

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANTA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL MEDICINĂ
ANUL UNIVERSITAR 2023

TEZĂ DE DOCTORAT

**Corelațiile studiilor clinico-
morfologice și genetice în evaluarea
prognosticului și diagnosticului
limfoamelor maligne non-Hodgkin cu
celulă mare B**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat : **Prof. univ. dr. Mariana Așchie**

Doctorand : **Miruna Cristian**

CUPRINS

ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT	15
INTRODUCERE.....	18
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	21
1. Anatomia și histofiziologia organelor limfoide.....	23
1.1. Țesuturile limfoide normale	24
1.2. Țesuturile limfoide primare (centrale).....	24
1.2.1. Măduva osoasă hematogenă.....	24
1.2.2. Timusul.....	30
1.3. Țesuturile limfoide secundare	31
1.3.1. Foliculul limfoid.....	31
1.4. Splina.....	39
1.4.1. Dezvoltarea ontogenetică a splinei.....	39
1.4.2. Apoptoza	40
1.4.3. Aspecte macroscopice	41
1.4.4. Anatomia splinei	Eroare! Marcaj în document nedefinit. 41
1.4.5. Aspecte microscopice ale splinei	41
1.4.6. Pulpa roșie.....	42
1.4.7. Pulpa albă	44
1.4.8. Pulpa foliculară zonală (PFZ)	45
1.4.9. Funcțiile splinei	45
1.4.10. Funcția de filtrare	46
1.4.11. Funcția imunologică.....	46
1.4.12. Hematopoieza.....	46
1.4.13. Funcția de rezervor.....	46
1.5. Țesutul limfoid asociat mucoaselor	47
2. Considerații generale, statistică, epidemiologie, clasificare, stadializare și histopatologia limfomului non-Hodgkin cu celulă mare B.....	49
2.1. Statistica și epidemiologia limfoamelor maligne cu celulă mare B	49
2.2. Considerații generale asupra limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B.....	49
2.3. Clasificarea WHO/OMS și stadializarea limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B	
50	
2.3.1. Principii ale clasificării neoplasmelor limfoide	50
2.3.2. Clasificarea OMS a neoplasmelor limfoide mature cu celulă mare B (ediția 5-a)	
52	
2.3.3. Stadializarea neoplasmelor limfoide mature cu celulă mare B	53
2.3.4. Aspectele histopatologice ale limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B	56
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	80
3. Motivația, scopul și obiectivele studiului	82
3.1. Motivația studiului.....	82
3.2. Scopul și obiectivele studiului.....	82
4. Material și metodă	85
4.1. Selecția cazurilor și metodele de lucru	85
4.1.1. Selecția cazurilor	85
4.1.2. Metodele de lucru.....	86

4.2.	Tehnici de lucru histopatologice.....	87
4.3.	Tehnici de lucru imunohistochimice	87
4.4.	Tehnici de lucru digitale	88
4.5.	Tehnici de lucru genetice.....	89
4.6.	Analiza statistică.....	94
5.	Studiul 1 – Studiu comparativ între metoda convențională clasică și evaluarea prin intermediul inteligenței artificiale a indicelui de proliferare Ki67 în limfoamele non-Hodgkin cu celulă mare B cu localizare gastrointestinală	96
5.1.	Introducere.....	96
5.2.	Obiective.....	97
5.3.	Material și metodă	97
5.3.1.	Metoda de lucru convențională de evaluare a indicelui de proliferare	106
5.3.2.	Metoda de lucru utilizând inteligența artificială pentru evaluarea indicelui de proliferare	106
5.3.3.	Analiza statistică a datelor.....	114
5.4.	Rezultate	115
5.4.1.	Rezultate clinice și demografice	115
5.4.2.	Indexul de proliferare, tratamentul și rata de supraviețuire	148
5.5.	Discuții.....	152
5.6.	Concluzii.....	154
6.	Studiul 2 – Profilurile moleculare și expresiile imunohistochimice ale genelor MYD88 și PIM1 în limfoamele non-Hodgkin cu celulă mare B	156
6.1.	Introducere.....	156
6.2.	Obiective.....	157
6.3.	Material și metodă	157
6.3.1.	Cohorta de pacienți și speciemenele tisulare tumorale	157
6.3.3.	Izolarea ADN-ului.....	159
6.3.4.	Genotiparea polimorfismelor genelor <i>MYD88</i> (rs387907272, T/C) și <i>PIM1</i> (rs377274719, G/A; rs200495767 C/G; rs137884665 G/T).....	159
6.3.5.	Analiza statistică	159
6.4.	Rezultate	160
6.4.1.	Caracteristicile clinice și demografice ale pacienților.....	160
6.4.2.	Genotiparea <i>MYD88 L265P</i> și expresia <i>MYD88</i>	197
6.4.3.	Genotiparea <i>PIM1 p.G28A, p.L184V, p.V197F</i> și expresia <i>PIM1</i>	207
6.5.	Discuții.....	212
6.6.	Concluzii.....	216
7.	Cazuri particulare de limfom matur cu celulă mare de tip B	217
7.1.	DLBCL, NOS, CD5-pozitiv, cu dezvoltare în cadrul unei deficiențe/deregări imune	217
7.2.	Trăsături clinice	218
7.3.	Examen histopatologic	219
7.4.	Examen imunohistochimic	219
7.5.	Discuții.....	222
7.6.	Concluzii.....	223
8.	Concluzii generale (sinteză)	224
9.	Originalitatea tezei.....	227

9.1. Originalitatea tezei.....	227
9.2. Limitări ale studiului	227
9.3. Direcții viitoare de cercetare.....	228
REFERINȚE	229
ANEXE.....	271
LISTA DE PUBLICAȚII	273
Lista figuri	275
Lista tabele.....	279

Cuvinte-cheie: Limfom, Non-Hodgkin, celulă mare B, difuz, proteina oncogenă MYD88, proteina oncogenă PIM1, machine learning, antigen Ki67, antigen CD5, prognostic.

Teza de doctorat cuprinde:

- 282 de pagini, din care 59 de pagini Partea Generală;
- 95 de figuri, din care 2 în Partea Generală;
- 102 tabele, din care 5 în Partea Generală;
- 503 referințe bibliografice.

Notă: în rezumatul prezent cuprinsul a fost păstrat sub aceeași formă ca în teza de doctorat.

INTRODUCERE

Prin prezentul studiu se urmărește descrierea patologiei tumorale limfoide (limfoamele non-Hodgkin cu celulă mare B) urmărind caracteristicile clinice, histopatologice, imunohistochimice și genetice ale acestora. Pentru buna înțelegere a mecanismelor de dezvoltare și evoluție a acestor entități, aceste date sunt imperios necesare, atât pentru stabilirea unor criterii clare de diagnostic histopatologic cât și pentru identificarea unor factori de prognostic cu rol în supraviețuirea pacienților.

Prin consultarea literaturii de specialitate actuale, am observat o preocupare deosebită a mai multor cercetători asupra criteriilor de diagnostic precoce ale limfoamelor cu celulă mare B, precum și importanța prognosticului în etapele evolutive ale acestora. Astfel, tema aleasă reprezintă un subiect de actualitate, în care, până în prezent nu se cunosc foarte multe date.

Studiile de secvențiere exomică au ilustrat recent că în ciuda utilizării diferitelor abordări de secvențiere și a diversilor algoritmi de grupare - peisajul genetic al limfoamelor cu celulă mare B poate fi utilizat pentru subclasificarea acestora cu o concordanță largă, influențând prognosticul și conduita terapeutică a bolii. Motivația acestui studiu se datorează în primul rând mortalității ridicate în cazul limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B care impune utilizarea unor metode de diagnostic exacte cu o fiabilitate ridicată.

Prin urmare, se impune identificarea unor biomarkeri de predicție a evoluției și prognosticului, care să permită o terapie personalizată.

