



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



**ОДНОС ФАКТОРА РАСТА И
ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈЕ-15 И ХЕПЦИДИНА СА
БИОМАРКЕРИМА МЕТАБОЛИЗМА
ГВОЖЂА У ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНИМ
БОЛЕСТИМА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор:

Проф. др Стеван Поповић

Проф. др Велибор Чабаркапа

Кандидат:

Данијела Агић

Нови Сад, 2021. године

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Данијела Агић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф. др Стеван Поповић, редовни професор, Медицински факултет Универзитет у Новом Саду Проф. др Велибор Чабаркапа, ванредни професор, Медицински факултет Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Однос фактора раста и диференцијације-15 и хепцидин са биомаркерима метаболизма гвожђа у лимфопролиферативним болестима
Језик публикације (писмо):	Српски (сажетак на српском и енглеском) Латиница
Физички опис рада:	Унети број: Страница 132 Поглавља 7 Референци 239 Табела 37 Слика 9 Графикона 12 Прилога 0
Научна област:	Медицина
Ужа научна област (научна дисциплина):	Хематологија
Кључне речи / предметна одредница:	Б-ћелијски лимфом; Хочкинова болест; лимфопролиферативне болести; фактор раста и диференцијације-15; хепцидин; феритин; трансферин; биомаркери; прогноза
Резиме на језику рада:	УВОД: Лимфопролиферативне неоплазме настају клонском пролиферацијом ћелија лимфоидне лозе различитог степена зрелости. Агресивне лимфопролиферативне неоплазме се лече одмах по постављању дијагнозе и циљ је постизање комплетне ремисије. Лечење индолентних лимфопролиферативних неоплазми, ако је оболели без симптома и велике туморске масе треба одложити уз редовно клиничко праћење, режим познат као „watch and wait“. Ако је анемија у лимфопролиферативној болести умерена или тешка и последица лимфопролиферације онда је и индикација за започињање терапије. Серумске концентрације биомаркера метаболизма гвожђа се редовно одређују у склопу дијагностичког алгоритма анемије. Главни регулатор метаболизма гвожђа је хепцидин на чију регулацију утиче еритропоетска активност, путем еритроферона, али и фактора раста и диференцијације-15 (ГДФ-15). ГДФ-15 има улогу у различитим метаболичким и имуношким процесима. Испитиван је у бројним

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>малигнитетима и повезан са годинама и морталитетом било ког узрока. Сем у мултиплом мијелому нема резултата испитивања улоге ГДФ-15 у другим лимфопролиферативним неоплазмама.</p> <p>ЦИЉ: Испитати циркулишући ниво биомаркера метаболизма гвожђа, параметре комплетне крвне слике и утврдити њихову везу с хепцидином и ГДФ-15 код оболелих од зрелих Б лимфопролиферативних неоплазми, као и испитати повезаност биомаркера метаболизма гвожђа, хепцидина и ГДФ-15 са стандардним лабораторијским показатељима инфламаторне и активности основне болести. Поред тога, утврдити постоји ли разлика у концентрацији параметара метаболизма гвожђа, хепцидина и ГДФ-15 између оболелих који имају индикацију за лечење и оболелих на „<i>watch and wait</i>“ режиму, као и испитати корелацију концентрација биомаркера метаболизма гвожђа, хепцидина и ГДФ-15 с постигнутим терапијским одговором у групи лечених.</p> <p>МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ: Проспективно истраживање обухватило је 71 испитаника: 40 у групи лечених од агресивних и индолентних лимфопролиферативних неоплазми с индикацијом за терапију и 31 у „<i>watch and wait</i>“ групи. У групи лечених анализе су рађене у три наврата: пре терапије, током терапије, на првој ревизији и после терапије код процене терапијског одговора. У „<i>watch and wait</i>“ групи материјал за анализе је узоркован два пута у размаку од 3 до 4 месеца. Све анализе су рађене по стандардној лабораторијској процедуре, а хепцидин и ГДФ-15 су одређивани након одmrзавања из претходно замрзнутих серума чуваних на -70°C, ЕЛИСА методом. Терапијски одговор је процењиван у складу с Лугано класификацијом. Анализа података је извршена употребом статистичког пакета <i>IBM SPSS Statistics 22</i>, а обрада методама дескриптивне и инференцијалне статистике. Сви тестови су двострани с нивоом значајности $p<0,05$.</p> <p>РЕЗУЛТАТИ: У групи лечених после у односу на време пре терапије значајно је нижи број леукоцита, лимфоцита и неутрофилних гранулоцита ($p<0,001$), нижа је серумска концентрација бета 2 микроглобулина ($p<0,001$) и хепцидина ($p=0,01$), а виша ГДФ-15 ($p=0,027$). У подгрупи лечених с агресивним лимфопролиферативним неоплазмама, након лечења су значајно више концентрације гвожђа ($p=0,025$), трансферина ($p=0,007$), албумина ($p=0,013$), а нижа је брзина седиментације ($p=0,033$). У подгрупи лечених с индолентним лимфопролиферативним неоплазмама по завршетку лечења значајно су више концентрације феритина ($p=0,009$), фибриногена ($p=0,01$), ГДФ-15 ($p=0,028$), а ниже бета 2 микроглобулина ($p<0,001$) и хепцидина ($p=0,002$). Хепцидин значајно позитивно корелира с феритином при свим мерењима у обе групе ($p<0,001$) и негативно с концентрацијом трансферина у групи лечених иницијално ($p<0,05$) и при сва три мерења с индексом феритина ($p<0,05$). У групи лечених пре започињања терапије постоји значајна позитивна корелација концентрације гвожђа, трансферина и солубилног трансферинског рецептора (сТфР) са албумином ($p<0,05$), а негативна с брзином седиментације ($p=0,001$) и плазматском концентрацијом фибриногена ($p<0,001$). После терапије постоји значајна позитивна повезаност концентрације трансферина и албумина ($p=0,005$) и значајна негативна корелација концентрације трансферина с брзином седиментације ($p=0,026$) и плазматском концентрацијом фибриногена ($p=0,011$). Након терапије феритин је значајно повезан с концентрацијом ЛДХ ($p=0,022$) и фибриногеном ($p=0,043$), а сТфР и ГДФ-15 с бета 2 микроглобулином($p=0,03$). Статистички су значајно ниже серумске концентрације гвожђа ($p<0,001$), као и иницијалне концентрације трансферина ($p<0,001$), а после терапије значајно више вредности феритина ($p=0,034$) и сТфР ($p=0,001$) у групи</p>
--	--

	<p>лечених у односу на „watch and wait“ групу . Постоји статистички значајна разлика ($p<0,05$) у брзини седиментације и плазматској концентрацији фибриногена у односу на терапијски одговор. Најниже вредности су код испитаника с комплетном ремисијом, а највише код оних са прогресијом болести.</p> <p>ЗАКЉУЧАК: Недостатак корелације хепцидина с параметрима крвне слике у нашем истраживању последица је већег броја испитаника без анемије и с концентрацијом биомаркера метаболизма гвожђа у референтном опсегу у обе групе, на шта су утицали строги критеријуми искључивања с циљем да се добијени резултати повежу искључиво с лимфопролиферативним неоплазмама. Серумске концентрације гвожђа су значајно ниже код оболелих од агресивних у односу на оболеле од индолентних лимфопролиферативних неоплазми, такође и значајно ниже код оболелих од индолентних лимфопролиферација који имају индикацију за терапију у односу на оне који је немају. Позитивна корелација феритина са лактат дехидрогеназом и фибриногеном и негативна корелација серумске концентрације трансферина с концентрацијом ЦРП, фибриногеном и брзином седиментације у групи испитаника који имају индикацију за лечење могла би бити основа за даље истраживање прогнозног значаја ових биомаркера код оболелих од ЛПН код којих је индикована терапија. Статистички сигнификантна корелација ГДФ-15 с бета 2 микроглобулином, пре и после терапије и фибриногеном пре терапије указује на могуће место овог фактора у процени ризика код оболелих од индолентних лимфопролиферативних неоплазми код којих је индиковано лечење. Не постоји значајна повезаност концентрације феритина, хепцидина и ГДФ-15 са стандардним маркерима активности ЛПН у групи испитаника код којих није индиковано лечење.</p>
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	17.9.2018.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Члан: Члан: Члан:
Напомена:	

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OR CENTER**

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Danijela Agić
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Prof. Dr Stevan Popović, Full Professor, Faculty of Medicine, University in Novi Sad Prof. Dr Velibor Čabarkapa, Associate Professor, Faculty of Medicine, University in Novi Sad
Thesis title:	The Relation of Growth and Differentiation Factor-15 and Hepcidin with Iron Metabolism Biomarkers in Lymphoproliferative Diseases
Language of text (script):	Serbian language (abstract in serbian and english language) Latin script
Physical description:	Number of: Pages <u>132</u> Chapters <u>7</u> References <u>239</u> Tables <u>37</u> Illustrations <u>9</u> Graphs <u>12</u> Appendices <u>0</u>
Scientific field:	Medicine
Scientific subfield (scientific discipline):	Hematology
Subject, Key words:	Lymphoma, B-Cell; Hodgkin Disease; Lymphoproliferative Disorders; Growth Differentiation Factor 15; Hepcidins; Ferritins; Transferrin; Biomarkers; Prognosis
Abstract in English language:	<p>INTRODUCTION: Lymphoproliferative neoplasms arise from the clonal proliferation of malignant lymphoid cells at different maturation stages. Treatment of aggressive lymphoma starts upon diagnosis and staging with the aim to achieve complete remission. Treatment of indolent lymphoproliferative neoplasms in the absence of symptoms and bulky mass should be postponed with careful follow up, an approach known as „watch and wait“.</p> <p>Moderate or severe anemia due to indolent lymphoproliferative disease is an indication for lymphoma/leukemia treatment initiation. Concentrations of iron metabolism biomarkers in serum are an essential part in the diagnostic algorithm of anemia. Hepcidin is the main systemic regulator of iron metabolism which depends on the erythropoietic activity, via erythroferrone and the growth and differentiation factor-15 (GDF-15). GDF-15 has a role in different metabolic and immune states. It has been examined in numerous malignancies and has been linked to age and mortality of any cause. Except in</p>

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5a – Statement on the authority,

5b – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5c – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>multiple myeloma there are no published data about the role of GDF-15 in other lymphoproliferative neoplasms.</p> <p>AIM: To investigate the relation between the circulating levels of iron metabolism biomarkers, complete blood count values in regards to hepcidin and GDF-15 levels in patients with mature B cell neoplasms as well as the relation of iron metabolism biomarkers, hepcidin and GDF-15 with standard laboratory markers of lymphoproliferative disease activity. To assess the differences between the circulating levels of those aforementioned parameters among patients who need lymphoma/leukemia treatment and those on “watch and wait” regimen and to find out if there is a correlation between iron metabolism biomarkers, hepcidin and GDF-15 levels and therapeutic response.</p> <p>MATERIAL AND METHODS: A prospective research included 71 patients, 40 in a group with aggressive or indolent lymphoproliferative neoplasms who needed and received treatment and 31 in “watch and wait” group. In treated patients laboratory analyses were performed before therapy, during treatment at 1st revision, and after, at treatment response evaluation. In the “watch and wait” group blood samples were taken on two separate occasions, 3 to 4 months apart. All analyses were done according to standard procedures, while ELISA technique from stored sera at -70°C was used for hepcidin and GDF-15 level measurement. Treatment response evaluations were done according to Lugano criteria. Statistical analyses were performed by IBM SPSS Statistics 22 using methods of descriptive and inferential statistics. All tests are two-tailed with significance level $p<0,05$.</p> <p>RESULTS: In the group of treated patients after receiving therapy, significantly lower white blood cells count, lymphocyte and neutrophil granulocyte count ($p<0,001$), lower concentrations of β2microglobulin ($p<0,001$) and hepcidin ($p=0,01$), and higher concentration of GDF-15 ($p=0,027$) were noticed when compared to prior treatment values. In the subgroup of patients treated for aggressive lymphoma after therapy, concentrations of iron ($p=0,025$), transferrin ($p=0,007$) and albumin ($p=0,013$) were significantly higher, while erythrocyte sedimentation rate (ESR) was lower ($p=0,033$). In the subgroup of patients treated for indolent lymphoproliferative neoplasms, significantly higher levels of ferritin ($p=0,009$) fibrinogen ($p=0,01$) and GDF-15 ($p=0,028$) as well as lower concentrations of β2microglobulin ($p<0,001$) and hepcidin ($p=0,002$) were observed after treatment completion. There is a positive correlation between hepcidin and ferritin in both groups ($p<0,001$) in treated patients. A negative correlation exists between the levels of hepcidin and transferrin before treatment ($p<0,05$) as well as between hepcidin level and ferritin index ($p<0,05$) in treated patients. Also, in the group of treated patients before treatment there are positive correlation between iron, transferrin and soluble transferrin receptor (sTfR) levels and albumin ($p<0,05$) while the level of the same iron metabolism biomarkers negatively correlate with erythrocyte sedimentation rate ($p=0,001$) and fibrinogen concentration ($p<0,001$). After treatment completion transferrin positively correlates with albumin ($p=0,005$) and negatively with ESR ($p=0,026$) and fibrinogen concentration ($p=0,011$); ferritin positively correlates with lactate dehydrogenase level (LDH) ($p=0,022$) and fibrinogen ($p=0,043$), while sTfR and GDF-15 positively correlate with β2microglobulin ($p=0,03$). Iron and transferrin concentrations before treatment are significantly lower in treated vs. „watch and wait“ group ($p<0,001$), while ferritin ($p=0,034$) and sTfR ($p=0,001$) concentrations are significantly higher in treated patients after therapy in comparison with those on “watch and wait“ regimen. ESR and fibrinogen level significantly correlate</p>
--	--

	<p>with treatment response; the lowest levels are in patients with complete response and highest in those with progressive disease.</p> <p>CONCLUSION: The vast majority of patients in both groups were non anemic with iron metabolism biomarkers within referent range, due to the strict exclusion criteria, as the aim was to link the findings exclusively to lymphoproliferative neoplasms, which in part led to the absence of correlation between hepcidin level and blood cell count. Serum iron concentration is lower in treated patients for aggressive than indolent lymphoma and also in patients with indolent lymphoproliferative diseases who need treatment than in those on „watch and wait” regimen. The positive correlation between ferritin levels, LDH and plasmatic fibrinogen concentration and the negative correlation of transferrin with ESR and fibrinogen which were found in treated patients might be the base for further investigation of the prognostic impact of those biomarkers in patients with lymphoproliferative neoplasms who need to be treated. Statistically significant correlation of GDF-15 with β2microglobulin and fibrinogen before and β2microglobulin after therapy suggests its possible role in the risk evaluation of patients with indolent lymphoproliferative neoplasms who need to be treated. There are no significant correlations between ferritin, hepcidin and GDF-15 levels with standard markers of disease activity in patients with lymphoproliferative neoplasms without indication for therapy.</p>
Accepted on Scientific Board on:	17.9.2018.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member: Member:
Note:	

Hvala mojim mentorima, prof. dr Stevanu Popoviću jer bez njega ne bih bila hematolog i prof. dr Veliboru Čabarkapi na svoj pomoći tokom izrade disertacije, savetima i bezrezervnoj podršci.

Hvala dr Veri Uzurov na svemu što me je naučila tokom zajedničkog rada.

Hvala mojim i Nikolajevim roditeljima na neizmernoj pomoći i ljubavi.

Najviše hvala mom Nikolaju, Mikiju i Sari što postoje.

