχνουν αυξημένη μόλυνση από τον τύπο B του ιού.

Η συχνότερη οδός μεταφοράς γίνεται μέσω του σιέλου. Ο ιός EBV προκαλεί δύο τύπους μόλυνσης στα κύτταρα:

- α) Παραγωγική μόλυνση με πλήρη αντιγραφή του ιού, παραγωγή ιικών αντιγράφων και απελευθέρωση τους μετά από λύση του κυττάρου.
- β) Λανθάνουσα μόλυνση με μερική έκφραση των γονιδίων του ιού, χωρίς παραγωγή ιικών αντιγράφων και χωρίς καταστροφή του κυττάρου ξενιστή.

Ο ιός EBV μολύνει τα ώριμα επιθηλιακά κύτταρα του στοματοφάρυγγα και τους πόρους των σιελογόνων αδένων(3,4). Έτσι, στις εκκρίσεις από αυτές τις περιοχές βρίσκουμε αντίγραφα του ιού. Ο EBV είναι λεμφοτρόπος ιός και εκλεκτικά μολύνει τα B λεμφοκύτταρα(5,6).

Σε αυτή τη φάση η μόλυνση είναι κυρίως λανθάνουσα και μη παραγωγική. Πάντως 1 έως 10 από τα 1000 μολυσμένα από τον ιό B λεμφοκύτταρα in vitro βρίσκονται σε παραγωγική φάση και μπορούν να παράγουν αντίγραφα του ιού.

Επιθηλιακά κύτταρα και B λεμφοκύτταρα μολύνονται από τον ιό μέσω σύνδεσης της μεγάλης πρωτεΐνης του φακέλλου του ιού με τον CR2 υποδοχέα CD21.

Ένα ποσοστό 30-40% των περιφερικών T λεμφοκυττάρων εκφράζουν το μόριο CD21 και έτσι ο EBV μπορεί να μολύνει τα T λεμφοκύτταρα. Τα επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται να παίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στη διατήρηση του ιού, στη χρόνια

αναπαραγωγή του και στην απελευθέρωση των ιικών αντιγράφων κατά τη διάρκεια της ζωής του ξενιστή. Ο EBV έχει μια μοναδική ικανότητα *in vitro* να μετατρέπει μολυσμένες B κυτταρικές σειρές σε λεμφοβλαστοειδείς σειρές, οι οποίες εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες. Έτσι τα B λεμφοκύτταρα μπορούν να υποστούν μόλυνση και διαιώνιση (immortalization) κατά την δίοδο τους από το μολυσμένο στοματοφαρυγγικό επιθήλιο και να διασπείρουν τον ιό κατά την κυκλοφορία τους. Μια δεύτερη εστία διατήρησης του ιού θεωρείται ο μυελός των οστών και ετερόλογη μεταμόσχευση μπορεί να αποτελέσει τρόπο μετάδοσης του.

Στη λανθάνουσα φάση της μόλυνσης εκφράζονται 8 πρωτεΐνες: 6 πυρηνικές πρωτεΐνες (EBNA-1,2,3a,3b,3c,LP «Leading Protein») και 2 μεμβρανικές πρωτεΐνες, η LMP-1 (Latent Membrane Protein) TM(Terminal Protein)(7).

Επίσης δύο μικρά EBV μη-πολυαδενυλομένα RNAs (EBER-1 EBER-2) αποτελούμενα από 165 και 169 βάσεις αντίστοιχα, βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων (8,9).

Η ακριβής λειτουργία τους είναι άγνωστη πάντως, φαίνεται ότι τα EBER συμμετέχουν στη ρύθμιση της μετάφρασης και του ματίσματος (splicing) του μηνύματος(10).

Τα EBER-1/2 ανιχνεύονται με την τεχνική του RNA *in situ* υβριδισμού.

Η EBNA-1 πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 79Kd είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της επισωματικής (κυκλικής) μορφής του ιού. Οι EBNA-2 και η LMP-1 πρωτεΐνες είναι απαραίτητες *in vitro* για τη διαιώνιση των B λεμφοκυττάρων. Η LMP-1 πρωτεΐνη αυξάνει την έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης.

Η διαιώνιση των B λεμφοκυττάρων από τον EBV αλλάζει τον κυτταρικό φαινότυπο αυξάνοντας την έκφραση των μορίων ενεργοποίησης (CD23,CD30) και των μορίων προσκόλλησης LFA-1 α/β (CD11a/CD18),ICAM-1(CD54), LFA-3(CD58) της κυτταρικής επιφάνειας(11).

Στην παραγωγική φάση γίνεται εκτεταμένη αντιγραφή του ιού με παραγωγή πολλών ιικών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων των αρχόμενων αντιγόνων

EA (Early Antigens), των αντιγόνων της κάψας VCA (Viral Capsid Antigen)

και των μεμβρανικών αντιγόνων MA (Membrane Antigen).

Η στροφή από τη λανθάνουσα στην παραγωγική φάση της μόλυνσης καθορίζεται από την πρωτεΐνη BZLF-1, η οποία παρουσιάζει ομολογία με τα ογκογονίδια c-jun/c-fos(12,13).

### **Ανοσολογική απάντηση στη μόλυνση από τον EBV**

Ανοσολογικές μελέτες σχετιζόμενες με τον έλεγχο της μόλυνσης από τον EBV αναφέρουν το σημαντικό ρόλο της κυτταρικής ανοσίας συμπεριλαμβανομένων των ειδικών Τ λεμφοκυττάρων και κυττάρων -φονέων (Natural Killer cells).

Αρχικά, στην πορεία της λοιμώδους μονοπυρήνωσης παράγονται τα αντιγόνα της παραγωγικής φάσης όπως τα EA, VCA και MA (14).

Όλα αυτά τα αντιγόνα προσπαθούν να περιορίσουν μία γενικευμένη ιαιμία.

Είναι επίσης υπεύθυνα για την επαγωγή των HLA-τάξης II περιοριζόμενων Τ λεμφοκυττάρων (15). Ο καλύτερος μηχανισμός άμυνας του ξενιστή στηρίζεται στα ειδικά CD8 κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα. Οι δομές-στόχοι των μολυσμένων Β λεμφοκυττάρων οι οποίες αναγνωρίζονται από τα κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα είναι οι πρωτεΐνες EBNA-2, EBNA-3, EBNA-3c και LMP-1.

### **Οροδιάγνωση της μόλυνσης από τον EBV**

Η διάγνωση της χρόνιας μόλυνσης στηρίζεται στην ανίχνευση των Ig αντισωμάτων έναντι των VCA και EBNAs (16). Στην οξεία φάση της μόλυνσης βρίσκουμε υψηλούς τίτλους IgM και IgG αντισωμάτων έναντι του VCA και σύντομη απάντηση έναντι του διάχυτου συστατικού του EA (EA-D), ενώ τα EBNAs δεν ανιχνεύονται.

Τα IgM αντισώματα έναντι των VCA και EA-D παρουσιάζουν ελάττωση του τίτλου τους και η πρωτεΐνη EBNA σταδιακά αυξάνεται. Ανθρωποι χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου είναι οροθετικοί σε νεαρότερη ηλικία σε σύγκριση με άτομα υψηλότερου επιπέδου.

## **ΝΟΣΟΙ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ**

### **1) ΛΟΙΜΩΔΗΣ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΣΗ (17)**

Θεωρείται ως αυτοπεριοριζόμενη, ιογενής λοίμωξη. Πάντως, έχουν περιγραφεί περιπτώσεις ανοσοκατασταλμένων ασθενών που έχουν οδηγηθεί σε θάνατο.

Οι ασθενείς παρουσιάζουν γενικευμένη συμμετοχή του λεμφικού ιστού με λεμφαδενοπάθεια, υπερπλασία λεμφικού ιστού του ρινοφάρυγγα και των αμυγδαλών



καθώς και σπληνομεγαλία. Ακολούθως ο ιός ανιχνεύθηκε σε φαρυγγικά εκπλύματα από ασθενείς με λοιμώδη μονοπυρήνωση καθώς και από υγιείς ανθρώπους.

Πρόσφατα με την τεχνική του *in situ* υβριδισμού που έγινε σε τομές παραφίνης από ιστό προερχόμενο από αμυγδαλές αρρώστων με λοιμώδη μονοπυρήνωση, βρέθηκαν πυρηνικά οξέα του ιού στα λεμφικά βλαστικά κύτταρα της παραφλοιώδους ζώνης(18).

Η T κυτταρική απάντηση του ξενιστή αντιπροσωπεύεται από τα άτυπα λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στο περιφερικό αίμα των ασθενών με λοιμώδη μονοπυρήνωση. Σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς με ελαττωματική T κυτταρική απάντηση, η αυτοπεριοριζόμενη παραγωγή B λεμφοκυττάρων μπορεί να μετατραπεί σε θανατηφόρα ασθένεια.

## 2. ΛΕΜΦΩΜΑ BURKITT (20-23)

Το λέμφωμα Burkitt αρχικά περιγράφηκε το 1958 από τον Dennis Burkitt ο οποίος περιέγραψε ένα ασυνήθιστο σάρκωμα το οποίο αναπτύσσεται στην γνάθο των παιδιών της Ανατολικής Αφρικής. Ο όγκος ταυτοποιήθηκε ως κακόηθες λέμφωμα από τους O'Connor και Davies το 1960.

Μετέπειτα μελέτες απέδειξαν ότι ο όγκος αυτός αποτελεί ξεχωριστή κλινικοπαθολογοανατομική οντότητα.

Το λέμφωμα Burkitt είναι ενδημικό στην Ανατολική Αφρική, όπου οι όγκοι αναπτύσσονται στην γνάθο νεαρών παιδιών.

Παρόμοιοι μορφολογικά, μη αφρικανικού τύπου όγκοι σποραδικά εμφανίζονται σε μεγαλύτερα παιδιά και σε ενήλικες και αρκετά συχνά εντοπίζονται ενδοκοιλιακά. Αυτοί οι ασθενείς συχνά παρουσιάζονται με ταχέως αυξανόμενους όγκους στα προχωρημένα στάδια της νόσου.

Ιστολογικά, οι αφρικανικού και οι μη αφρικανικού (μη ενδημικού) τύπου όγκοι είναι όμοιοι.

Παρουσιάζουν μια διάχυτη μονότονη ανάπτυξη βλαστικών κυττάρων με αρκετές πυρηνοκινησίες, εστίες νεκρώσεων και παρουσία διάσπαρτων μακροφάγων, δημιουργώντας μια εικόνα έναστρου ουρανού (Starry-Sky pattern).

Τόσο ο ενδημικός όσο και μη ενδημικός τύπος του λεμφώματος Burkitt έχουν αποδειχθεί ότι πρόκειται για λεμφώματα B κυτταρικής προέλευσης.

Από την εποχή που έγινε η αρχική απομόνωση του ιού Epstein-Barr από λεμφοβλαστικές σειρές προερχόμενες από λέμφωμα Burkitt, μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του EBV και του λεμφώματος Burkitt έχει καθιερωθεί.

Κύτταρα προερχόμενα από βιοψίες αρρώστων με αφρικανικό λέμφωμα Burkitt βρέθηκε ότι εκφράζουν μεμβρανικά αντιγόνα του ιού.

Επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν υψηλούς τίτλους αντισωμάτων σχετιζομένων με τον EBV σε αυτούς τους αρρώστους. Μετέπειτα μελέτες, με την τεχνική του υβριδισμού, ανίχνευσαν DNA του EBV στην πλειονότητα των περιπτώσεων με λέμφωμα Burkitt Αφρικανικού τύπου (20).

Η ανίχνευση με την τεχνική του Southern blot ενός μοναδικού γονιδιώματος του ιού στο τελικό άκρο, αποτελεί μία ισχυρή ένδειξη για την κλωνική επέκταση ενός

μοναδικού, προγόνου κυττάρου το οποίο έχει μολυνθεί από τον ιό. Επίσης υποστηρίζει τον άμεσο ρόλο του ιού στην παθογένεση του λεμφώματος. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο ο ιός προκαλεί το λέμφωμα Burkitt παραμένει άγνωστος. Και οι δύο τύποι (ενδημικός και μη ) περιέχουν χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. Σχεδόν όλες οι περιπτώσεις παρουσιάζουν μετατόπιση του πρωτοογκογονιδίου c-myc από το χρωμόσωμα 8 στο μακρύ σκέλος είτε του χρωμοσώματος 14 (θέση του γονιδίου της βαριάς αλύσου της ανοσοσφαιρίνης, 75% των περιπτώσεων ) ή του χρωμοσώματος 22 (θέση του γονιδίου της λ ελαφράς αλύσου, 16% των περιπτώσεων ) ή του χρωμοσώματος 22 (θέση του γονιδίου της κ ελαφράς αλύσου, 9% των περιπτώσεων).

Η παρουσία του EBV δεν αυξάνει άμεσα τις χρωμοσωμικές μετατοπίσεις. Αυτό στηρίζεται στις παρατηρήσεις ότι κυτταρικές σειρές μολυσμένες με τον ιό δεν παρουσιάζουν μετατοπίσεις και όταν αυτές συμβούν είναι διαφορετικές από αυτές που έχουν ανιχνευθεί στο λέμφωμα Burkitt.

Ο μηχανισμός που τελευταία υποστηρίζεται, αναφέρει ότι η μόλυνση με τον EBV προκαλεί μία συνεχή παραγωγή B κυτταρικών κλώνων που έχουν μολυνθεί από τον ιό. Καθένας από αυτούς τους κλώνους έχει αυξημένη πιθανότητα χρωμοσωμικής μετατόπισης, απορύθμισης του γονιδίου c-myc και ικανότητα νεοπλασματικής ανάπτυξης. Το γεγονός ότι η πλειοψηφία των μη ενδημικών λεμφωμάτων Burkitt δεν περιέχουν DNA του ιού φανερώνει ότι ο ιός δεν είναι απαραίτητος για τη δημιουργία του λεμφώματος και ότι πιθανόν άλλοι μηχανισμοί να εμπλέκονται στην ογκογένεση. Ενδιαφέρουσες πληροφορίες προέρχονται από τη μελέτη του ανοφαινότυπου του λεμφώματος Burkitt. Τα θετικά στον EBV ενδημικά λεμφώματα Burkitt είναι EBNA-1 θετικά, αλλά LMP-1 και EBNA-2 αρνητικά.

Και οι δύο τύποι του λεμφώματος παρουσιάζουν απορρύθμιση των μορίων προσκόλλησης CD11a, CD18, CD54 και CD58(21,22).

Επειδή οι LMP-1 και EBNA-2 πρωτεΐνες είναι στόχοι των κυτταροτοξικών T κυττάρων και τα παραπάνω μόρια προσκόλλησης είναι απαραίτητα για την ανοσολογική αναγνώριση, η απουσία ή η απορρύθμιση αυτών των μορίων πιθανόν να επιτρέπει στο λέμφωμα Burkitt να διαφεύγει την ανοσοεπίβλεψη(23).

### **3.ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΡΙΝΟΦΑΡΥΓΓΑ (24,25)**

Το καρκίνωμα ρινοφάρυγγα είναι ένας σπάνιος όγκος στα περισσότερα μέρη του κόσμου, αλλά παρουσιάζει μία ασυνήθιστα υψηλή συχνότητα στη Νοτιοανατολική Ασία. Οι άνδρες προσβάλλονται συχνότερα μεταξύ 15 έως 25 και 60 έως 69 χρονών. Το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα φαίνεται ότι προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του ρινοφάρυγγα και κυρίως από την πτυχή του Rosenmuller.

Η συσχέτιση του ιού με το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα στηρίχθηκε στους υψηλούς τίτλους των ειδικών αντισωμάτων έναντι του EBV, οι οποίοι μετρήθηκαν στους ασθενείς με αυτό το νεόπλασμα.

Η άμεση συσχέτιση του EBV με το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα στηρίχθηκε στην ανίχνευση DNA του ιού στα νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα και όχι στα λεμφοκύτταρα, με την χρησιμοποίηση των τεχνικών του ανοσοφθορισμού και του *in situ* υβριδισμού (26,27).

Η ανάδειξη του ομογενοποιημένου τελικού άκρου του γονιδιώματος του ιού στα νεοπλασματικά κύτταρα αποτελεί μια άμεση απόδειξη ότι το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα, όπως και το λέμφωμα Burkitt αντιπροσωπεύει μία κλωνική επέκταση ενός μοναδικού, προγόνου κυττάρου το οποίο έχει μολυνθεί από τον ιό και αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη για τον ρόλο του EBV στην ογκογένεση.

Μελέτες του ανοσοφαινότυπου του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα έχουν δείξει ότι όλοι οι όγκοι ήταν EBNA-1 θετικοί και ότι ένα ποσοστό 20% από αυτούς παρουσίαζαν έκφραση της LMP-1 πρωτεΐνης. Οι EBNA-2 και οι λανθάνουσας φάσης πρωτεΐνης καθώς και οι πρωτεΐνες αντιγραφής ήταν αρνητικές(28,29).

Αδιαφοροποίητα καρκινώματα τύπου ρινοφάρυγγικού καρκινώματος έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες ανατομικές θέσεις(30) π.χ. στο στομάχι, στους σιελογόνους αδένες, στο θύμο και στον πνεύμονα. Σε μερικούς από αυτούς τους όγκους ανιχνεύθηκε ο ιός (καρκίνωμα σιελογόνων στους Εσκιμώους), ενώ σε άλλους όχι (31-37).

## **ΛΕΜΦΟΥΠΕΡΠΛΑΣΤΙΚΕΣ ΝΟΣΟΙ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΠΡΟΣΦΑΤΑ ΣΥΣΧΕΤΙΣΘΕΙ ΜΕ ΤΟΝ EBV**

### **ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΣΕ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Ασθενείς με επίκτητες, ιατρογενείς ή συγγενείς ανοσοανεπάρκειες παρουσιάζουν μια αυξημένη συχνότητα non-Hodgkin λεμφωμάτων κυρίως B κυτταρικής προέλευσης, τα οποία συσχετίζονται με την παρουσία του ιού Epstein-Barr (EBV).