Validarea unui panel standardizat de mutații genetice care să clasifice pacienții în grupe de risc funcție de prognostic și ulterior să poată permite alegerea terapiei țintite reprezintă un element de originalitate în managementul limfoamelor cu celulă mare B.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Anatomia și histofiziologia organelor limfoide

Țesuturile limfoide sunt locurile în care celulele precursori se maturizează în celule limfoide imunocompetente și unde apar reacții imune la antigeni. Țesuturile limfoide și etapele diferențierii și maturizării limfocitelor au o anatomie - ele apar în anumite locuri ale corpului. Au o arhitectură - fiecare țesut limfoid este organizat într-un mod specific, iar diferențierea și reacțiile celulare au loc în locuri specifice din acest țesut organizat. Au o morfologie celulară specifică - celulele își schimbă dimensiunea, forma și alte caracteristici pe măsură ce se maturizează și reacționează la antigen și alți stimuli. Ele suferă modificări genetice și biologice specifice - celulele limfoide își modifică genele, expresia genică și proteinele pe care le produc și la care răspund în diferitele stadii de diferențiere și maturare. Înțelegerea acestor structuri normale și modificările lor în timpul dezvoltării și activării celulelor limfoide și în timpul răspunsurilor imune este importantă pentru patologii care trebuie să diagnosticheze stări reactive și neoplazice ale țesuturilor și celulelor limfoide.

Pe această anatomie a țesutului limfoid este suprapusă biologia sistemului imunitar. Funcția sistemului imunitar este de a se apăra împotriva infecțiilor. Componentele sale celulare includ

celule fagocitare (neutrofile, monocite și histiocite sau macrofage), limfocite (celule T, celule B și celule natural killer [NK]) și celule prezentatoare de antigen (histiocite, celule dendritice și celule B). Există două tipuri distincte de reacții imune: răspunsuri imune înnăscute sau naturale și răspunsuri imune dobândite sau adaptive.

Răspunsurile imune înnăscute sunt efectuate de fagocite, celule dendritice, celule NK și unele celule T, inclusiv gamma-delta T. celule, care răspund în același mod, indiferent de expunerea anterioară la antigen.

Răspunsurile imune adaptive implică celule T și celule B specifice antigenului și sunt modificate prin expunerea prealabilă la antigen. Recunoașterea antigenului în sistemul imunitar înnăscut este mediată de receptori codificați în ADN-ul germinal. De la existența primelor organisme multicelulare, acești receptori au evoluat pentru a recunoaște un număr limitat de structuri extrem de conservate care sunt prezente pe agenții patogeni comuni - așa-numitele modele moleculare asociate patogenului - dar nu sunt prezente pe celulele gazdă. Acestea includ lipopolizaharide bacteriene, manani de perete celular de drojdie, ADN bacterian și altele. În schimb, recunoașterea antigenului în sistemul imunitar adaptiv este mediată de receptori generați somatic în celulele B și T, producând o mare varietate de receptori de suprafață, dintre care doar unii au specificitate utilă. Cele care sunt periculoase (adică, având specificitate anti-auto) trebuie selectate împotriva celor care sunt utile (adică, specifice pentru agenți patogeni) trebuie selectate prin expansiune clonală la expunerea la antigen. Răspunsul imunitar adaptiv se îmbunătățește în eficiență și specificitate în timpul vieții individului datorită expunerii repetate la antigen, dar, prin definiție, acest lucru nu poate fi transmis descendenților.

O altă diferență majoră între răspunsurile înnăscute și adaptive este că celulele imune înnăscute își îndeplinesc funcțiile efectoare imediat după angajarea receptorului, în timp ce celulele răspunsului adaptiv proliferază mai întâi ca răspuns la antigen. Pe lângă recunoașterea și controlul rapid al agenților patogeni, celulele sistemului imunitar înnăscut inițiază și reglează răspunsurile imune adaptative prin prezentarea de antigen și activarea semnalelor celulelor T și celulelor B.

1.1. Țesuturile limfoide normale

Țesuturile limfoide sunt împărțite în două compartimente majore, în funcție de stadiile de diferențiere a celulelor limfoide și de interacțiunile funcționale: țesuturi limfoide centrale sau primare și țesuturi limfoide periferice sau secundare. Țesuturile limfoide centrale sunt măduva osoasă și timusul. Aceste organe conțin celulele limfoide precursorare și susțin procesul inițial de diferențiere independent de antigen de la celulele imature la stadiul matur, în care își pot îndeplini funcția ca răspuns la antigene. Organele limfoide periferice sau secundare sunt ganglionii limfatici, splina și țesutul limfoid asociat mucoasei (MALT), unde celulele limfoide mature întâlnesc antigeni și dezvoltă diferite tipuri de răspunsuri imune. Aceste compartimente sunt micromedii foarte organizate ale diferitelor populații de celule, structuri vasculare și componente stromale care maximizează interacțiunile selective dintre limfocite și antigeni pentru inițierea și extinderea răspunsurilor imune.

2. Considerații generale, clasificarea, stadializarea și histopatologia limfomului non-Hodgkin cu celulă mare B

2.3. Clasificarea WHO/OMS și stadializarea limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B

Noua ediție a WHO/OMS recunoaște 17 entități specifice ca limfoame cu celulă mare B în afara DLBCL, NOS grupate în funcție de caracteristicile lor genetice, contextul clinic specific sau un anumit loc particular de origine (extranodal):

- Limfom cu celulă mare B cu rearanjarea IRF4
- Limfom difuz cu celulă mare B (DLBCL), NOS
- Limfom cu celulă mare B bogat în celule T/histiocite
- Limfom primar cu celulă B localizat în situsurile imun-privilegiate; Limfom primar difuz cu celulă mare B al sistemului nervos central.
- Limfom difuz cu celulă mare B/Linfom cu celulă B de grad înalt cu rearanjarea MYC și BCL2
- Limfom cu celulă B de grad înalt cu aberație 11q
- Granulomatoză limfomatoidă
- Limfom primar cutanat difuz cu celulă mare B, de tip gambier
- Limfom difuz cu celulă mare B, EBV-pozitiv
- DLBCL ce asociază inflamație cronică/fibrină
- Limfom mediastinal (timic) cu celulă mare B
- Limfom plasmablastic
- Limfom cu celulă mare B asociat supraîncărcării lichidiene
- Limfom intravascular cu celulă mare B
- Limfom cu celulă mare B ALK-pozitiv
- Limfom cu celulă B de grad înalt, NOS
- Limfom mediastinal de zonă "gri"

În majoritatea acestor categorii, conceptele biologice și strategiile de diagnosticare au rămas în mare parte neschimbate; cu toate acestea, unele dintre denumiri au fost schimbate de la ediția a 4-a (revizuită), cum ar fi denumirea de limfom difuz cu celulă mare B la limfom cu celulă mare B, recunoscând faptul că un model de creștere difuză nu face neapărat parte din definiția bolii sau că un model de creștere nu poate fi evaluat în unele entități.

Tipurile/entitățile de limfom sunt definite prin criterii morfologice, imunofenotipice și clinice, dar niciuna dintre acestea nu este absolut specifică și definitorie. Prin urmare, o linie ierarhică de luare a deciziilor este inevitabilă. Caracteristicile morfologice și/sau clinice care definesc entitatea/tipul, respectiv, anulează caracteristicile genetice în astfel de cazuri. În mod similar, o caracteristică de deficiență imună/dereglare anulează alți parametri definitorii (de exemplu, localizarea SNC a DLBCL asociată cu deficiența/dereglarea imună, EBV-pozitiv, HIV-pozitivă).

2.3.4. Aspectele histopatologice ale limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B

2.3.4.2. Limfomul difuz cu celulă mare B (DLBCL), NOS

DLBCL, NOS, este un limfom format din celule B de dimensiune medie-mare, cu un model de creștere difuz. Aceasta este o entitate heterogenă din punct de vedere morfologic și molecular

care nu îndeplinește criteriile de diagnostic ale neoplasmelor specifice de limfom cu celulă mare B .