SADRŽAJ

1. UVOD	4
1.1. LIMFOPROLIFERATIVNE NEOPLAZME.....	4
1.2. ANEMIJA KOD OBOLELIH OD LIMFOPROLIFERATIVNIH NEOPLAZMI.....	14
1.3. METABOLIZAM GVOŽĐA.....	16
1.3.1. REGULACIJA METABOLIZMA GVOŽĐA.....	16
1.3.2. FEROPTOZA.....	21
1.3.3. HEPCIDIN U INFLAMACIJI I LIMFOPROLIFERATIVnim NEOPLAZMAMA.....	24
1.4. GDF-15 U ZDRAVLJU I BOLESTI.....	28
1.4.1. GDF-15 U METABOLIČKIM POREMEĆAJIMA, UPALNIM I DRUGIM NEMALIGNIM STANJIMA.....	29
1.4.2. GDF-15 U MALIGNITETIMA.....	33
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	41
2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	41
2.2. HIPOTEZE	41
3. MATERIJAL I METODE	43
3.1. UZORAK.....	43
3.2. METODE LABORATORIJSKIH ISPITIVANJA.....	45

3.3.	PROCENA TERAPIJSKOG ODGOVORA.....	47
3.4.	STATISTIČKE METODE.....	47
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	48
4.1.	OPIS UZORKA.....	48
4.2.	DESKRIPCIJA.....	52
4.3.	KORELACIJA GDF-15 I HEPCIDINA S PARAMETRIMA KRVNE SLIKE I BIOMARKERIMA METABOLIZMA GVOŽĐA U OBE GRUPE.....	61
4.4.	KORELACIJA BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA, GDF-15 I HEPCIDINA SA STANDARDnim LABORATORIJSKIM MARKERIMA AKTIVNOSTI BOLESTI U OBE GRUPE... 69	
4.5.	TESTIRANJE RAZLIKE U SERUMSKOJ KONCENTRACIJI BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA, GDF-15 I HEPCIDINA IZMEĐU DVE GRUPE..... 73	
4.5.1.	POREĐENJE INICIJALNO. Lečeni s agresivnim LPN, lečeni s indolentnim LPN, „watch and wait“ (međusobna)..... 79	
4.6.	KORELACIJA SERUMSKIH KONCENTRACIJA BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA, GDF-15 I HEPCIDINA S TERAPIJSKIM ODGOVOROM..... 84	
4.6.1.	TERAPIJSKI ODGOVOR..... 84	
4.6.2.	SERUMSKA KONCENTRACIJA BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA I TERAPIJSKI ODGOVOR NA SREDINI TERAPIJE .. 85	
4.6.3.	SERUMSKA KONCENTRACIJA BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA I TERAPIJSKI ODGOVOR NAKON ZAVRŠETKA LEČENJA..... 90	
4.6.4.	MARKERI AKTIVNOSTI BOLESTI I TERAPIJSKI ODGOVOR..... 95	

5. DISKUSIJA_____ 99

6. ZAKLJUČAK_____ 109

7. LITERATURA_____ 111

1. UVOD

1.1 LIMFOPROLIFERATIVNE NEOPLAZME

Limfoproliferativne neoplazme (LPN) su velika grupa malignih bolesti nastalih klonskom proliferacijom ćelija limfoidne loze različitog stepena zrelosti. U zavisnosti od toga kad se u razvoju limfocita desila maligna alteracija ćelije posledično nastale bolesti će biti drukčijeg toka i agresivnosti. Ako je maligna promena ćelije nastupila ranije proliferativni potencijal klena će biti veći, odnosno ćelije će se brže umnožavati, a bolest koja nastaje će biti agresivnija.

Za postavljanje dijagnoze limfoproliferativne neoplazme neophodna je patohistološka i imunohistohemijska analiza bioptata tumorske promene, najčešće limfnog čvora. Biopsija kostne srži se radi da bi se videlo da li postoji infiltracija limfomskim ćelijama u njoj, odnosno da bi se odredio klinički stadijum bolesti. Ako postoji leukemijska slika LPN dijagnoza se može postaviti i imunofenotipizacijom ćelija protočnom citometrijom iz periferne krvi. Na osnovu morfološke slike na patohistološkom preparatu uz imunohistohemijsku analizu, nekad i uz dodatne molekularne i citogenetske analize određuje se tip limfoproliferativne neoplazme koristeći klasifikaciju Svetske zdravstvene organizacije iz 2016. godine (WHO 2016) [1]. LPN mogu biti porekla B ili T limfocita. B limfocitne proliferacije su češće i po WHO klasifikaciji se dele na dve grupe [1]:

1. prekursorske B ćelijske neoplazme koje uključuju limfoblastnu leukemiju/limfom sa ili bez rekurentnih citogenetskih abnormalnosti i
2. zrele B ćelijske neoplazme

U grupi zrelih B ćelijskih neoplazmi, koje će biti tema našeg istraživanja razlikuje se više od 40 podtipova LPN:

1. Hronična limfocitna leukemija (HLL)/sitnoćelijski limfocitni limfom (SLL)
2. Monoklonska B ćelijska limfocitoza
3. B ćelijska prolimfocitna leukemija
4. Splenični marginalne zone limfom (SMZL)
5. Triholeukemija
6. Splenični B ćelijski limfom/leukemija, neklasifikovan
7. Splenični difuzni sitnoćelijski limfom crvene pulpe

8. Triholeukemija-varijant
9. Limfoplazmocitni limfom (LPL)
10. Waldenströmova makroglobulinemija (WM)
11. Monoklonska gamaglobulinemija neodređenog značaja (MGUS), IgM
12. Bolest teških lanaca (μ , γ , α)
13. MGUS, IgG, IgA
14. Plazmocitni mijelom
15. Solitarni plazmocitom kosti
16. Ekstraosealni plazmocitom
17. Bolest depozita monoklonskih imunoglobulina
18. Ekstranodalni marginalne zone limfom-limfnog tkiva povezanog sa sluznicom (MALT limfom)
19. Nodalni marginalne zone limfom
20. Pedijatrijski nodalni marginalne zone limfom
21. Folikularni limfom
22. In situ folikularna neoplazija
23. Duodenalni tip-folikularni limfom
24. Pedijatrijski tip-folikularni limfom
25. B krupnoćelijski limfom sa IRF-4 rearanžmanom
26. Primarni kutani limfom ćelija folikularnog centra
27. Mantl ćelijski limfom (MCL)
28. In situ mantl ćelijska neoplazma
29. Difuzni B krupnoćelijski limfom (DBKL) – drukčije neoznačen (NOS)
30. DBKL-tip B ćelija germinativnog centra (GCB)
31. DBKL-aktivisanih B ćelija (ABC) tip
32. DBKL-T ćelijama/histiocitima bogat tip
33. Primarni DBKL centralnog nervnog sistema (CNS)
34. Primarni kutani DBKL-leg tip
35. Epštajn-Bar virus (EBV) pozitivan DBKL-drukčije neoznačen (NOS)
36. EBV pozitivan mukokutani ulkus
37. DBKL povezan sa hroničnom inflamacijom
38. Limfomatoidna granulomatoza
39. Primarni medijastinalni B krupnoćelijski limfom

40. Intravaskularni B krupnoćelijski limfom
41. Anaplastičnog limfoma kinaza (ALK) pozitivan B krupnoćelijski limfom
42. Plazmoblastni limfom
43. Limfom primarnih izliva
44. DBKL povezan sa humanim herpes virusom 8 (HHV-8), NOS
45. Burkitt limfom
46. Burkitt like limfom sa 11q aberacijom
47. High grade B ćelijski limfom sa MYC i bcl 2 i / ili bcl 6 rearanžmanom
48. High grade B ćelijski limfom, NOS
49. B ćelijski limfom nekласификован, sa osobinama između DBKL i klasičnog Hočkinovog limfoma

Posebnu grupu čini Hočkinov limfom koji može biti nodularni limfocitima predominirajući Hočkinov limfom (NLPHL) i klasični Hočkinov limfom (cHL).

Klasičan Hočkinov limfom obuhvata 4 patološka tipa:

1. Limfocitne predominacije
2. Nodulske skleroze
3. Mešovite celulnosti
4. Limfocitne deplecije

Kad se postavi dijagnoza LPN kliničkim, radiološkim i dodatnim pregledima se određuje stadijum bolesti koristeći Ann Arbor klasifikaciju [2]. Ranije je uz dijagnozu i stadijum bilo obavezno registrovati i prisustvo ili odsustvo opštih simptoma: gubitak na telesnoj masi veći od 10% za manje od 6 meseci, noćno preznojavanje, povišenu telesnu temperaturu [2], sad se ovo smatra obavezним samo za Hočkinov limfom [3]. Pored toga određuju se prognostički skorovi specifični za pojedine tipove limfoma: IPS za Hočkinov limfom, IPI, aaIPI, R-IPI i NCCN IPI za DBKL, MIPI za mantl ćelijski limfom (MCL), FLIPI i FLIPI 2 za folikularni limfom. U prognozne skorove pored pola, starosti, kliničkog stadijuma ulaze i različiti laboratorijski parametri npr: sedimentacija (SE), laktat dehidrogenaza (LDH), beta 2 mikroglobulin (β 2M), koncentracija albumina (Alb), koncentracija hemoglobina (Hg).

Agresivne LPN se leče nakon postavljanja dijagnoze i određivanja stadijuma bolesti u skladu s nacionalnim vodičem [4] koji je usklađen sa vodičima evropskog i američkog udruženja onkologa: Evropskog udruženja za medicinsku onkologiju (eng. European Society for Medical Oncology-ESMO) i Nacionalne mreže za malignitete (eng. National Comprehensive Cancer Network -NCCN) [5,6].

Ako je dijagnostikovana indolentna LPN koja je sporo progredirajućeg toka, a sada dostupnim terapijskim opcijama neizlečiva i ukoliko je oboleli bez tegoba, onda je standarni pristup u svim vodičima da se ovi pacijenti van kliničkih studija redovno prate bez terapije i da se leče kad se pojave simptomi. Ovaj pristup je u literaturi i svakodnevnoj praksi poznat kao „watch and wait“ [4-6].

Kad je lečenje neophodno odlučuje se o terapijskom modalitetu, planira se broj terapijskih ciklusa i vreme prve procene terapijskog odgovora. Procena terapijskog odgovora odnosno revizija se obično sprovodi nakon dve do četiri terapijske kure i u zavisnosti od postignutog odgovora planira se nastavak lečenja. Za procenu terapijskog odgovora kao i za inicijalno određivanje stadijuma bolesti koriste se jasno ustanovljeni kriterijumi međunarodne radne grupe iz 2007. i revidirane preporuke-Lugano klasifikacija iz 2014. [3,7]. Ove preporuke modifikuju i Ann Arbor klasifikaciju [7]. Modifikacija nastaje jer se za procenu stadijuma bolesti limfoma sa velikim afinitetom za fluorodeoksiglukozu (FDG) koristi fuziono snimanje: pozitronska emisiona tomografija/kompjuterizovana tomografija (PET/CT), a za neavidne kompjuterizovana tomografija (CT).

Tabela 1. Ann Arbor klasifikacija

Stadijum I	Zahvaćenost jedne regije limfnih nodusa (LN)/jedna ekstranodalna lokalizacija
Stadijum II	Zahvaćenost dve ili više limfnih regija sa iste strane dijafragme
Stadijum III	Zahvaćenost više limfnih regija s obe strane dijafragme
Stadijum IV	Diseminovana ekstranodalna zahvaćenost

S-zahvaćenost slezine modifikuje I, II i III klinički stadijum, E-ekstranodalna lokalizacija modifikuje I i II stadijum, A-bez B simptoma, B-prisutni B simptomi

Određivanje kliničkog stadijuma kod bolesnika sa hroničnom limfocitnom leukemijom (HLL) vrši se na osnovu klasifikacija po Rai-u i po Binet-u navedenim u tabeli 2.

Tabela 2. Klasifikacija kliničkog stadijuma po Rai i Binet

Rai klinički stadijumi 0, I, II, III, IV	Binet klinički stadijumi A, B, C
0 limfocitoza $\geq 15 \times 10^9 / l$	A limfocitoza + limfadenomegalija < 3 regije
I limfocitoza + limfadenomegalija	B limfocitoza + hepatosplenomegalija / limfadenomegalija ≥ 3 regije
II limfocitoza + hepatosplenomegalija	C limfocitoza i anemija Hg $< 100 g/l$ / trombocitopenija Trc $< 100 \times 10^9 / l$
III limfocitoza + anemija Hg $< 110 g/l$	
IV limfocitoza + trombocitopenija Trc $< 100 \times 10^9 / l$	

U okviru fizikalnog pregleda pre odluke o terapiji procenjuje se i stanje bolesnika koristeći ECOG (eng. Eastern Cooperative Oncology Group) skor za procenu opštег stanja obolelog naveden u tabeli 3.

Tabela 3. ECOG skor

0	Bez simptoma, normalno obavlja sve aktivnosti
1	Ograničen u napornim fizičkim aktivnostima
2	Vezanost za postelju $< 50\%$ vremena tokom dana

3	Vezanost za postelju >50% vremena tokom dana
4	Stalna vezanost za postelju

Kompletne remisije (CR) podrazumeva da se kliničkim, radiološkim i dodatnim pregledima čiji obim i vrsta zavisi od tipa LPN i mesta koja su bila zahvaćena bolescu na početku, više ne registruje prisustvo bolesti. Parcijalna remisija (PR) znači da postoji smanjenje prethodno postojeće tumorske mase za više od 50% i da nema novonastalih tumorskih promena. O stabilnoj bolesti (SD) govorimo kad je tumorska masa redukovana za manje od 50% i nema novonastalih promena u vezi s bolesti, a o progresiji bolesti (PD) kad se pod terapijom povećaju postojeće promene ili nastanu nove [3,7]. Upotreba PET/CT skena u inicijalnoj proceni raširenosti bolesti i proceni terapijskog odgovora kod FDG avidnih limfoma donela je i reviziju kriterijuma za procenu odgovora koja je dovela do Lugano klasifikacije. Ako procenu odgovora vršimo PET/CT skenom tad koristimo termine kompletne i parcijalne metaboličke remisije.

Tabela 4. Lugano klasifikacija procene terapijskog odgovora

Odgovor	¹⁸ F-FDG PET/CT metabolički odgovor	CT radiološki odgovor
Kompletan odgovor (CR)	Skor 1, 2 ili 3 na D5PS bez pojave novih lezija, bez zahvatanja kostne srži	LD _i LN/nodalne mase ≤ 1.5cm, nema ekstranodalnih lezija, regresija uvećanih organa na normalnu veličinu, bez pojave novih lezija, bez infiltracije kostne srži.
Parcijalni odgovor (PR)	Skor 4 ili 5 na D5PS sa smanjenjem akumulacije radiofarmaka u odnosu na početne vrednosti, bez pojave novih lezija,	≥50% smanjenje SPD, ≥ 50% redukcije u veličini slezine u odnosu na početno uvećanje, bez pojave novih lezija

	rezidualna akumulacija u kostnoj srži manja od početnih vrednosti	
Stabilna bolest (SD)	Skor 4 ili 5 na D5PS uz nepromjenjen nivo akumulacije radiofarmaka u odnosu na početnu vrednost, bez pojave novih lezija, infiltracija kostne srži bez promene	< 50% redukcije u SPD, bez pojave novih lezija
Progresija bolesti (PD)	Skor 4 ili 5 na D5PS uz povećanu akumulaciju radiofarmaka u odnosu na početnu vrednost. Pojava novih pozitivnih lezija ili ponovno zahvatanje LN ili kostne srži	$\geq 50\%$ porasta u PPD, porast u LD _i ili SD _i (0.5cm ako je LN $\leq 2\text{cm}$, 1cm ako je LN $> 2\text{cm}$); Progresivna splenomegalija (uvećanje slezine $>50\%$ inicijalnog uvećanja), pojava novih lezija, splenomegalije ili ponovno zahvatanje LN ili koštane srži

Legenda: 18F-FDG PET/CT - pozitronska emisiona tomografija sa [18F]-fluoro-2-deoksi-D-glukozom u kombinaciji sa kompjuterizovanom tomografijom; CT – kompjuterizovana tomografija; D5PS -Deauville PET 5-point scale; LD_i – najduži dijametar; SD_i –najkraći dijametar; LN - limfnii nodus; SPD – suma proizvoda LD_i i SD_i šest dominantnih LN/nodalnih tkiva/ekstranodalnih lezija; PPD –proizvod najdužeg i najkraćeg dijamaetra jednog LN nodalnog tkiva/ekstranodalne lezije

Međunarodna radna grupa je 2017. dala kriterijume za procenu odgovora u terapiji limfoma u kliničkim studijama (RECIL-2017) kako bi ih harmonizovala s postojećim kriterijumima procene odgovora u solidnim tumorima (RECIST). Za procenu su koristili zbir najdužih dijametara tri ciljne lezije i uveli su provizorni entitet minor odgovora [8].

Tabela 5. Konsenzus Međunarodne radne grupe za procenu terapijskog odgovora
(Response Evaluation Criteria in Lymphoma – RECIL 2017)

	CT	18F-FDG PET	Nalaz u kostnoj srži	Nove lezije (>1cm)
Kompletan odgovor	Nestanak svih ciljanih lezija i LDi svih LN< 10mm, \geq 30% smanjenje zbira LDi ciljanih lezija	negativan (D5PS 1-3)	Negativan	Ne
Parcijalni odgovor	\geq 30% smanjenje zbira LDi ciljanih lezija	pozitivan (D5PS 4-5)	negativan ili pozitivan	Ne
Minor odgovor	\geq 10%, ali < 30% smanjenje zbira LDi ciljanih lezija	negativan ili pozitivan	negativan ili pozitivan	Ne
Stabilna bolest	< 10% smanjenje ili \leq 20% povećanje zbira LDi ciljanih lezija	negativan ili pozitivan	negativan ili pozitivan	Ne
Progresivna bolest	> 20% povećanje zbira LDi ciljanih lezija. Za male LN LDi<15mm posle terapije postoji apsolutno povećanje LDi >5mm i LDi LN>15mm. Pojava novih lezija	negativan ili pozitivan	negativan ili pozitivan	Da ili ne

Legenda: CT-kompjuterizovana tomografija, 18F-FDG PET-pozitronska emisiona tomografija sa [18F]-fluoro-2-deoksi-D-glukozom; LN-limfni nodus, LDi-najduži dijametar; D5PS -Deauville PET 5-point scal

Unutar tri meseca od primljene poslednje terapijske kure ponovo se radi procena terapijskog odgovora. Cilj lečenja je postizanje najdublje remisije, ali imajući na umu prirodu osnovne bolesti, nuspojave terapije, uz očuvanje kvaliteta života uzimajući u obzir karakteristike obolelog. Postizanje kompletne remisije uglavnom dovodi do produženja vremena do progresije bolesti (PFS-progresion free survival) i ponovne potrebe za lečenjem, a nekad i do poboljšanja ukupnog preživljavanja (OS-overall survival).