#### **1. ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ**

##### **α) Λεμφώματα σχετιζόμενα με AIDS (38-41)**

Στο σύνδρομο της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, η ανάπτυξη ενός non-Hodgkin λεμφώματος είναι μια συχνή επιπλοκή και η παρουσία του ιού με την τεχνική του RNA in situ υβριδισμού (RISH) βρέθηκε στο 60% περίπου των περιπτώσεων συστηματικού non-Hodgkin λεμφώματος (42). Η ελαττωματική T κυτταρική ανοσοεπίβλεψη σε συνδυασμό με την περίεργη φύση της μόλυνσης με τον EBV έχει ως αποτέλεσμα την κυκλοφορία πολύ μεγάλου αριθμού B λεμφοκυττάρων μολυσμένων με τον ιό. Η πλειοψηφία των non-Hodgkin λεμφωμάτων που σχετίζονται με AIDS παρουσίαζαν μεταθέσεις του ογκογονιδίου c-myc.

##### **β) Λεμφοϋπερπλαστικές καταστάσεις σε μεταμοσχευμένους ασθενείς (43-47)**

Οι ανοσοκατασταλμένοι, λόγω μεταμόσχευσης ενός οργάνου, ασθενείς παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μιας λεμφοϋπερπλαστικής νόσου, η οποία σχετίζεται με τον EBV. Αυτές κυμαίνονται από μία πολυκλωνική λεμφική υπερπλασία έως μία μονοκλωνική ανάπτυξη ενός διαχύτου λεμφώματος από μεγάλα κύτταρα B κυτταρικής αρχής, οι οποίες μπορούν να υποχωρήσουν με ελάττωση της ανοσοκαταστολής ή να εξελιχθούν σε βιολογικά εμφανή νεοπλάσματα.

Ενδείξεις για τη συσχέτιση του EBV με τις λεμφοϋπερπλαστικές νόσους σε ανοσοκατασταλμένους, αποτελούν η ανίχνευση ειδικών αντιγόνων έναντι του ιού ή γονιδιωμάτων του από το νεφρό, ήπαρ, πνεύμονα ή την καρδιά των μεταμοσχευμένων, με τις τεχνικές του Southern blot και in situ υβριδισμού. Τελευταία

βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι ο ιός βρέθηκε στην ομάδα αυτή των ασθενών σε ποσοστό το οποίο κυμαίνεται από 50-100% ανάλογα με την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Με την τεχνική του Southern blot υβριδισμού, βρέθηκε μονοκλωνικό μέτωπο ενδεικτικό ενσωμάτωσης του EBV πριν από την κακοήγη εξαλλαγή. Σε περίπου 40% των περιπτώσεων ανιχνεύθηκαν περιοριστικά τμήματα τα οποία είναι χαρακτηριστικά της γραμμικής μορφής του EBV και τα οποία αναγνωρίζονται μόνο κατά τη φάση της παραγωγικής μόλυνσης.

## **2. ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΣΥΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΑ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΕΣ**

Οι ασθενείς της ομάδας αυτής παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα ανάπτυξης κακοήθους λεμφώματος. Το 4% των ασθενών αναπτύσσουν κάποια κακοήθεια ενώ το 60% από αυτούς αναπτύσσουν non-Hodgkin λεμφώματα ή λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες. Σχεδόν όλα τα λεμφώματα είναι B κυτταρικής προέλευσης από μεγάλα κύτταρα με παρουσία γονιδιωμάτων του ιού σε αυτά. Τα σύνδρομα Wiskott-Aldrich (48), αταξίας-τελαγγειεκτασίας και Duncan's είναι σοβαρές περιπτώσεις ανοσοανεπάρκειας και όλα έχουν συσχετισθεί με λεμφώματα τα οποία είναι θετικά στον EBV.

## **3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ EBV ΣΕ ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΣΕ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΜΕΝΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

Πρόσφατες μελέτες του ανοσοφαινότυπου έχουν δείξει ότι θετικά στον EBV λεμφώματα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (AIDS ή μεταμόσχευση) εκφράζουν διάφορα λανθάνοντα γονίδια του EBV. Έτσι έχουμε LMP-1+/ EBNA-2+/ EBNA-2- ή LMP-1-/EBNA-2-, ενώ το EBNA-1 είναι συνήθως θετικό(41,49-51).

Εκφραση της πρωτεΐνης BZLF-1 και των Eas βρέθηκε σε μία αναλογία non-Hodgkin λεμφωμάτων που σχετίζονται με AIDS, ενώ τα VCAs και τα Mas αντιγόνα έχουν βρεθεί πολύ σπάνια (41). Επίσης, έκφραση των μορίων προσκόλλησης CD11a, CD54 και CD58 βρέθηκε στα λεμφώματα που αναπτύσσονται σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (40-51).

## **ΛΕΜΦΩΜΑΤΑ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΜΕΝΑ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΧΩΡΙΣ ΠΡΟΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΑΝΟΣΟΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ**

### **1. Νόσος Hodgkin (52-56)**

Η συσχέτιση του ιού με τη νόσο Hodgkin στηρίζεται σε μία μεγάλη σειρά από επιδημιολογικές και μοριακής βιολογίας μελέτες. Το γεγονός ότι οι ασθενείς με λοιμώδη μονοκυττάρωση έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης νόσου Hodgkin σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό και ότι οι ασθενείς με νόσο Hodgkin παρουσιάζουν υψηλούς τίτλους αντισωμάτων έναντι του ιού, τουλάχιστον 3 χρόνια πριν την διάγνωση, αποτελεί μία ισχυρή ένδειξη ότι η επανεργοποίηση του ιού μπορεί να συσχετίζεται με την έναρξη της νόσου (43).

DNA του ιού έχουν ανιχνευθεί στο 20% των περιπτώσεων μικτής κυτταροβρίθειας ή οζώδους σκλήρυνσης με την τεχνική του Southern blot (57-59)

Πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν ανίχνευση του ιού στο 50-60% των περιπτώσεων χρησιμοποιώντας την μέθοδο PCR (αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση) (60,61). DNA ή RNA του ιού βρέθηκαν στα Reed-Sternberg κύτταρα σε 30-50% των περιπτώσεων (62,63). Αντίθετα, mRNAs EBER1-2 ανιχνεύθηκαν όχι μόνο στα R-S, αλλά και στα μικρά λεμφοκύτταρα. Ο ρόλος των μικρών λεμφοκυττάρων και η «αντιδραστική» τους φύση καθώς και η πιθανή συμμετοχή στη νόσο είναι άγνωστα.

Με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους βρέθηκε θετική έκφραση της LMP-1 πρωτεΐνης στα R-S κύτταρα περίπου σε 30-35% των περιπτώσεων, ενώ η EBNA-2 πρωτεΐνη δεν ανιχνεύθηκε (64-66). Το γεγονός της ανίχνευσης της «ογκογόνου» LMP-1 πρωτεΐνης ενισχύει τον πιθανό ρόλο του ιού στην παθογένεση μερικών περιπτώσεων νόσου Hodgkin. Πάντως η έκφραση της LMP-1 πρωτεΐνης δε φαίνεται να σχετίζεται με την πρόγνωση της νόσου(67).

### **2. Μη-Hodgkin λεμφώματα (68-72)**

Περιπτώσεις λεμφαδενικών B ή T μη-Hodgkin λεμφωμάτων, οι οποίες εξετάστηκαν με διάφορες τεχνικές(PCR, Southern blot, DISH), η ανίχνευση γονιδιωμάτων του EBV βρέθηκε σε 3-18% των περιπτώσεων. Ένα υψηλό ποσοστό DNA του ιού, περίπου 42% βρέθηκε σε B ή T θετικά CD30 θετικά αναπλαστικά λεμφώματα από μεγάλα κύτταρα(73,74).

Με τις τεχνικές RISH και ανοσοϊστοχημεία mRNAs, EBERs καθώς και LMP-1 πρωτεΐνη, βρέθηκαν μόνο σε νεοπλασματικά κύτταρα από αναπλαστικά λεμφώματα και έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο EBV συσχετίζεται με την παθογένεση αυτών των νεοπλασμάτων. Σε περιπτώσεις σποραδικών B λεμφωμάτων η LMP-1 πρωτεΐνη βρέθηκε συχνότερα σε ιστολογικά υψηλότερης κακοήθειας όγκους(75)

Μερικές μελέτες αναφέρουν ότι B λεμφώματα από μικρά λεμφοκύτταρα και πλασματοκυτταροειδή NHL, εκφράζουν CD30 αντιγόνο σε κύτταρα που μοιάζουν με R-S και τα οποία φέρουν τον EBV. Για αυτό το λόγο υποστηρίζουν μια συσχέτιση του EBV με την έκφραση του CD30 σε μη-Hodgkin λεμφώματα εκτός από τα αναπλαστικά.

Επειδή ένα ποσοστό 30-40% των T-λεμφοκυττάρων του αίματος εκφράζουν τον CD30 EBV υποδοχέα, όταν T λεμφοκύτταρα αναμειχθούν με DNA του ιού έχουν τη δυνατότητα να διαιωνισθούν.

Με τις τεχνικές Southern blot και DNA in situ υβριδισμού βρέθηκαν λίγες περιπτώσεις CD4+ T non-Hodgkin λεμφωμάτων, σε ασθενείς οι οποίοι είχαν χρόνια μόλυνση από τον EBV (71).

Ο EBV και η LMP-1 πρωτεΐνη ανιχνεύθηκαν σε αγγειοανοσοβλαστική λεμφαδενοπάθεια T-NHL (76-78). Σε ένα μεγάλο αριθμό περιπτώσεων T λεμφωμάτων ανιχνεύθηκε ο EBV με τις τεχνικές PCR (50%) ή με RISH(30%). Η LMP-1 πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε 15% των περιπτώσεων. Η έκφραση της σημαίνει πιο επιθετική συμπεριφορά στην ομάδα αυτή των T-NHL.

Πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν ότι ο ιός σχετίζεται με εξωλεμφαδενικές υπερπλασίες T κυττάρων που περιγράφονται με τον όρο αγγειοανοσο-υπερπλαστικές καταστάσεις(79).

Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται η λεμφματοειδής κοκκιωμάτωση και το κοκκίωμα της μέσης γραμμής που τώρα θεωρούνται λεμφώματα. (80-83).

Πάντως, έκφραση της LMP-1 πρωτεΐνης δε βρέθηκε σε όλες τις παραπάνω οντότητες.



Ο EBV επίσης ανιχνεύθηκε σε μερικά T μη-Hodgkin λεμφώματα του γαστρεντερικού (84), ενώ είναι πολύ σπάνιος στα B μη-Hodgkin λεμφώματα της ίδιας περιοχής.

Ο EBV σε ελάχιστες περιπτώσεις βρέθηκε σε B μη-Hodgkin λεμφώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος σε ασθενείς χωρίς προϋπάρχουσα ανοσοανεπάρκεια (85).

Συμπερασματικά, για τη μελέτη της σχέσης του EBV με τα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη την περιοχή της ανάπτυξης του όγκου, τον ιστολογικό τύπο και την προέλευση από την B ή T κυτταρική σειρά (86).

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ EBV**

- 1) Klein G. Cell 58:5-8, 1989.
- 2) Rocchi G et al. N Eng J. Med 296:132,1977.
- 3) Sixbey J.W et al. N Eng J Med 310:1225-1230,1984.
- 4) Wolf H et al. J Virol 51:795-798, 1984.
- 5) Nilsson K et al. Int J Cancer 8:443-450, 1971.
- 6) Yao QY et al. Int J. Cancer 43:67-71, 1989.
- 7) Dillner J et al. Adv Cancer Res 50:95-158, 1988.
- 8) Herbst H et al. Blood 78:2666-2673,1991.
- 9) Howe JG et al. Proc. Natl Acad Sci USA 83:9006,1986.
- 10) Howe JG et al. Cell 57:825,1989.
- 11) Wang F et al. J.Virol 64:2309-2318,1990.
- 12) Grogan E et al. Proc Natl Acad Sci USA 84:1332-1336, 1987.
- 13) Miller G. J.I nfect Dis 161:833-844,1990.
- 14) Henle W et al. Epstein MA, Achong BG(eds) Springer, Berlin Heidelberg NewYork p.61,1979.
- 15) Menezes J. et al. Ablashi DV et al.(eds) Humana Press p.179, 1989.
- 16) Herbst H et al. Crit Rev Oncog. 4:191-239, 1993.
- 17) Henle W et al. Engl. J. Med 288(5):263-264, 1973.
- 18) Niedobitek G et al. Hum. Pathol. 20:796,1989.
- 19) Sullivan LJ. Seminars in Hematology 25:269-278, 1988.
- 20) Zur Hausen ET AL. Nature 288:1056-1058,1970.
- 21) Billaud M et al. Blood 75:1827-1833, 1990.
- 22) Klein G. Cell 58:5-8, 1989.
- 23) Gregory CD et al. J.Exp. Med. 167:1811-1824, 1988.
- 24) Wolf H et al Nature 244:245-247, 1973.
- 25) Kuper CF et al Immunol. Today 13:219-224,1992.
- 26) Niedobitek G et al. J. Pathol. 165:17-24,1991.
- 27) Weiss LM et al. Am. J. Surg. Pathol. 13:625-631, 1989.
- 28) Young LS et al J. Gen Virol. 69:1051-1065, 1988.
- 29) Niedobitek G et al. Am. J. Pathol. 140(4): 879-887, 1992.

- 30) Harabuchi Y et al. Lancet 335:128-130,1990.
- 31) Niedobitek G et al. Lancet 343(5): 333-335, 1994.
- 32)Saemundsen AK. Et al. Br. J. Cancer 46:721-728, 1982.
- 33)Saw D et al. Hum.Pathol. 17:914-923, 1986.
- 34)Krishnamurthy S et al. Hum. Pathol. 18:986-996, 1987.
- 35)Burke AP et al. N. Engl.J. Med. 312:1296-1299, 1985.
- 36)Butler A. et al. Am. J. Surg. Pathol. 13:632-639, 1989.
- 37)Burke AP et al. Mod. Pathol. 3:377-380, 1990.
- 38)Borisch-Chappuis B et al. Am. J. Pathol. 136:751-758, 1990.
- 39)Hamilton-Dutoit SJ. Et al. Am. J. Pathol. 138(1):149-163, 1991.
- 40)Hamilton-Dutoit SJ. Et al. Am. J. Pathol. 143:1072-1085, 1993.
- 41)Pilesen G. Et al. J. Pathol. 165:289-299, 1991.
- 42)Hamilton-Dutoit SJ. Et al. Blood 82:619-624, 1993.
- 43)Mueller N et al. N. Eng. J. Med 320:689-695, 1989.
- 44)Weiss LM et al. Am. J. Pathol. 134:651-659, 1989.
- 45)Gratama JW et al. Int. J. Cancer 47:188-192, 1991.
- 46)Katz BZ et al. J. Infect. Dis. 160:589-598, 1989.
- 47)Patton DF et al. Transplantation 49:1080-1084, 1990.
- 48)Nakanishi M. et al. Cancer 72:1376-1381, 1993.
- 49)Young LS et al. N. Eng. J. Med 321:1080-1985, 1989.
- 50)Cen H et al. Blood 81:1393-1403, 1993.
- 51)Thomas JA et al. Transplant 49:944-953, 1990.
- 52)Kanavaros P. Et al. Hum. Pathol. 24:725-729, 1993.
- 53)Karameris A et al. Pathol. Res. Pract. 188:310-314, 1992.
- 54)Jiwa NM et al. J.Pathol. 169:129-136, 1986.
- 55)Brousset P. Et al. Blood 82:872-876, 1993.
- 56)Murray P. Et al. J. of Pathol. 166:1-5, 1992.
- 57)Weiss LM et al. Am. J.Pathol. 129:86-91, 1987.
- 58)Staal SP et al. Am. J. Clin. Pathol. 91:1-5, 1989.
- 59)Anagnostopoulos I. Et al. Blood 74: 810-816, 1989.
- 60)Delsol G. Et al. Am. J. Pathol. 140:247-253, 1992.
- 61)Herbst H. Et al. Am. J. Pathol. 137:13-18, 1990.
- 62)Brousset P et al. Blood 77:1781-1787, 1991.
- 63)Weiss LM et al. N. Engl. J. Med 320:502-506, 1989.

- 64)**Pallesen G. Et al. Lancet 337:320-322, 1991.
- 65)**Herbst H. et al. Lancet 337:420-422, 1991
- 66)**Herbst H et al Proc. Natl. Acad Sci USA 88:4766-4770,1991.
- 67)**Vestlev PM et al. Int. J. Cancer 50:670-671, 1992.
- 68)**Su IJ. Et al. Blood 77:799-808, 1991.
- 69)**Zhou NG et al. Histopathology 24:115-122, 1993.
- 70)**De Bruin PC et al. Histopathology 23:509-518, 1993.
- 71)**Jones GF et al. Engl. J. Med 318:733-741,1988.
- 72)**Oshima K. et al. Virchows Arch. B Cell Pathol. 59:383-389,1990.
- 73)**Herbst H et al. Blood 78:2666-2673,1991.
- 74)**Kanavaros P. et al. J.Pathol. 168:307-315, 1992.
- 75)**Hamilton-Dutoit et al. Am. J.Pathol. 140:1315-1325, 1992.
- 76)**Medeiros LJ et al. Am. J. Pathol. 16:439-447, 1992.
- 77)**Medeiros LJ et al. Hum. Pathol. 22:1150-1157, 1991.
- 78)**Anagnostopoulos I. Et al. Blood 80:1804-1812, 1986.
- 79)**Lipford EH. Et al. Blood 72:1674-1681, 1988.
- 80)**Ho FCS et al. Hematol. Oncol. 8:271-281, 1990.
- 81)**Harabuchi Y et al. Lancet 335:128-130, 1990.
- 82)**Kanavaros P et al. Blood 81:2688-2695, 1993.
- 83)**Sabourin JC. et al. Am. J. Surg. Pathol. 17:995-1002, 1993.
- 84)**Pan L. et al. J. Pathol. 170:137-143,1993.
- 85)**Gerdes JF. et al. J.Clin. Pathol. 45:587-590,1992.
- 86)**Kanavaros P. et al. Leukemia and Lymphoma 18:27-34, 1995.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **Υλικό και μέθοδοι**

Τα **87** περιστατικά **λεμφαδενικών NHLs** ελήφθησαν από τα αρχεία των Παθολογοανατομικών Εργαστηρίων ΠΕΠΑΓΝΗ και ΒΕΝΙΖΕΛΕΙΟΥ. Ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την (πλέον προσφάτως) ενημερωμένη κατάταξη του Κιέλου(1988) σε:

**52** υψηλής κακοήθειας λεμφώματα (**47 B-NHLs** και **5 T-NHLs**) και **35** χαμηλής κακοήθειας λεμφώματα (**32 B-NHLs** και **3 T-NHLs**).