2.3.4.3. Limfomul cu celulă mare B bogat în celule T/histiocite (THRLBCL)

THRLBCL este un limfom cu celule B agresiv cu <10% celule B neoplazice mari, împrăștiate într-un fundal difuz bogat în celule T și histiocite și cu absența virtuală a celulelor B mici. Un subset de cazuri prezintă o suprapunere clinică, imunofenotipică și moleculară marcată cu limfomul Hodgkin predominant limfocitar nodular (NLPHL).

2.3.4.4. Limfomul primar cu celulă B localizat în situsurile privilegiate din punct de vedere imunitar: Limfomul primar difuz cu celulă mare B al sistemului nervos central

Limfoamele primare cu celulă mare B (LBCL) ale locurilor imun-privilegiate (IP-LBCL) cuprind limfoame cu celulă mare B care apar ca tumori primare în sistemul nervos central (SNC), vitreoretina și testiculele pacienților imunocompetenți. Sunt excluse din această categorie limfoamele care apar în dura și coroidă, limfoamele care implică secundar aceste situsuri și cele care apar în situații legate de deficiența imună/dereglare.

2.3.4.5. Limfomul primar cutanat difuz cu celulă mare B, de tip gambier

Limfomul primar cutanat difuz cu celule B mari, de tip gambier (PCLBCL-LT) este un limfom compus exclusiv din centroblaste și imunoblaste, care apar cel mai frecvent la nivelul piciorului.

2.3.4.6. Limfomul cu celulă mare B de grad înalt, NOS

Limfomul cu celule B de grad înalt, NOS (HGBL, NOS) reprezintă o categorie heterogenă de limfoame agresive cu celulă B matură compuse din celule de dimensiuni medii sau blastoide care nu se încadrează în alte categorii definite de limfoame.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

3. Motivația, scopul și obiectivele studiului

În diagnosticul precis al neoplaziilor limfoide, este esențială o abordare multidisciplinară care acoperă aspecte clinice, microscopice și moleculare. Alegerea acestui subiect derivă din complexitatea manifestărilor clinice și a suprapunerilor frecvente între caracteristicile histopatologice ale diferitelor tipuri de limfom cu celulă B, precum și datorită mortalității ridicate în cazul acestui spectru tumoral care impune utilizarea unor metode de diagnostic exacte cu o fiabilitate ridicată. De asemenea, datele patogenice sunt încă insuficiente, chiar și în ciuda numeroaselor studii efectuate până în prezent. Prin prezentul studiu se urmărește identificarea a 4 mutații oncogene la pacienții cu limfoame non-Hodgkin cu celulă mare B și validarea acestora în panelul standard de investigare cu scopul stratificării pacienților pe grupe de risc, precum și evidențierea posibilelor corelații cu variabilele clinico-morfologice și genetice în vederea selectării celor mai fideli indicatori de predicție și evoluție a bolii. De asemenea se urmărește identificarea unor metode de diagnostic cât mai rapide și mai fiabile, precum și evaluarea utilității prognostice a unor biomarkeri în cadrul acestor neoplazii.

4. Material și metodă

A fost realizat un studiu retrospectiv pe un lot de 50 pacienți diagnosticați cu limfom malign non-Hodgkin cu celulă mare B, în cadrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică Constanța și în cadrul Serviciului de Anatomie Patologică Săcele, Brașov, aflați sub tratament oncologic pentru această afecțiune. Caracteristicile clinice și paraclinice ale pacienților au fost colectate retrospectiv din foile de observație ale pacienților din cadrul secției de Medicină Internă și Hematologie și registrul Serviciului Clinic de Anatomie Patologică: vârsta la debut, sex, date paraclinice (LDH, serologie virală), tratamentul urmat.

Metodele de cercetare folosite pentru realizarea studiului:

1. Selectia cazurilor din histoteca Serviciului Clinic de Anatomie Patologică Constanța și din cadrul Serviciului de Anatomie Patologică Săcele, Brașov și reevaluarea anatomopatologică și imunohistochimică - reprezintă încadrarea leziunilor diagnosticate anterior ca limfom non-Hodgkin cu celula mare de tip B conform stadializarilor și clasificărilor actuale publicate în WHO 2022. Toți pacienții au fost stadializați utilizând Statusul de Performanță ECOG, Sistemul de Stadializare Ann Arbor și Indicele de Prognostic Internațional.
2. Analiza imunohistochimică utilizând biomarkerii MYD88 (clona RM306) și PIM1 (clona ST0513), de la Novus Biologicals, utilizând metoda DAB și respectând recomandările producătorului a fost realizată în cadrul Centrului de Cercetare Dezvoltare a Studiilor Morfologice și Genetice în Patologia Malignă (CEDMOG), Universitatea "Ovidius" din Constanța.
3. Evaluarea biomarkerilor a fost realizată utilizând atât calitativ cât și cantitativ. Pentru cuantificarea expresiei imunohistochimice a MYD88 a fost utilizat un sistem de scorificare pe baza intensității.
4. Scanarea lamelor a fost obținută utilizând scannerul de lame Huron LE120TM 4000XT în cadrul Centrului de Cercetare Dezvoltare a Studiilor Morfologice și Genetice în Patologia Malignă (CEDMOG), Universitatea "Ovidius" din Constanța.
5. Cuantificarea digitală a indicelui de proliferare Ki67 a fost realizată utilizând software-ul QuPath (versiunea 0.4.3.).
6. Extracția ADN genomic a fost efectuată din blocurile de parafină, prin metoda disecției macroscopice a țesutului neoplazic reprezentativ și procesat cu ajutorul kitului de extracție QiaAmp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany) conform recomandărilor producătorului. Probele ADN extrase au fost cuantificate spectrofotometric cu Nanodrop OneC (ThermoFisher Scientific) determinându-se concentrația și puritatea prin calcularea rapoartelor A260/A280nm și A260/A230nm, dar și fluometric cu ajutorul Qubit III (Life Technologies) pentru o determinare mai exactă a concentrației.
7. Genotiparea MYD88 și PIM-1 a fost realizată folosind kitul TaqMan SNP Genotyping Assay, (AppliedBiosystems), folosind sonde TaqMan specifice pentru mutațiile celor 2 gene.
8. Analiza statistică uni- și multivariată a cazurilor stratificate, dar și regresia logistică a fost realizată folosind SPSS software versiunea 26.0.

5. Studiul 1 – Studiu comparativ între metoda convențională clasică și evaluarea prin intermediul inteligenței artificiale a indicelui de proliferare Ki67 în limfoamele non-Hodgkin cu celulă mare B cu localizare gastrointestinală

5.1. Introducere

Tractul gastrointestinal reprezintă cea mai frecventă localizare a limfomului non-Hodgkin extraganglionar, reprezentând 20% până la 40% din toate limfoamele extraganglionare. Majoritatea limfoamelor non-Hodgkin care implică tractul gastro-intestinal aparțin liniei de proliferare celulară B, dintre care limfomul difuz cu celulă mare B este cel mai frecvent subtip, indiferent de localizare. Odată cu dezvoltarea recentă a imaginii digitale a întregii lame de sticlă (WSI), este acum posibilă identificarea automată a caracteristicilor histopatologice ale limfoamelor. O metodă de definire a patologiei digitale este procesul de utilizare a scanerelor de lame pentru a converti lamele de sticlă cu probe histopatologice, în imagini digitale de înaltă rezoluție, care sunt apoi interpretate și utilizate pentru a genera date patologice. QuPath este un software care oferă cercetătorilor o funcționalitate puternică de procesare în loturi, continuă, și o platformă extensibilă cu care să dezvolte și să partajeze noi algoritmi pentru a analiza imagini complexe de țesut. Cu toate acestea, studiile privind utilizarea patologiei digitale pentru identificarea limfomului sunt încă limitate doar la determinarea dacă o proliferare tumorală este prezentă sau absentă.