Terapija agresivnih nehočkinskih i Hočkinovog limfoma se započinje odmah po određivanju kliničkog stadijuma i grupe rizika zbog agresivne prirode bolesti. Iz istog razloga je izuzetno važno postizanje kompletne remisije. Standardnom prvom terapijskom linijom se kompletna remisija postiže u visokom procentu obolelih, a stratifikacija po grupama rizika služi da se prepoznaju visokorizični bolesnici kod kojih je verovatnoća da neće odgovoriti na terapiju veća-primarno rezistentni ili oni kod kojih je veći rizik od ranog vraćanja bolesti-relapsa. Prva revizija po započinjanju terapije služi da procenimo efekat primjenjenog lečenja i da se, ako nismo zadovoljni postignutim odgovorom, raniye uključe intenzivniji terapijski protokoli ili noviji lekovi koji daju veću šansu za dublu remisiju [9]. Pored toga, u grupi bolesnika niskog rizika, prognostički povoljnih, uglavnom kad govorimo o Hočkinovoj bolesti, kod kojih se već nakon prvih ciklusa terapije postigne traženi odgovor, sve češće su preporuke o smanjivanju broja terapijskih kura ili isključivanju nekih lekova, kako bi se ne kompromitujući efekat lečenja, smanjio rizik od kasnih komplikacija terapije [10,11].

Kad se radi o indolentnim limfoproliferativnim neoplazmama stav je nešto drugачiji zato što se, trenutno dostupnim terapijskim mogućnostima, ove bolesti i dalje smatraju neizlečivim. Kompletna remisija se povezuje s dužim vremenom do progresije (PFS), ali i dalje za većinu bez dokazanog povećanog ukupnog preživljavanja (OS). Važno je pre uvođenja terapije uraditi stažiranje bolesti i procenu rizika, uključujući i molekularne parametre lošije prognoze. Jedna od ovih bolesti je i hronična limfocitna leukemija/sitnoćelijski limfom CLL/SLL. Del 17p, prisustvo mutacije TP 53 i mutacioni status za varijabilni region teških lanaca imunoglobulina (IgHV) imaju prediktorni značaj u proceni odgovora na terapiju kod ove bolesti. Bolesnici sa del 17p, mutacijom TP53 i nemutiranim genom u

varijabilnom regionu za teške lance imunoglobulina su obično rezistentni na standardnu imunohemoterapiju koja se u prvoj liniji preporučuje kod mlađih bolesnika bez komorbiditeta. Da bi se izbegla toksičnost terapije od koje se ne očekuje da će dati rezultat važno je pre odluke o lečenju uraditi navedene analize [12]. Zbog svega navedenog i dalje su preporuke svih vodiča da se van kliničkih studija asimptomatični bolesnici s ovom bolesti ne leče, čak i ako su nosioci ovih nepovoljnih riziko-faktora. Isto važi i za druge indolentne limfoproliferativne neoplazme koje ne daju simptome: folikularni limfom (FCL), limfom marginalne zone (MZL), triholeukemiju, limfoplazmocitni limfom (LPL) [4-6, 12].

Indikacije za terapiju kod indolentnih limfoproliferativnih neoplazmi su:

- kompresivne tegobe koje nastaju zbog pritiska uvećanih limfnih čvorova, jetre, slezine ili velike tumorska mase (bulky bolest) koja podrazumeva uvećanje limfnih nodusa preko 10cm ili slezine preko 6cm ispod rebarnog luka [11],
- pojava izražene malaksalosti,
- tegobe od strane organa i sistema koji su zahvaćeni limfoproliferativnom bolesti,
- pojava citopenija koje su u vezi s limfomom,
- pojava B simptoma.

B simptomi su: gubitak na telesnoj masi veći od 10% za period kraći od šest meseci, noćna preznojavanja, povišena telesna temperatura bez infekcije [2]. Indikacija za započinjanje terapije hronične limfocitne leukemije je i autoimuna citopenija refrakterna na terapiju kortikosteroidima [11].

U svim vodičima se navodi i aktivna uloga obbolelog u odluci o terapiji. Bolesniku sa limfoproliferativnim neoplazmama se predočava priroda bolesti, aktuelni stavovi, dostupne terapijske opcije, kao i mogući ishodi lečenja i kod donošenja odluke o započinjanju lečenja ili nastavku kliničkog praćenja u obzir se uzimaju stavovi, stil života i želje obolelih.

Ako se doneće odluka da kod bolesnika sa indolentnom LPN nije potrebno primeniti terapiju nastavljaju se redovne kontrole, najčešće na 3 do 4 meseca koje

podrazumevaju anamnezu, fizikalni pregled i laboratorijske analize, a radiološki i dodatni pregledi se rade ako postoji klinička potreba, odnosno sumnja na progresiju bolesti i mogućnost da je potrebno uvođenje antilimfomske ili antileukemijske terapije [4-6,12].

1.2 ANEMIJA KOD OBOLELIH OD LIMFOPROLIFERATIVNIH NEOPLAZMI

Anemija se definiše kao smanjenje broja eritrocita ili koncentracije hemoglobina u odnosu na referentne vrednosti za pol i životnu dob. Do puberteta devojčice dostižu vrednosti normalne za odrasle osobe ženskog pola. Koncentracija hemoglobina (Hg) se pod uticajem androgena povećava kod muškaraca do 18. godine što dovodi do razlike u vrednostima Hg između muškaraca i žena od oko 15g/L do oko 70. godine. Tokom naredne dve decenije koncentracija Hg kod muškaraca padne za oko 10g/L, a kod žena za oko 2g/L, tako da je u godinama iznad 90. mala razlika u normalnim vrednostima između polova [14].

Eritrociti se stvaraju u kostnoj srži i za normalan broj eritrocita neophodno je prisustvo svih gradivnih materija u adekvatnoj količini, normalna funkcija kostne srži, normalna regulacija eritrocitopoeze i normalan životni vek eritrocita. Birgegard i saradnici 2006. nakon analize podataka podgrupe od 2360 pacijenata sa limfomom ili multiplim mijelomom u sklopu istraživanja anemije u malignitetima kod pacijenata u Evropi, navode da je kod obolelih od limfoma i multiplog mijeloma u momentu uključenja anemiju imalo 52,5% bolesnika, prevalenca anemije tokom istraživanja je bila 72,9%, kod bolesnika sa multiplim mijelomom 85,3%, sa nehočkinskim limfomom 77,9%, sa hočkinovim limfomom 57,4%. Incidenca u grupi koja je primala hemoterapiju je bila 55,4%, a samo 47,3% bolesnika koji su bili anemični, u bilo kom momentu istraživanja, je dobilo i antianemiju terapiju [15].

Anemija pogoršava subjektivno stanje i utiče na kvalitet života obolelih. S obzirom da kod indolentnih LPN može biti i razlog za započinjanje antilimfomske terapije potrebno je pre započinjanja lečenja razjasniti etiologiju anemije.

Zbog infiltracije kostne srži malignim ćelijama može doći do potiskivanja normalne hematopoeze i posledične citopenije. U sklopu nekih LPN dolazi i do povećanog stepena fibroze u kostnoj srži što takođe dovodi do anemije.

Kod indolentnih LPN prvenstveno kod HLL i SLL i ako ne postoji visok stepen infiltracije kostne srži malignim klonom mogu se javiti autoimune citopenije, najčešće autoimuna hemolizna anemija (AIHA), potom imuna trombocitopenija (ITP), i ređe izolovana aplazija crvene loze (PRCA) i imuna granulocitopenija. AIHA i ITP se mogu javiti i zajedno u sklopu Evansovog sindroma. Načеšće primenjivana definicija AIHA-e podrazumeva prisustvo svih navedenih kriterijuma [16-18]:

Hg \leq 110g/L u odsustvu primene citotoksične terapije unutar mesec dana ili druge poznate etiologije anemije;

Dokaz o prisutnom autoimunom mehanizmu npr: pozitivan direktni antiglobulinski test (DAT) ili za IgG ili za C3 ili prisustvo hladnih aglutinina, posle isključivanja drugih mogućnosti (npr. kasne hemolizne posttransfuzione reakcije);

Prisustvo jednog ili više laboratorijskih markera hemolize: povećan broj retikulocita (Rtc), nizak nivo haptoglobina, povišena laktat dehidrogenaza (LDH) ili bilirubin u serumu;

Pored navedenih uzroka anemija može biti posledica deficita vitamina B12, folne kiseline ili gvožđa. Ovi bolesnici se prvo leče supstitucijom faktora koji nedostaje, a potom se ponovo procenjuje potreba za terapijom ukoliko anemija perzistira.

Ne treba zaboraviti ni mogućnost pojave drugih bolesti pored dokazane LPN koje mogu biti uzrok anemije. Decenijama unazad se opisuje veća učestalost drugih maligniteta kod osoba sa LPN u odnosu na opštu populaciju [19-21]. LPN se može razviti i kod bolesnika sa preegzistirajućom, a neotkrivenom anemijom drugog uzroka.

Ako znamo da je anemija direktna posledica LPN onda je i indikacija za uvođenje antilimfomske terapije.

1.3 METABOLIZAM GVOŽĐA

Kod malignih hemopatija se često, već u momentu postavljanja dijagnoze, nalazi anemija različite težine, ili se i bez anemije, uočavaju poremećaji u biohemičkim parametrima metabolizma gvožđa.

Gvožđe ima ulogu u ćelijskoj proliferaciji i metabolizmu u sklopu različitih enzima uključujući ribonukleotid reduktazu i citohrom 450 [22]. Ugrađen u hemoglobin prenosi kiseonik, ali učestvuje i kao kofaktor ribonuokleotid reduktaze u sintezi DNK, a kofaktor je i mnogih belančevina u ciklusu limunske kiseline te učestvuje u stvaranju ATP-a. S druge strane, gvožđe može da stvara reaktivne kiseonične radikale (ROS) i dovodi do oksidativnog stresa koji pokreće signalne puteve neophodne za ćelijski opstanak i programiranu ćelijsku smrt [22]. Oksidativni stres dovodi do direktnog ili indirektnog reaktivnim kiseoničnim radikalima posredovanog oštećenja nukleinskih kiselina, proteina, lipida te učestvuje u procesu karcinogeneze [22,23], neurodegeneracije [22,24,25], ateroskleroze, dijabetesa [22, 26] i starenja [22,27]. U procesu regulacije metabolizma gvožđa učestvuju brojni faktori.

1.3.1. REGULACIJA METABOLIZMA GVOŽĐA

Kontrolu metabolizma gvožđa možemo posmatrati na dva nivoa: regulaciju na unutarćelijskom nivou i regulaciju sistemskog metabolizma gvožđa (slika 1). Intraćelijska homeostaza je dominantno regulisana posttranskripcionom kontrolom gena preko sprege belančevina i elemenata senzitivnih na koncentraciju gvožđa (iron responsive proteins (IRP)- iron responsive elements (IRE)) [28].

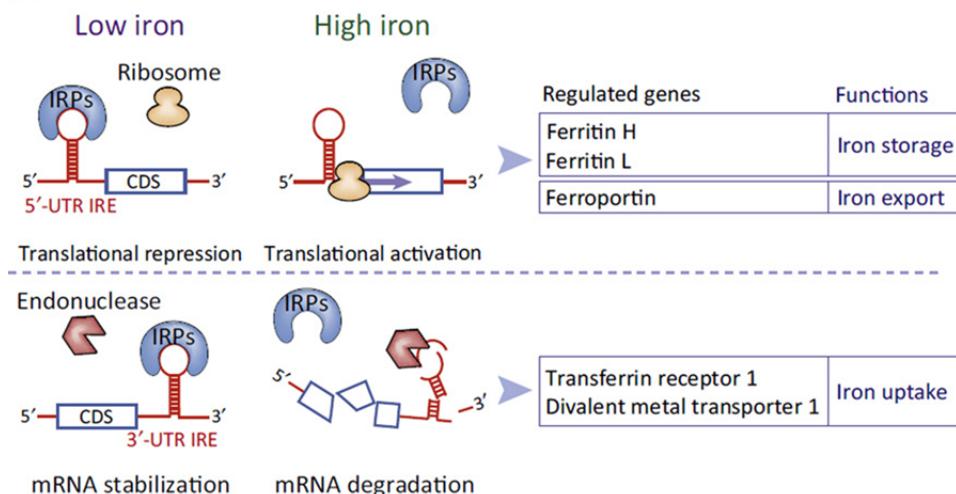
Sistemska homeostaza je uglavnom kontrolisana hepcidinom, proteinom koji se stvara u jetri i dovodi do internalizacije i degradacije feroportina koji je zasad jedini poznati eksporter gvožđa iz ćelija [28].

Gvožđe uneto hranom preko feroportina izlazi iz enterocita, prenosi se transferinom u trovalentnom obliku do perifernih tkiva. Kompleks gvožđa vezanog za transferin se vezuje za transferinski receptor 1 (TfR1) i endocitozom dospeva u ćelije. Unutar ćelije iz trovalentnog prelazi u dvovalentni oblik i inkorporira se u

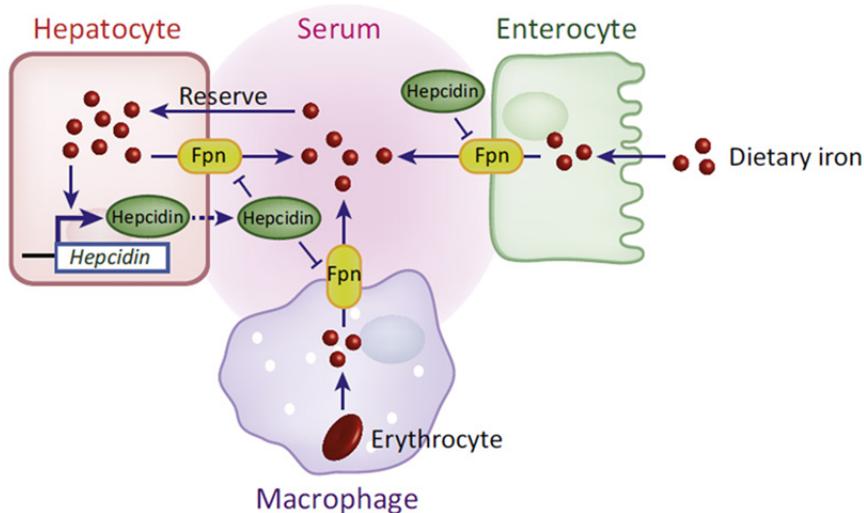
različite enzime, učestvuje u sintezi hema, u procesu oksidativne fosforilacije, sintezi dezoksiribonukleotida. Svišno gvožđe se skladišti u obliku feritina.

Na slici 1 je prikazan mehanizam sistemske i intracelularne regulacije metabolizma gvožđa.