Αναλυτικότερα τα παραπάνω χαρακτηρίστηκαν ως:

**18** λεμφοζιδιακά κεντροβλαστικά/κεντροκυτταρικά B-NHLs

**9** ανοσοκυττώματα

**2** λεμφοκυτταρικά B-NHLs

**3** κεντροκυτταρικά (μανδύα) B-NHLs

**39** κεντροβλαστικά B-NHLs

**2** τύπου Burkitt B-NHLs

**3** αγγειοανοσοβλαστικά T-NHLs

**4** ανοσοβλαστικά B-NHLs

**3** πολύμορφα από μεσαία και μεγάλα κύτταρα T-NHLs

**2** αναπλαστικά από μεγάλα κύτταρα B-NHLs και

**2** αναπλαστικά από μεγάλα κύτταρα T-NHLs.

Χρησιμοποιήθηκαν **4** αντιδραστικοί λεμφαδένες ως μάρτυρες.

Ο ανοσοφαινοτυπικός χαρακτηρισμός των λεμφωμάτων έγινε με τομές παραφίνης με τα ακόλουθα αντισώματα:CD45/ LCA, CD20/ L26, CD45RO/OPD4, CD45RO/UCHL1, CD15, CD30, CD79α, CD3.

Στα λεμφώματα με πλασματοκυτταρική διαφοροποίηση έγινε έλεγχος για κυτταροπλασματικές ανοσοσφαιρίνες IgM, IgG, IgA, κ και λ και έλεγχος με

in situ υβριδισμό για κ και λ ανοσοσφαιρίνες. Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB (Ki67) ελέγχθηκε σε όλες τις περιπτώσεις.

Από τα ίδια επίσης αρχεία ελήφθησαν **27 γαστρικά MALT-λεμφώματα** (MALT=βλεννογονοεξαρτώμενος λεμφικός ιστός) .

Τα **26 B-MALT** λεμφώματα είχαν ταξινομηθεί σε:

**21** περιπτώσεις υψηλής κακοήθειας

**6** περιπτώσεις χαμηλής κακοήθειας

**Το ένα T- MALT** λέμφωμα ήταν υψηλής κακοήθειας.

Μελετήθηκαν επίσης **11 λεμφώματα δέρματος** που είχαν ταξινομηθεί ως:

**2 B-**φαινοτύπου χαμηλής κακοήθειας

**9 T-** φαινοτύπου από τα οποία **3** ήταν υψηλής κακοήθειας και

**6** χαμηλής κακοήθειας του τύπου της σπογγοειδούς μυκητίασης.

**Τέλος, 5 λεμφώματα ρινοφαρυγγικής κοιλότητας** ταξινομήθηκαν ως

**3 B** και **2T/NK λεμφώματα** και χαρακτηρίστηκαν όλα ως λεμφώματα υψηλής κακοήθειας.

### **Τεχνική ανοσοϊστοχημείας**

Ανοσοϊστοχημική χρώση εφαρμόστηκε σε τομές παραφίνης, μονιμοποιημένες σε φορμόλη χρησιμοποιώντας την μέθοδο APAAP (αλκαλική φωσφατάση). Εγινε απευθείας εφαρμογή μονοκλωνικών αντισωμάτων για την ανίχνευση των πρωτεϊνών bcl-2(Dako), mdm-2 (Oncogene), p53(Dako), LMP-1(EBV) (Dako) και p21/waf1(Oncogene) σε αραιώση 1/100 επί 3ωρο. Τα σύμπλοκα (πολυμερή) bridging rabbit antimouse (Z259) και APAAP (D314) αγοράστηκαν από την Dako. Όλες οι τομές θερμάνθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα νιτρικού άλατος 0,01 pH 6 σε φούρνο μικροκυμάτων πριν γίνει η επώαση με όλα τα αντισώματα που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Τομές παραφίνης από λεμφαδένα ασθενούς με νόσο Hodgkin ,γνωστού όντος του γεγονότος ότι ήταν θετικές στις p53, mdm2, p21/waf1, bcl-2 και LMP-1 πρωτεΐνες, περιελήφθησαν στην δοκιμασία εφαρμογής ανοσοϊστοχημείας ως θετικοί μάρτυρες.

Αρνητικοί μάρτυρες επίσης περιελήφθησαν παραλείποντας το πρωτοταγές αντίσωμα.

Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε ποιοτικός έλεγχος για την κατάσταση διατήρησης των αντιγόνων με ανοσοχρώση για PCNA ( της Oncogene).

Θετική

ανοσοχρώση χαρακτηρίζεται εκείνη όπου τουλάχιστον 5% των κυττάρων παρουσιάζουν ανοσοαντίδραση.

### **Τεχνική RNA in situ υβριδισμού**

Τομές πάχους 4μ καλά αποπαραφινωμένες σε ξυλόλη, ενυδατώνονται σε κατιούσα οινόπνευμάτων, στεγνώνονται στον αέρα και στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε απεσταγμένο νερό. Οι τομές επωάζονται με πρωτεΐνωση Κ στους 37° C για 30 λεπτά σε μία συγκέντρωση 4-5μg/ml σε 0,75 M Tris buffer, το οποίο περιέχει 1Mm CaCl<sub>2</sub> (pH:7,6). Μετά, οι τομές εμβαπτίζονται σε απεσταγμένο νερό διαδοχικά σε 99% οινόπνευμα. Στη συνέχεια στεγνώνονται και προστίθενται 1-2 σταγόνες από EBV (EBER<sub>1/2</sub>) ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία είναι συνδεδεμένα με φλουορεσεΐνη ( FITC, YO17 Dako) καλύπτονται με καλυπτρίδες και επωάζονται για 2 ώρες στους 37° C σε υγρό περιβάλλον.

Αφού ολοκληρωθεί το στάδιο του υβριδισμού οι τομές εμβαπτίζονται σε TBS που περιέχει 1% Triton X-100 και ακολούθως σε διάλυμα TBS. Για την ανίχνευση των υβριδίων που έχουν συνδεθεί με τη φλουορεσεΐνη, οι τομές επωάζονται με αντίσωμα κουνελιού συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση και σεσημασμένου με αντι-φλουορεσεΐνη (rabbit F(ab) anti FITC/AP) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά οι τομές ξεπλένονται με TBS και εμβαπτίζονται μια φορά στο διάλυμα του υποστρώματος(substrate buffer) το οποίο περιέχει 0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 50Mm MgCl<sub>2</sub>, pH 9,0. Για την ανίχνευση της αντίδρασης οι τομές επωάζονται σε υπόστρωμα ενζύμου, στο οποίο προστίθεται μικρή ποσότητα αναστολέα (Levamisol) για 30-60 λεπτά. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήσαμε ήταν το 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate (BCIP) και το Nitroblue Tetrazolium (NBT) ως χρωμογόνο.

Οι τομές καλύπτονται με καλυπτρίδες και η θετική χρώση αναγνωρίζεται στο μικροσκόπιο ως σκούρα μπλε-μαύρη χρωστική στη θέση του υβριδισμού. Θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε περίπτωση λεμφώματος Hodgkin στην οποία υπήρχε ο ιός Epstein-Barr όπως είχε αποδειχθεί με RNA in situ υβριδισμό ή με PCR. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές στις οποίες τα EBV ολιγονουκλεοτίδια δεν είχαν τοποθετηθεί.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. Αποτελέσματα της έκφρασης των p53, mdm2, p21 και bcl-2 (Εικόνες 1-8)

#### A. Λεμφαδενικά λεμφώματα (Πίνακας 1)

- **Έκφραση της p53 πρωτεΐνης:** Ανιχνεύθηκε πυρηνικό p53 αντιγόνο σε **39** από τις **87** περιπτώσεις NHLs.

Όσον αφορά στο συσχετισμό της έκφρασης του p53 με τον ιστολογικό τύπο, βρέθηκε θετική έκφραση σε **3** από **35** χαμηλής κακοήθειας και σε **36** από **52** υψηλής κακοήθειας NHLs.

Τα ποσοστά των p53 θετικών λεμφοκυττάρων ήταν 1-5%, 5-25%, 25-50% και >50% σε **25**, **5**, **4** και **2** περιστατικά αντίστοιχα των υψηλής κακοήθειας NHLs. Τα **3** χαμηλής κακοήθειας NHLs ανέδειξαν θετικότητα στο p53 σε ποσοστό 1-5% των νεοπλασματικών κυττάρων.

Σπάνια p53 θετικά κύτταρα βρέθηκαν σε βλαστικά κέντρα και σε περιοχές μεταξύ των βλαστικών κέντρων σε όλους τους αντιδραστικούς λεμφαδένες.

- **Έκφραση της mdm2 πρωτεΐνης:** Ανιχνεύθηκε πυρηνικό mdm-2 αντιγόνο σε **23** από τα **87** NHLs

**21** από τα **52** υψηλής κακοήθειας και **2** από τα **35** χαμηλής κακοήθειας λεμφώματα ανέδειξαν θετικότητα στην έκφραση της mdm2 πρωτεΐνης. mdm-2 θετικά κύτταρα βρέθηκαν σε ποσοστό 1-5% σε όλα.

Σε 4 υψηλής κακοήθειας NHLs το ποσοστό θετικότητας ήταν 5-25% και σε ένα μόνο από αυτά το ποσοστό θετικότητας ήταν 25-50%.

Σπάνια mdm-2 θετικά κύτταρα βρέθηκαν σε βλαστικά κέντρα και σε περιοχές μεταξύ των βλαστικών κέντρων σε όλους τους αντιδραστικούς λεμφαδένες.

- **Έκφραση της p21/waf1 πρωτεΐνης:** Ανιχνεύθηκε πυρηνικό p21 σε **34** από τα **87** NHLs

**31** από τα **52** υψηλής κακοήθειας και **3** από τα **35** χαμηλής κακοήθειας λεμφώματα ανέδειξαν θετικότητα στην έκφραση της p21 πρωτεΐνης.

p21 θετικά κύτταρα βρέθηκαν σε ποσοστό 1-5% σε όλες τις περιπτώσεις.

Σε 6 υψηλής κακοήθειας NHLs το ποσοστό θετικότητας ήταν 5-25%. Σπάνια p21 θετικά κύτταρα βρέθηκαν σε βλαστικά κέντρα και σε περιοχές μεταξύ των βλαστικών κέντρων σε όλους τους αντιδραστικούς λεμφαδένες.

- **Συσχετισμός της έκφρασης p53,mdm2 και p21:**

Παράλληλη **p53 / mdm2/ p21/waf1** έκφραση βρέθηκε σε **23 από τα 87** περιστατικά NHLs **21** ήταν υψηλής κακοήθειας και **2** χαμηλής κακοήθειας.

Ασύμφωνη **p53 θετική / mdm-2 αρνητική** έκφραση βρέθηκε σε **16 από τις 87** περιπτώσεις λεμφωμάτων.

**15** από αυτές ήταν υψηλής κακοήθειας και **1** χαμηλής κακοήθειας.

**11 από τις 16** αυτές περιπτώσεις ανέδειξαν επίσης θετικότητα στην έκφραση της **p21/ waf1** πρωτεΐνης ενώ 5 ήταν αρνητικές.

Οι πρωτεΐνες mdm-2 και p21/ waf1 δεν εκφράζονταν, επί τη απουσία εκφράσεως της πρωτεΐνης p53.

- **Έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης:** Από τα **35** χαμηλής κακοήθειας λεμφώματα η πρωτεΐνη bcl-2 βρέθηκε θετική στα **31** και από τα οποία τα **18** ήταν λεμφοζιδιακά B-NHL, **6** ανοσοκυττώματα, **3** κεντροκυτταρικά, **1** λεμφοκυτταρικό και **3** αγγειοανοσοβλαστικά T-NHL).

Από τα **52** υψηλής κακοήθειας λεμφώματα η πρωτεΐνη bcl-2 βρέθηκε θετική στα **23** τα οποία ήταν υψηλής κακοήθειας B-NHL.

Συνολικά **54 από τα 87** NHL ήταν bcl-2 θετικά.

Ο συσχετισμός της θετικότητας της πρωτεΐνης bcl-2 με τις πρωτεΐνες p53, mdm-2 και p21, δεν ανέδειξε ιδιαίτερη θετική ή αρνητική σχέση μεταξύ τους.

## **B. Εξωλεμφαδενικά λεμφώματα (Πίνακας 2)**

- **Έκφραση p53 πρωτεΐνης:** Η πρωτεΐνη p53 βρέθηκε σε **5 από τα 21** B-NHL

MALT υψηλής κακοήθειας, σε **1 από τα 3** T-υψηλής κακοήθειας λεμφώματα δέρματος και σε **1 από τα 5** υψηλής κακοήθειας B-λεμφώματα ρινοφάρυγγα.

- **Εκφραση mdm-2 πρωτεΐνης:** Η πρωτεΐνη mdm-2 βρέθηκε σε **2 από τα 21**

B-NHL MALT υψηλής κακοήθειας και **1 από τα 5** υψηλής κακοήθειας B-λεμφώματα ρινοφάρυγγα.

- **Εκφραση p21 πρωτεΐνης:** Η πρωτεΐνη p21 βρέθηκε σε **3 από τα 21** B-NHL MALT υψηλής κακοήθειας και **1 από τα 5** υψηλής κακοήθειας B-λεμφώματα ρινοφάρυγγα.
- **Εκφραση bcl-2 πρωτεΐνης:** Η πρωτεΐνη bcl-2 βρέθηκε σε **6 στα 6** B-NHL MALT χαμηλής κακοήθειας, **2 από τα 21** B-NHL MALT υψηλής κακοήθειας και **3 από τα 6** T-λεμφώματα δέρματος χαμηλής κακοήθειας.
- Συσχετισμός της έκφρασης των **bcl-2, p53, mdm-2** και **p21:** Δεν βρέθηκαν ιδιαίτερες θετικές ή αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ των εκφράσεων αυτών των πρωτεϊνών σε εξωλεμφαδενικά λεμφώματα.

## 2. Αποτελέσματα μελέτης EBV (Πίνακας3) (Εικόνες 9-10)

Από τα **87 λεμφαδενικά** λεμφώματα ο ιός EBV βρέθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα μόνο σε **2** υψηλής κακοήθειας B-λεμφώματα τα οποία ήταν κεντροβλαστικά και σε **4** T-λεμφώματα (**3** αγγειοανοσοβλαστικά και **1** πολύμορφο).

Οι περιπτώσεις αυτές ήταν **EBER+/ LMP-1+**.

Από τα **43 εξωλεμφαδενικά** λεμφώματα ο ιός EBV βρέθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα, μόνο σε **1** υψηλής κακοήθειας B-MALT λέμφωμα στομάχου και σε **2** υψηλής κακοήθειας T-NK λεμφώματα του ρινοφάρυγγα.

Αυτές οι περιπτώσεις ήταν επίσης **EBER+/ LMP-1+**.

Αξιοσημείωτο ήταν το εύρημα ότι από τα EBV θετικά λεμφώματα οι δύο περιπτώσεις T-NK λεμφωμάτων του ρινοφάρυγγα ήταν θετικές για EBV σε όλα σχεδόν τα νεοπλασματικά κύτταρα, ενώ στα υπόλοιπα EBV θετικά

λεμφώματα ένα μόνο τμήμα των κακοήθων κυττάρων ήταν EBV θετικό και τα οποία τώρα θεωρούνται NK-λεμφώματα.

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν μία συσχέτιση μεταξύ EBV και T-ανοσοφαινότυπου στα λεμφαδενικά και εξωλεμφαδενικά λεμφώματα καθώς και μεταξύ EBV και NK-ρινοφαρυγγικών λεμφωμάτων στα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα. Από μελέτες μας επίσης παρατηρήσαμε ότι ο ιός EBV δεν βρέθηκε τόσο σε 30 περιπτώσεις T-λεμφωμάτων δέρματος (Kanavaros et al, Pathol Res Practice 190:767, 1994) όσο και σε 15 περιπτώσεις λεμφαδενικών T-λεμφοβλαστικών λεμφωμάτων της παιδικής ηλικίας (Kanavaros et al, Pathol Res Practice 190:1026, 1994).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν απουσία συσχετισμού του ιού EBV με T-δερματικά λεμφώματα και T-λεμφοβλαστικά λεμφαδενικά λεμφώματα. Επιπλέον για να διερευνήσουμε συγκριτικά το ποσοστό θετικότητας των NHL για τον EBV χρησιμοποιήσαμε αποτελέσματα από προηγούμενες εργασίες με τα Πανεπιστήμια PARIS 12(Γαλλία) και Free University (Ολλανδία) τα οποία συνοψίζονται στην εργασία ( P.Kanavaros et al Leukemia and Lymphoma 1995.18,27-34).

Συνοπτικά, και τα 22 T/NK λεμφώματα της ρινικής κοιλότητας, 2 από τα 8 T-λεμφώματα του πνεύμονα, 2 από τα 5 T-λεμφώματα του δακτυλίου Waldeyer και 1 από τα 15 T-λεμφώματα του γαστρεντερικού σωλήνα ήταν EBER ½ θετικά και LMP-1 θετικά.

Αντίθετα, μόνο 2 από τα 74 εξωλεμφαδενικά B-λεμφώματα ήταν EBER ½ θετικά χωρίς LMP-1 θετικότητα.

Από τα T-λεμφαδενικά λεμφώματα 15 από τις 45 περιπτώσεις ήταν EBER ½ θετικές και από αυτές οι 8 ήταν επίσης και LMP-1 θετικές.