Scopul principal al acestui studiu actual este de a investiga utilitatea de diagnosticare a DP folosind software-ul QuPath (versiunea 0.4.3) în evaluarea semnificației prognostice a Ki67 la pacienții cu limfoame gastrointestinale cu celulă mare B, pentru a compara valorile obținute între metoda convențională de evaluare și evaluarea cu ajutorul inteligenței artificiale (AI) și de a observa rolul prognostic în supraviețuirea pacientului a parametrilor studiați la un grup de pacienți diagnosticați în cadrul a două centre din România, observându-le asociațiile și corelațiile.

5.4. Rezultate

Vârsta medie a pacienților a fost de 56,73 ani (SE 3,833) cu extreme între 32 și 86 de ani. Cel mai afectat a fost sexul masculin, observat în 60% din cazuri. S-a observat o asocierie semnificativă statistic între prezența anemiei secundare și pacienții tineri, spre deosebire de cei mai în vârstă ($p = 0,035$). Vârsta medie a pacienților cu DLBCL, NOS, a fost mai mare (58,15 ani) comparativ cu vârsta medie a celor cu HGBL, NOS (47,50 ani), fără o diferență semnificativă statistic ($p = 0,305$).

Cea mai frecventă localizare a limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B în tractul gastrointestinal, a fost la nivelul stomacului (33,33%) respectiv la nivelul intestinului subțire (33,33%). De asemenea, cele mai frecvente localizări ale limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B, în tractul gastro-intestinal atât la bărbați, cât și la femei, cu același procent, au fost la nivelul stomacului (33,33%) și intestinului subțire (33,33%). Cele mai frecvente comorbidități întâlnite au fost anemia secundară (93,33%) și hiperuricemia (20%). Ca factor de risc semnificativ pentru dezvoltarea bolii, doar un singur caz a prezentat infecție cu bacteria *Helicobacter pylori* și DLBCL, NOS, localizată la nivelul stomacului (6,67%).

În cazurile în care celula de origine a putut fi identificată (86,67%), s-a observat o predominanță a subtipului asemănător celulei B din centrul germinal (GCB) (84,62%).

Valoarea medie a LDH serică a fost de 731,07, cu limite cuprinse între 164 și 3956. În 66,67% din cazuri s-a observat o valoare peste limita normală. S-a observat o diferență semnificativă statistic, constând în faptul că vârsta înaintată a pacienților s-a corelat cu valorile crescute ale LDH ($p = 0,040$).

La sfârșitul studiului, 10 pacienți au decedat (66,67%). Durata medie de viață a pacienților din grupul care a decedat a fost de 32,07 săptămâni (1-126,09 săptămâni).

Majoritatea pacienților (73,3%) au avut un scor IPI scăzut (0-2), iar mai mult de jumătate dintre pacienți (53,3%) au avut un scor prognostic ECOG ridicat (2-4). Stadializarea Ann Arbor a evidențiat toate cazurile din categoria de grad înalt (III-IV). Aproape toți pacienții cu limfom cu localizare la nivelul intestinului subțire au avut un scor IPI ridicat (3-5) în comparație cu celelalte localizări și, în contrast, toți pacienții cu limfom localizat la nivelul stomacului au avut un scor IPI scăzut (0-2), cu semnificație semnificativă din punct de vedere statistic ($p = 0,012$).

Distribuția la nivelul tubului digestiv a prezentat o frecvență crescută a acestora la nivelul stomacului și intestinului subțire (33,33% fiecare), mai puțin evidentă la nivel proximal (orofaringian 13,33%). În funcție de topografia lezională, s-a observat o supraviețuire crescută în localizările de la nivelul intestinului gros (94,20 săptămâni), spre deosebire de celelalte localizări ($p = 0,011$). Totuși, localizarea nu reprezintă un factor de risc independent care prezice mortalitatea ($p = 0,054$).

Indicele mediu de proliferare (Ki67) a fost de 58,33% cu valori cuprinse între 10% și 85%. Cu toate acestea, evaluarea prin metoda convențională (vizuală/microscopic optic) oferă valori Ki67 mai mici decât analiza automată a imaginii digitale. După stratificarea cazurilor, s-a observat un indice de proliferare crescut în majoritatea cazurilor (53,33%). Acest aspect a fost asociat cu vârsta înaintată a pacienților ($p = 0,045$). Coeficientul de concordanță dintre metoda convențională și metoda AI indică un nivel excelent de fiabilitate (ICC1-0,970, ICC2-0,990). Analiza multivariată a relevat faptul că în cazurile în care indicele de proliferare Ki67 este ridicat (>70%), scorul IPI reprezintă un factor de risc important de predicție a mortalității (HR = 10,597, $p = 0,033$).

5.5. Discuții

În studiul nostru, DLBCL, NOS, a fost cel mai frecvent subtip în grupul de pacienți studiat (86,67%), în concordanță cu rezultatele obținute și cu datele furnizate de OMS Ediția a 5-a, 2022. Conform unor studii anterioare, cea mai frecventă localizare pentru LNH gastrointestinal este la nivelul stomacului (60-75% din toate cazurile), urmat de intestinul subțire și regiunea ileocecală, iar două dintre cele mai răspândite diagnostice sunt limfomul difuz cu celulă mare B (DLBCL) și limfomul de zonă marginală (MALT). Cercetarea noastră susține acest lucru: cea mai frecventă localizare a pacienților diagnosticați cu DLBCL, NOS, la nivelul tractului gastro-intestinal a fost la nivelul stomacului (33,33%) și intestinul subțire (33,33%).

În ceea ce privește subtipurile moleculare, subtipul GCB (cu celulă B de centru germinal) are o frecvență de aproximativ 60%, în timp ce subtipul ABC (cu celulă B activate) are o frecvență de aproximativ 25-30%. Cercetarea noastră a identificat cazurile în care a putut fi determinată celula de origine (86,67%), cu o predominanță mai mare a subtipului GCB (84,62%).

Studii recente au arătat că în cadrul limfomului, LDH serică se corelează puternic cu niveluri mai ridicate de ADN tumoral fără celule și ar putea fi un surogat al celulelor tumorale circulante crescute. Studiul de față demonstrează că în 66,67% din cazuri s-a observat o valoare peste limita normală (>250) și o diferență semnificativă statistic, constând în faptul că vârsta înaintată a pacienților s-a corelat cu valorile crescute ale LDH serică ($p = 0,040$). În cercetarea noastră, în ceea ce privește supraviețuirea pacienților în funcție de acest parametru, nu au fost observate diferențe majore – 31,39 săptămâni pentru valori crescute și 33,66 pentru valori normale.

Conform unui studiu realizat de Prochazka și colab., în analiza univariabilă a timpului până la eveniment, nivelurile crescute de acid uric au fost asociate cu o PFS mai proastă (supraviețuirea fără progresie; riscul relativ (HR)) și o rată de supraviețuire (OS) mai proastă. În studiul nostru, una dintre cele mai frecvente comorbidități întâlnite a fost hiperuricemia (20%), dar nu s-a corelat cu o rată de supraviețuire mai proastă. Proteina nucleară Ki-67 este implicată în controlul proliferării celulare, iar expresia sa a fost folosită în mod obișnuit ca marker pentru a evalua activitatea proliferativă a limfomului. Semnificația sa predictivă pentru limfom este încă nedefinită și insuficientă, totuși. În studiul nostru, după stratificarea cazurilor, s-a observat un indice de proliferare crescut în majoritatea cazurilor (53,33%), iar acest aspect a fost asociat cu vârsta înaintată a pacienților ($p = 0,045$). Supraviețuirea medie a fost similară (31,04 săptămâni și, respectiv, 33,62 săptămâni), indiferent dacă indicele de proliferare Ki67 a fost clasificat ca ridicat sau scăzut. Conform unui studiu realizat de Broyde și colab., în limfomul difuz cu celulă mare B, o valoare limită de 70% poate distinge pacienții cu prognostic bun și prost atunci când este combinată cu alți factori de prognostic ca scorul IPI scăzut și boală de tip "bulky". În mod similar, studiul nostru a arătat că în cazurile de limfom cu celulă mare B în care indicele de proliferare Ki67 este ridicat (>70%), scorul IPI reprezintă un factor de risc important în prezicerea mortalității. Cu toate acestea, variabilitatea intra- și interobservator a Ki-67, care este dependentă de heterogenitatea tumorii și a zonei supuse examinării, descurajează validarea acestuia ca factor de prognostic. În studiul nostru, coeficientul de acord între metoda convențională și metoda AI indică un nivel excelent de fiabilitate (ICC1–0,970, ICC2–0,990).