(A) Intracellular iron metabolism



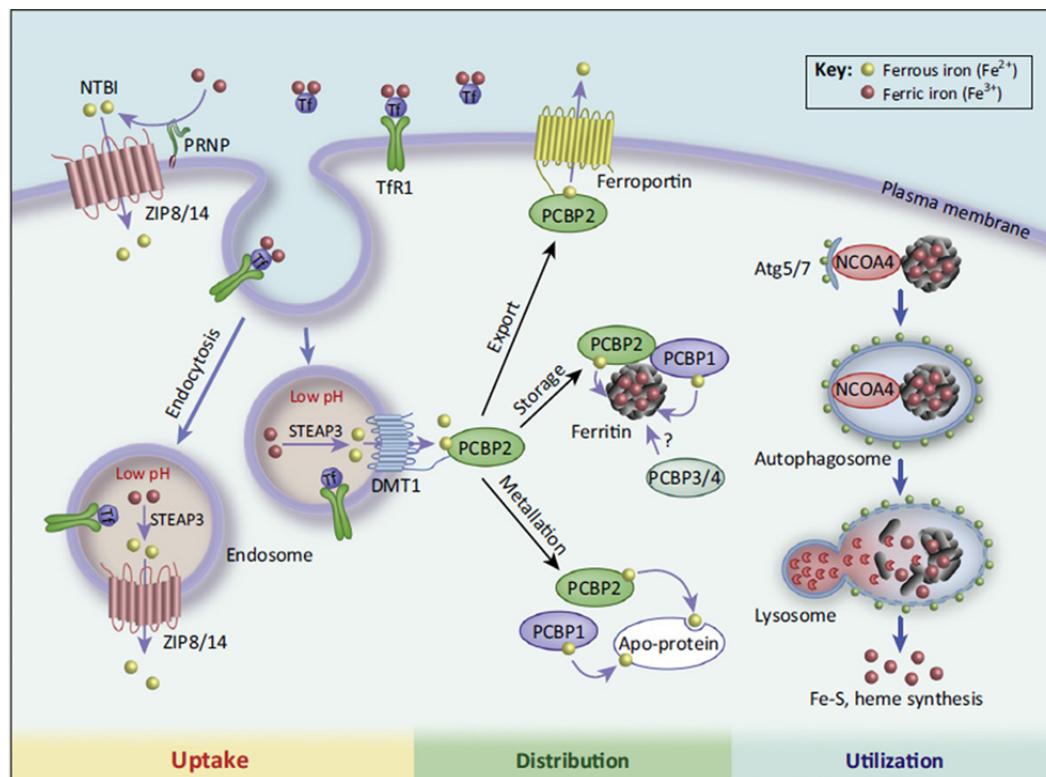
(B) Systemic iron metabolism



Slika 1. Bogdan R.A. et al. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. Mehanizam intraćelijske i sistemske homeostaze gvožđa [28] (s dozvolom izdavača)

Dodatni faktori koji učestvuju u intraćelijskoj homeostazi gvožđa su i dva proteina za koje se znalo da prenose cink, ali se pokazalo da učestvuju i u transportu gvožđa koje nije vezano za transferin (NTBI) kroz ćelijsku membranu: ZIP 8 i ZIP 14 [28-]

32], a imaju ulogu i u bolestima s nagomilavanjem gvožđa-hemohromatozi [32]. Ostaje da se razjasni uloga ovih belančevina u drugim stanjima s viškom gvožđa: malignitetima i anemijama [28]. Proteini koji prate dvovalentno gvožđe unutar citosola i učestvuju u procesu njegove distribucije unutar ćelije su PCBP1 i PCBP2 [28, 33,34], dok koaktivator jedarnog receptora 4 (NCOA4) ima ulogu u iskoristljivosti gvožđa smeštenog unutar feritina učestvujući u autofagiji feritina (slika 2). [28,35-38]



Slika 2. Bogdan R.A. et al. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. Novi mehanizmi regulacije intraćelijskog metabolizma gvožđa [28] (s dozvolom izdavača)

Feritin skladišti gvožđe unutar ćelija u netoksičnom obliku, ali se ono dok je vezano u njemu ne može koristiti za potrebe ćelije. Da bi se iskoristilo mora biti oslobođeno iz feritina, obično degradacijom u lisozomima [35-38]. Način degradacije feritina izgleda da je isti i u stanjima s deficitom, kao i u onima s nakupljanjem gvožđa, ali je način isporuke lisozomima drukčiji [28,36]. U stanjima s deficitom gvožđa radi se o autofagiji dok se u stanjima s viškom gvožđa koriste drugi putevi [36]. NCOA4 igra važnu ulogu u autofagiji feritina u stanjima deficita

gvožđa i neophodan je za homeostazu gvožđa u slezini [39,40]. Kad ne postoji deficit gvožđa, neautofagni putevi degradacije feritina u malignim ćelijama su manje aktivni u odnosu na normalne ćelije čime se objašnjava otpornost maligne ćelije na oštećenja izazvana viškom gvožđa [36]. Reaktivacija ovih puteva mogla bi povećati toksičnost gvožđa za malignu ćeliju i eventualno predstavljati novu strategiju u lečenju [28].

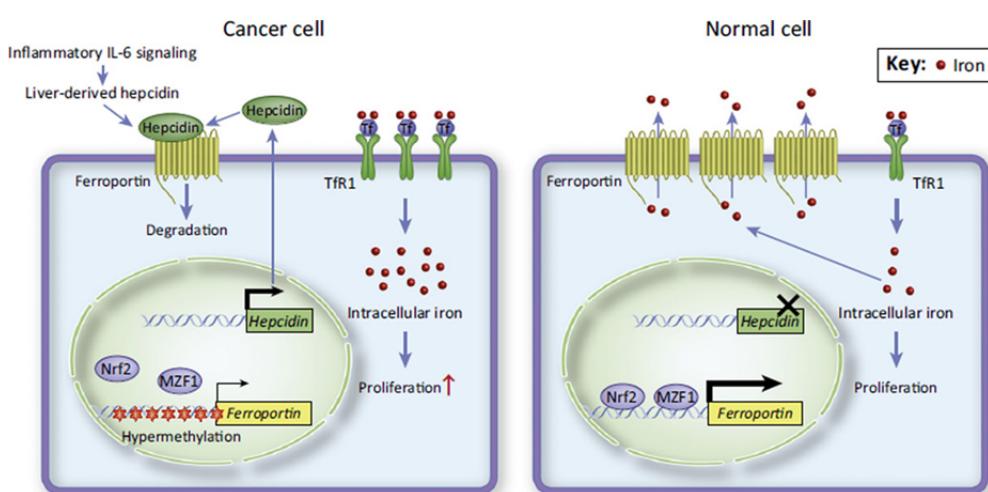
Sistemska regulacija gvožđa zavisi od hepcidina. On se stvara u jetri i, kako je već rečeno, dovodi do internalizacije i degradacije feroportina čime se gvožđe zadržava u ćelijama: hepatocitima, makrofagima, enterocitima, a smanjuje se njegova koncentracija u serumu. Jedini prirodni put gubitka gvožđa je deskvamacijom epitela i minimalnim krvarenjima te se praktično jedino na nivou apsorpcije iz dijetnog unosa može regulisati nivo dodatnog gvožđa u organizmu. Regulatorni mehanizmi koji kontrolisu nivo hepcidina su poslednjih godina predmet intenzivnog proučavanja i nisu do kraja rasvetljeni. Do povećanog stvaranja hepcidina dolazi u stanjima sa nagomilavanjem gvožđa što ima za cilj sprečavanje dalje akumulacije gvožđa tako što će se ono zadržati u enterocitima, makrofagima i jetri. Ova regulacija se obavlja preko BMP-SMAD signalnog puta. U inflamaciji dolazi do povećanja interleukina 6 koji preko JAK-STAT signalnog puta dovodi do povećane produkcije hepcidina, ali se navodi da se i ova regulacija obavlja delom preko BMP-SMAD puta te da između ovih puteva postoji interakcija koja u zapaljenjima rezultira povećanom produkcijom hepcidina [41].

Za stvaranje eritrocita u kostnoj srži-eritropoezu, gvožđe je neophodan gradivni sastojak. Hemoglobin koji se nalazi u eritrocitima vezuje kiseonik i doprema ga svim našim ćelijama. U sastav hemoglobina ulazi 4 grupe hema i u svakoj se nalazi po jedan atom dvovalentnog gvožđa (Fe^{2+}). Kad je eritropoezna aktivnost veća neophodna je i veća količina gvožđa za sintezu hemoglobina. Eritropoezna aktivnost u kostnoj srži deluje supresivno na stvaranje hepcidina i time se povećava apsorpcija gvožđa iz unosa hranom, a i iskoristljivost gvožđa iz depoa prisutnih u organizmu. Faktori koji se spominju kao učesnici u ovoj regulaciji i stvaraju se u eritroblastima različite starosti su: faktor rasta i diferencijacije 15 (GDF-15), eritroferon (ERFE) i TWSG1 (eng. twisted gastrulation factor-1). Uloga GDF-15 i TWSG1 je i dalje nerazjašnjena delom i zbog razlike u eritropoezi kod ljudi i životinjskih modela. Naime, GDF -15 se nalazi u kasnim i apoptoznim

eritroblastima kod ljudi u velikoj količini dok ga kod miševa nema [41]. Nasuprot tome ERFE se stvara i u eritroblastima ljudi i miševa i postoje dokazi iz studija da u uslovima stres eritropoeze dovode do inhibicije stvaranja hepcidina [41-44].

Hepcidin se stvara i u nekim tumorskim ćelijama. Karcinom dojke, karcinom prostate i multipli mijelom su tumori koji su povezani s visokim nivoom hepcidina i malom ekspresijom feroportina što se pokazalo kao nepovoljan prognostički parametar [45-49]. Feroportin služi kao efluks pumpa koja izbacuje gvožđe iz enterocita i makrofaga nakon čega se ono vezuje za transferin i prenosi dalje. Maligna ćelija u odnosu na normalnu ćeliju eksprimira veći nivo transferinskog receptora 1 (TfR1), a manji feroportina, uz viši nivo hepcidina što dodatno dovodi do toga da je koncentracija gvožđa unutar maligne ćelije veća [28,50]. Ovo povećava aktivnosti proteina zavisnih od gvožđa što omogućava bržu proliferaciju ćelije [50]. Za mnoge belančevine koje su inicijalno izučavane zbog uloge u normalnom metabolizmu gvožđa pokazano je da doprinose malignom rastu [50].

Ekspresija feroportina u malignoj ćeliji je manja i zbog hipermetilacije feroportin promotera što dovodi do inhibicije faktora transkripcije za feroportin [28].



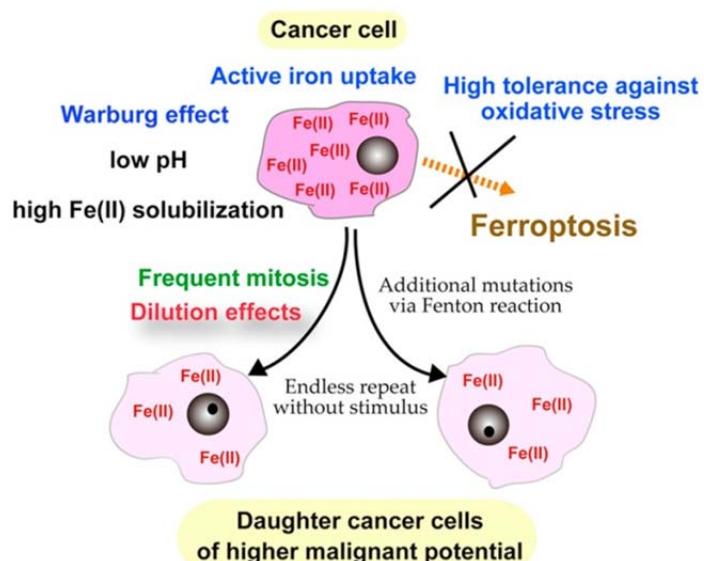
Slika 3. Bogdan R.A. et al. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. Feroportin-Hepcidin osovina u malignoj i normalnoj ćeliji [28] (s dozvolom izdavača)

1.3.2. FEROPTOZA

Pojam feroptoza je prvi put upotrebljen u radu Diksona i saradnika 2012. kao neapoptotski, nenekrozni i neautofagni put ćelijske smrti [51]. Pre toga je radom Dolme i saradnika 2003. otkriven erastin koji može da izazove nov način ćelijske smrti, a potom Yagoda 2007. i Yang 2008. nalaze da ovaj mehanizam ćelijske smrti može biti inhibiran helatorima gvožđa, otkrivaju nove faktore koji imaju ulogu u ovom mehanizmu i da u njemu dolazi do mitohondrijalne disfunkcije [52-54]. Za razliku od apoptoze feroptoza zavisi od gvožđa, nema aktivacije kaspaznog puta niti je blokiraju inhibitori kaspaze, zahteva prisustvo lipidnih peroksida i inhibira se ferostatinom, dovodi do inflamatorne reakcije i privlačenja ćelija koje učestvuju u imunom odgovoru. U odnosu na apoptizu gde dolazi do bubrenja ćelijske membrane i kondenzacije hromozoma u feroptizi se promene dešavaju na mitohondrijama, one se smanjuju uz povećanje denziteta njihove membrane, smanjuju se i nestaju mitohondrijalne kristale [51, 55-59]. Na biohemijском nivou dolazi do deplecije intraćelijskog glutationa, smanjene aktivnosti glutation peroksidaze 4 (GPX4), enzima koji učestvuje u redukciji lipidnih peroksida. Fe $^{2+}$ oksidiše lipide čime se stvara velika količina reaktivnih kiseoničnih radikala (ROS) i pokreće mehanizam feroptoze [55]. Značajnu ulogu u ovom procesu, a i mesto na kom deluju induktori feroptoze imaju i transmembranski kanali x_c^- koji se nalazi u fosfolipidnim membranama ćelija, a služe kao aminokiselinski antiporteri, odnosno u odnosu 1:1 se kroz njih vrši razmena cistina i glutamata. Cistin iz ekstraćelijskog prostora ulazi u ćeliju i u njoj se redukuje u cistein koji služi za sintezu glutationa [51,55]. Pored faktora koji dovode do feroptoze otkriveni su i neki koji je inhibiraju. To su helatori gvožđa, ferostatin 1 (Fer-1), liprokstatin 1, vitamin E. U studiji iz 2014. na tri in vitro modela: Hantingtonove bolesti, periventrikularne bele mase i bubrežnoj insuficijenciji ferostatin 1 je inhibirao ćelijsku smrt i time se otvorilo područje za ispitivanje novih ciljnih terapija u različitim bolestima [55,61].

S obzirom da feroptoza zavisi od gvožđa i faktori koji učestvuju u procesu ulaska u i izlaska gvožđa iz ćelije, kao i iskoristljivosti i skladištenju gvožđa, a i faktori regulacije intraćelijskog metabolizma gvožđa imaju dokazanu ili potencijalnu ulogu u regulaciji feroptoze, odnosno povećavaju ili smanjuju osetljivost ćelije na feroptazu [56,62,63]. Kancerske ćelije su podložne menjanju metabolizma tiola, koji imaju ulogu intraćelijskih redoks pufera dok je oksidativni stres zbog ekscesa gvožđa povezan s karcinogenozom [64]. Maligne ćelije kao što je prethodno prikazano na slici 3 zadržavaju veću količinu gvožđa unutar ćelije, ali ne

samo u lizozomima, nego i u citosolu i mitohondrijama. Mitohondrije u ovim ćelijama postaju disfunkcionalne, povećava se preuzimanje glukoze i u procesu aerobne glikolize povećava se produkcija laktata što je poznato kao Varburgov efekat. Osobina malignih ćelija za povećano preuzimanje glukoze je našla primenu u dijagnostici maligniteta i proceni terapijskog efekta primenom PET/CT skena [65]. Maligne ćelije su pod stalnim oksidativnim stresom, ali ga tolerišu i istovremeno izbegavaju feroptozu - slika 4 [64]



Slika 4. Toyokuni S, et al. Iron and thiol redox signaling in cancer: An exquisite balance to escape ferroptosis. Free Radic Biol Med. Graphical abstract [64] (s dozvolom izdavača)

Agensi koji blokiraju preuzimanje cistina, kao što je erastin i sulfasalazin, ili oni koji utiču na depleciju glutationa ili njegovo smanjeno stvaranje, u eksperimentalnim radovima su dovodili do prekida rasta tumora i feroptoze [64,66-68]. Povišen nivo slobodnih kiseoničnih radikala je bio odgovor na promenu metabolizma cistina i glutationa, a ćelijska smrt je, tamo gde je testirana, prevenirana antioksidativnom terapijom [62]. Erastin je jak induktor feroptoze koji deluje inhibicijom transmembranskog antiportera za razmenu intraćelijskog glutamata i ekstraćelijskog cistina (x_c). Cistin je neophodan za stvaranje glutationa koji učestvuje u održavanju redoks ravnoteže i njegov deficit dovodi do nagomilavanja slobodnih kiseoničnih radikala [69-71]. Dikson i saradnici su otkrili da i sulfasalazin i sorafenib izazivaju selektivnu feroptozu blokirajući ovaj kanal, ali je erastin

2500 puta potentniji inhibitor sistema x_c od sulfasalazina. Helator gvožđa, deferoksamin suprimira erastinom indukovana ćelijsku smrt i nagomilavanje ROS, a egzogeno gvožđe je potencira što je dodatni pokazatelj uloge gvožđa u ovom procesu [51,66,72]. Yang i saradnici na kulturi ispitivanih 117 kancerskih linija ćelija pokazuju statistički značajnu senzitivnost ćelija DBKL i karcinoma bubrega na erastinom indukovana ćelijsku smrt [73]. U radu nemačkih naučnika je potvrđeno da erastin povećava osetljivost ćelija akutne limfoblastne leukemije na terapijsko dejstvo Smac mimetika LCL 161 i da sinergističkim delovanjem dovode do smrti leukemijske ćelije [74]. Druga grupa autora potvrđuje da erastin dozno zavisno indukuje mešani tip ćelijske smrti: feroptozom, apoptozom, nekroptozom, autofagijom u kulturi ćelija akutne mijeloidne leukemije i suprimira rast ovih ćelija u kulturi. Ovaj efekat se u istom istraživanju suprimira inhibitorom feroptoze ferostatinom 1 ili nekrostatinom 1 koji je inhibitor nekroptoze, ali ne i kaspaznim inhibitorom koji deluje na apoptozu niti hlorohinom koji je inhibitor autofagije. Ovaj efekat nisu imali na ćelijama akutne T limfoblastne leukemije, akutne promijelocitne leukemije i hronične mijeloidne leukemije. Pored toga, male doze erastina su signifikantno povećavale osetljivost ćelija akutne mijeloidne leukemije (AML) na standardno primenjivane hemioterapeutike u prvoj terapijskoj liniji: citozin arabinozid i antracikline [75], iako su u ovom istraživanju autori koristili doksorubicin, a ne danas u AML češće primenjivani, daunoblastin. Limfoidne ćelije ne mogu da sintetišu cistein i zavise od unošenja cistina koje stvaraju ćelije mikrookoline: fibroblasti i dendritičke ćeije. Sulfasalazin je delujući na antiporter x_c u kulturi ćelija limfoma dovodio do prekida proliferacije limfomskih ćelija, a kasnije je na životinjskom modelu sa transplantiranim limfomom dovodio do supresije rasta tumora, bez veće toksičnosti za domaćina [76]. Derivati artemisinina su indukovali feroptozu na kulturi ćelija 60 tumorskih linija, a i geni povezani s metabolizmom gvožđa, između ostalih oni koji kodiraju transferin, transferinski receptor 1 i 2, su identifikovani kao prediktivni biomarkeri osetljivosti na artemisinin [77].