Ενα ιδιαίτερα αξιοσημείωτο εύρημα ήταν η θετικότητα όλων των LMP-1 θετικών λεμφωμάτων τόσο από το υλικό του εργαστηρίου μας όσο και από εκείνο των άλλων εργαστηρίων για το CD30 αντιγόνο. Επομένως, η σχέση EBV/λεμφωμάτων θα μπορούσε να συνοψισθεί ως εξής:

- α)** Τα T-λεμφώματα είναι πολύ πιο συχνά EBV θετικά από τα B-λεμφώματα
- β)** Από το σύνολο των T-λεμφωμάτων, τα εξωλεμφαδενικά είναι πιο συχνά EBV θετικά από τα λεμφαδενικά.

γ) Από το σύνολο των T-λεμφαδενικών λεμφωμάτων, τα T/NK λεμφώματα της ρινικής κοιλότητας, ρινοφάρυγγα και παραρρινίων κόλπων είναι σχεδόν πάντα EBV θετικά.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γεγονός ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 είναι οι πιο συχνές γενετικές τροποποιήσεις, που έχουν μέχρι στιγμής αναγνωρισθεί στους ανθρώπινους όγκους (1-5).

Η έκφραση της πρωτεΐνης p53, είτε ως αποτέλεσμα μετάλλαξης του γονιδίου p53, είτε εξαιτίας της προσκόλλησης της σε άλλες κυτταρικές ή ιογενείς πρωτεΐνες, μπορεί να ανιχνευτεί από την ανοσοϊστοχημεία (4).

Ενας έμμεσος τρόπος να αναλύσουμε τις ιδιότητες του γονιδίου p53 είναι να διερευνήσουμε τις πρωτεΐνες που προήλθαν από το φυσικό τύπο του p53.

Μία από αυτές είναι η πρωτεΐνη mdm2, που σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με την p53 και κατόπιν αναστέλλει τη λειτουργία της p53.

Ο φυσικός τύπος του p53 μπορεί να προκαλέσει τη μεταγραφή της mdm2 μέσω της ύπαρξης ενός στοιχείου ευαίσθητου στην p53, στο πρώτο ιντρόνιο του γονιδίου mdm2.

Οι πρωτεΐνες p53 και mdm2 επηρεάζουν η μία την άλλη, διαμορφώνοντας έναν αυτορρυθμιζόμενο κύκλο ανατροφοδότησης (6-12).

Η πρωτεΐνη p21/waf1 προέρχεται από τον φυσικό τύπο της p53, που ενεργοποιεί τα συμπλέγματα κυκλινών-κινασών, τα οποία εμποδίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στην μετάβαση G1-S (13-16).

Υπάρχουν αποδείξεις ότι η p53, μετά από «βλάβη» του DNA, αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης p21, η οποία δεσμεύει τα συμπλέγματα κυκλινών-κινασών έχοντας ως αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος(RB) (13-16).

Επιπλέον η πρωτεΐνη p21/waf1 αναστέλλει τη δράση του πυρηνικού αντιγόνου του πολλαπλασιαζόμενου κυτάρου (PCNA), παρεμποδίζοντας την δημιουργία πανομοιότυπου αντιγράφου του DNA (17).

Στα κύτταρα των όγκων, που είτε έχουν χάσει την πρωτεΐνη p53, είτε περιέχουν μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53, τα επίπεδα της p21 έχουν σημαντικά ελαττωθεί ή η πρωτεΐνη αυτή λείπει. Αυτό θα μπορούσε να

έχει ως αποτέλεσμα τον αντικανονικό έλεγχο της μεταγραφής του DNA και της προόδου του κυτταρικού κύκλου.

Και οι δύο περιπτώσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην αστάθεια του γονιδιώματος, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ογκογένεση.

Προηγούμενες έρευνες σε μη-Hodgkin λεμφώματα (NHL) έδειξαν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης p53 είναι ένα συχνό εύρημα σε NHL υψηλού βαθμού κακοήθειας (4,5,18-19).

Η έκφραση της πρωτεΐνης p53 στα NHL μερικές φορές ακολουθεί τις μεταλλάξεις του γονιδίου p53 αλλά σε πολλές περιπτώσεις είναι ανεξάρτητη από τη μετάλλαξη (4,5,18-20).

Επιπλέον, η πρωτεΐνη mdm2 έχει ανιχνευθεί σε μερικά NHL υψηλού βαθμού, κακοήθειας αλλά λιγότερο συχνά από την πρωτεΐνη p53 (20).

Ο φυσικός τύπος του p53 είναι επίσης σε θέση να προκαλέσει τη μεταγραφή του γονιδίου mdm2. Το γονίδιο mdm2, που υπάρχει στο χρωμόσωμα 12q 13-14 του ανθρώπου, όταν ενισχυθεί ή υπερεκφραστεί, μπορεί να ενέχεται σε ογκογενετικές δράσεις(10,11). Το γονίδιο αυτό έχει βρεθεί ότι αναπτύσσεται στα σαρκώματα του ανθρώπινου οργανισμού, και στα γλοιώματα (23,24). Υπερεκφράζεται στο καρκίνωμα του μαστού, στην νόσο Hodgkin, σε οξείες λευχαιμίες, σε χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες, και σε λεμφώματα από B-κύτταρα(25-28). Κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη η οποία μπορεί να δεσμεύει την p53, παρεμποδίζοντας τον μεταγραφικό έλεγχο του p53 (8).

Με αφορμή αυτές τις πληροφορίες, ερευνήσαμε την έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21/waf1 στα NHL.

Αρχίζουμε τη συζήτηση με τα αποτελέσματα στα λεμφαδενικά λεμφώματα.

Παρατηρήσαμε ότι η έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21/waf1 σχετίζεται πιο συχνά με υψηλού βαθμού κακοήθειας (ΥΒ) NHL. Οι πρωτεΐνες αυτές βρέθηκαν σπάνια σε χαμηλού βαθμού κακοήθειας (ΧΒ) NHL.

Τα αποτελέσματα των p53, mdm2 που έχουμε, βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα και υποδηλώνουν ότι η έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21/waf1 είναι συνδεδεμένη με τους επιθετικούς ιστολογικούς τύπους των NHL (4,5,18,20,29-31).

Στη μελέτη μας βρέθηκαν δύο τύποι έκφρασης των πρωτεϊνών p53 / mdm2 .

**A)** Ταυτόχρονη έκφραση των πρωτεϊνών p53 και mdm2 σε 23 περιπτώσεις (21 υψηλού βαθμού και 2 χαμηλού βαθμού κακοήθειας NHL).

Όλες αυτές οι περιπτώσεις ήταν θετικές και στη πρωτεΐνη p21/waf1.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη mdm2 μπορεί να βρεθεί κυρίως στις περιπτώσεις με φυσικό τύπο του γονιδίου p53.

Συνεπώς, η ανεύρεση των πρωτεϊνών mdm2 και p21/waf1 στις περιπτώσεις αυτές των NHL υπαινίσσεται ότι το γονίδιο p53 δεν μεταλλάσσεται και ότι η έκφραση της mdm2 θα μπορούσε να είναι ένας από τους παράγοντες, που οδηγούν στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53.

Αυτό μπορεί να υποστηριχθεί από προηγούμενα ευρήματα (24-28), όπου από τις 17 περιπτώσεις NHL με υπερέκφραση του γονιδίου mdm2, οι 14 είχαν φυσικό τύπο p53. Το τελευταίο θα μπορούσε να αποδειχθεί ενδιαφέρον από την πλευρά της παθογένεσης των περιπτώσεων p53+/ mdm2+. Δεδομένου ότι η mdm2 μπορεί να παρεμποδίσει την ενεργοποίηση του p53 ως «μεσολαβητού», είναι πιθανόν η έκφραση να ενέχεται στην παθογένεση ορισμένων, υψηλού κυρίως βαθμού NHL, με το να αποσυντονίζει μηχανισμούς του κυτταρικού κύκλου που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη p53.

Προηγούμενες μελέτες έχουν ερευνήσει τους μοριακούς μηχανισμούς του αποσυντονισμού του γονιδίου mdm2 σε λεμφικά νεοπλασμάτα.

Με την μέθοδο Southern blot, μόνο μια περίπτωση λεμφοζιδιακού B-NHL είχε ενίσχυση του γονιδίου mdm2 από το σύνολο των 162 περιπτώσεων NHL και λεμφοκυτταρικών λευχαιμιών που εξετάστηκαν(26,27,30,31).

Αυτό δηλώνει ότι άλλοι μηχανισμοί, εκτός από την ενίσχυση, όπως αυξημένη μετάφραση του γονιδίου, μπορούν να παίξουν κάποιο ρόλο στο αποσυντονισμό

της έκφρασης του γονιδίου mdm2 σε NHL και λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες (26,27,32).

**B)** Έκφραση της πρωτεΐνης p53 χωρίς την έκφραση της πρωτεΐνης mdm2 σε 16 περιπτώσεις (15 YB και 1 XB NHL).



Ο τύπος αυτός (p53+/mdm2-) υποδηλώνει τον αποσυντονισμό του αυτορρυθμιζόμενου κύκλου ανατροφοδότησης, ο οποίος δημιουργείται από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών mdm2 και p53.

Πέντε από τις 15 περιπτώσεις υψηλού βαθμού κακοήθειας NHL ήταν p21 αρνητικές. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πιθανόν να έχουν συμβεί μεταλλάξεις του γονιδίου p53 ανίκανες να ενεργοποιήσουν τις πρωτεΐνες mdm2 και p21/waf1.

Αυτό μπορεί επίσης να υποστηριχθεί και από προηγούμενα ευρήματα δεδομένου ότι μερικές περιπτώσεις υψηλού βαθμού κακοήθειας NHL με τύπους των πρωτεϊνών p53+/mdm2- είχαν μεταλλάξεις του γονιδίου p53, όπως επίσης και από την ύπαρξη των μεταλλάξεων του γονιδίου p53 σε μια αναλογία μέχρι 45% υψηλού βαθμού κακοήθειας NHL (3,5,18-20,30).

Από αυτή την άποψη, είναι αξιοσημείωτο ότι μερικές από αυτές τις μεταλλάξεις βρέθηκαν στα εξόνια 4 ή 10, και όχι στις κλασσικές περιοχές (exons 5-8).

Οι υπόλοιπες 11 περιπτώσεις (10 YB και 1 XB NHL) είχαν τον τύπο p53+/mdm2-/p21+. Είναι πιθανόν, στις περιπτώσεις αυτές ο αποσυντονισμός του γονιδίου mdm2 να έχει συμβεί κατά την απουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου p53.

Εναλλακτικά, αν το γονίδιο p53 μεταλλάσσεται σε αυτές τις περιπτώσεις, τότε η έκφραση της πρωτεΐνης p21/waf1 ίσως να έχει πραγματοποιηθεί μέσω μιας οδού ανεξάρτητης της p53, δεδομένου ότι η έκφραση της p21 in vitro μπορεί να προκληθεί από παράγοντες διαφοροποίησης, σε in vitro αιμοποιητικά συστήματα αρνητικά στην p53 (33).

Παρόλα αυτά, πληροφορίες σχετικά με τα NHL δείχνουν ότι, τουλάχιστον στα νεοπλάσματα αυτά, τα υψηλά επίπεδα p21 συνδέονται με το φυσικό τύπο του γονιδίου της p53 (34).

Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι η έκφραση των πρωτεϊνών mdm2 ή p21/waf1 δεν ανιχνεύθηκε κατά την απουσία της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στα NHL.

Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα ότι η απουσία της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 δε θα επιτρέψει την ενεργοποίηση των mdm2 και p21/waf, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει έκφραση των mdm2 και p21/waf1 (6,7,10,13).

Όσον αφορά στα p53-/mdm2-/p21- NHL, είναι πιθανόν ότι το γονίδιο της p53

είναι φυσικού τύπου ή ότι το γονίδιο p53 μεταλλάσσεται αλλά δεν ενεργοποιείται εξαιτίας μεταλλάξεων χωρίς νόημα, ή μεταλλάξεων που οδηγούν στο μετατοπισμό του πλαισίου ανάγνωσης τους (4,20). Επιπλέον, η πιθανότητα ότι κάποια NHL με μεταλλάξεις της p53 δεν εκφράζουν ανοσοϊστοχημικά την p53, μπορεί να συνυπολογιστεί σε σχέση με προηγούμενα ευρήματα στα νεοπλάσματα αυτά.

Τέλος, είναι ενδιαφέρον να συγκρίνουμε τους διαφορετικούς τύπους της έκφρασης των πρωτεϊνών p53/mdm2/p21 των NHL με το σταθερό τύπο p53+/mdm2+/p21+ των κυττάρων Reed-Stemberg ο οποίος σε πρόσφατη μελέτη (34) ανεδείχθη σε όλες τις περιπτώσεις της νόσου Hodgkin (HD). Στην πρόσφατη αυτή μελέτη, υπάρχουν αποδείξεις ότι το γονίδιο της p53 στη νόσο Hodgkin λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο και επομένως ότι η μετάλλαξη του γονιδίου της p53 θα μπορούσε να είναι ένα δευτερεύον φαινόμενο στη HD το οποίο οδηγεί σε μετασχηματισμό σε μια πιο επιθετική παραλλαγή της HD ή σε ένα αναπλαστικό από μεγάλα κύτταρα λέμφωμα.

Συνεκτιμώντας όλες τις προαναφερθείσες πληροφορίες και τα ευρήματα μας συνάγουμε ότι η ανοσοϊστολογική έρευνα της έκφρασης των πρωτεϊνών p53,mdm2 και p21/waf1 είναι δυνατόν να δώσει έμμεσες πληροφορίες για την κατάσταση του γονιδίου της p53 στα λεμφώματα ενώ παράλληλα αποτελεί χρήσιμο βοήθημα στις μελέτες της μοριακής βιολογίας.

Επιπλέον η σύγκριση της έκφρασης των πρωτεϊνών p53/mdm2/ p21 μεταξύ λεμφαδενικών και MALT-λεμφωμάτων δεν κατέδειξε ιδιαίτερα σημαντικές αποκλίσεις. Η έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21 ήταν συχνότερη στα υψηλής κακοήθειας MALT λεμφώματα.

Συνοπτικά, η μελέτη μας δείχνει ότι υπάρχουν διαφορετικοί τύποι αρμονικής ή δυσαρμονικής έκφρασης των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21 στα NHL, συμπεραίνοντας έτσι ότι η διαταραχή της διόδου καταστολής της ανάπτυξης που έχει σχέση με αυτές τις πρωτεΐνες μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση κάποιων NHL.

Ενας περαιτέρω στόχος αυτής της μελέτης ήταν να καθοριστεί η έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης στα λεμφώματα και να συγκριθεί η έκφραση αυτής μεταξύ λεμφαδενικών και εξωλεμφαδενικών λεμφωμάτων.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι έκφραση της bcl-2 ογκοπρωτεΐνης βρίσκεται εκτός από τα οζώδη Β-λεμφώματα και σε ένα ποσοστό διαχύτων Β-λεμφωμάτων υψηλής ιστολογικά κακοήθειας, Τ-λεμφωμάτων και στα κύτταρα Reed-Sternberg της νόσου Hodgkin, ανεξάρτητα από την παρουσία διαμετάθεσης 14:18 (41).

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι οι 6 περιπτώσεις χαμηλής ιστολογικά κακοήθειας γαστρικού Β-λεμφώματος MALT ήταν θετικές για την ογκοπρωτεΐνη bcl-2.

Η ανοσοϊστοχημική θετικότητα είχε κυτταροπλασματική εντόπιση. Σε κάποιες περιπτώσεις ήταν δυνατή η ανάδειξη λεμφοεπιθηλιακών βλαβών μέσω της bcl-2

θετικότητας νεοπλασματικών λεμφικών κυττάρων εντός των γαστρικών αδενίων.

Ενα ενδιαφέρον εύρημα σε δύο περιπτώσεις χαμηλής κακοήθειας γαστρικών Β-λεμφωμάτων MALT ήταν η παρουσία ορισμένων διασπάρτων bcl-2 αρνητικών βλαστικών νεοπλασματικών κυττάρων.

Σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρήθηκαν αντιδραστικά δευτερογενή λεμφοζίδια στα οποία τα κύτταρα του βλαστικού κέντρου ήταν αρνητικά για bcl-2 ενώ τα κύτταρα της ζώνης του μανδύα ήταν bcl-2 θετικά.

Επιπλέον με την ανοσοϊστοχημική χρώση για bcl-2 ήταν δυνατή σε κάποιες περιπτώσεις, η αναγνώριση αντιδραστικών δευτερογενών λεμφοζιδίων τα οποία δεν ήταν ορατά με τις συμβατικές ιστολογικές χρώσεις.

Ολες πλην δύο περιπτώσεων υψηλής ιστολογικά κακοήθειας Β-γαστρικών λεμφωμάτων MALT ήταν αρνητικές για την bcl-2 ογκοπρωτεΐνη. Σε δύο περιπτώσεις ένα μέρος των μεγάλου μεγέθους λεμφικών νεοπλασματικών κυττάρων ήταν bcl-2 θετικό. Σε δύο περιπτώσεις υψηλής κακοήθειας Β-γαστρικών λεμφωμάτων MALT αναγνωρίστηκε περιοχή χαμηλής ιστολογικά κακοήθειας η οποία ήταν bcl-2 θετική.

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα συμπεραίνουμε ότι η ογκοπρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται στα χαμηλής ιστολογικά κακοήθειας γαστρικά Β-λεμφώματα MALT ενώ είναι απύσα στη πλειοψηφία των υψηλής κακοήθειας περιπτώσεων.

Υπό το φως προηγούμενων μελετών και των ευρημάτων μας (42) που έδειξαν ότι ένα σημαντικό ποσοστό λεμφαδενικών B-λεμφωμάτων υψηλής ιστολογικά κακοήθειας εκφράζει την bcl-2 ογκοπρωτεΐνη, τα αρνητικά ευρήματα μας στα αντίστοιχα MALT λεμφώματα δείχνουν ότι η ρύθμιση του bcl-2 γονιδίου είναι διαφορετική στα λεμφαδενικά από ότι στα MALT λεμφώματα υψηλής ιστολογικά κακοήθειας.