5.6. Concluzii

În concluzie, studiul nostru a arătat că în cazurile de limfom cu celulă mare B în care indicele de proliferare Ki67 este ridicat (>70%), scorul IPI reprezintă un factor de risc important care prezice mortalitatea, fără o corelație semnificativă statistic între expresia Ki67 analizată cu metoda convențională sau metoda AI și statusul de performanță ECOG sau stadializarea Ann Arbor.

În ciuda ecranului histopatologic de diagnosticare provocator pentru patologii practicanți, deoarece diferitele forme de limfoame prezintă o heterogenitate modestă în constatările lor histologice, identificarea automată s-a dovedit a fi mai obiectivă și reproductibilă. Evaluarea Ki67 în limfoamele non-Hodgkin cu celulă mare B cu ajutorul software-ului QuPath poate atinge scopul de a crește productivitatea anatomo-patologilor și poate demonstra fezabilitatea integrării unui ecran automat de diagnosticare a limfoamelor pentru a ajuta la diagnosticarea mai precisă a acestora, în fluxul de lucru din anatomia patologică în viitor.

6. Studiul 2 – Profilurile moleculare și expresiile imunohistochimice ale genelor MYD88 și PIM1 în limfoamele non-Hodgkin cu celulă mare B

6.1. Introducere

Cadrelle morfologice și/sau clinice care definesc entitatea/tipul, anulează caracteristicile genetice în astfel de cazuri. În mod similar, un cadru de deficiență/dereglare imună anulează alți parametri definitorii (de exemplu, localizarea SNC a DLBCL asociată cu deficiența /dereglarea imună, cadrul EBV-pozitiv, HIV-pozitiv). Acestea sunt îmbogățite pentru mutații ale căii BCR, cum ar fi în MYD88, CD79B, PIM1 și PRDM1 care codifică BLIMP1. Proteina răspunsului primar de diferențiere mieloidă 88 (MYD88) este o moleculă adaptoare importantă în semnalizarea a receptorilor toll-like (TLR) care determină activarea NF-κB și producerea atât a citokinelor inflamatorii, cât și a interferonilor de tip I. Ngo și colab. au constatat că 29% dintre pacienții diagnosticați cu DLBCL, subtip ABC, au prezentat un schimb de leucină (CTG) cu prolină (CCG) la poziția 265 (L265P) a genei de răspuns principal de diferențiere mieloidă 88, care poate fi un alt factor care contribuie la hiperactivitatea NF-κB. Expresia PIM1 este corelată cu un prognostic slab în DLBCL, NOS și cele mai frecvente mutații PIM1 identificate la pacienții cu răspuns slab la terapia țintită sunt G28D, L2V și S97N. Prin urmare, PIM1 apare ca o țintă atractivă în terapia neoplasmelor hematopoietice și ca un biomarker al progresiei timpurii. Cu toate acestea, mutațiile MYD88 L265P și PIM1 p.G28A, p.L184V și p.V197F nu au fost încă examinate împreună cu expresia proteinei MYD88 și PIM1 în cazurile de NHL cu celulă mare B. În acest studiu, ne-am propus să determinăm frecvența mutației MYD88 L265P și PIM1 p.G28A, p.L184V, p.V197F, nivelul exprimării imunohistochimice MYD88 și PIM1 și asocierile acestora între ele și cu parametrii clinico-patologici în rândul pacienților cu limfoame non-Hodgkin cu celulă mare B din România. Prin urmare, poate fi esențială efectuarea unei determinări a acestor mutații și, dacă este necesar, să se clasifice tumorile în lumina existenței mutației în limfoame.

6.4. Rezultate

În studiul de față, am identificat 50 de cazuri de limfoame non-Hodgkin cu celulă mare B, acestea fiind reprezentate de tipurile DLBCL (80%), HGBL (8%), THRLBCL (8%) și PCLBCL-LT (4%). În cazul celei de origine a DLBCL, cel mai frecvent identificat a fost subtipul GCB (80%). Limfoamele non-Hodgkin cu celulă mare B au afectat ambele sexe în mod egal (M:F=1:1). Vârsta medie a pacienților a fost de 61,04 ani (cu extreme între 27-101 ani), majoritatea pacienților având peste 60 de ani (60%). Mai mult de jumătate din cazuri au fost identificate la nivelul ganglionilor limfatici (54%). Celelalte localizări principale ale LNH cu celulă mare B, conform analizei lotului studiat, sunt la nivelul tractului gastrointestinal (30%) respectiv SNC (8%). De asemenea, cea mai frecventă localizare în tractul gastrointestinal a fost la nivelul stomacului (10%) respectiv intestinului subțire (10%). Pacienții diagnosticați limfom au prezentat un status de performanță ECOG scăzut (0-1) la internare în majoritatea cazurilor (70%). Conform fișelor medicale de spitalizare a pacientului, cele mai frecvente comorbidități raportate au fost anemia secundară (74%), hipertensiunea arterială (20%) și diabetul zaharat (14%).

Vârsta înaintată a pacienților, în special a celor peste 60 de ani, a fost asociată cu prezența hipertensiunii arteriale ($p=0,038$, respectiv $p=0,031$). De asemenea, a fost observată o asociere cu prezența fibrilației atriale la pacienții vârstnici ($p=0,016$). Prezența dislipidemie a fost observată mai ales în cazul DLBCL, prezentând asocieri statistice semnificative cu sexul feminin ($p=0,018$). S-a remarcat faptul că hipertensiunea arterială este în strânsă asociere cu hiperuricemia ($p=0,020$), fibrilația atrială ($p<0,001$), hematuria ($p=0,002$), insuficiența renală ($p=0,003$), hemoragia digestivă superioară ($p=0,003$) și insuficiența cardiacă ($p=0,003$). $<0,001$). Unii dintre pacienți au prezentat antecedente de infecții acute în 16% din cazuri (cu *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*; *Helicobacter Pylori* și *Candida Albicans*) sau infecții cronice precum virusul hepatitic C (HVC, 8%), tuberculoza (TBC, 8%), virusul hepatitic B (HVB, 4%) sau virusul imunodeficienței umane (HIV, 4%).

Pacienții cu infecție HIV au fost mai tineri decât pacienții fără infecție HIV ($p=0,003$). O predominanță a pacienților de sex masculin a fost observată în distribuția antecedentelor de boli infecțioase acute ($p=0,007$), iar HVC a fost observată mai ales la pacienții de sex feminin ($p=0,038$).

Majoritatea pacienților (70%) au avut un status de performanță bun ECOG (0-1). Principalele simptome care au dus la spitalizare au variat, cele mai frecvente fiind hiperuricemia (16%), hepatosplenomegalia (16%) sau hematuria (12%). Prezența hiperuricemiei a fost asociată cu prezența neoplasmelor concomitente ($p=0,015$).

Din punct de vedere biochimic, cea mai importantă modificare a fost creșterea valorilor LDH serică (56% din cazuri). LDH serică a avut o valoare medie de 471,04 UI/L.