Čitajući navedene radove nameće se nekoliko pitanja:

Da li i kako serumski biomarkeri metabolizma gvožđa koreliraju sa opisanim procesima?

Da li su i u kakvoj korelaciji serumski biomarkeri metabolizma gvožđa sa inflamatornim biomarkerima koji imaju primenu u prognostičkim skorovima za LPN?

Da li bi se dodavanjem nekih i kojih biomarkera metabolizma gvožđa u prognostičke skorove povećala njihova osetljivost?

Kako drugi faktori koji učestvuju u regulaciji gvožđa u fiziološkim i patofiziološkim uslovima koreliraju s ovim procesima i mogu li pomoći u predikciji terapijskog odgovora?

1.3.3. HEPCIDIN U INFLAMACIJI I LIMFOPROLIFERATIVNIM NEOPLAZMAMA

Hepcidin se stvara u jetri i kao što je već rečeno glavni je regulator sistemskog metabolizma gvožđa. Koncentracija hepcidina je pod uticajem serumskog gvožđa i kad postoji sideropenijska anemija, pada i koncentracija hepcidina kako bi se povećala resorpcija gvožđa, a i mobilisalo gvožđe iz ćelija monocitno makrofagnog sistema u cilju veće produkcije eritrocita i korigovanja anemije. S druge strane, u stanjima s nagomilavanjem gvožđa, posle transfuzije eritrocita, ili kod hemohromatoze, dolazi do porasta koncentracije hepcidina kako bi se smanjilo preuzimanje gvožđa iz enterocita i ćelija monocitno makrofagnog sistema i sprečilo dodatno opterećenje gvožđem. Situacija je komplikovanija u zapaljenjima. Hepcidin se primarno stvara u jetri, a među faktorima koji stimulišu produkciju hepcidina je i jedan od medijatora zapaljenja, interleukin 6 (IL 6). U upalnim stanjima se nalazi snižen nivo serumskog gvožđa, ali uz povećan nivo hepcidina koji dovodi do degradacije feroprotina zbog čega gvožđe ostaje zarobljeno u ćelijama monocitno makrofagnog sistema, a smanjuje se i njegovo preuzimanje iz enterocita. Ovo dovodi do smanjene raspoloživosti gvožđa za eritrocitopoezu odnosno do funkcionalnog deficit-a. Prateći serumske biomarkere u upalnim stanjima ćemo pored sniženih vrednosti gvožđa naći povišene vrednosti feritina, C reaktivnog proteina (CRP) i IL 6. Neretko, u upalnim stanjima uz funkcionalni može postojati i apsolutni deficit gvožđa, posebno ako se radi o inflamatornim bolestima creva ili malignim tumorima s prisutnim hroničnim krvarenjima. Zbog povišene koncentracije hepcidina i opisanog dejstva na enterocite peroralna primena preparata gvožđa obično ostaje bez terapijskog učinka.

Serumsku koncentraciju hepcidina reguliše i eritropoezna aktivnost. Kao faktori koji učestvuju u ovom načinu regulacije prethodno su već spomenuti eritroferon, GDF-15 i TWGF1 [41-44]. Kad je eritropoezna aktivnost veća, kao posle krvarenja ili lize eritrocita dolazi do supresije stvaranja hepcidina čime je omogućena veća resorpcija i raspoloživost

gvožđa za eritrocitopoezu. S druge strane i u stanjima neefektivne eritrocitopoeze, kao u mijelodisplaznom sindromu ili talasemiji doći će do manje produkcije hepcidina, čime će se dodatno povećati nagomilavanje gvožđa. [78-81] Nije sigurno da u fiziološkim i u bolesnim stanjima ovi faktori istim mehanizmima dovode do supresije hepcidina [82].

Više grupa autora je publikovalo rezultate istraživanja nivoa hepcidina kod bolesnika sa multiplim mijelomom, limfoplazmocitnim limfomom, DBKL, Hočkinovim limfomom i akutnom leukemijom. U svim grupama je nivo hepcidina obrnuto korelirao s koncentracijom hemoglobina [83-88]. Kod bolesnika s nehočkinskim limfomom postojala je pozitivna korelacija sa inflamatornim parametrima, posebno IL 6 i sa smrtnim ishodom. [84]

Kod bolesnika s Hočkinovom bolesti koncentracija hepcidina u plazmi je bila signifikantno veća u odnosu na kontrolnu grupu zdravih, nezavisno od prisustva anemije. U podgrupi ispitanika s anemijom postojala je inverzna korelacija vrednosti hepcidina s hemoglobinom. U odnosu na biomarkere metabolizma Fe, postojala je pozitivna korelacija hepcidina s vrednostima feritina, a negativna sa TIBC (eng. Total iron binding capacity) i gvožđem. U multivarijantnoj regresionoj analizi nivoi IL 6 i fibrinogena su bili nezavisno povezani s hepcidinom [83]. Autori navode da pored hepcidina verovatno postoje i drugi, od hepcidina nezavisni mehanizmi, koji utiču na razvoj anemije u Hočkinovoj bolesti. Smatraju da su povezani sa proinflamatornim citokinima prvenstveno IL 6 [83,85]. Sam IL 6 ne suprimira eritrocitopoezu, ali se smatra da bi neki drugi reaktant akutne faze zapaljenja mogao imati takav efekat, i kao jedan od njih se navodi feritin [85]. Relativna insuficijencija eritropoeze nije nužno povezana s poremećajima metabolizma gvožđa, ali oni mogu biti dodatni faktor u nastanku anemije u Hočkinovoj bolesti [85].

Pored hepatocita i monocita u zapaljenjima proizvode hepcidin. Koncentracija hepcidina proizvedenih u monocitima se povećavala nakon stimulacije interferonom 6 i bila je praćena smanjenom ekspresijom feroportina na ovim ćelijama [89]. Ćelije monocitno makrofagnog sistema predstavljaju značajan deo tumorske mikrookoline i pokazano je da imaju uticaja na stvaranje i rast tumora, ali i da su povezani s odgovorom na terapiju [85]. Tkivni makrofagi su samo delom porekla od monocita kostne srži. Od 2000. se u radu Milsa i saradnika govori o makrofagima M1 i M2 [90]. Makrofagi nakon što fagocituju ostarele i mrtve ćelije iz svoje okoline proizvodeći različite faktore rasta pomažu obnovi ovog tkiva i zameni mrtvih ćelija novim [91,92]. Imaju ulogu u odbrani organizma od

infektivnih agenasa, ali i prepoznavanju sopstvenih promjenjenih ćelija koje fagocituju i sprečavaju njihovo dalje umnožavanje na taj način štiteći i od nastanka tumora [92,93]. Ley vrlo ilustrativno piše da „ubijanje ima svoju cenu: M1 posredovano ubijanje pričinjava kolateralnu tkivnu štetu koju M2 moraju da počiste i pomognu da zaraste nakon što je osvajač eliminisan“ [94]. Mada poreklo tkivnih makrofaga može biti različito, sposobni su za samoobnavljanje, ali se dopunjaju i makrofagima porekla monocita iz kostne srži, svi oni pokazuju jaku M2 polarizaciju u zdravom tkivu pod homeostatskim uslovima [94,95]. Mils i saradnici navode da M1 makrofagi ubijaju kancerske ćelije, a M2 ih promovišu [91,94,96]. U radu američkih autora iz 2017. genskim profilisanjem uzoraka biopsija 39 različitih tumora se navodi da je prisustvo genskog profila M1 makrofaga bilo povezano s boljom prognozom u odnosu na profil M2 u mnogim malignitetima [94,95], a na mišjem modelu je terapijskim delovanjem indukovana polarizacija makrofaga iz M2 u M1 [94,97].

S obzirom da znamo da u Hočkinovoj bolesti Hočkinove i Rid Šternbergove (RS) ćelije zauzimaju manji deo tumorskog tkiva, a da značajan deo ćine mikrookoline u međusobno različitom kvantitativnom odnosu u zavisnosti od tipa Hočkinove bolesti, uključujući ćelije monocitno makrofagnog sistema i T limfocite jasno je da razumevanje biologije ovih ćelija doprinosi razvoju novih terapijskih opcija. Ovo je našlo primenu u imunoterapiji malignih bolesti, uključujući i Hočkinov limfom, primenom check point inhibitora.

U studiji koja je obuhvatila 53 bolesnika s DBKL nivo hepcidina i IL 6 je bio značajno viši u odnosu na nivo kod kontrolne grupe zdravih, a produkcija eritropoetina nije bila adekvatno povišena u odnosu na stepen anemije [87]. U objavljenom komentaru na ovaj rad navodi se da je učestalost i stepen anemije kod ispitanih bolesnika sa DBKL i prethodno objavljenim rezultatima na ispitanicima sa Hočkinovom bolesti, kao i koncentracija serumskog gvožđa i IL 6 bila slična, dok je nivo hepcidina bio nešto viši kod ispitanih s Hočkinovom bolesti u odnosu na one sa DBKL [86]. Nivo hepcidina je bio značajnije povišen i stepen anemije izraženiji u radu koji se bavio ispitanicima sa multiplim mijelomom (MM) [98,99] i Waldenströmovom makroglobulinemijom (WM) [88], uz ogradu autora da su korišćeni različiti eseji za ispitivanje nivoa hepcidina [86]. Takođe se navodi da je verovatno uticaj BMP-a (eng. bone morphogenic protein), pored IL 6 značajan za veću koncentraciju hepcidina u MM [86,99], a radovi objavljeni pre više od dvadeset godina ukazuju na neadekvatnu produkciju eritropoetina u odnosu na stepen anemije, kao i

neadekvatan odgovor eritrona na stepen anemije i stimulaciju eritropoetinom [98,99]. Pored podrazumevajućeg stvaranja hepcidina u jetri otkriveno je i da limfoplazmociti u Waldenströmovoj makroglobulinemiji proizvode hepcidin što bi mogao biti dodatni faktor koji utiče na anemiju u ovoj bolesti [88, 86].

Grupa japanskih autora je 2014. publikovala rezultate jednogodišnjeg prospektivnog ispitivanja veze koncentracije hepcidina s mortalitetom u grupi od 50 anemičnih bolesnika sa NHL [102]. U zavisnosti od serumske koncentracije hepcidina ispitani su podeljeni u grupu s niskim i visokim koncentracijama u odnosu na srednju vrednost koja je bila oko devet puta veća u odnosu na referentnu vrednost kod zdravih [102]. Visoka serumska koncentracija hepcidina je bila povezana sa niskim vrednostima hemoglobina, a kumulativna smrtnost signifikantno veća u ovoj grupi, rizik od smrti je bio četiri puta viši u odnosu na ispitanike u grupi s niskom serumskom koncentracijom hepcidina [102].

Poremećaji metabolizma gvožđa, bilo da se radi o deficitu ili nagomilavanju gvožđa uglavnom su se povezivali s hematološkim bolestima i u svakodnevnoj praksi su čest razlog za dalje hematološko ispitivanje. Međutim, novija saznanja o uticaju metabolizma gvožđa i njegovoj regulaciji na sistemskom i ćelijskom nivou su dovela do uvida u značaj koji ima u patogenezi drugih bolesti: inflamatornih, neurodegenerativnih ili malignih, kao i u stanjima povezanim sa starenjem [45-50, 57-63, 91-95, 103-107]. Sve to je uticalo na ispitivanje novih terapijskih ciljeva i potencijalne primene ranije poznatih lekova poput helatora gvožđa u novim indikacijama, kao i razvoj novih terapeutika [71, 72, 74-77, 96, 97, 101, 105-110]. S obzirom na kompleksnost signalnih puteva i uticaj različitih citokina na njih i da se in vivo u zdravlju i bolesti ovi uticaji često prepliću rezultati dobijeni na in vitro modelima u kontrolisanim uslovima se ne mogu uvek lako preneti na teren kliničke primene. Takođe, u ovom momentu nije jasno da li poremećaji u metabolizmu gvožđa u svakoj bolesti u kojoj su uočeni imaju značaj i koliki je za patogenезу te bolesti ili samo predstavljaju preklapajući nalaz. Treba znati i da normalni nalazi serumskih koncentracija biomarkera metabolizma gvožđa ne isključuju prisustvo poremećaja na ćelijskom nivou [107,108].

1.4. GDF-15 U ZDRAVLJU I BOLESTI

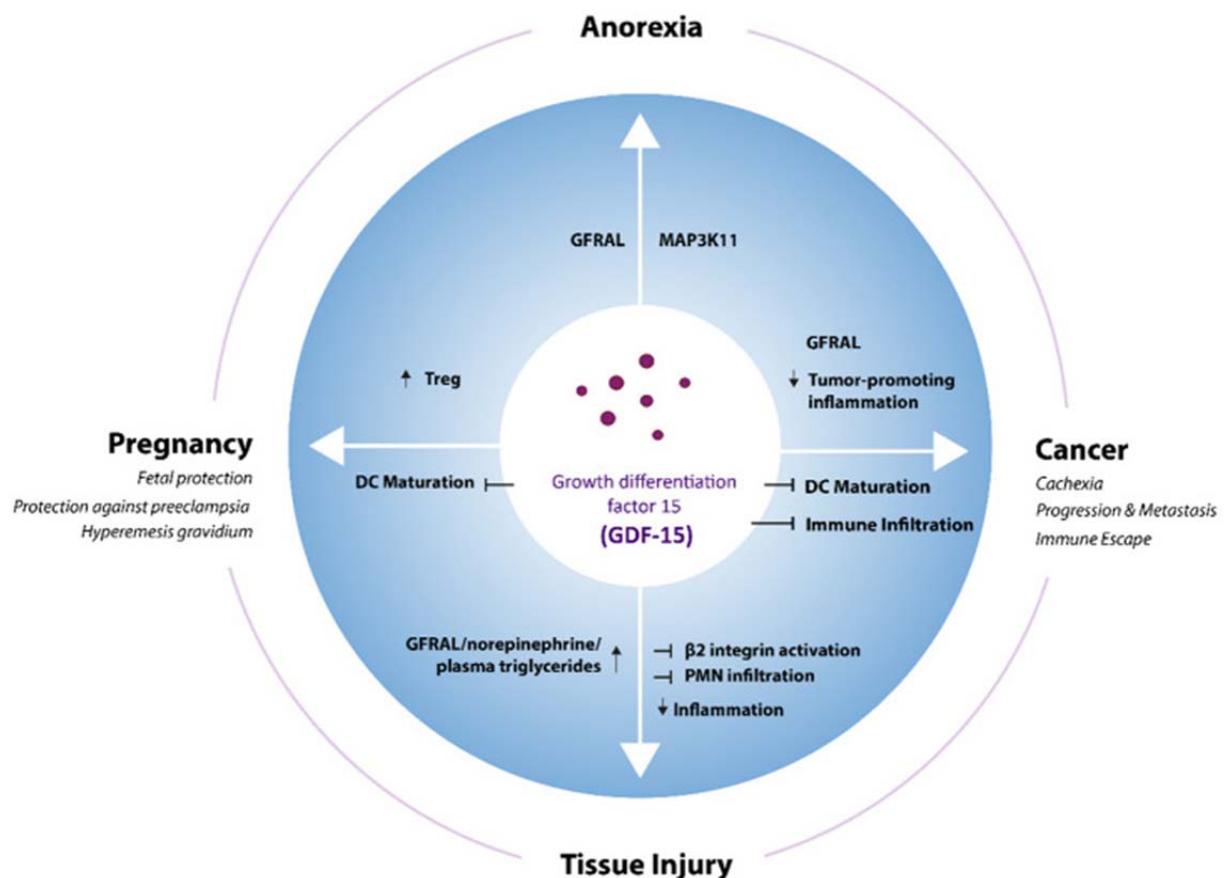
GDF-15 je odvojeni član porodice transformišućeg faktora rasta β (TGF- β), takođe se zove i makrofag inhibirajući citokin 1 (MIC-1), NAG-1 (eng. non steroid anti-inflammatory drug-inducible gene-1), placentalni TGF- β , PDF (eng. prostate derived factor) i PLAB (eng. placental bone morphogenetic protein) [111-114]. U fiziološkim uslovima u većoj količini se nalazi u placenti gde najviši nivo dostiže početkom trećeg trimestra trudnoće i smatra se da utiče na imunološku toleranciju majčinog organizma na plod [111,113,115]. U nekoliko radova je navedeno da je nivo GDF-15 bio niži kod trudnica kod kojih se kasnije javlja pobačaj ili kod onih koje su kasnije doživele preeklamsiju, te se predlaže kao mogući koristan marker za praćenje trudnoće [111, 116-118].