Τα ευρήματα μας υπαινίσσονται επίσης ότι B-λεμφώματα υψηλής κακοήθειας με ίδια ιστολογική εικόνα αλλά διαφορετική εντόπιση (λεμφαδενικά versus MALT) έχουν διαφορετική παθογένεση.

Επιπλέον μελετήσαμε στη παρούσα εργασία τη σχέση του ιού EBV με τα μη-Hodgkin λεμφώματα.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν συσχέτιση αφενός μεταξύ EBV και T ή NK ανοσοφαινοτύπου στα λεμφαδενικά και εξωλεμφαδενικά λεμφώματα και αφετέρου μεταξύ EBV και T/ NK λεμφωμάτων ρινοφάρυγγα στα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα, ενώ παράλληλα δεν διαπιστώθηκε συσχέτισμός των T- δερματικών λεμφωμάτων και T- λεμφοβλαστικών λεμφαδενικών λεμφωμάτων με τον EBV.

Όσον αφορά τη διερεύνηση του ρόλου του EBV στα λεμφώματα χρησιμοποιώντας τις τεχνικές του RNA in situ (ISH) υβριδισμού και της ανοσοϊστοχημείας για την ανίχνευση των EBER-RNA και της πρωτεΐνης LMP-1 δείξαμε ότι ο ιός EBV εντοπιζόταν στα νεοπλασματικά κύτταρα των non-Hodgkin λεμφωμάτων.

Με την ανοσοϊστοχημεία δείξαμε ότι η LMP-1 πρωτεΐνη εκφραζόταν στα νεοπλασματικά κύτταρα των non-Hodgkin λεμφωμάτων, αν και το ποσοστό της LMP-1 θετικότητας ήταν αρκετά μικρότερο από εκείνο που βρέθηκε στη νόσο του Hodgkin (23 από τις 41 περιπτώσεις Hodgkin του εργαστηρίου μας ήταν EBV-θετικές).

Με βάση το σύνολο αυτών των δεδομένων, και στο μέτρο που η πρωτεΐνη LMP-1 έχει ενοχοποιηθεί για in vitro ογκογόνο δραστηριότητα, υποστηρίζουμε

την άποψη ότι ο EBV συμμετέχει στη παθογένεση λίγων μη- Hodgkin λεμφωμάτων που δεν σχετίζονται με προϋπάρχουσα διαγνωσμένη ανοσοανεπάρκεια.

Το ερώτημα αν ο EBV έχει έμμεση ή άμεση δράση στη παθογένεση αυτών των λεμφωμάτων βρίσκεται υπό διερεύνηση.

Ενα ενδιαφέρον εύρημα ήταν η υψηλή συχνότητα του EBV σε CD30 θετικά λεμφώματα. Αυτή η παρατήρηση, με βάση τα προηγούμενα μας δεδομένα ότι τα EBV θετικά κύτταρα της νόσου του Hodgkin (Reed-Sternberg cells) είναι CD30 θετικά, υπαινίσσεται ένα συσχετισμό μεταξύ της έκφρασης του δείκτη «ενεργοποίησης» CD30 και του EBV, η οποία είχε ήδη ανευρεθεί σε

in vitro μελέτες.

Τα δεδομένα αυτά συνεπώς υπαινίσσονται ένα συσχετισμό μεταξύ νόσου Hodgkin και CD30 θετικών (αναπλαστικών και μη) λεμφωμάτων, με τον ιό EBV (43,44).

Με βάση νεότερα δεδομένα ότι το CD30 μόριο μπορεί να είναι υποδοχέας για αυξητικούς παράγοντες, οι παρατηρήσεις αυτές μπορούν να ενταχθούν σε ένα γενικότερο «υποθετικό» σχήμα όπου ο ιός EBV μέσω της επαγωγής του μορίου CD30 έχει τη δυνατότητα να επηρεάζει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό νεοπλασματικών λεμφικών κυττάρων.

Στα πλαίσια της διερεύνησης των σχέσεων EBV και λεμφωμάτων είχαμε επίσης την ευκαιρία να παρατηρήσουμε ότι όλα τα T/ NK λεμφώματα της ρινικής κοιλότητας και των παραρινικών κόλπων είναι θετικά για τον EBV και εκφράζουν την «ογκογόνο» πρωτεΐνη LMP-1(45,46). Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι και στους Δυτικούς πληθυσμούς, όπως και στους πληθυσμούς από την Απω Ανατολή, τα λεμφώματα αυτής της ανατομικής περιοχής έχουν μια σταθερή συσχέτιση με τον EBV.

Παράλληλα η ανάλυση του ανοσοφαινοτύπου αυτών των λεμφωμάτων (43-46) έδειξε ότι τα περισσότερα εκφράζουν δείκτες NK (Natural Killer) όπως CD56 και δεν εκφράζουν τα αντιγόνα CD3, TCR αβ και TCR γδ.

Θεωρούμε λοιπόν ότι τα T/ NK λεμφώματα της ρινικής κοιλότητας είναι μια διακριτή, νέα οντότητα στο πεδίο των λεμφωμάτων.

Αυτή η νέα οντότητα με βάση τα νεότερα δεδομένα των προηγούμενων ερευνών μας αντιστοιχεί σε NK-λεμφώματα, EBV θετικά, της ρινικής κοιλότητας και των παραρινικών κόλπων.

Η συχνή συσχέτιση μεταξύ EBV και T/ NK λεμφωμάτων θέτει το ερώτημα πως ο EBV εισέρχεται σε αυτά τα κύτταρα καθότι το CD21( υποδοχέας EBV) εκφράζεται μόνο στο 30-40% των T-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος αλλά σπάνια σε EBV θετικά T-λεμφώματα (43-46).

Θεωρείται πιθανό ότι ο EBV μπορεί είτε να μειώνει το επίπεδο έκφρασης του CD21 στα T και NK κύτταρα μετά τη μόλυνση είτε ότι έκφραση του CD21 είναι παροδική σε αυτά τα κύτταρα.

Ενα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι η σχέση μεταξύ EBV και των T-λεμφωμάτων εξαρτάται από την πρωτοπαθή εντόπιση αυτών.

Η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ EBV και T-NK λεμφωμάτων (43-46) της ρινικής κοιλότητας και του ρινοφάρυγγα καθώς και ο μη συσχετισμός μεταξύ EBV και T-δερματικών λεμφωμάτων δείχνει ότι πιθανώς η ανατομική εντόπιση T-NK κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη EBV θετικών λεμφωμάτων από αυτά τα κύτταρα.

Είναι πιθανό ότι η συνεχής έκθεση των T-NK κυττάρων της ανώτερης αναπνευστικής οδού στον EBV μπορεί να αποτελεί μία αιτιολογική βάση ερμηνείας και κυρίως αν ληφθεί υπόψη ότι τα T-NK κύτταρα είναι υπεύθυνα για την άμυνα εναντίον των ιών μεταξύ των οποίων και του EBV (43-46).

Ενα επίσης ενδιαφέρον ερώτημα είναι το αν ο EBV προσβάλλει τα T-NK κύτταρα πριν ή μετά την νεοπλασματική εξαλλαγή. Φαίνεται ότι στα T-NK λεμφώματα της ρινικής κοιλότητας, των παραρινικών κόλπων και του ρινοφάρυγγα ο EBV προσβάλλει τα κύτταρα πριν την νεοπλασματική εξαλλαγή, διότι σχεδόν όλα τα κακοήθη κύτταρα είναι EBV θετικά.

Αντίθετα στα περισσότερα άλλα EBV θετικά T-λεμφώματα μόνο ένα ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων φιλοξενεί τον EBV γεγονός το οποίο υπαινίσσεται είσοδο του EBV μετά την νεοπλασματική εξαλλαγή (43,44).

## Βιβλιογραφία συζήτησης

1. Levine A, Momand J, Finlay C. The p53 tumour suppressor gene, Nature 1992: 351:453-6.
2. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature 1989: 342:705-8.
3. Gaidano G, Ballcrini P, Gone JZ, Inghirami G, Neri A, Nowcomb EW, et al. P53 mutations in human lymphoid malignancies : association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 1991: 88:5413-17.
4. Villuedas R, Pins MA, Algero P, Sanchez-Bcato M, Sanchez-Verde L, Martinez JC, et al. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. Blood 1993:82:3151-6.
5. Kocialkowski S, Pezzela F, Morrison H, Joncs M, Laha S, Harris AL, et al. Mutations in the p53 gene are not limited to classic «hot spots» and are not predictive of p53 protein expression in high-grade non-Hodgkin's lymphoma. Br.J Haematol 1995:89:55-60.
6. Barak Y, Oren M. Enhanced binding of a 95kd protein to p53 in cells undergoing p53 mediated growth arrears. EMBO J 1992:11:2115-21.
7. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm2 oncogene product forms a complex with p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell 1992:69:1237-45.

8. Oliner ID, Pietenpo JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncoprotein mdm2 conveys the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 1993 : 362:857-60.
9. Finlay CA. The mdm2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Cell Biol.* 1993:13:301-6.
10. Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M. Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* 1993:8:3411-16.
11. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53 -mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 1993:7: 1126-32.
12. Chen CY, Oliner JD, Zhen Q, Fornace AJ Jr, Vogelstein B, Kastan MB. Interactions between p53 and mdm2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994:91:2684-91.
13. Bi-Deiry WAS, Tokino T, Velculesku VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. Waf1, a potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* 1993:75:817-25.
14. Harper JW, Adam GY, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. *Cell* 1993:75:805-16.
15. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Brach D. P21 is universal inhibitor of cyclin kinase. *Nature* 1993:366:701-4.
16. Gu Y, Turk CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20 k regulatory subunit. *Nature* 1993:366:707-10.
17. Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinase controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994:369:574-8.
18. Cesarman E, Inghirami G, Chadburn A, Knowles DM. High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 gene mutations in anaplastic large cell lymphoma. *Am. J Pathol* 1993:143:845-56.
19. Nakamura H, Said JW, Miller CW, Koeffler HP. Mutation and protein expression of p53 in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas *Blood* 1993:82:920-6.



- 20.** Martinez JC, Mateo MS, Senchez-Beato M, Villuendas R, Orrade JK, Algara P, et al. MDM2 expression in lymphoid cells and reactive and neoplastic lymphoid tissue. *J Pathol.* 1995;177:27-35.
- 21.** Cordell JL, Falini B, Erber WN, Chosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-22.
- 22.** Kanavaros P, Kouvidou Ch, Dai Y, Tzardi M, Datsaris G, Darivianaki K, et al. MDM2 protein expression in nasopharyngeal carcinomas. Comparative study with p53 protein expression. *J.Clin Pathol Mol Pathol* 1995;48:M322-5.
- 23.** Ladanyi M, Cha C, Lewis R, Thanwar SC, Huvos AG, Hesley JH. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 1993;53:16-18.
- 24.** Reiferberger G, Liu L, Ichimura K, Schimide EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the mdm2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 1993;53:2736-9.
- 25.** Sheikh MS, Shao ZM, Hussain A, Fontana JA. The p53-binding protein MDM2 gene is differentially expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:3226-8.
- 26.** Bueso-Ramow CE, Yang Y, de Leon E, McCown P, Stass SA, Albitar M. The human MDM2 oncogene is over-expressed in leukemia. *Blood* 1993;82:2617-23.
- 27.** Waranabe T, Hotts T, Ichikawa A, Kinoshita T, Nagai H, Uchida T, et al. The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* 1994;9:3158-65.
- 28.** Cholosi M, Doglioni C, Menestrina F, Montagna L, Rigo A, Lestani M, et al. Abnormal expression of the p53-binding protein MDM2 in Hodgkin's disease. *Blood* 1994;54:4295-300.
- 29.** Pezzella F, Morrison H, Jones M, Lane D, Harris AL, Mason DY. Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 proteins in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1993;22:39-44.
- 30.** Matsushima AY, Cesarman E, Chadburn A, Knowles DM. Post-thymic T-cell lymphomas frequently overexpress p53 protein but infrequently exhibit gene mutations. *Am J Pathol* 1994;144:573-84.

- 31.** Villuedas R, Pins MA, Orradre JL, Mollejo M, Algara P, Sanchez L, et al. P53 protein expression in lymphomas and reactive lymphoid tissue. *J Pathol* 1992;166:235-41.
- 32.** Landers JE, Haincs DS, Straus JF, George DL. Enhanced translation: a novel model of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumour cells. *Oncogene* 1994;9:2745-51.
- 33.** Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, Houseini ME. Induction of p21 (WAF1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 1994;9:3389-96.
- 34.** Sanchez-Bearo M, Pins MA, Martinez-Montero JC, Carcia JF, Villuendas R, Carcia FJ, et al. MDM-2 and p21/waf1 wild type p53 induced proteins are regularly expressed. Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease (in press)
- 35.** Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Antl Acad Sci USA*, 1986;83:5214-5218.
- 36.** Allsop TE, Wyatt S, Paterson HF, Davies AM. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 1993;73:295-307.
- 37.** Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 promotes the survival of haemopoietic cells and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335:440-442.
- 38.** Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP. Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990;144:3602-3610.
- 39.** Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2 deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993;75:229-240.
- 40.** Hockenbery DM, Oltval ZN, Yin XM, Millian CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions is an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251.
- 41.** Pezzella F, Morrison H, Jones M, Lane D, Harris AL, Mason DY. Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 proteins in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1993;22:39-44.
- 42.** Navratil E, Gaulard P, Kanavaros P, et al. Expression of the bcl-2 gene

product in follicular lymphoma. J Clin Pathol 1995;48:18-21.

43. Kanavaros P, et al EBV in T and NK cell non-Hodgkin's lymphomas. Leukemia 1996(10), Sup.2,84-87.
44. Kanavaros P, et al. EBV in extranodal T-non Hodgkin's lymphomas. Leukemia and Lymphoma 1995;18:27-34.
45. Kanavaros P, et al. Nasal T-cell lymphomas. Blood 1993;81:2688-2695.
46. Kanavaros P, et al. EBV in non-Hodgkin's lymphomas of the upper respiratory tract. J. Pathol 1996;178:297-302

### ΠΙΝΑΚΑΣ 1

#### Ανοσοϊστοχημεία p53, mdm2, p21, bcl-2 σε λεμφαδενικά λεμφώματα

<b>p53</b>	<b>+</b>	<b>39 / 87</b>	<b>3 / 35 ΧΚ</b>	<b>36 / 52 ΥΚ</b>
<b>mdm2</b>	<b>+</b>	<b>23 / 87</b>	<b>2 / 35 ΧΚ</b>	<b>21 / 52 ΥΚ</b>
<b>P21</b>	<b>+</b>	<b>34 / 87</b>	<b>3 / 35 ΧΚ</b>	<b>31 / 52 ΥΚ</b>
<b>bcl-2</b>	<b>+</b>	<b>54 / 87</b>	<b>31/ 35 ΧΚ</b>	<b>23 / 52 ΥΚ</b>

**ΧΚ:** Χαμηλής κακοηθείας

**ΥΚ:** Υψηλής κακοηθείας

#### Συσχέτιση p53/mdm2/p21

<b>p53+ / mdm2+ / p21+</b>	<b>23</b>	<b>2 ΧΚ</b>	<b>21 ΥΚ</b>
<b>p53+ / mdm2- / p21+</b>	<b>11</b>	<b>1 ΧΚ</b>	<b>10 ΥΚ</b>
<b>p53+ / mdm2- / p21-</b>	<b>5</b>	<b>-</b>	<b>5 ΥΚ</b>

## Πίνακας 2

Ανοσοϊστοχημεία p53, mdm2, p21, bcl-2  
σε εξωλεμφαδενικά λεμφώματα

p53 +	0/14 ΧΚ	7/ 29 ΥΚ
mdm2 +	0/14 ΧΚ	3/ 29 ΥΚ
p21 +	0/14 ΧΚ	4/ 29 ΥΚ
bcl-2 +	9/14 ΧΚ	2/ 29 ΥΚ

## Πίνακας 3

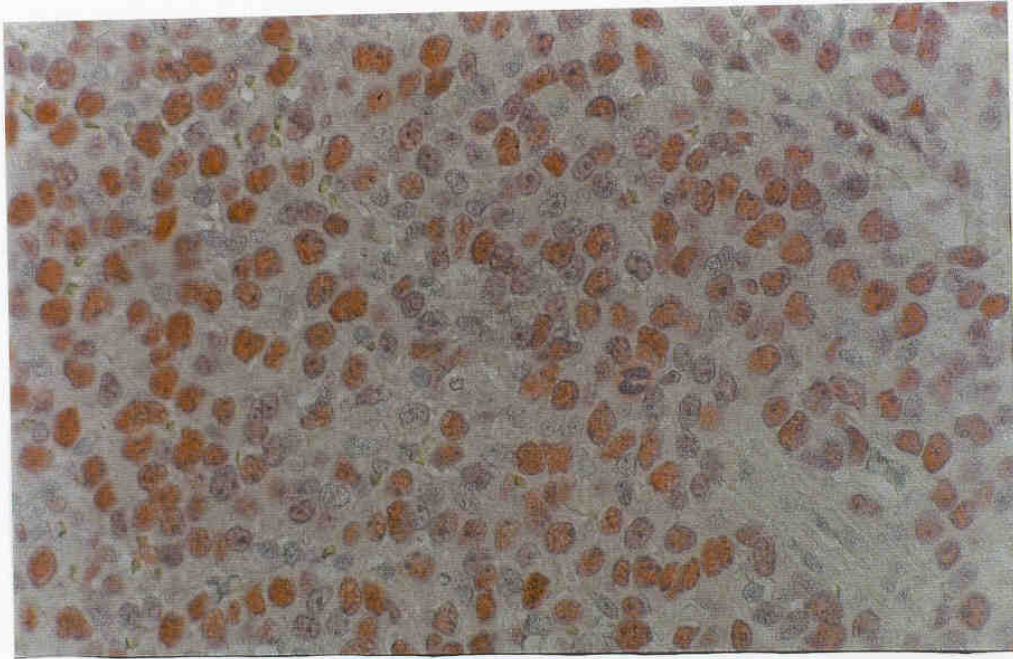
RNA in situ υβριδισμός (EBER<sup>1/2</sup>) και  
ανοσοϊστοχημεία LMP-1