În cazul sindromului anemic, valoarea medie a hemoglobinei a fost de 10,93 g/dl (4,90-15,70 g/dl). În ceea ce privește asocierea dintre analizele de laborator, am observat o creștere a valorilor LDH serice la internare care a fost asociată statistic semnificativ cu prezența anemiei ($p=0,033$), dar și cu valori scăzute ale hemoglobinei ($p=0,011$). De asemenea, am observat o asociere semnificativă statistic între valorile LDH serice și hemoglobină - cu cât valoarea LDH este mai mare, cu atât hemoglobina este mai mică ($p=0,001$). Cu toate acestea, în cazul valorilor LDH crescute, statusul de performanță ECOG a fost scăzut (0-1), ($p=0,033$). În cazul hemoglobinei, scăderea acesteia a fost asociată și cu prezența hemoragiei digestive superioare ($p=0,021$), precum și cu alte neoplasme concomitente ($p=0,046$).

Puțin peste jumătate dintre cazuri au avut localizare ganglionară (54%), fiind asociată cu prezența hepatosplenomegaliei ($p=0,039$). Pacienții cu limfom la nivelul intestinului subțire, splinei, creierului și testiculelor au avut un status de performanță ECOG ridicat (2-4) în comparație cu celelalte locații ($p=0,001$).

În funcție de localizările limfomului cu celulă mare B, localizările testiculare sau splenice au fost asociate cu cea mai redusă supraviețuire, 7 zile (o săptămână), respectiv 49,14 zile (7,02 săptămâni). De asemenea, s-a observat o supraviețuire mai redusă în localizarea extraganglionară a limfoamelor comparativ cu localizarea ganglionară a limfoamelor ($p=0,130$).

O valoare crescută a LDH a fost asociată cu supraviețuirea scăzută a pacienților ($p=0,002$), 869,34 zile (124,19 săptămâni) față de 2447,10 zile (349,58 săptămâni). O valoare LDH crescută la internare a reprezentat un factor de risc negativ independent în ceea ce privește supraviețuirea pacientului (HR=3,100, $p=0,004$).

Stadializarea Ann Arbor a evidențiat o ușoară majoritate a cazurilor (52%) în categoria de grad scăzut (I-II). Același aspect a fost găsit și a putut fi transpus în ceea ce privește scorul IPI, 64% dintre cazuri fiind cu risc scăzut. O stadializare Ann Arbor de grad scăzut a fost asociată cu

localizări ganglionare ($p<0,001$), iar un aspect similar a fost observat și în cazurile cu un scor IPI scăzut ($p=0,001$). Un scor IPI ridicat a fost asociat cu localizări extraganglionare, altele decât cele de la nivelul tegumentului sau intestinului gros ($p<0,001$). De asemenea, un scor IPI ridicat a fost remarcat în cazurile cu valori LDH serice crescute ($p=0,001$).

Din păcate, nu toți pacienții au beneficiat de tratament, ci doar 62% dintre ei, iar protocolul de tratament preferat a fost R-CHOP (44%). Această schemă de tratament a fost asociată în special cu o vârstă scăzută a pacienților ($p=0,034$), dar și cu localizarea ganglionară a limfomului ($p=0,004$). Ambele scheme de protocol R-CHOP și CHOP au fost asociate cu un status performanță ECOG bun ($p<0,001$), cu un stadiu Ann Arbor scăzut ($p=0,005$) și cu un scor favorabil de risc IPI ($p<0,001$).

La sfârșitul acestui studiu, doar 36% dintre pacienți erau în viață. Supraviețuirea medie a fost de 913,42 zile (130,48 săptămâni). Pacienții cu un status de performanță bun (0-1) au avut o supraviețuire medie mult mai mare, 2176,49 zile (310,92 săptămâni) față de 54,36 zile (7,76 săptămâni), comparativ cu cei cu un status modificat ($p<0,001$). Statusul de performanță ECOG a reprezentat un factor de risc independent care prezice mortalitatea ($HR=9,372$, $p<0,001$).

Cel mai eficient tratament pentru asigurarea supraviețuirii a fost utilizarea schemei CHOP, în cazul acesteia observându-se o supraviețuire medie de 2323,32 zile (331,90 săptămâni), în timp ce în schema R-CHOP s-a observat o medie de 2278,90 zile (325,55 săptămâni), iar cei care nu au efectuat tratament chimioterapic au avut o medie de 117,16 zile (16,73 săptămâni), ($p<0,001$). Lipsa tratamentului chimioterapeutic reprezintă un factor de risc privind mortalitatea pacientului ($HR=6,750$, $p<0,001$).

Scorul IPI a fost asociat cu supraviețuirea pacienților, astfel încât cei cu risc crescut au avut o medie mai mică, 54,36 zile (7,76 săptămâni) față de 2176,49 zile (310,92 săptămâni), comparativ cu cei din categoria cu risc scăzut ($p<0,001$). Riscul ridicat reprezentat de scorul IPI reprezintă un factor de risc negativ în ceea ce privește supraviețuirea pacientului ($HR=4,654$, $p<0,001$).

Analiza multivariată a datelor arată că asocierile dintre un status de performanță moderat scăzut (2-4) cu vârsta de peste 60 de ani și o valoare LDH crescută cu prezența anemiei sunt factori de risc privind supraviețuirea ($HR=7,715$, $p<0,001$, respectiv $HR=3,582$, $p=0,020$).

Analiza genetică a relevat un status mutant al MYD88 în 8% din cazuri și al PIM1 în 2% din cazuri. Dintre pacienții cu mutație L265P, au fost un pacient de sex masculin respectiv trei pacienți de sex feminin, cu o vârstă medie de 68,5 ani, variind de la 54 la 82 de ani. Trei dintre pacienți aveau o vârstă mai mare de 60 de ani. Niciunul dintre pacienții cu mutația L265P nu a arătat o asociere semnificativă cu parametrii clinici ai DLBCL, inclusiv vârsta pacientului, genul, localizarea tumorii, statusul de performanță ECOG, nivelul LDH serică, scorul IPI și stadiul Ann Arbor. Toți pacienții, cu excepția a doi dintre aceștia, au fost diagnosticați cu limfom difuz cu celulă mare B, subtipul non-GCB.

MYD88 a fost exprimat în celulele limfoide în 8 (16%) din 50 de cazuri. În ceea ce privește imunopozitivitatea MYD88, cuantificarea reacției a evidențiat un scor scăzut (2-4) în 10% din cazuri și un scor înalt (5-6) în 6% din cazuri. Un scor înalt a fost asociat cu limfoamele HGBL, în timp ce un scor scăzut a fost corelat cu THRLBCL și PCLBC ($p=0,005$). În cazurile de DLBCL, imunopozitivitatea cuantificată ca scor scăzut și înalt este asociată cu originea non-GCB ($p<0,001$), dar nu și cu alți parametri clinico-patologici. Nu a fost observată nicio corelație

semnificativă statistic între expresia MYD88 și mutația L265p MYD88 (Spearman $\rho = -0,072$, $p=0,617$).

Analiza genetică a evidențiat un status mutant al PIM1 în 2% din cazuri. PIM1 p.G28A a fost observat în 1 din 4 cazuri THRLBCL. PIM1 a fost exprimat în celulele limfoide în 27 (54%) din 50 de cazuri. Niciunul dintre pacienții cu mutația PIM1 p.G28A nu a prezentat o asociere semnificativă cu parametrii clinici, inclusiv vârsta pacientului, genul, localizarea tumorii, statusul de performanță ECOG, nivelul LDH serică, scorul IPI și stadiul Ann Arbor.

Analiza multivariată a relevat că asocierea dintre o valoare LDH ridicată la internare și expresia imunohistochimică a PIM1 sau statusul mutant al genei PIM1, reprezintă factori de prognostic negativ (HR=2,066, $p=0,042$, respectiv HR=3,100, $p=0,004$).

Nu a fost observată nicio corelație semnificativă statistic între expresia PIM1 și mutația PIM1 p.G28A (Spearman $\rho = -0,132$, $p=0,361$). În cazul statusului mutant nu s-au remarcat decese, acestea fiind notate doar în cazul statusul "wild type".

6.5. Discuții

În studiul actual, DLBCL, NOS este cel mai frecvent subtip de limfom din cohorta de pacienți examinați (80%), iar constatările au fost în acord cu datele furnizate de OMS 2022.