Nakon placente, u fiziološkim uslovima ekspresija GDF-15 je najveća u prostati, u kojoj ovu ekspresiju pored androgena reguliše i metabolit vitamina D-kalcitriol [111, 119, 120]. Prisustvo GDF-15 u prostati moglo bi imati uticaja na zaštitu spermatozoida od maternalnog imunog sistema s obzirom da GDF-15 ne utiče na vijabilnost spermatozoida, ali suprimira proliferaciju mononukleara, odnosno B i T limfocita, NK ćelija i monocita periferne krvi te bi na taj način mogao uticati na uspešnost trudnoće [121].

Van reproduktivnih organa ekspresija GDF-15 u drugim tkivima je mala ili je nema, ali u određenim stanjima može biti indukovana [111,122]. Ćelije koje ga eksprimiraju u stresnim i inflamatornim situacijama su makrofagi, adipociti, ćelije srčanog mišića, endotelne i glatkomišićne ćelije krvnih sudova [111, 115]. Publikovani radovi ukazuju na veću koncentraciju ovog biomarkera u inflamacijama, sepsi, infarktu miokarda, dijabetesu, različitim malignitetima. Sprovedena su istraživanja s ciljem da se nađe mehanizam kojim ovaj citokin deluje u različitim patofiziološkim stanjima, kao i receptori za koje se vezuje i signalni putevi koji aktivira. Pokazano je da deluje preko GFRAL receptora (eng. glial cell derived neurotrophic factor family receptor α -like) [124,125], ali s obzirom da se on nalazi samo u arei postremi mozga verovatno je da deluje i preko drugih receptorskih sistema koji do sad nisu identifikovani [111]. Regulacija ekspresije GDF-15 je kompleksna i verovatno zavisna od tkiva zahvaćenog procesom. Regulisana je različitim faktorima, a neki od njih su: IL-1 β , TNF- α , IL-2, MCSF-1 (eng. macrophage colony stimulating factor-1) [126].

Opisuju se uloge GDF-15 u regulaciji apetita, razvoju anoreksije i kaheksije, preživljavanju ćelija i tkiva u inflamatornom stresu, prilikom prekida snabdevanja krvlju, kao u infarktu ili

hirurškim procedurama i kao što je navedeno u imunološkoj toleranciji u trudnoći i malignitetima (slika 5) [111]

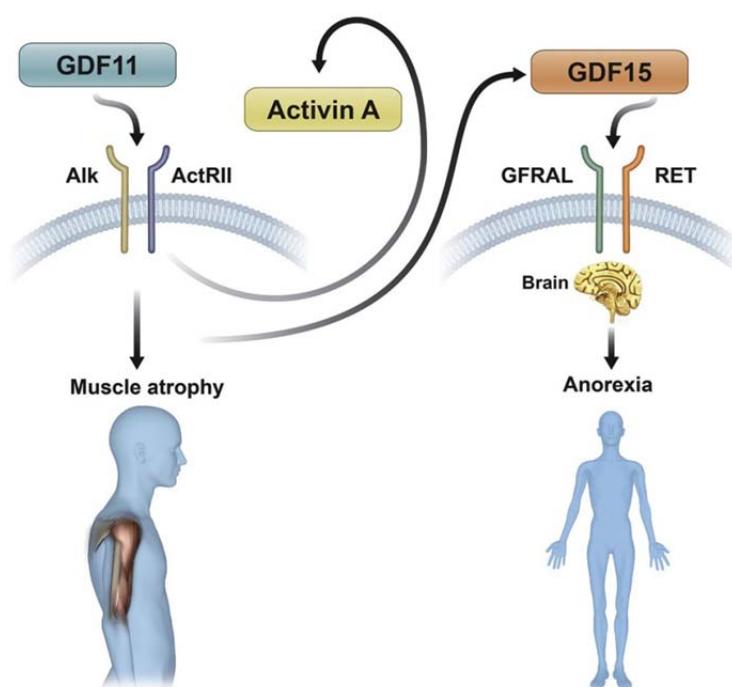


Slika 5. Wischhusen J, et al. GDF-15 u različitom fiziološkom i patofiziološkom kontekstu [111] (rad je objavljen je pod uslovima Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives License (CC BY NC ND))

1.4.1. GDF-15 U METABOLIČKIM POREMEĆAJIMA, UPALNIM I DRUGIM NEMALIGNIM STANJIMA

Anoreksija i kaheksija su metabolički sindromi karakterisani gubitkom apetita, progresivnim gubitkom telesne mase, redukcijom masnog tkiva i gubitkom skeletne mišićne mase [127]. Više od 80% obolelih od karcinoma u odmaklom kliničkom stadijumu ima anoreksiju i kaheksiju, a istovremeno na ovaj uzrok otpada 20-30% svih smrtnih ishoda povezanih s kancerom [127]. Ovo je ujedno i stanje u kom je način delovanja GDF-15 najpreciznije objašnjen. Na životinjskim modelima je pokazano da GDF-15 aktivira MAP3K11 (eng. mitogen-activated protein kinase kinase 11) i da to predstavlja okidač za gubitak

telesne mase u kaheksiji povezanoj s malignitetima [111,128]. U kasnijim istraživanjima su četiri nezavisna istraživačka tima identifikovala GFRAL kao receptor u mozgu preko kog se ovo dejstvo ostvaruje [111, 124, 125, 129, 130]. Jedna od ovih istraživačkih grupa navodi da suprafiziološke doze GDF-11 dovode do kaheksije i gubitka telesne mase makar delom povećavajući koncentraciju GDF-15. Kad se antitelima blokira GDF-15 vraća se apetit i povećava telesna masa, ali ne i mišićna masa te zaključuju da je za gubitak mišićne mase odgovoran GDF 11 delujući na Activin A (slika 6) [131].

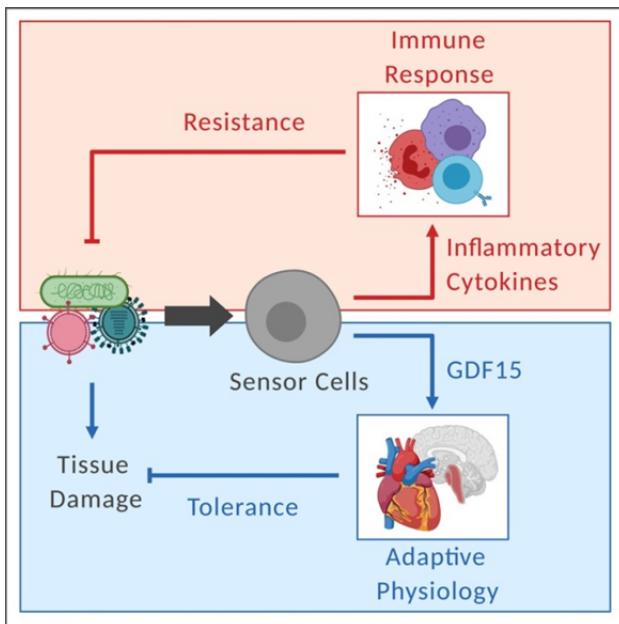


Slika 6. Jones JE, et al. Supraphysiologic administration of GDF11 induces cachexia in part by upregulating GDF15 (Graphical Abstract) [131] (rad je objavljen je pod uslovima Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives License (CC BY NC ND))

Metformin je jedan od lekova koji se najčešće koriste u terapiji dijabetesa tipa 2, ali i u insulinskoj rezistenciji i pored sniženja glukoze u krvi dovodi često do redukcije telesne mase. Ovaj lek indukuje stvaranje GDF-15 i dokazano je odgovoran za smanjenje gojaznosti kod miševa [132]. Ovim su GDF-15 i GFRAL postali potencijalne mete ciljne terapije za regulisanje telesne mase i energetskog bilansa [111].

U okviru uloge u metabolizmu može se posmatrati i uticaj GDF-15 na makrofage. Kod negojsaznih u masnom tkivu preovlađuju antiinflamatorni M2 makrofagi [133] koji svoje metaboličke potrebe zadovoljavaju oksidativnom fosforilacijom [134, 135]. Kod gojaznih je masno tkivo infiltrisano CD8+ T ćelijama i postoji polarizacija ka inflamatornim M1 makrofagima kod kojih se energija predominantno dobija glikolizom [135-137], a produkti ovog metaboličkog puta imaju ulogu u odbrani od štetnih agenasa [135, 138]. Ovo dovodi do produkcije veće količine TNF- α i time do glukozne intolerancije i insulinske rezistencije [111, 137, 139]. Kao odgovor na antiinflamatorne citokine IL-2, IL-4 dolazi do veće ekspresije GDF-15 u tkivnim makrofagima, aktivacije procesa oksidativne fosforilacije i time polarizacije ka M2 makrofagima [111, 134, 140]. Na ovaj način, a u skladu s imenom MIC-1 (eng. macrophage inhibitory citokin-1) GDF-15 inhibiranjem zapaljenskih makrofaga dovodi do poboljšanja metaboličkog stanja, smanjenja glukozne intolerancije i reverzije insulinske rezistencije [111]. Posle navedenog deluje paradoksalno da je kod ljudi povišen nivo GDF-15 prediktor razvoja dijabetesa tipa 2 i težine bolesti [141, 142], ali kako u revijalnom članku Wischhusen i saradnici navode to i dalje ne znači da nema ulogu u odlaganju manifestne bolesti kod rizične grupe [111].

S obzirom da je više eksprimiran u inflamatornim stanjima, a u skladu s prethodno navedenim saznanjima, moguće je da predstavlja jedan od modulatora inflamatornog odgovora koji ima za cilj ponovno uspostavljanje homeostatskih uslova [111]. Luan i saradnici ga u radu publikovanom 2019. opisuju kao „inflamacijom indukovani centralni medijator tkivne tolerancije“ (slika 7) [143].

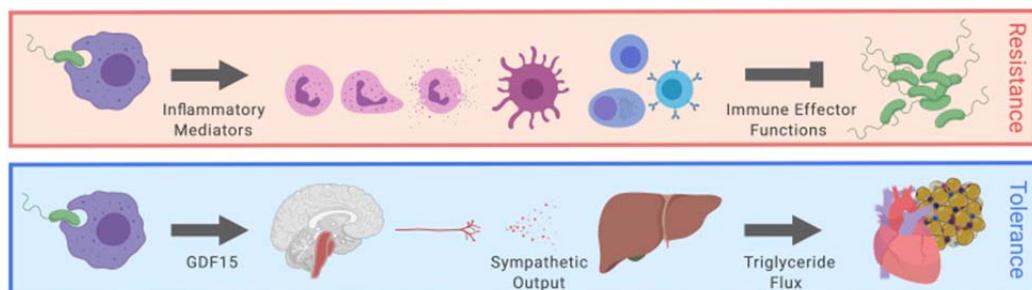


Slika 7. Luan HH, et al. GDF15 is an inflammation-induced central mediator of tissue tolerance. Graphical Abstract. [143] (s dozvolom izdavača)

Poznato je da su promene koje vidimo u inflamaciji rezultat uzajamnog dejstva patogena i napadnutog organizma. Krajnji ishod lečenja sistemskih infekcija zavisi od uspešnosti savladavanja mikrobiološkog uzročnika, ali i mogućnosti организма domaćina da iskontroliše imuni odgovor i ograniči i popravi štetu u tkivima nastalu u toku borbe s patogenom. Smatra se da je mortalitet u sepsi prouzrokovana maladaptivnim zapaljenjem u odgovoru na sistemsku infekciju [144]. Sličnu situaciju nalazimo i nakon infarkta i drugih nemikrobnih oštećenja tkiva koja dovode do lokalne zapaljenske reakcije te krajnja posledica predstavlja proizvod sadejstva inicijalnog oštećenja i reakcije tkiva na to oštećenje. Pre više od dvadeset godina je publikovan rad u kom se otkriva povećana ekspresija GDF-15 nakon akutne lezije jetre, bilo hemijske ili hirurske [145]. Kasnije, Chung i saradnici navode povećanu produkciju GDF-15 nakon oštećenja jetre alkoholom ili ugljen-tetrahloridom [146]. Preživeli miševi koji nisu eksprimirali GDF-15 imali su veći stepen fibroze i infiltraciju zapaljenskim CD4+ i CD 8+ limfocitima, monocitima i neutrofilnim granulocitima [111].

U prethodno navedenom radu Luana i saradnika [143] daje se objašnjenje protektivne uloge GDF-15 u inflamaciji, nezavisno da li je izazvana bakterijskim ili virusnim uzročnikom. Autori pokazuju da je neophodan za protektivnu produkciju triglicerida u jetri tako što preko GFRAL receptora deluje na β adrenergični signalni put [143]. Navode i da se time

potpomažu metabolički zahtevi srca i sprečava srčano oštećenje i insuficijencija i održava telesna temperatura [143]. Ovim se GDF-15 prikazuje kao medijator metaboličke adaptacije na sistemsku inflamaciju [111, 143] (slika 7).



Slika 7. Luan HH, et al. Model od GDF-15 regulating Hepatic Sympathetic Outflow Controlling Lipid Metabolism to Support Cardiac Function [143] (s dozvolom izdavača)

Nezavisno od mehanizma delovanja postoji konsenzus da GDF-15 deluje protektivno na srce, jetru i bubrege posle akutnog oštećenja i da reguliše povredom posredovani odgovor u plućima [111, 147-149].

Protektivnu ulogu GDF-15 na srčani mišić pokazuju u ranijim istraživanjima i drugi autori. Navode da ima ulogu u sprečavanju hipertrofije, ograničavanju polja oštećenja nakon infarkta i smanjenju inflamatornog infiltrata u polju ishemija/reperfuzija lezije [150-152].

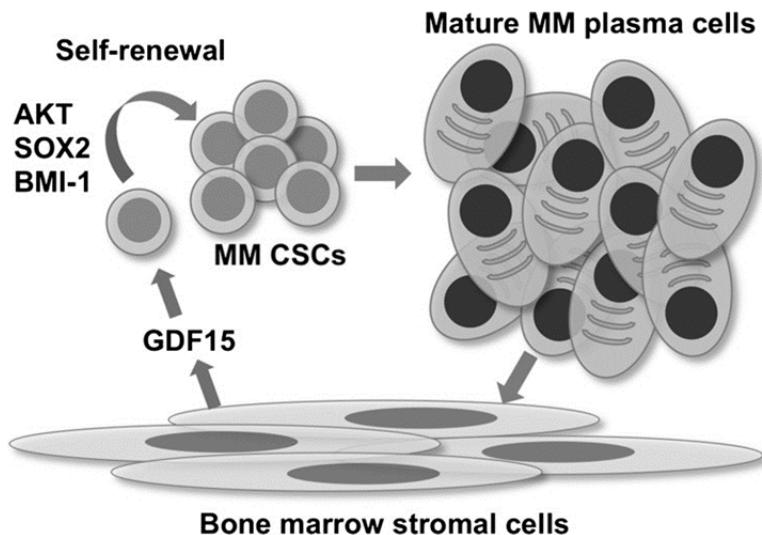
1.4.2. GDF-15 U MALIGNITETIMA

GDF-15 je ispitivan u mnogim tumorima. Welsh i saradnici nalaze da je najeksprimiraniji solubilni marker u velikom broju različitih maligniteta [153]. Predlaže se kao koristan biomarker u dijagnostici i predikciji ishoda digestivnih tumora: karcinoma jednjaka i želuca, gde je bio i prediktor kaheksije [154-157]. Međutim, neki autori su dobijali i drukčije rezultate. Skipworth i saradnici iako nalaze prosečno više vrednosti GDF-15 u obolelih od karcinoma jednjaka i želuca u odnosu na kontrolnu grupu zdravih volontera i da je postojala slaba korelacija GDF-15 sa dijetnim unosom, ne nalaze korelaciju s BMI, antropometrijskim merama i gubitkom telesne mase [158]. Ispitanici koji su imali izraženije povišen nivo GDF-15 imali su lošije preživljavanje u odnosu na one s nižim

koncentracijama ovog biomarkera, ali nije bio nezavisni prognozni indikator [158]. Ishige i saradnici nalaze da je ekspresija GDF -15 veća u difuznom karcinomu želuca i kad su in vitro tretirali fibroblaste ovim citokinom došlo je do njihove aktivacije i povećane proliferacije ćelija slično kao kad se izloži dejstvu TGF- β te su zaključili da GDF-15 delujući preko aktivacije fibroblasta utiče na progresiju difuznog karcinoma želuca [156]. Pored toga, različita istraživanja potvrđuju ulogu ovog markera u kolorektalnom [160-163] i hepatocelularnom karcinomu [164]. Hogendorf i saradnici navode njegovu superiornost u diferenciranju karcinoma pankreasa od hroničnog pankreatitisa u odnosu na druge često korišćene tumor markere [165]. U više radova se navodi superiornost kombinacije GDF-15 sa PSA u diferenciranju karcinoma prostate od benigne hiperplazije prostate i značaj ovakvog testiranja u smanjenju broja nepotrebnih biopsija [166-168]. Brown i autori u radu objavljenom pre više od deset godina navode da je kod ispitanika sa visokim vrednostima GDF-15 pre terapije stopa smrtnosti bila osam puta veća u odnosu na grupu s niskim nivoom ovog biomarkera [169]. Takođe je i prisustvo varijante u genu za GDF-15 povezano sa smanjenom ekspresijom GDF-15 bilo praćeno smanjenjem mortaliteta time ukazujući na mogućnost da modifikuje bolest [169]. Nivo GDF-15 korelira je s lošijom prognozom i kraćim preživljavanjem i u radovima koji su se bavili karcinomom ovarijuma [170-172], malignim melanomom [173-176], glioblastomom [177-179], karcinomom pluća [180-181].