### Λεμφαδενικά λεμφώματα

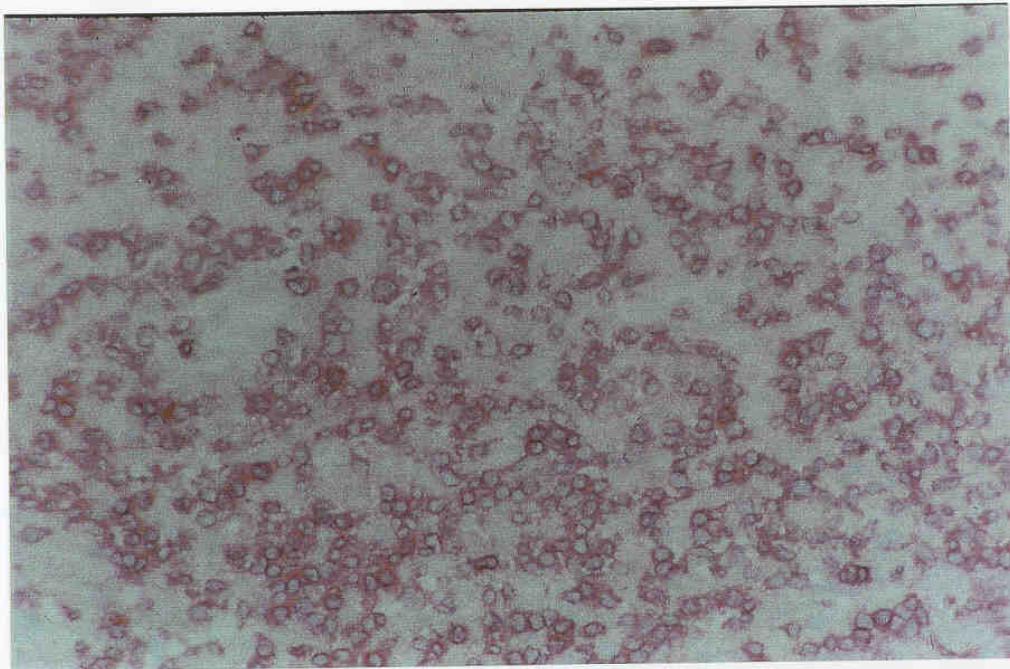
EBER <sup>1/2</sup> +	3 / 35 ΧΚ	3 / 52 ΥΚ
LMP-1 +	3 / 35 ΧΚ	3 / 52 ΥΚ

**Εξωλεμφοαδενικά λεμφώματα**

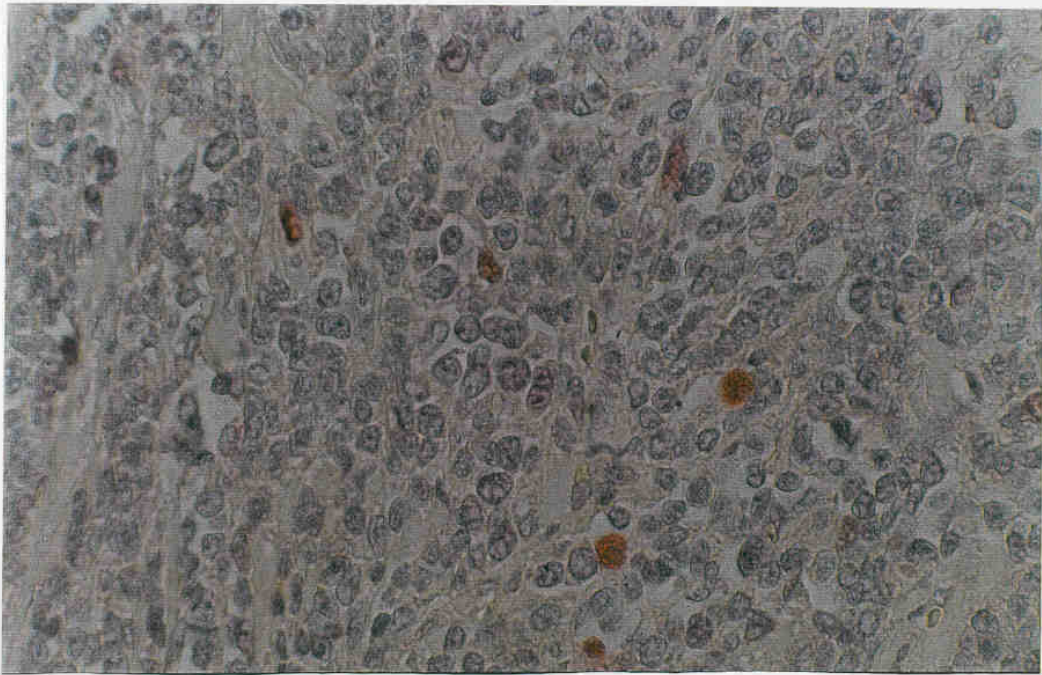
<b>EBER 1/2 +</b>	<b>0/14 ΧΚ</b>	<b>3/ 29 ΥΚ</b>
<b>LMP-1 +</b>	<b>0/14 ΧΚ</b>	<b>3/ 29 ΥΚ</b>