În concordanță cu constatările unor studii anterioare, am remarcat faptul că jumătate din cazurile de DLBCL, NOS au fost identificate la nivelul ganglionilor limfatici (50%). În cercetarea noastră, cele mai frecvente localizări extraganglionare ale limfoamelor cu celulă mare B sunt la nivelul tractului gastrointestinal (30%), reprezentat de stomac (10%), intestin subțire (10%) și intestin gros (6%).

În studiul nostru, vârsta medie a pacienților diagnosticați cu DLBCL, NOS este similară cu estimarea anterioară (60,78 ani). Sunt disponibile date limitate în mod specific pentru HGBL, NOS dar cel puțin este stabilit faptul că incidența acestuia crește în general odată cu vârsta și, în consecință, pacienții vârstnici sunt afectați cel mai adesea. În studiul nostru, vârsta medie a pacienților diagnosticați cu HGBL, NOS a fost sub aceste valori (55,25 ani), subliniind predominanța bolii la pacienții mai tineri. THRLBCL reprezintă <10% din totalitate limfoamelor cu celulă mare B și afectează preferențial adulții de vârstă mijlocie sau vârstnicii (interval de vârstă 18 – 90 de ani), în cazuri rare afectând copiii. În studiul nostru, vârsta medie a pacienților diagnosticați cu THRLBCL a fost similară cu valorile menționate în literatura de specialitate (58 de ani). PCLBCL-LT apare de obicei la pacienții vârstnici cu o vârstă medie de aproximativ 75 de ani, dar în studiul nostru, vârsta medie a pacienților cu PCLBCL-LT a fost mai mare decât aceste valori (84 de ani).

Cercetarea noastră a identificat cazurile în care celula de origine a putut fi identificată (80%), cu o predominanță mai mare a subtipului GCB (64%) și o predominanță mai redusă a subtipului non-GCB (16%). DLBCL, NOS apare în general puțin mai frecvent la sexul masculin față de sexul feminin iar în mod similar, în studiul prezent, pacienții de sex masculin sunt cel mai frecvent diagnosticați cu DLBCL, NOS, fapt observat în 52,5% din cazuri.

În cazurile diagnosticate cu limfom cu celulă mare B, de grad înalt, NOS nu a fost raportată nicio predilecție de gen. În cercetarea noastră, sexul feminin este cel mai frecvent afectat (75%). THRLBCL are o ușoară predominanță masculină cu un raport bărbați:femei, de 1,7-2,6:1. În schimb, în studiul nostru, THRLBCL afectează ambele sexe în mod egal (M:F = 1:1). PCLBCL-LT este mai frecvent la pacienții de sex feminin, cu un raport femei:bărbați între 2:1 și 4:1. În mod contrar, în studiul nostru, PCLBCL-LT afectează ambele sexe în mod egal (M: F = 1:1).

Cercetarea noastră a identificat faptul că, din păcate, nu toți pacienții au beneficiat de tratament, ci doar 62% dintre ei, iar schema preferată a fost R-CHOP (44%). În studiul nostru, schema de tratament cu R-CHOP a fost asociată în special cu vârsta redusă a pacienților ($p=0,034$), dar și cu localizarea ganglionară a limfomului ($p=0,004$). Ambele scheme de protocol R-CHOP și CHOP au fost asociate cu o status de performanță ECOG bun ($p<0,001$), cu un stadiu Ann Arbor scăzut ($p=0,005$) și cu un scor de risc IPI favorabil ($p<0,001$). De asemenea, în studiul de față, cel mai eficient tratament pentru supraviețuire a fost utilizarea schemei CHOP, în cazul acesteia observându-se o supraviețuire medie de 2323,32 zile (331,90 săptămâni), în timp ce în la utilizarea schemei R-CHOP, s-a remarcat o medie de 2278,90 zile (325,55 săptămâni), iar cei care nu au efectuat tratament chimioterapic au avut o medie de 117,16 zile (16,73 săptămâni), ($p<0,001$). Lipsa tratamentului chimioterapeutic reprezintă un factor de risc privind mortalitatea pacientului ($HR=6,750$, $p<0,001$).

În studiul prezent, în ceea ce privește supraviețuirea pacienților în funcție de valoarea LDH serică, o valoare crescută a acesteia a fost asociată cu supraviețuirea redusă a pacienților, 869,34 zile (124,19 săptămâni) versus 2447,10 zile (349,58 săptămâni), ($p=0,002$). O valoare LDH ridicată la internare a reprezentat un factor de risc negativ independent în ceea ce privește supraviețuirea pacientului ($HR=3,100$, $p=0,004$).

Într-un studiu de cercetare realizat de Prochazka și colab., nivelurile mai ridicate de acid uric au fost legate de supraviețuirea fără progresie (PFS, raportul de risc (HR)) și rata de supraviețuire globală (OS) mai reduse în analiza timpului până la evenimentul univariabil. Hiperuricemia (20%) a fost una dintre cele mai răspândite comorbidități în grupul nostru de studiu, deși nu a avut nicio legătură cu o rata de supraviețuire globală redusă.

În studiul nostru, analiza genetică a relevat un status mutant al MYD88 la 8% dintre pacienți și mutația L265P a fost observată în 4 din 40 de cazuri DLBCL (Tabelul 94). De asemenea, niciunul dintre pacienții cu mutația L265P nu a arătat o asociere semnificativă cu parametrii clinici ai DLBCL, inclusiv vârsta pacientului, genul, localizarea tumorii, statusul de performanță ECOG, nivelul LDH, scorul IPI și stadiul Ann Arbor. Pacienții cu DLBCL, subtipul GCB au demonstrat o frecvență redusă a mutației, în timp ce pacienții cu DLBCL, subtipul non-GCB au prezentat un status mutant al MYD88 în 27,8% din cazuri. Aceste rezultate sunt în concordanță cu constatările altor studii conform cărora prevalența mutațiilor MYD88 L265P la pacienții cu DLBCL a variat între 6,5 și 19%. În studiul nostru, frecvența mutației a fost similară între subtipurile GCB și non-GCB de DLBCL.

Dintre cele patru mutații ale MYD88 L265P, două dintre acestea au avut implicare ganglionară, în timp ce celelalte două au avut implicare extraganglionară, inclusiv localizări imun-privilegiate. Pacienții cu afectare extraganglionară s-au prezentat în stadiu Ann Arbor avansat (III-IV). Deoarece mutația MYD88 este prezentă în mai multe limfoame cu celulă B, s-a emis ipoteza că mutația MYD88 reprezintă un eveniment molecular precoce al limfomogenezei. Un studiu realizat de Fujiishi și colab., nu a fost detectată mutația într-o probă de biopsie diagnostică a unui pacient cu DLBCL, deși proba post-mortem a altui pacient cu DLBCL a fost testată pozitiv pentru mutație, aceștia emițând ipoteza că mutația ar putea fi legată de un fenotip mai agresiv. Conform constatărilor noastre, persoanele cu mutația MYD88 L265P au fost caracterizate printr-un stadiu avansat, ceea ce ridică posibilitatea ca mutația să fie crucială în dezvoltarea limfomului și să fie legată de un prognostic mai prost pentru boală.

Conform unui studiu realizat de Kraan și colab., mutațiile MYD88 au fost relativ neobișnuite în DLBCL, subtipul cu celulă B activată (ABC) care se dezvoltă în ganglionii limfatici sau la nivelul intestinului; cu toate acestea, rata de mutație a fost mai mare în tumorile care provin din

situsuri privilegiate imun. De asemenea, alte studii au indicat că mutațiile MYD88 au fost mai răspândite în limfoamele primare ale sistemului nervos central. În schimb, în cercetarea noastră mutația MYD88 L265P a fost detectată la jumătate dintre pacienții cu DLBCL non-GCB fie cu implicare ganglionară, fie cu implicarea situsurilor privilegiate din punct de vedere imun: sistemul nervos central (creier). În mod similar, doar jumătate dintre pacienții cu DLBCL, subtipul GCB cu implicare ganglionară au prezentat mutația MYD88 L265P.