Za razliku od solidnih tumora gde je velik broj radova koji pokazuju statistički značajnu razliku u ekspresiji GDF-15 između tumorskog i komparabilnog zdravog tkiva, te prognostički značaj ovog markera, u hematološkim malignitetima je manje ispitivan. Nalazimo radove s ispitivanjem njegove uloge u multiplom mijelomu, mijeloproliferativnim neoplazmama (MPN), mijelodisplastičnom sindromu (MDS) i akutnoj mijeloidnoj leukemiji (AML).

Multipli mijelom je hronična bolest koja je, bez obzira na terapijske pomake nastale nakon uvođenja imunomodulatorne, terapije inhibitorima proteozoma i imunološke terapije, i dalje neizlečiva bolest s ponavljanim relapsima. Ovo upućuje na pretpostavku da hemorezistentne mijelomske ćelije imaju sposobnost samoobnavljanja na koju verovatno slično kao i kod zdrave matične ćelije u kostnoj srži utiču ćelije mikrookoline [182]. Tanno i saradnici daju model ove interakcije mijelomskih plazmocita i ćelija mikrookoline (slika 8) [182].



Slika 8. Tanno et all. Interactions between MM plasma cells, TICs, and BMSCs. The interaction between BMSCs and mature MM plasma cells induces GDF15 secretion and enhances the self-renewal of MM CSCs by AKT, SOX2, and BMI-1. Subsequent production of mature tumor cells further promotes this process. [182]

U svom istraživanju ova grupa autora nalazi da stromalne ćelije kostne srži obolelih od multiplog mijeloma proizvode veću količinu GDF-15 u odnosu na one dobijene od zdravih donora. Tretiranje malignih plazmocita ovim faktorom dovodilo je do većeg rasta kolonija, pored toga prijavljuju da je tumorogeni potencijal bio izraženiji na in vivo modelu, nego u in vitro uslovima zaključujući da pored povećanja rasta ćelija možda utiču i na homing u kostnoj srži i na ekspanziju tumorskih ćelija in vivo [182].

Povećanu ekspresiju GDF-15 u mezenhimalnim ćelijama kostne srži obolelih od multiplog mijeloma prijavljuje nešto ranije i druga grupa autora koja navodi da ovaj citokin povećava preživljavanje i od strome zavisnih i primarnih ćelija multiplog mijeloma [183]. Pored toga, nalaze i da doprinosi rezistenciji ovih ćelija na melfalan, bortezomib i nešto manje na lenalidomid [183]. S obzirom na ovakve nalaze dobijene na kulturi ćelija isti autori su testirali koncentraciju GDF-15 u plazmi 131 ispitanih obolelog od multiplog mijeloma i korelirali ga, uz standardne prognozne pokazatelje u ovoj bolesti sa ukupnim preživljavanjem (OS) i vremenom do neželenog događaja (EFS). Nakon merenja plazmatske koncentracije GDF-15 podelili su grupu u dve podgrupe, one sa nižim i one s višim koncentracijama GDF-15. Na univarijantnoj analizi EFS je bio signifikantno povezan sa plazmatskom koncentracijom GDF-15, $\beta2$ mikroglobulinom i godinama, a na

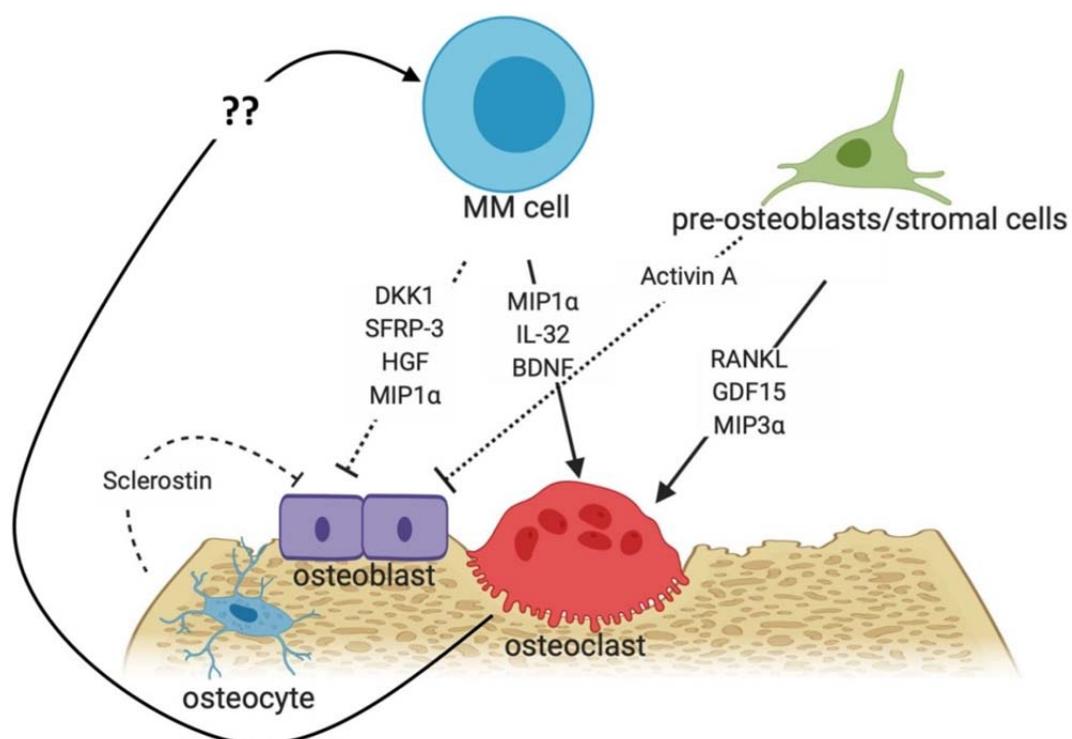
multivarijantnoj samo s koncentracijom GDF-15 i godinama. OS i EFS su bili signifikantno niži u grupi sa visokom koncentracijom GDF-15 [183]. Nekoliko autora od 2017. prijavljuju da komercijalno dostupni rekombinantni GDF-15 sadrže različitu količinu bioaktivnog TGF- β 1 [111, 123, 184,185]. S obzirom na ovaj problem opisivani efekti pripisivani GDF-15 mogu biti posledica delovanja TGF- β 1, pogotovo jer je za sad jedino dokazano vezivanje GDF-15 za GFRAL receptore u mozgu čime se ne mogu objasniti imunomodulatorni efekti [111]. Zbog navedenog Wischhusen i saradnici u revijalnom prikazu dosadašnjih saznanja o ovom citokinu i njegovoj ulozi u različitim stanjima se oslanjaju uglavnom na rezultate ispitivanja na genetskim in vivo modelima ili ex vivo analizama iz humanih uzoraka [111].

Zhao i Yang su testiranjem nivoa GDF-15 kod ispitanika sa multiplim mijelomom pre terapije i kod kontrolne grupe zdravih našli signifikantno višu koncentraciju u grupi obolelih, kao i signifikantno viši nivo kod ispitanika u trećem kliničkom stadijumu u odnosu na ispitanike u prvom i drugom stadijumu [186]. U ovom radu nije bilo signifikantne korelacije između GDF-15 i koncentracije M proteina, beta 2 mikroglobulina ili kreatinina, ali je nakon primljene treće kure terapije kod bolesnika sa redukcijom M proteina za više od 50% postojalo signifikantno smanjenje koncentracije GDF-15 dok je kod onih kod kojih nije bilo uočljivog smanjenja M komponente koncentracija GDF-15 povećana [186].

Grupa istraživača iz Češke je koristeći panel sa 92 tumorska markera analizirala one koji su bili povišeni u serumu obolelih od multiplog mijeloma, MGUS i kontrolne grupe zdravih. Adrenomedulin (ADM), GDF-15 i sMICA (eng. Major histocompatibility complex class I-related chain A) su značajno više eksprimirani u multiplom mijelomu u odnosu na MGUS i imaju sposobnost razdvajanja ova dva entiteta [187]. Statistički značajna razlika u ekspresiji GDF-15 je postojala između uzoraka obolelih od multiplog mijeloma pre započinjanja terapije i uzoraka osoba sa MGUS, takođe i između zdravih i obolelih od multiplog mijeloma 100 dana nakon autologne transplantacije matične ćelije hematopoeze [187].

Iako nedostaju saznanja o drugim receptorima za koje bi se GDF-15 vezivao izuzev, više puta pomenutog, GFRAL i nerazjašnjeni su signalni putevi kojima deluje ipak su brojni dokazi o njegovom uticaju na preživljavanje tumorske ćelije i postoji saglasnost da na više nivoa inhibira imuni odgovor [111]. Već je navedeno da u inflamaciji deluje kao fini modulator i sprečava mobilizaciju inflamatornih ćelija na mesto oštećenja i da deluje na

polarizaciju makrofaga ka M2 za koje je navedeno da promovišu tumorske ćelije. Postoje dokazi da deluje na dendritičke ćelije tako što inhibira njihovo sazrevanje i funkciju, onemogućava se uloga ovih ćelija u aktiviranju specifičnog imunog odgovora i citotoksičnih T limfocita i time pomaže tumorskim ćelijama da izbegnu imunološki nadzor [179, 188, 189]. Na ovaj način deluje na nastanak tumora. U spomenutom revijalnom članku Wischhusena [111] i saradnika daje se zanimljivo objašnjenje za naizgled paradoksalan nalaz da prekomerna ekspresija GDF-15 kod karcinoma prostate u transgenskom modelu dovodi do smanjenja veličine primarnog tumora, ali promoviše pojavu metastaza [190]. Naime, Wischhusen i saradnici navode da se smanjenje veličine primarnog tumora može objasniti antiinflamatornim dejstvom GDF-15, a da s druge strane na pojavu metastaza ne utiče veličina primarnog tumora, ali utiče supresija imunološkog nadzora [111]. Windrichova i saradnici otkrivaju pet novih biomarkera u praćenju koštanih metastaza, među njima i GDF-15 [191]. GDF-15 je i jedan od citokina za koji se misli da imaju ulogu u koštanim promenama kod multiplog mijeloma tako što inhibira osteoblaste, a stimuliše osteoklaste (slika 9) [192, 193].



Slika 9. Børset M, et al. Proteins proposed to be involved in myeloma bone disease. (kopiranje dozvoljeno pod uslovima Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives License (CC BY NC ND)) [192].

U istraživanju Westhrina i saradnika koncentracija GDF-15 je bila signifikantno veća kod obolelih sa više od tri koštane lezije, takođe je nivo GDF-15 negativno korelirao sa preživljavanjem [193].

Pretraživanjem baza nalazimo pojedinačne rade koji ispituju GDF-15 u AML i MPN. Grupa egipatskih autora navodi da je u njihovom istraživanju GDF-15 bio signifikantno viši kod obolelih od AML u odnosu na kontrolnu grupu, kao i da je koncentracija viša od prosečne u grupi obolelih korelirala s kraćim preživljavanjem zajedno s višim brojem trombocita i većim brojem blasta u kostnoj srži [194]. U multivarijantnoj analizi ukupnog preživljavanja GDF-15 je bio nezavisni faktor rizika [194]. Lu i saradnici navode da leukemijske ćelije produkuju GDF-15, njime dovode do remodelovanja adipocita kostne srži od velikih ka malim adipocitima, a zajedničkim kultivisanjem leukemijskih ćelija s malim adipocitima primećuju bržu proliferaciju leukemijskih ćelija [195]. Druga grupa autora nešto ranije publikuje rad u kom istražuju ulogu fibroblasta kostne srži u zaštiti leukemijskih ćelija od terapije i navode da ovu ulogu ostvaruju preko GDF-15 [196].

U MPN: pravoj policitemiji (PV) i esencijalnoj trombocitemiji (ET) GDF-15 je bio signifikantno viši nego u zdravoj populaciji, ali bez obzira na visok nivo nije bilo očekivane supresije hepcidina što autori objašnjavaju mogućim kompenzatornim mehanizmom kako bi se sprečio dalji rast eritropoezne aktivnosti [197]. Kod obolelih sa prisutnom mutacijom JAK 2 V617F nivo GDF-15 je bio signifikantno viši u odnosu na obolele bez ove mutacije [197]. Grupa japanskih autora publikuje rezultate istraživanja uloge ovog citokina u hematološkim malignitetima i nalazi da je veći u svim bolestima u odnosu na kontrolnu grupu zdravih, a najviše vrednosti su dobili kod obolelih od mijelofibroze [198]. Imunohistohemiskim bojenjem uzoraka kostne srži obolelih nalaze da GDF-15 najviše eksprimiraju megakariociti te njih smatraju izvorom povišenih vrednosti [198]. U daljem istraživanju koriste rekombinantni GDF-15 i ispitujući njegov efekat na mezenhimalne ćelije kostne srži u in vitro uslovima dolaze do zaključka da stimuliše osteoblastnu diferencijaciju mezenhimalnih ćelija i da na mišjem modelu stimulišu stvaranje osteogenih formacija [198]. Ako i uzmememo s rezervom poslednji deo istraživanja uticaja rekombinantnog GDF-15 na mezenhimalne ćelije u kostnoj srži s obzirom da u godinama koje slede drugi autori prikazuju problem s čistoćom rekombinantnog GDF-15, ostaju rezultati ispitivanja iz bioloških uzoraka seruma i kostne srži.

Iz navedenih radova nameće se zaključak da je uloga ćelija mikrookoline u inicijalnom nastanku, a potom i u rastu i proliferaciji maligne ćelije ključna, kao i da od ovih ćelija značajno zavisi odgovor na standardnu hemioterapiju, ali i efikasnost nove terapije poput check point inhibitora ili CAR T ćelija. Kako bi se što preciznije sagledali mogući uticaji iz mikrookoline na tumorsku ćeliju ispituju se različiti citokini, receptori i signalni putevi, ali se često dobijaju i oprečni rezultati. Isti markeri, kao u ovom slučaju GDF-15, se u nekim istraživanjima spominju kao prediktori loše prognoze, a u drugim se argumentovano objašnjava da im je primarna uloga u održavanju homeostatskih uslova. Iste komplikacije bolesti kod svih bolesnika obolelih od iste bolesti izgleda da nisu uvek posredovane istim mehanizmima [192].

Wiklund i saradnici su ispitivali prediktivni značaj koncentracije GDF-15 sa mortalitetom bilo kog uzroka u dve kohorte: prvu su činili muškarci, njih 876 starosti od 35 do 80 godina, a drugu 324 istopolna para blizanaca, od kojih su 69% bile žene [199]. Period praćenja je bio do 14 godina. GDF-15 je bio nezavisni prediktor mortaliteta u grupi ispitivanih muškaraca, ovi rezultati su potvrđeni i u grupi blizanaca, a ostali su i nakon prilagođavanja dužini telomere, nivou IL-6 i CRP-a [199]. Ispitan je prediktorni značaj za smrtnost bilo kog uzroka, kao i odvojeno za mortalitet uzrokovani malignitetom ili kardiovaskularnim događajem i u svim slučajevima se pokazao kao značajan prognozni parametar na čiju koncentraciju podjednako utiču genetski i faktori sredine [199]. Slične rezultate na drukčijim grupama ispitanika dobijali su i drugi istraživači [200,201]. Rothenbacher i saradnici su korelirali nivo GDF-15 u serumu 1470 odraslih osoba starosti ≥ 65 godina pored laboratorijskih i sa funkcionalnim parametrima kao što su brzina hoda, snaga stiska ruke i dužina hodanja [200]. Takođe, nalaze konzistentnu povezanost nivoa GDF-15 sa mortalitetom bilo kog uzroka i nakon prilagođavanja vrednostima drugih laboratorijskih parametara inflamacije, srčanog oštećenja i fizičke funkcije [200]. Ovi autori primećuju kako GDF-15 možda nije koristan marker organ specifičnog oštećenja nego kumulativnog pada nekoliko fizioloških sistema i može biti pokazatelj vulnerabilnosti povezane sa starenjem [200]. U populaciji 240 zdravih odraslih osoba od 22 do 93 godine ispitivana je koncentracija 1301 proteina u plazmi, GDF-15 je imao signifikantno najjaču povezanost s godinama [202].

Čitajući ove radove nameće se mišljenje da ovaj citokin može predstavljati surrogat marker biološkog potencijala obolelog. S obzirom da na ishod lečenja obolelih od LPN značajno

utiče i ovaj potencijal, a i izbor terapije zavisi od njega bilo bi korisno ispitati potencijalnu ulogu GDF-15 u LPN i njegovu korelaciju s drugim parametrima aktivnosti bolesti.