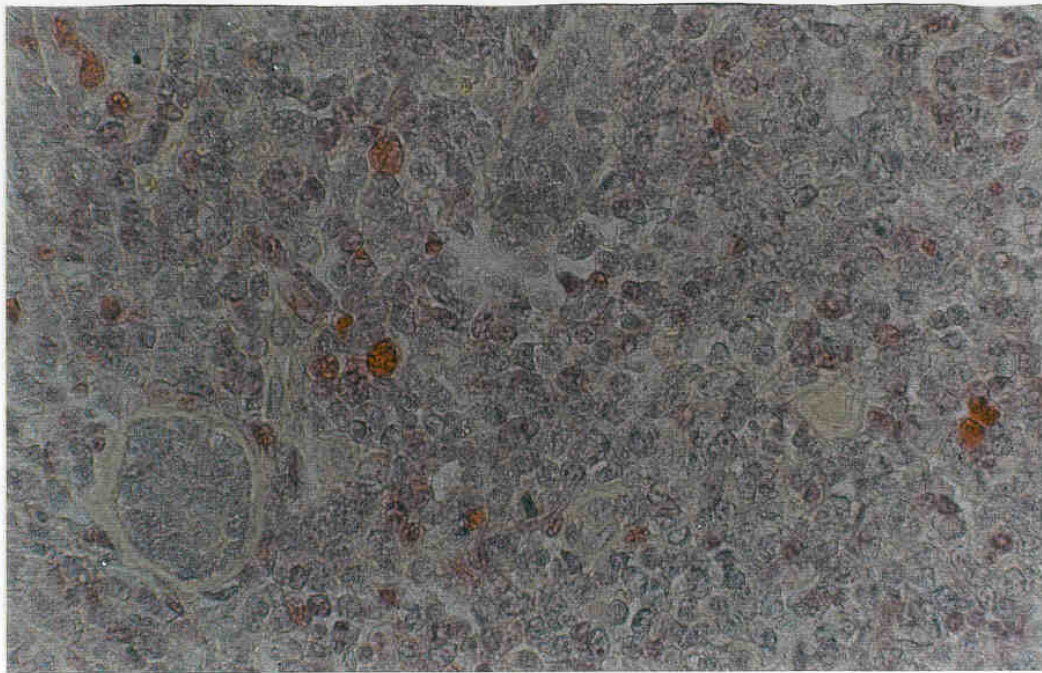
EIKONA 1



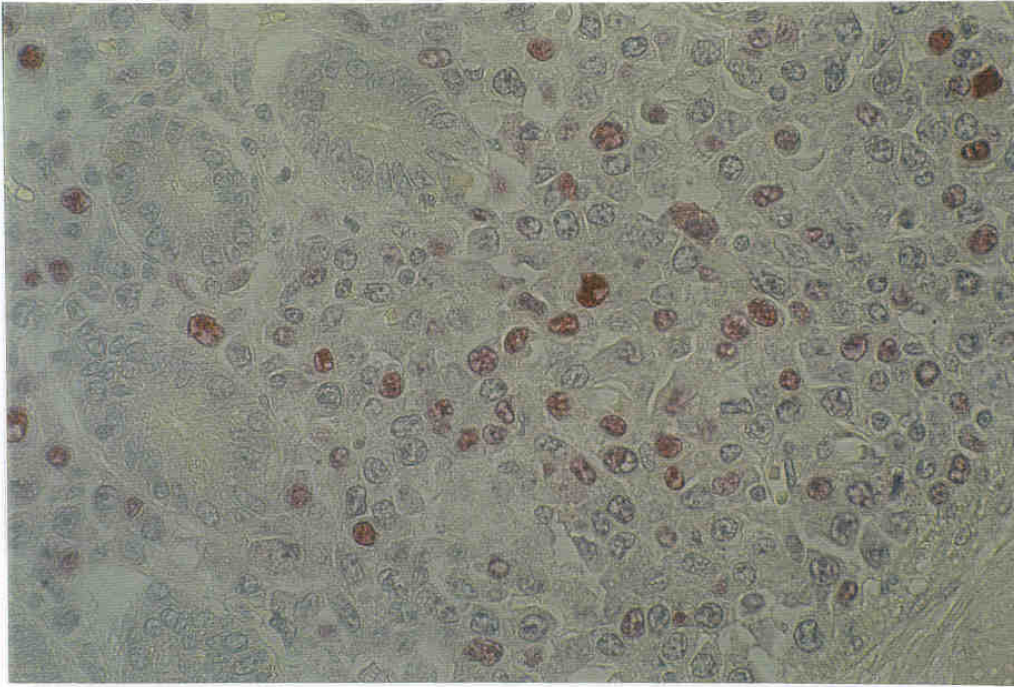
EIKONA 2



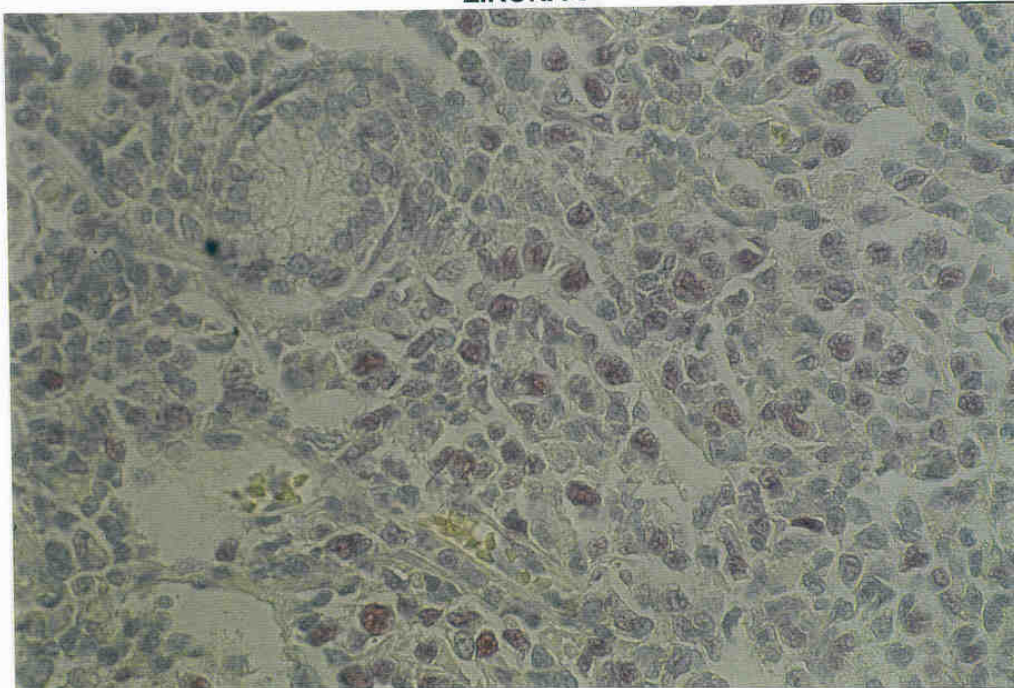
**EIKONA 3**



**EIKONA 4**

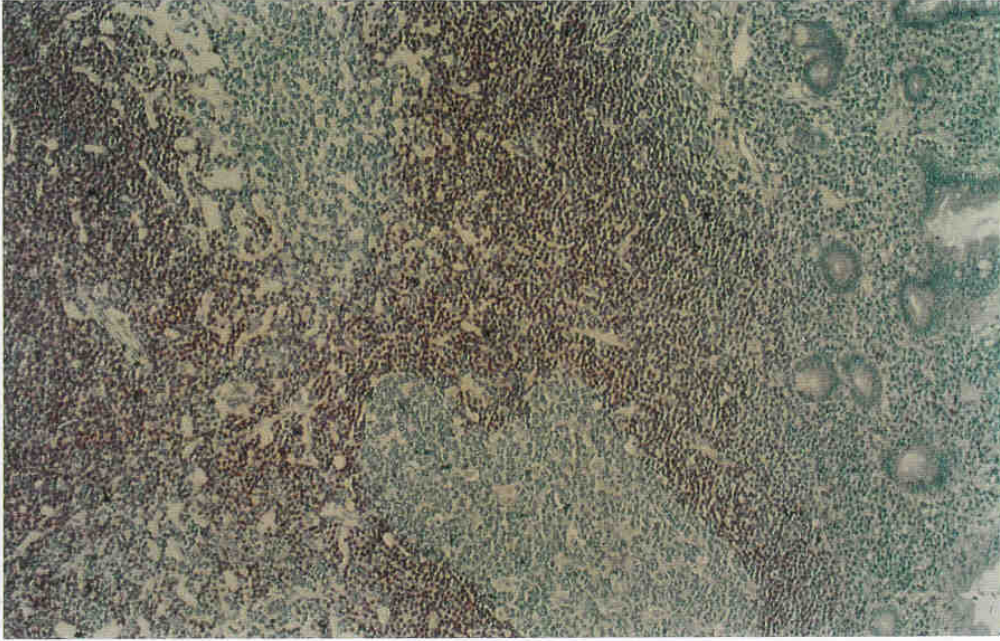


**EIKONA 5**

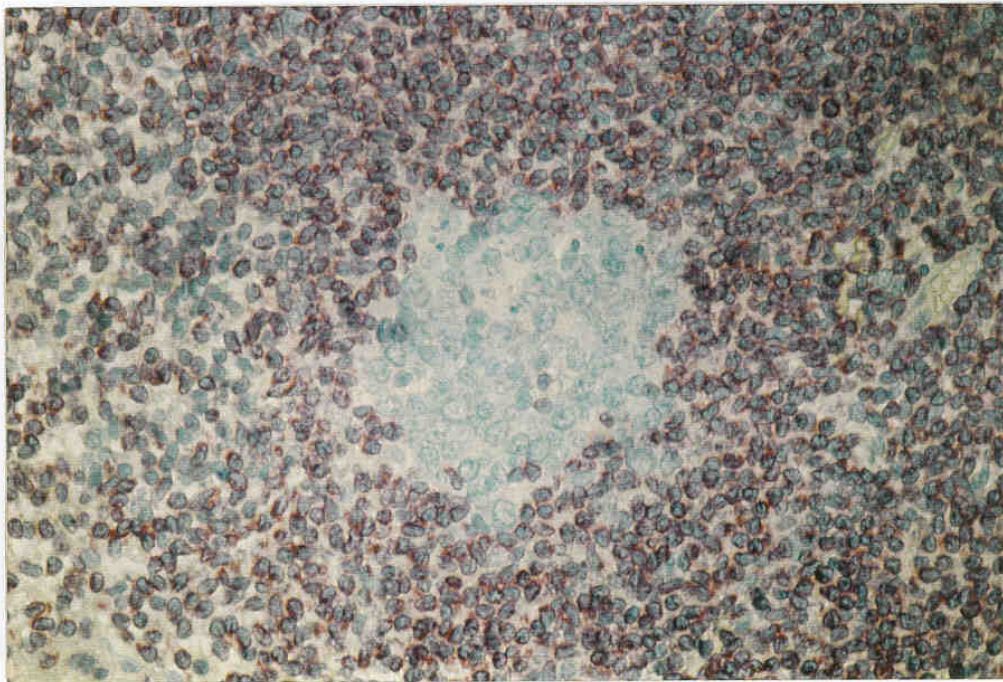


**EIKONA 6**

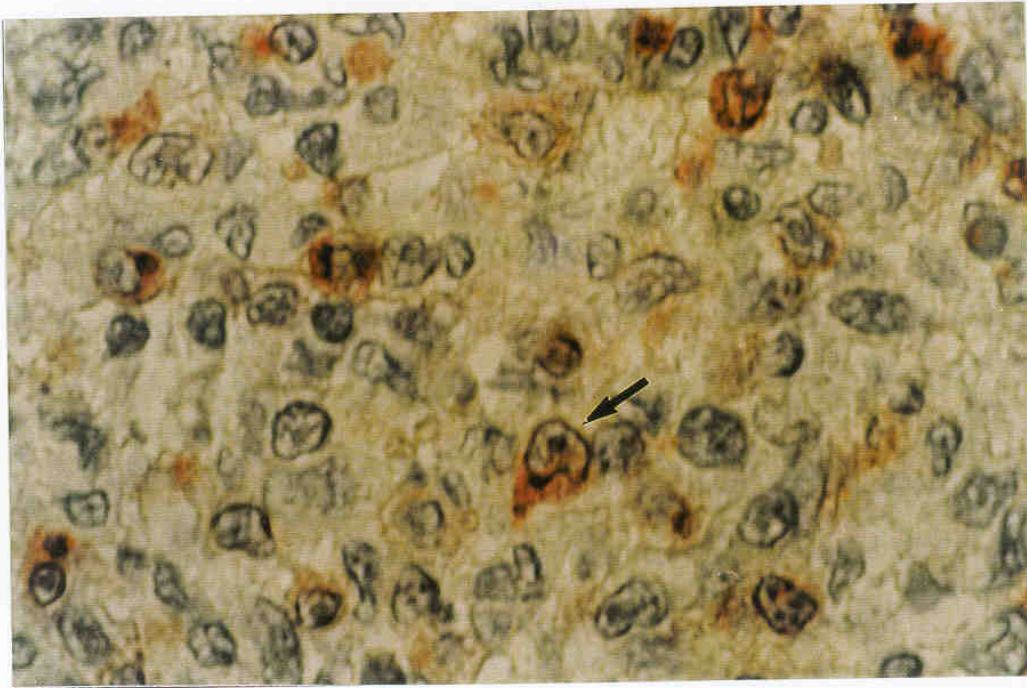




EIKONA 7

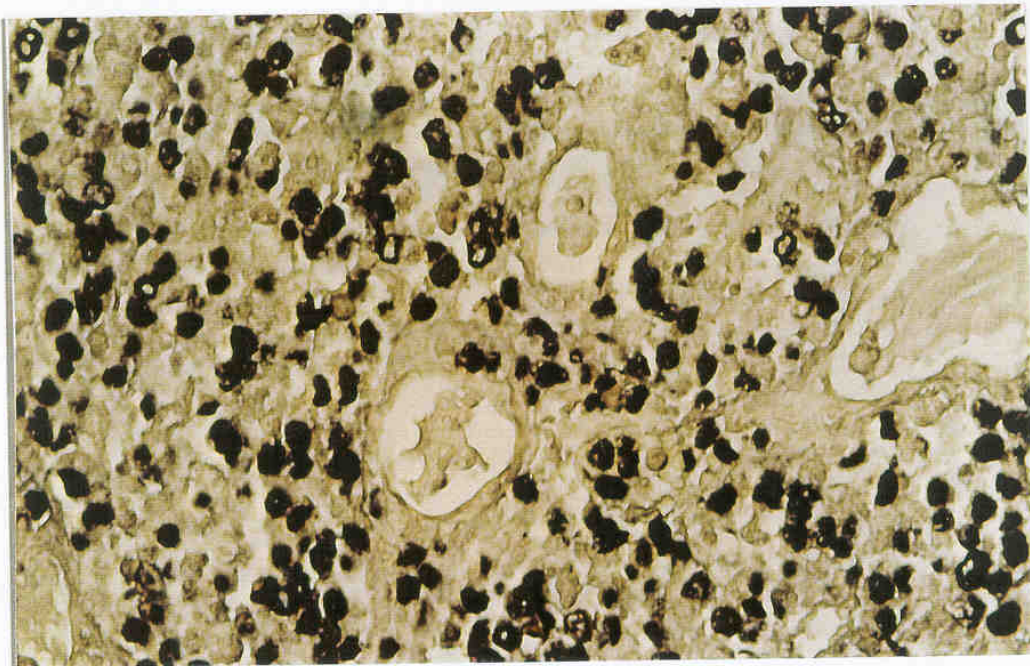


EIKONA 8



7) Καρδιά της γαλαργούλας (S. aurata) με έντονη χρωματισμό  
καρμίνη.

EIKONA 9



EIKONA 10

## ΥΠΟΤΙΤΛΟΙ

- 1) Εκφραση της πρωτεΐνης p53 σε υψηλής κακοήθειας λεμφαδενικό λέμφωμα.
- 2) Εκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 σε υψηλής κακοήθειας λεμφαδενικό λέμφωμα.
- 3) Εκφραση της πρωτεΐνης mdm2 σε υψηλής κακοήθειας λεμφαδενικό λέμφωμα .
- 4) Εκφραση της πρωτεΐνης p21/waf1 σε υψηλής κακοήθειας λέμφωμα.
- 5) Εκφραση της πρωτεΐνης p53 σε B-MALT λέμφωμα υψηλής κακοήθειας
- 6) Εκφραση της πρωτεΐνης p21/waf1 σε B-MALT λέμφωμα υψηλής κακοήθειας.
- 7) Εκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 σε B-MALT λέμφωμα χαμηλής κακοήθειας.
- 8) Εκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 σε B-MALT λέμφωμα χαμηλής κακοήθειας.
- 9) LMP-1 (EBV) θετικότητα σε T-λέμφωμα της ρινικής κοιλότητας ( Τεχνική ανοσοϊστοχημείας).
- 10) EBER ( EBV) θετικότητα σε T-λέμφωμα υψηλής κακοήθειας ( Τεχνική in situ υβριδισμού ).

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα λεμφώματα ορίζονται ως κακοήθεις νεοπλασίες του λεμφικού ιστού.

Θεωρείται ότι προέρχονται από κακοήγη μετασχηματισμό λεμφικών κυττάρων σε διάφορα στάδια λειτουργικής διαφοροποίησης.

Τα λεμφώματα χωρίζονται στη νόσο Hodgkin και στα μη- Hodgkin's λεμφώματα.

Η ταξινόμηση των μη- Hodgkin's λεμφωμάτων κατέχει σημαντική θέση στον καθορισμό της θεραπευτικής στρατηγικής και της κατανόησης των μηχανισμών παθογένεσης αυτών των νεοπλασιών.

Πολλές ταξινομήσεις έχουν προταθεί, αλλά τα τελευταία 10 χρόνια οι ταξινομήσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι η ταξινόμηση του Κιέλου (Ευρώπη) και η Διεθνής Συμβιβαστική Ταξινόμηση (ΗΠΑ).

Οι ταξινομήσεις δεν είναι οριστικές αλλά εξελίσσονται λαμβάνοντας υπόψη τα κλινικά προγνωστικά δεδομένα και ενσωματώνοντας έννοιες των βασικών επιστημών (Ανοσολογίας και Μοριακής Βιολογίας).

Σε αυτά τα πλαίσια προτάθηκε πρόσφατα η ταξινόμηση Real.

Τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη για τη ταξινόμηση των λεμφωμάτων είναι:

- α. Ιστολογία (αρχιτεκτονική οζώδης, διάχυτη ή μικτή ).
- β. Κυτταρολογία ( μέγεθος κυττάρων, χαρακτήρες πυρήνα και πυρηνίσκων, χαρακτήρες κυτταροπλάσματος ).
- γ. Ανοσοφαινότυπος ( έκφραση αντιγόνων B ή T διαφοροποίησης, έκφραση του αντιγόνου CD30 ).
- δ. Ο γονότυπος ( ταξινόμηση Real ).

Με βάση αυτά τα στοιχεία η ταξινόμηση του Κιέλου διαιρεί τα λεμφώματα κατ'αρχήν σε B και T ανάλογα με τον ανοσοφαινότυπο και κατόπιν σε χαμηλής και υψηλής κακοήθειας ανάλογα με την ιστολογική τους εικόνα.

Η διαίρεση των λεμφωμάτων σε υψηλής και χαμηλής κακοήθειας οντότητες προέκυψε από τη συσχέτιση με τα κλινικά δεδομένα κυρίως σε B-λεμφώματα των λεμφαδένων.

Φαίνεται όμως ότι αυτή η διαίρεση μάλλον αντιπροσωπεύει την αυθόρμητη πορεία της νόσου αλλά ίσως όχι την εξέλιξή της με βάση τα δεδομένα της σύγχρονης θεραπευτικής αγωγής. Κατά συνέπεια για λόγους ακριβέστερης προσέγγισης θα ήταν σκόπιμο να θεωρούμε ότι οι όροι υψηλή / χαμηλή κακοήθεια αναφέρονται κατ'αρχην στον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

Τα περισσότερα μέχρι τώρα διαθέσιμα δεδομένα για την συσχέτιση ιστολογίας ανοσοφαινότυπου-πρόγνωσης προέκυψαν από μελέτες στα B-λεμφώματα τα οποία είναι πιο συχνά στο Δυτικό κόσμο.

Τα δεδομένα για τον ρόλο της ιστολογικής ταξινόμησης επί της κλινικής πορείας των Τ-λεμφωμάτων δεν είναι ακόμη επαρκή και σαφή.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα Τ-λεμφώματα, ανεξάρτητα από την ιστολογική τους εικόνα, συμπεριφέρονται ως υψηλής κακοήθειας νεοπλασίες.

Σε αυτό το σημείο είναι απαραίτητο να σημειώσουμε ότι από τις αναλύσεις της επιθετικής συμπεριφοράς των Τ-λεμφωμάτων αποκλείονται τα Τ-δερματικά λεμφώματα τα οποία παρουσιάζουν σαφείς κλινικές και βιολογικές ιδιαιτερότητες.

Αντίστοιχες σημαντικές διαφορές στη βιολογική συμπεριφορά ανευρίσκονται αν συγκριθούν τα Β-λεμφώματα που εξορμούνται από το λεμφικό ιστό των βλεννογόνων (MALT) και τα οποία εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σωλήνα, στους πνεύμονες, στο θυρεοειδή και τους σιελογόνους αδένες. Τα ανωτέρω στοιχεία δείχνουν μία εγγενή αδυναμία των υπαρχουσών ταξινομήσεων οι οποίες δεν λαμβάνουν υπόψη την πρωτοπαθή εστία του λεμφώματος (αν είναι δηλαδή λεμφαδενοειδής ή εξωλεμφαδενοειδής).

Με την εισαγωγή της έννοιας του ιστο-ειδικού εποικισμού των λεμφοκυττάρων (homing), φαινόμενο το οποίο εξαρτάται από ιστο-ειδικά μόρια προσκόλλησης των λεμφοκυττάρων που, αναγνωρίζουν αντίστοιχα μόρια προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα αγγείων λεμφικών οργάνων, φαίνεται τώρα ότι τα λεμφώματα αποτελούν νεοπλασματικά ισοδύναμα ανακυκλοφορούντων ιστο-ειδικών λειτουργικών υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων μετά την επαφή τους με το αντιγόνο.

Αυτή η έννοια επιβεβαιώνεται από τις παρατηρήσεις ότι λεμφώματα με την ίδια μορφολογία αλλά με διαφορετική πρωτοπαθή εντόπιση (π.χ. λεμφαδένες, MALT, δέρμα κλπ.) παρουσιάζουν διαφορές στη κλινική συμπεριφορά, στην έκφραση ογκοπρωτεϊνών και στην παρουσία ορισμένων ογκογόνων ιών (π.χ. EBV, HTLV-1).

Επιπλέον υπάρχουν διαφορές ως προς την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και την έκφραση ογκοπρωτεϊνών μεταξύ εξωλεμφαδενοειδών Β-λεμφωμάτων και αντιστοίχου ιστοτύπου Β-λεμφαδενοειδών λεμφωμάτων .

Πράγματι, η χρωμοσωμική διαμετάθεση t(14;18) που ενεργοποιεί το ογκογονίδιο Bcl-2 ανευρίσκεται στο 40% των λεμφαδενοειδών Β-λεμφωμάτων.

Αντίστοιχα ευρήματα αναφέρονται ως προς την έκφραση της Bcl-2 ογκοπρωτεΐνης στις ανωτέρω κατηγορίες λεμφωμάτων.

Εκτός από την σημασία της πρωτοπαθούς εντόπισης για τις μελλοντικές ταξινομήσεις των λεμφωμάτων, ευρήματα της Μοριακής Βιολογίας είναι ενδεικτικά της σημασίας

ορισμένων μοριακών βλαβών, οι οποίες συνδέονται με ενεργοποίηση ογκογονιδίων και που φαίνεται τουλάχιστον προς το παρόν να χαρακτηρίζουν ειδικές νοσολογικές οντότητες. Για παράδειγμα η διαμετάθεση t( 8:18) που ενεργοποιεί το ογκογονίδιο Bcl-2 ανευρίσκεται στο 60%-80% των οζωδών Β-λεμφωμάτων(κεντροβλαστικών / κεντροκυτταρικών ),η διαμετάθεση t( 8:14) που ενεργοποιεί το ογκογονίδιο c-myc ανευρίσκεται σχεδόν σε όλα τα λεμφώματα Burkitt, και η διαμετάθεση t( 11:14) που ενεργοποιεί το γονίδιο της κυκλίνης D1(PRAD1) ανευρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό των Β-λεμφοκυττάρων του μανδύα (κεντροκυτταρικά).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 ενέχεται στους μηχανισμούς παθογένεσης ορισμένων τύπων λεμφωμάτων. Η p53 πρωτεΐνη οδηγεί σε αδρανοποίηση της λειτουργίας του ως ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Μεταλλάξεις του p53 γονιδίου έχουν ανευρεθεί σε λεμφώματα Burkitt, Β-ΧΛΛ και υψηλής κακοήθειας Β και Τ λεμφώματα .

Εκτός από τις μεταλλάξεις, αδρανοποίηση της λειτουργίας της p53 πρωτεΐνης μπορεί να προέλθει μέσω σύνδεσης με κυτταρικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες ιών.

Έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη του ογκογονιδίου mdm-2 μπορεί μέσω σύνδεσης με την πρωτεΐνη p53 να οδηγήσει σε αδρανοποίηση της τελευταίας.

Σε αυτή την οπτική πρόσφατα αναφέρθηκε συνέκφραση των πρωτεϊνών mdm-2 και p53 σε μικρή σειρά non-Hodgkin's λεμφωμάτων.

Η πρωτεΐνη p21/waf1 προέρχεται από τον φυσικό τύπο της p53, που ενεργοποιεί τα κυκλίνες-κινάσες εξαρτώμενα συμπλέγματα, τα οποία εμποδίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στην μετάβαση G1-S. Επιπλέον αναστέλλει τη δράση του πυρηνικού αντιγόνου του πολλαπλασιαζόμενου κυττάρου (PCNA), παρεμποδίζοντας την δημιουργία πανομοιότυπου αντιγράφου του DNA . Στα κύτταρα των όγκων, που είτε έχουν χάσει την πρωτεΐνη p53, είτε περιέχουν μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53, τα επίπεδα της p21 έχουν σημαντικά ελαττωθεί ή η πρωτεΐνη λείπει. Αυτό θα μπορούσε να έχει σαν αποτέλεσμα τον ανώμαλο έλεγχο της μεταγραφής του DNA και της προόδου του κυτταρικού κύκλου.

Ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί τα τελευταία στη σχέση του ιού EBV με τις κακοήθεις λεμφικές νεοπλασίες.

Ο ιός EBV είχε συνδεθεί με το λέμφωμα Burkitt αλλά τα τελευταία χρόνια βρέθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα σε ένα μεγάλο ποσοστό περιπτώσεων νόσου Hodgkin (40-50%) και σε ένα μικρότερο ποσοστό σε μη- Hodgkin λεμφώματα, κυρίως Τ-φαινοτύπου(10-30%). Ιδιαίτερα έντονη (80-90%)ήταν η συσχέτιση μεταξύ EBV και Τ- λεμφωμάτων της ρινικής κοιλότητας.

Μέχρι στιγμής δεν έχουν γίνει συνθετικές μελέτες που να συνδυάζουν την έκφραση

των γονιδίων BCL-2, mdm-2, p53, p21 και την παρουσία του ιού EBV με βασικές ιστοπαθολογικές ( ιστοτύπος, βαθμός κακοήθειας, πρωτοπαθής εντόπιση) και ανοσοφαινοτυπικές παραμέτρους ( B ή T-κυτταρική προέλευση ) των λεμφωμάτων. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία η παρούσα πρόταση έχει ως στόχο την ανάλυση της συσχέτισης πρωτεϊνών ογκογονιδίων (BCL-2, mdm-2), ογκοκατασταλτικών γονιδίων (p53), της επαγόμενης από τον φυσικό τύπο του p53, πρωτεΐνης p21/waf-1 καθώς και του ιού EBV με τις βασικές ιστοπαθολογικές (ιστολογικός τύπος, βαθμός κακοήθειας, πρωτοπαθής εντόπιση) και ανοσοφαινοτυπικές (B ή T-κυτταρική προέλευση) παραμέτρους των λεμφωμάτων.

Ο απώτερος στόχος είναι η συνεισφορά στην επεξεργασία μιας συνθετικής μορφολογικής-φαινοτυπικής-μοριακής ταξινόμησης των λεμφωμάτων.

Για τον σκοπό αυτό μελετήθηκαν **87** περιστατικά **λεμφαδενικών NHLs**

Ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την (πλέον προσφάτως) ενημερωμένη κατάταξη του Κιέλου(1988) σε:

52 υψηλόβαθμα λεμφώματα (47 B-NHLs και 5 T-NHLs) και

35 χαμηλόβαθμα λεμφώματα (32 B-NHLs και 3 T-NHLs).

Επίσης μελετήθηκαν **27 γαστρικά MALT**

(MALT=βλεννογοεξαρτώμενος λεμφικός ιστός) λεμφώματα. Τα 26 B-MALT είχαν ταξινομηθεί σε: 21 περιπτώσεις υψηλής κακοήθειας 6 περιπτώσεις χαμηλής κακοήθειας

Το ένα T- MALT λέμφωμα ήταν υψηλής κακοήθειας.

Καθώς **11 λεμφώματα δέρματος** που είχαν ταξινομηθεί

2 B-φαινοτύπου χαμηλής κακοήθειας

9 T- φαινοτύπου από τα οποία:3 ήταν υψηλής κακοήθειας και

6 χαμηλής κακοήθειας του τύπου της σπογγοειδούς μυκητρίωσης και

**5 λεμφώματα ρινοφαρυγγικής κοιλότητας** που είχαν ταξινομηθεί

3 B και 2T όλα υψηλής κακοήθειας.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **1 Αποτελέσματα p53, mdm2, p21 και bcl-2**

#### **α) Λεμφαδενικά λεμφώματα**

- Έκφραση της **p53** πρωτεΐνης: Ανιχνεύθηκε πυρηνικό p53 αντιγόνο σε 39 από τις 87 περιπτώσεις NHLs.

Σε συσχέτιση της έκφρασης του p53 με τον ιστολογικό τύπο, βρέθηκε θετική έκφραση σε 3 από 35 χαμηλόβαθμα και σε 36 από 52 υψηλόβαθμα NHLs.

- Έκφραση της **mdm2** πρωτεΐνης: Ανιχνεύθηκε πυρηνικό mdm2 αντιγόνο σε 23 από τα 87 NHLs ( 21/52 υψηλόβαθμα 3/35 χαμηλόβαθμα).