Din câte se cunosc, doar Choi și colab. și Caner și colab. au evaluat expresia MYD88 prin analiza IHC în DLBCL. Studiul lui Choi și colab., nu a identificat nicio asociere între expresia MYD88 și variabile clinico-patologice, cum ar fi stadiul Ann Arbor sau scorul IPI. În schimb, studiul lui Caner și colab. a găsit o relație inversă între supraexprimarea MYD88 și stadiul Ann Arbor respectiv scorul IPI. În cercetarea noastră, am analizat, de asemenea, expresia proteinei MYD88 prin analiza IHC în LNH cu celulă B mature și similar cu rezultatele raportate de Choi și colab., respectiv de către Caner și colab., studiul nostru nu a reușit să dezvăluie corelația dintre mutația și expresia MYD88. O limitare potențială a studiului nostru este că faptul că a fost pus accentul exclusiv pe mutația MYD88 L265P, cea mai răspândită mutație identificată în limfoame; alte variante MYD88, cum ar fi S222R și T294P, ar putea fi responsabile pentru expresia modificată a proteinei. Prin urmare, sunt necesare mai multe cercetări pentru a înțelege alte modificări genetice și epigenetice care stau la baza expresiei MYD88 identificate la mai mulți pacienți diagnosticați cu NHL cu celulă B.

Potrivit lui Zhou și colab., PIM1 și MYD88 au fost foarte exprimate în cohorta de pacienți și au fost legate de timpul lor de supraviețuire globală, iar expresia ridicată a PIM1 sau MYD88 a fost corelată cu un scor de risc ridicat, iar expresia înaltă a MYD88 a fost, de asemenea, corelată cu niveluri ridicate de LDH serică. Cu toate acestea, nu a existat o corelație semnificativă cu vârsta, genul pacientului și/sau tipul. De asemenea, același raport de cercetare a arătat că analiza modelului de regresie Cox multivariat, inclusiv scorul de risc, nivelul LDH, metoda de tratament și statusul expresiilor PIM1 și MYD88, a indicat faptul că statusul expresiei MYD88 a fost un predictor independent al OS cu un raport de risc (HR) de 0,004. În concordanță cu aceste studii, în cazul nostru analiza multivariată a identificat faptul că asocierea dintre o valoare LDH ridicată la internare și expresia imunohistochimică a PIM1 sau cu statutul mutant al genei PIM1 reprezintă factori de prognostic negativ (HR=2,066, p=0,042, respectiv HR=3,100, p=0,004).

6.6. Concluzii

În concluzie, studiul nostru identifică faptul că, în comparație cu studiile raportate anterior, incidența mutațiilor *MYD88 L265P* și *PIM1 p.G28A* la pacienții cu DLBCL este mai mică și oferă o imagine clară a peisajului mutațional în DLBCL, ceea ce poate duce la idei noi pentru tratarea afecțiunii. Astfel, indiferent de mutația *MYD88 L265P*, expresia MYD88 poate avea implicații semnificative asupra progresiei DLBCL, independent de mutația *MYD88 L265P*.

Din acest motiv, sugerăm că expresia MYD88 și mutația *L265P* ar trebui utilizate doar ca indicatori de prognostic pentru cazurile de boli în stadiu avansat. Independent de mutație, expresia MYD88 nu indică prognosticul bolii.

În ceea ce privește *PIM1*, din cauza asocierii dintre valoarea ridicată a LDH serică la internare și expresia imunohistochimică a PIM1 sau cu statutul mutant al genei *PIM1*, am emis ipoteza că atât expresia imunohistochimică, cât și mutația genei *PIM1* ar putea fi utilizate ca factori de prognostic la pacienții diagnosticați cu limfom cu celulă mare B.

9. Originalitatea tezei

9.1. Originalitatea tezei

- ✚ Este primul studiu care investighează prezența concomitentă a mutațiilor oncogene ale MYD88 și PIM1, atât prin metoda reacției de polimerizare în lanț în timp real (RT-PCR), cât și prin evaluarea imunohistochimică, cu posibile implicații în tratamentul și prognosticul bolii, în rândul pacienților cu limfoame non-Hodgkin cu celulă mare B din regiunea centrală și de sud-est a României.
- ✚ Este primul studiu care evaluează expresia indicelui de proliferare Ki67 prin intermediul inteligenței artificiale (QuPath software), precum și rolul patologiei digitale în semnificația prognostică, la pacienții cu limfoame non-Hodgkin cu celulă mare B cu localizare extranodală – gastrointestinală din regiunea centrală și de sud-est a României.
- ✚ Evaluarea expresiei unui panel original de gene oncogene asociate cu proliferarea și progresia tumorală cu ajutorul unor de tehnici de imunohistochimie și biologie moleculară, adaptate și optimizate condițiilor specifice de lucru din laboratoarele de histopatologie respectiv biologie moleculară din cadrul CEDMOG.
- ✚ Rezultatele obținute în urma acestui studiu completează panelul de biomarkeri și mutații oncogene existente în diagnostic, fiind utile la descifrarea mecanismelor complexe histomoleculare implicate în patogeniza limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B și pot influența managementul terapeutic final.
- ✚ Evaluarea rolului imunodeficienței și terapiei antiretrovirale în dezvoltarea limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B .
- ✚ Datele obținute în urma acestei lucrări științifice pot servi drept referință pentru studii viitoare în domeniul cercetării biomarkerilor și mutațiile oncogene sau ca bază pentru dezvoltarea de noi terapii personalizate.

9.2. Limitări ale studiului

Ar trebui luate în considerare câteva limitări atunci când se interpretează rezultatele acestui studiu. În primul rând, numărul de pacienți evaluați este nu este suficient de mare pentru a oferi o imagine completă asupra variației expresiei genelor precum și biomarkerilor MYD88 și PIM1 respectiv asupra variabilității expresiei indicelui de proliferare Ki67 evaluate prin intermediul patologiei digitale la pacienții cu limfoame non-Hodgkin cu celulă mare B cu localizare gastrointestinală. Deci, pentru a confirma rezultatele studiului din cadrul populației din centrul și sud-estul României, sunt necesare studii suplimentare care să includă mai multe loturi de pacienți pentru a susține descoperirile realizate.

În al doilea rând, toate ADN-urile umane care au fost studiate s-au bazat pe o revizuire atentă a literaturii de specialitate, cu suspiciunea că alte specii de ADN ar putea fi supraexprimate mai proeminent sau subexprimate.

În al treilea rând, este necesară o perioadă mult mai extinsă de timp și studii randomizate suplimentare pentru a evalua treptat rolul imunodeficienței și terapiei antiretrovirale în apariția acestei categorii de limfoame.

9.3. Direcții viitoare de cercetare

La momentul actual, studiul expresiei genice respectiv diagnosticul prin intermediul inteligenței artificiale în cadrul limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B oferă perspective promițătoare și deschide noi oportunități terapeutice la nivel global, iar biologia moleculară și patologia digitală devin o parte importantă în diagnosticul acestei patologii, cu un ritm de ascensionare impresionant. Astfel, este necesară dezvoltarea atât a unui program de screening uzual cât și a unui software specializat în hematopatologie, și implementarea acestora la nivel atât național cât și internațional în diagnosticul limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B .

În viitor, descoperirea și dezvoltarea unor biomarkeri specifici și sensibili respectiv a programelor de patologie virtuală în diagnosticul precoce al limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B va constitui un obiectiv vital în personalizarea managementului terapeutic al pacientului oncologic.

O altă direcție posibilă ar fi studiul și testarea de terapii țintite contra limfoamelor non-compliante, care prezintă expresia acestor mutații oncogene. În acest mod, ar putea fi explorat potențialul acestor biomarkeri ca potențiale ținte terapeutice.

O altă provocare importantă este traducerea noilor cunoștințe științifice în instrumente diagnostice, prognostice și terapeutice cu aplicabilitate clinică în tratamentul limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B .