- Έκφραση της **p21/waf1** πρωτεΐνης: Ανιχνεύθηκε πυρηνικό p21 σε 34/87 NHLs (31/52 υψηλόβαθμα και 3/35 χαμηλόβαθμα).
- Συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης **p53,mdm2 και p21**:  
Παράλληλη p53 / mdm-2 έκφραση βρέθηκε σε 23/87 περιστατικά NHLs ( 21 υψηλόβαθμα και 2 χαμηλόβαθμα). Και οι 23 περιπτώσεις απέδειξαν επίσης θετικότητα στην έκφραση της p21/ waf1 πρωτεΐνης. Ασύμφωνη p53θετική / mdm-2αρνητική έκφραση βρέθηκε σε 16/87 περιπτώσεις (15 υψηλόβαθμα και 1 χαμηλόβαθμο NHL). 11 από τις 16 αυτές περιπτώσεις απέδειξαν θετικότητα στην έκφραση της p21/ waf1 πρωτεΐνης και 5 απεδείχθησαν p21/ waf1 αρνητικές. Οι πρωτεΐνες mdm-2 και p21/ waf1 δεν εκφράζονταν, επί τη απουσία εκφράσεως της πρωτεΐνης p53.
- Έκφραση της **bcl-2** πρωτεΐνης: Από τα 35 χαμηλής κακοηθείας λεμφώματα, η πρωτεΐνη bcl-2 βρέθηκε στα 31.  
Από τα 52 υψηλής κακοηθείας η πρωτεΐνη bcl-2 βρέθηκε στα 23 τα οποία ήταν υψηλής κακοηθείας B-NHL. Συνολικά 54/87 NHL ήταν bcl-2 θετικά.  
Η συσχέτιση της θετικότητας για πρωτεΐνη bcl-2 με τις πρωτεΐνες p53, mdm-2 και p21, δεν ανέδειξε ιδιαίτερη θετική ή αρνητική σχέση μεταξύ τους.

## β) Εξωλεμφοδενικά λεμφώματα

- Έκφραση **p53** πρωτεΐνης: Η πρωτεΐνη p53 βρέθηκε σε 5/21 B-NHL MALT υψηλής κακοηθείας, σε 1/3 T-υψηλής κακοηθείας λεμφώματα δέρματος και σε 1/5 υψηλής B-λεμφώματα ρινοφάρυγγα.
- Έκφραση **mdm-2** πρωτεΐνης: Η πρωτεΐνη mdm-2 βρέθηκε σε 2/21 B-NHL MALT υψηλής κακοηθείας και 1/5 υψηλής κακοηθείας B-λεμφώματα ρινοφάρυγγα.
- Έκφραση **p21** πρωτεΐνης: Η πρωτεΐνη p21 βρέθηκε σε 3/21 B-NHL MALT υψηλής κακοηθείας και 1/5 υψηλής κακοηθείας B-λεμφώματα ρινοφάρυγγα.
- Έκφραση **bcl-2** πρωτεΐνης: Η πρωτεΐνη bcl-2 βρέθηκε σε 6/6 B-NHL MALT χαμηλής κακοηθείας, 2/21 B-NHL MALT υψηλής κακοηθείας και 3/6 T-λεμφωμάτων δέρματος χαμηλής κακοηθείας.
- Συσχέτιση έκφρασης **bcl-2, p53, mdm-2 και p21**: Δεν βρέθηκαν ιδιαίτερες θετικές ή αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ των εκφράσεων αυτών των πρωτεϊνών σε εξωλεμφοδενικά λεμφώματα.

## 2) Αποτελέσματα μελέτης EBV

Από τα 87 λεμφοδενικά λεμφώματα ο ιός EBV βρέθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα μόνο σε 2 υψηλής κακοηθείας B-λεμφώματα και σε 4 T-λεμφώματα. Αυτές οι περιπτώσεις ήταν EBER+/ LMP-1+.



Από τα 43 εξωλεμφαδενικά λεμφώματα ο ιός EBV βρέθηκε στα νεοπλασματικά κύτταρα, μόνο σε 1 υψηλής κακοηθείας B-MALT λέμφωμα στομάχου και σε 2 υψηλής κακοηθείας T-NK λεμφώματα του ρινοφάρυγγα. Αυτές οι περιπτώσεις ήταν επίσης EBER+/ LMP-1+.

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν μία συσχέτιση μεταξύ EBV και T-ανοσοφαινότυπου στα λεμφαδενικά και εξωλεμφαδενικά λεμφώματα και μια συσχέτιση μεταξύ EBV και NK-ρινοφαρυγγικών λεμφωμάτων στα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα.

### **ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Βρέθηκε ότι η έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21/waf1 σχετίζεται πιο συχνά με υψηλού βαθμού (ΥΒ) NHL. Οι πρωτεΐνες αυτές βρέθηκαν σπάνια σε χαμηλού βαθμού (ΧΒ) NHL. Τα αποτελέσματα των p53, mdm2 που έχουμε, βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενα ευρήματα και υποδηλώνουν ότι η έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21/waf1 είναι συνδεδεμένη με τους επιθετικούς ιστολογικούς τύπους των NHL.

Δύο τύποι έκφρασης των πρωτεϊνών p53 / mdm2 βρέθηκαν στη μελέτη μας.

**A)** Ταυτόχρονη έκφραση των πρωτεϊνών p53 / mdm2 σε 23 περιπτώσεις [21 υψηλού βαθμού (ΥΒ) και 2 χαμηλού βαθμού (ΧΒ) NHL]. Όλες αυτές οι περιπτώσεις ήταν θετικές και στη πρωτεΐνη p21/waf1. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη mdm2 μπορεί να βρεθεί κυρίως στις περιπτώσεις με φυσικό τύπο του γονιδίου p53. Με αυτόν τον τρόπο, η εύρεση των πρωτεϊνών mdm2 και p21/waf1 σε αυτές τις περιπτώσεις των NHL δείχνει ότι το γονίδιο p53 δεν μεταλλάσσεται και ότι η έκφραση της mdm2 θα μπορούσε να είναι ένας από τους παράγοντες, που οδηγούν στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53.

Αυτό θα μπορούσε να αποδειχθεί ενδιαφέρον από την πλευρά της παθογένεσης των περιπτώσεων p53+/ mdm2+. Αφού η mdm2 μπορεί να παρεμποδίσει την ενεργοποίηση του p53 ως «μεσολαβητού», είναι πιθανόν ότι η έκφραση της mdm2 μπορεί να ενέχεται στην παθογένεση κάποιων, κυρίως υψηλού βαθμού NHL, με το να αποσυντονίζει τη δίοδο καταστολής της εξαρτώμενης από την p53 ανάπτυξής τους.

Προηγούμενες μελέτες έχουν ερευνήσει τους μοριακούς μηχανισμούς του αποσυντονισμού του γονιδίου mdm2 σε λεμφικά νεοπλάσματα.

Με την μέθοδο Southern blot, μόνο μια περίπτωση λεμφοζιδιακού B-NHL είχε ενίσχυση του γονιδίου mdm2 από το σύνολο των 162 περιπτώσεων NHL και λεμφοκυτταρικών λευχαιμιών που εξετάστηκαν.

Αυτό δηλώνει ότι άλλοι μηχανισμοί, εκτός από την ενίσχυση, όπως αυξημένη μετάφραση του γονιδίου, μπορούν να παίξουν κάποιο ρόλο στη αποδιοργάνωση της έκφρασης του γονιδίου mdm2 σε NHL και λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες.

**B)** Έκφραση της πρωτεΐνης p53 χωρίς την έκφραση της πρωτεΐνης mdm2 σε 16 περιπτώσεις (15 YB και 1 XB NHL). Αυτός ο τύπος υποδηλώνει τον αποσυντονισμό του αυτορυθμιζόμενου κύκλου ανατροφοδότησης, ο οποίος δημιουργείται από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών mdm2 και p53. Πέντε από αυτές τις 16 περιπτώσεις ήταν p21 αρνητικές υψηλού βαθμού NHL.

Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πιθανόν να έχουν συμβεί μεταλλάξεις του p53 ανίκανες να ενεργοποιήσουν τις πρωτεΐνες mdm2 και p21/waf

Οι υπόλοιπες 11 περιπτώσεις (10 YB και 1 XB NHL) είχαν τον τύπο p53+/mdm2-/p21+.

Είναι πιθανόν, σε αυτές τις περιπτώσεις, ο αποσυντονισμός του γονιδίου mdm2 ίσως να έχει συμβεί κατά την απουσία των μεταλλάξεων του γονιδίου p53.

Εναλλακτικά, αν το γονίδιο p53 μεταλλάσσεται σε αυτές τις περιπτώσεις, τότε η έκφραση της πρωτεΐνης p21/waf1 ίσως να έχει πραγματοποιηθεί μέσω μιας οδού ανεξάρτητης της p53, αφού η έκφραση της p21 in vitro μπορεί να προκληθεί από παράγοντες διαφοροποίησης, σε αιμοποιητικά in vitro συστήματα αρνητικά στην p53. Παρόλα αυτά, πληροφορίες από τα NHL δείχνουν ότι, τουλάχιστον σε αυτούς τους όγκους, τα υψηλά επίπεδα p21 συνδέονται με το φυσικό τύπο του γονιδίου της p53. Είναι ενδιαφέρον ότι η έκφραση των πρωτεϊνών mdm2 ή p21/waf1 δεν βρέθηκαν κατά την απουσία της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 στα NHL. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα ότι η απουσία της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 δε θα επιτρέψει την ενεργοποίηση των mdm2 και p21/waf, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει έκφραση των mdm2 και p21/waf.

Όσον αφορά τα p53-/mdm2-/p21- NHL, είναι πιθανόν ότι το γονίδιο της p53 είναι φυσικού τύπου ή ότι το γονίδιο p53 μεταλλάσσεται αλλά δεν ενεργοποιείται εξαιτίας μεταλλάξεων χωρίς νόημα ή μεταλλάξεων που οδηγούν στο μετατοπισμό του πλαισίου δομής τους. Επιπλέον, η πιθανότητα ότι κάποια NHL με μεταλλάξεις της p53 δεν εκφράζουν ανοσοϊστοχημικά την p53, μπορεί να συνυπολογιστεί σε σχέση με προηγούμενα ευρήματα σε αυτούς τους όγκους.

Αν συγκεντρωθούν όλες μαζί, οι παραπάνω πληροφορίες δείχνουν ότι οι ανοσοϊστολογικές έρευνες στην έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21/waf1 μπορούν να δώσουν έμμεσες πληροφορίες για την κατάσταση του γονιδίου της p53 σε λεμφώματα και ένα χρήσιμο βοήθημα στις μελέτες της μοριακής βιολογίας. Επιπλέον συγκρίναμε τις εκφράσεις p53/mdm2/ p21 μεταξύ λεμφαδενικών και MALT-λεμφωμάτων αλλά δεν διαπιστώσαμε ιδιαίτερα σημαντικές αποκλίσεις. Πράγματι η έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21 ήταν συχνότερη στα υψηλής κακοήθειας εξωλεμφαδενικά λεμφώματα.

Συνοπτικά, η μελέτη μας δείχνει ότι υπάρχουν διαφορετικοί τύποι αρμονικής ή δυσαρμονικής έκφρασης των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21 στα NHL, συμπεραίνοντας έτσι ότι η διαταραχή της διόδου καταστολής της ανάπτυξης που έχει σχέση με αυτές τις πρωτεΐνες μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση κάποιων NHL.

Ενας περαιτέρω στόχος αυτής της μελέτης ήταν να καθοριστεί η έκφραση της bcl-2 πρωτεΐνης στα λεμφώματα και να συγκριθεί η έκφραση μεταξύ λεμφαδενικών και εξωλεμφαδενικών λεμφωμάτων.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έδειξαν ότι έκφραση της bcl-2 ογκοπρωτεΐνης βρίσκεται εκτός από τα οζώδη B-λεμφώματα και σε ένα ποσοστό διαχύτων B-λεμφωμάτων υψηλής ιστολογικά κακοήθειας, T-λεμφωμάτων και στα κύτταρα Reed-Sternberg της νόσου Hodgkin, ανεξάρτητα από την παρουσία διαμετάθεσης 14:18 .

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι 6 περιπτώσεις χαμηλής ιστολογικά κακοήθειας γαστρικού B-λεμφώματος MALT ήταν θετικές για την ογκοπρωτεΐνη bcl-2.

Ολες πλην δύο περιπτώσεων υψηλής ιστολογικά κακοήθειας B-γαστρικών λεμφωμάτων MALT ήταν αρνητικές για την bcl-2 ογκοπρωτεΐνη.

Σε δύο περιπτώσεις υψηλής κακοήθειας B-γαστρικών λεμφωμάτων MALT αναγνωρίστηκε περιοχή χαμηλής ιστολογικά κακοήθειας η οποία ήταν bcl-2 θετική. Με βάση αυτά τα ευρήματα συμπεραίνουμε ότι η ογκοπρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται στα χαμηλής ιστολογικά κακοήθειας γαστρικά B-λεμφώματα MALT ενώ είναι απύσθα στη πλειοψηφία των υψηλής κακοήθειας περιπτώσεων. Υπό το φως προηγούμενων μελετών και των ευρημάτων μας που έδειξαν ότι ένα σημαντικό ποσοστό λέμφαδενικών B-λεμφωμάτων υψηλής ιστολογικά κακοήθειας εκφράζει την bcl-2 ογκοπρωτεΐνη, τα αρνητικά ευρήματα μας στα αντίστοιχα MALT λεμφώματα δείχνουν ότι η ρύθμιση του bcl-2 γονιδίου είναι διαφορετική στα λεμφαδενικά από ότι στα MALT λεμφώματα υψηλής ιστολογικά κακοήθειας. Επί πλέον τα ευρήματα μας υπαινίσσονται ότι B-λεμφώματα υψηλής κακοήθειας με ίδια ιστολογική εικόνα αλλά διαφορετική εντόπιση (λεμφαδενικά versus MALT) έχουν διαφορετική παθογένεση. Επιπλέον μελετήσαμε στη παρούσα εργασία τη σχέση του ιού EBV με τα μη-Hodgkin λεμφώματα.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν συσχέτιση μεταξύ EBV και T-ανοσοφαινοτύπου στα λεμφαδενικά και εξωλεμφαδενικά λεμφώματα και συσχέτιση μεταξύ EBV και T-λεμφωμάτων ρινοφάρυγγα στα εξωλεμφαδενικά λεμφώματα.

Επιπλέον δείξαμε απουσία συσχέτισης μεταξύ T- δερματικών λεμφωμάτων και T-λεμφοβλαστικών λεμφαδενικών λεμφωμάτων με τον EBV.

Με βάση το σύνολο αυτών των δεδομένων, και στο μέτρο που η πρωτεΐνη LMP-1 έχει ενοχοποιηθεί για *in vitro* ογκογόνο δραστηριότητα, υποστηρίζουμε

την άποψη ότι ο EBV συμμετέχει στη παθογένεση των κακοήθων νεοπλασιών του λεμφικού συστήματος (τουλάχιστον ενός ποσοστού από αυτά) που δεν σχετίζονται με προϋπάρχουσα ανοικτή ανοσοανεπάρκεια.

Το ερώτημα αν ο EBV έχει έμμεση ή άμεση δράση στη παθογένεση αυτών των λεμφωμάτων είναι ανοικτό και βρίσκεται υπό διερεύνηση.

Ενα ενδιαφέρον και πρωτότυπο εύρημα ήταν η υψηλή συχνότητα του EBV σε CD30 θετικά λεμφώματα. Αυτή η παρατήρηση, με βάση τα προηγούμενα μας δεδομένα ότι τα EBV θετικά κύτταρα της νόσου του Hodgkin (Reed-Sternberg cells) είναι CD30 θετικά, υπαινίσσεται μια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του δείκτη «ενεργοποίησης» CD30 και του EBV, η οποία είχε ήδη ανευρεθεί σε in vitro μελέτες. Στα πλαίσια της διερεύνησης των σχέσεων EBV και λεμφωμάτων είχαμε επίσης την ευκαιρία να παρατηρήσουμε ότι όλα τα T-λεμφώματα της ρινικής κοιλότητας και των παραρινικών κόλπων είναι θετικά για τον EBV και εκφράζουν την «ογκογόνο» πρωτεΐνη LMP-1. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι και στους Δυτικούς πληθυσμούς, όπως και στους πληθυσμούς από την Απω Ανατολή, τα λεμφώματα αυτής της ανατομικής περιοχής έχουν μια σταθερή συσχέτιση με τον EBV.

Ενα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι η σχέση μεταξύ EBV και των T-λεμφωμάτων εξαρτάται από την πρωτοπαθή εντόπιση αυτών. Η ισχυρή συσχέτιση μεταξύ EBV και T-NK λεμφωμάτων της ρινικής κοιλότητας/ρινοφάρυγγα ενώ η απουσία συσχέτισης μεταξύ EBV και T-δερματικών λεμφωμάτων δείχνει ότι πιθανώς η ανατομική εντόπιση T-NK κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη EBV θετικών λεμφωμάτων από αυτά τα κύτταρα. Φαίνεται πιθανό ότι η σταθερή έκθεση των T-NK κυττάρων της ανωτέρας αναπνευστικής οδού στον EBV μπορεί να αποτελεί μία βάση εξήγησης αν επίσης ληφθεί υπόψη ότι τα T-NK κύτταρα είναι υπεύθυνα για την άμυνα εναντίον των ιών μεταξύ των οποίων και ο EBV.

Ενα επίσης ενδιαφέρον ερώτημα είναι το αν ο EBV προσβάλλει τα T-NK κύτταρα πριν ή μετά την νεοπλασματική εξαλλαγή. Φαίνεται ότι T-NK λεμφώματα της ρινικής κοιλότητας / ρινοφάρυγγα ο EBV προσβάλλει τα κύτταρα πριν την νεοπλασματική εξαλλαγή διότι σχεδόν όλα τα κακοήθη κύτταρα είναι EBV θετικά.

Αντίθετα στα περισσότερα άλλα EBV θετικά T-λεμφώματα μόνο ένα ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων φιλοξενεί τον EBV γεγονός το οποίο υπαινίσσεται είσοδο του EBV μετά την νεοπλασματική εξαλλαγή.