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA:

1. Ispitati cirkulišući nivo biomarkera metabolizma gvožđa (feremija, transferin, feritin, solubilni transferinski receptor), kompletну krvnu sliku, broj retikulocita i utvrditi njihovu vezu sa hepcidinom i GDF-15 kod obolelih od LPN kod kojih je indikovana primena antilimfomske terapije i kod obolelih od LPN na „watch and wait“ režimu.
2. Ispitati povezanost/korelaciju biomarkera metabolizma gvožđa, GDF-15 i hepcidina sa standardnim laboratorijskim pokazateljima aktivnosti bolesti (brzinom sedimentacije (SE), C reaktivnim proteinom, laktat dehidrogenazom, β 2mikroglobulinom) u grupi obolelih od LPN kod kojih je indikovano lečenje i obolelih u „watch and wait“ grupi.
3. Utvrditi postoji li statistički značajna razlika u serumskoj koncentraciji gvožđa, transferina, feritina, solubilnog transferinskog receptora, hepcidina i GDF-15 kod ispitanika na „watch and wait“ režimu i ispitanika kojima je indikovana antilimfomska terapija.
4. Ispitati korelaciju serumske koncentracije gvožđa, transferina, feritina, GDF-15 i hepcidina s postignutim terapijskim odgovorom: parcijalnom ili kompletnom remisijom.

2.2. HIPOTEZE:

1. Postoji statistički značajna pozitivna korelacija koncentracije GDF-15 sa brojem leukocita i monocita i statistički značajna negativna korelacija nivoa hepcidina sa brojem Erc, Rtc, koncentracijom Hg i Htc, a pozitivna sa nivoom feritina kod obe grupe ispitanika sa LPN.
2. Postoji statistički značajna pozitivna korelacija koncentracije feritina, GDF-15 i hepcidina sa standardnim parametrima aktivnosti bolesti (SE, CRP, LDH, β 2mikroglobulinom) kod obe grupe ispitanika.
3. Postoji statistički značajna razlika u koncentraciji feritina, GDF-15 i hepcidina između dve grupe ispitanika. Statistički su značajno više vrednosti feritina, GDF-15 i hepcidina u grupi ispitanika kod kojih je indikovana

antilimfomska terapija u odnosu na grupu ispitanika koji su na „watch and wait“ režimu.

4. Kod ispitanika kod kojih je postignuta kompletna ili parcijalna remisija dolazi do normalizacije ili približavanja referentnim vrednostima serumske koncentracije biomarkera metabolizma gvožđa, GDF-15 i hepcidina.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je prospективna studija u koju su uključeni ispitanici sa dijagnostikovanim zrelim B limfoproliferativnim neoplazmama, lečeni i kontrolisani na Klinici za hematologiju, u Hematološkoj dnevnoj bolnici ili Specijalističkoj hematološkoj ambulanti Kliničkog centra Vojvodine u periodu od 2017. do 2021. godine.

Pre započinjanja istraživanja dobijena je saglasnost Etičkog odbora Kliničkog centra Vojvodine i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, a svi ispitanici su nakon dobijene informacije o ispitivanju potpisom potvrdili saglasnost za uključenje u studiju.

Dijagnoza LPN je bila postavljena patohistološkim i imunohistohemijskim pregledom bioptata limfnog čvora ili kostne srži, ili protočnom citometrijom iz periferne krvi, a u skladu s aktuelnim vodičima.

3.1. UZORAK

Kriterijumi za uključivanje ispitanika u istraživanje su bili:

1. Dijagnostikovana zrela B LPN
2. Starost ≥ 18 godina
3. Osobe oba pola, uključujući žene u generativnom periodu

Istraživanje je obuhvatilo dve grupe ispitanika.

Prvu grupu je činilo 40 ispitanika sa novodijagnostikovanom zrelom B LPN (indolentni ili agresivni NHL, HLL ili Hočkinova bolest) ili u relapsu nakon što su prethodno bili minimalno 6 meseci u remisiji, a koji su u momentu uključivanja u istraživanje imali indikaciju za započinjanje antilimfomske/antileukemijske terapije.

Druga grupa ispitanika je obuhvatila 31 osobu obolelu od indolentne LPN koja u momentu uključenja u istraživanje, a i u momentu ponovljenog uzorkovanja materijala za ispitivanje parametara od značaja, na kontrolnom pregledu, nije imala indikaciju za započinjanje antilimfomske/antileukemijske terapije, odnosno bili su na „watch and wait“ režimu (grupa „w&w“).

Kriterijumi za isključivanje ispitanika iz istraživanja su bili:

1. Trudnoća i dojenje

2. Porođaj u prethodnih šest meseci
3. Primena preparata gvožđa ili transfuzije krvi u tri meseca koja su prethodila uključivanju
4. Dijagnostikovan drugi malignitet
5. Teška srčana bolest (dekompenzovana kardiomiotopatija, atrijalna fibrilacija ili preboleli infarkt unutar 6 meseci pre uključivanja ili nakon uključivanja, a pre poslednjeg uzorkovanja materijala)
6. Koncentracija glukoze u krvi $>6,1\text{ mmol/l}$
7. Serumska koncentracija kreatinina iznad gornje granice referentne vrednosti
8. Akutna inflamacija u vreme uključivanja ili prilikom uzorkovanja materijala za kontrolne analize
9. Hronične inflamatorne ili sistemske bolesti vezivnog tkiva
10. U prvoj grupi ispitanika kod kojih je bila indikovana terapija dodatni kriterijum za isključivanje je bila ejekcionala frakcija ($\text{EF} < 50\%$)

Nakon uključenja u istraživanje, uzetih anamnestičkih podataka i kliničkog pregleda svim ispitanicima su urađene standardne laboratorijske analize, radiološki i dodatni pregledi po algoritmu za LPN, a u skladu s vodičem SLG [4] kako bi se procenila veličina tumorske mase, klinički stadijum i potreba za specifičnom antilimfomskom terapijom.

Bolesnici su sukcesivno uključivani tokom perioda od marta 2017. do decembra 2020. godine, a praćeni su do marta 2021. godine.

U prvoj grupi ispitanika, grupa „lečeni“, materijal za laboratorijske analize od značaja za istraživanje je uzorkovan u tri navrata: pre započinjanja specifične terapije, nakon primljene 2 do 4 terapijske kure, odnosno na 1. reviziji i unutar tri nedelje do tri meseca od primljene poslednje terapijske kure. Vreme obavljanja prve revizije, odnosno da li se radi nakon druge, treće ili četvrte terapijske kure zavisilo je od vrste LPN, kliničkog stadijuma, inicijalno prisutnih faktora povezanih s lošom prognozom, a u skladu s aktuelnim vodičima. Od istih faktora zavisilo je i vreme revizije nakon završetka lečenja. Kod indolentnih LPN kod kojih klinički nalaz nije ukazivao na progresiju bolesti, a i postizanje parcijalnog odgovora predstavljalo je zadovoljavajuć nalaz revizija se mogla odložiti do 3 meseca. Kod agresivnih LPN kod kojih je cilj bio postizanje kompletne remisije revizija se

radila nakon tri do četiri nedelje, kako bi se ako nije postignut kompletan odgovor što ranije odlučilo o primeni druge terapijske linije i nastavilo lečenje.

U drugoj grupi ispitanika, koji su praćeni i nije bilo indikacija za započinjanje lečenja, grupa „w&w“ materijal je uzorkovan dva puta: prvi put pri uključivanju u istraživanje i drugi put na kontrolnom pregledu koji je uglavnom bivao u periodu od 3 do 4 meseca, kad i dalje nije bilo indikacija za započinjanje terapije.

Ako bi se na kontrolnom pregledu ispitanika iz druge grupe zbog progresije bolesti postavila indikacija za započinjanje terapije bili bi isključeni iz istraživanja i nakon kompletne revizije pre započinjanja lečenja, a u odsustvu drugih kriterijuma za isključenje, bili bi uključeni u istraživanje u grupu „lečeni“.

3.2. METODE LABORATORIJSKIH ISPITIVANJA

Ispitanicima u obe grupe analizirani su isti laboratorijski parametri:

1. Parametri krvne slike: broj leukocita (Lkc) i leukocitarna formula, broj eritrocita (Erc), koncentracija hemoglobina (Hg), hematokrit (Hct), retikulociti (Rtc) i eritrocitni indeksi (MCV, MCH, MCHC).
2. Parametri aktivnosti osnovne bolesti i standarni inflamatorni parametri: brzina sedimentacije (SE), serumska koncentracija laktat dehidrogenaze (LDH), C reaktivnog proteina (CRP), β 2mikroglobulina (β 2M), albumina i plazmatska koncentracija fibrinogena
3. Biomarkeri metabolizma gvožđa: serumska koncentracija gvožđa, transferina, feritina, solubilni transferinski receptor (sTfR)
4. Serumska koncentracija hepcidina
5. Serumska koncentracija GDF-15

Svim ispitanicima je uzorkovana venska krv u jutarnjim satima, našte, po standardnoj proceduri u Hematološkoj dnevnoj bolnici ili na Klinici za hematologiju. Sve analize su urađene u Centru za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine po prihvaćenoj proceduri, a u skladu s principima dobre laboratorijske prakse.

Parametri krvne slike, brzina SE, CRP, LDH, β 2M, Fe, transferin, feritin, sTfR određivani su po standardnoj proceduri.

Materijal za analize koje se ne rade redovno: hepcidin i GDF-15 je nakon uzorkovanja iz venske krvi u epruvetu za biohemijske analize, bez antikoagulansa, centrifugiran i serum je zamrznut i čuvan na temperaturi -70°C , u zamrzivaču Klinike za nefrologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra Vojvodine ili u Centru za laboratorijsku medicinu Kliničkog centra Vojvodine.

Parametri krvne slike, broj Lkc, Erc, eritrocitni indeksi, leukocitarna formula, broj Rtc je određivan na hematološkom brojaču ABH Pentra HL 80 (Horiba, Japan) metodom protočne citometrije uz upotrebu komercijalnih setova istog proizvođača.

Serumska koncentracija LDH određivana je enzimskom metodom na biohemijskom analizatoru ADVIA 1800 uz korišćenje komercijalnih setova proizvođača Simens, Nemačka. Serumska koncentracija CRP određivana je imunoturbidimetrijskom metodom na biohemijskom analizatoru ADVIA 1800, uz korišćenje komercijalnih setova proizvođača Simens, Nemačka. Serumska koncentracija β 2M je određivana imunometrijskom metodom na analizatoru Arhitekt ci4000 uz korišćenje komercijalnih setova firme Abbot, Nemačka.

Serumska koncentracija gvožđa je određivana spektrofotometrijski, a serumske koncentracije transferina i feritina imunoturbidimetrijskom metodom na biohemijskom analizatoru ADVIA 1800 uz upotrebu komercijalnih kitova proizvođača Simens, Nemačka. Solubilni transferinski receptor (sTfR) je nefelometrijski određivan imunohemijskom reakcijom na nefelometru BN ProSpec, uz korišćenje komercijalnih setova firme Siemens, Nemačka.

Serumske koncentracije hepcidina i GDF-15 su određivane nakon odmrzavanja iz prethodno zamrznutih serumu čuvanih na -70°C , ELISA metodom na analizatoru RYTO upotrebom komercijalnih setova R&D po uputstvu proizvođača.

3.3. PROCENA TERAPIJSKOG ODGOVORA

Procena terapijskog odgovora je vršena u prvoj grupi ispitanika nakon uvida u nalaze prve revizije posle primljene 2 do 4 terapijske kure, odnosno po pristizanju laboratorijskih rezultata drugog uzorkovanja u ovoj grupi i unutar jednog do tri meseca nakon završetka terapije, odnosno posle uvida u rezultate laboratorijskih analiza trećeg uzorkovanja materijala. Radiološki i dodatni pregledi i procena terapijskog odgovora je rađena u zavisnosti od tipa LPN, mesta gde je bolest inicijalno bila prisutna, a u skladu sa vodičem SLG i Lugano klasifikacijom [4]. Za procenu odgovora kod FDG-avidnih LPN: Hočkinove bolesti i DBKL rađen je PET/CT sken, a kod neavidnih kompjuterizovana tomografija. Kod obolelih sa Hočkinovom bolesti ili NHL i inicijalno prisutnom infiltracijom kostne srži rebiopsija kostne srži je rađena posle 1 do 3 meseca od primljene poslednje terapijske kure, odnosno nakon oporavka od jatrogene citopenije.

3.4. STATISTIČKE METODE

Analiza podataka je izvršena korišćenjem statističkog paketa IBM SPSS Statistics 22. Obrada podataka je obuhvatila metode deskriptivne i inferencijalne statistike. Numerička obeležja su prikazana putem srednjih vrednosti (aritmetička sredina, medijana) i mera varijabiliteta (standardna devijacija, interkvartilni rang), a atributivna obeležja korišćenjem frekvencija i procenata.

Testiranje razlika u distribuciji frekvencija za atributivna obeležja je vršeno primenom hi kvadrat testa. Testiranje razlika vrednosti dve grupe podataka vršeno je primenom Studentovog t-testa za parametarske podatke, odnosno neparametarskog Man-Vitnijevog testa. Testiranje razlika vrednosti tri ili više grupa podataka je vršeno primenom jednosmerne analize varijanse (ANOVA) za parametarske podatke, odnosno Kruskal-Valis testa za neparametarske podatke. Poređenje vrednosti za dva zavisna uzorka je vršeno primenom Studentovog t-testa za vezane uzorke za parametarske podatke, odnosno Vilkoksonovog testa za neparametarske podatke. Spirmanov koeficijent korelaciјe je primenjen za testiranje povezanosti GDF-15 i hepcidina i sa ostalim parametrima. Svi testovi su dvostrani sa nivoom značajnosti $p < 0.05$.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. OPIS UZORKA

Istraživanje je sprovedeno na ukupno 71 ispitaniku, 40 u grupi lečenih i 31 u „watch and wait“ grupi. Više je bilo žena u obe grupe, a najveći broj ispitanika pripada starosnoj kategoriji 45-64 godine (60% grupa lečenih, 64,5% „watch and wait“ grupa). Svaki četvrti lečeni ispitanik (25%), odnosno skoro svaki treći iz „watch and wait“ grupe (32,3%) je starosti 65 ili više godina. Nije utvrđena značajna razlika u polnoj ($p=0,640$) i starosnoj strukturi ($p=0,242$) između dve grupe ispitanika (tabela 6).

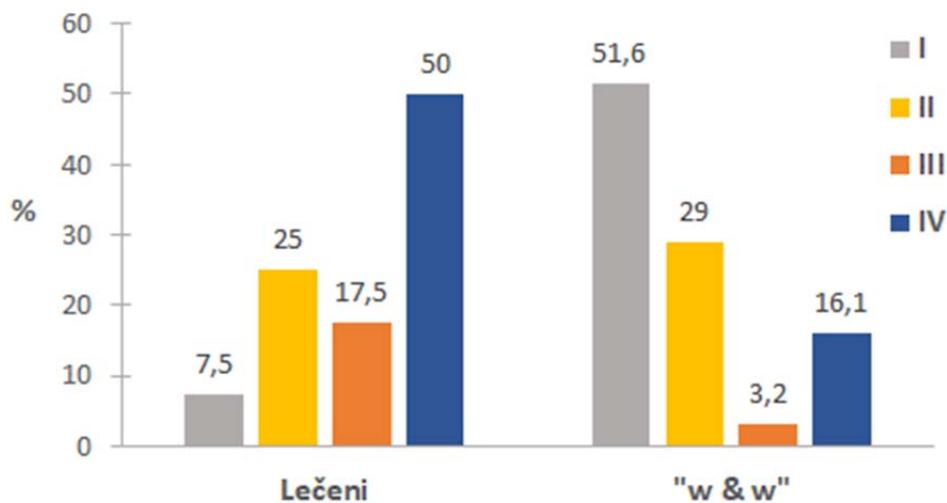
Tabela 6. Polna i starosna struktrura u grupi lečenih i „watch and wait“ grupi

Karakteristike	Grupa lečenih		„Watch and wait“ grupa		χ^2	p
	N	%	N	%		
Pol						
Muški	19	47,5	13	41,9	$\chi^2 = 0,218,$	
Ženski	21	52,5	18	58,1	$p = 0,640$	
Starosne kategorije (god.)						
19-44	6	15,0	1	3,2	$\chi^2 = 2,840,$	
45-64	24	60,0	20	64,5	$p = 0,242$	
65+	10	25,0	10	32,3		
Prosečna starost (Mean±SD)	$55,80 \pm 11,14$		$59,90 \pm 8,53$		$t = 1,700,$	
					$p = 0,094$	

Više od polovine lečenih ispitanika (52,5%), odnosno „watch and wait“ grupe (58,1%) čine žene. Prosečna starost je nešto niža u grupi lečenih ($55,80 \pm 11,14$) u odnosu na na „watch and wait“ grupu ($59,90 \pm 8,53$), pri čemu dobijena razlika nije statistički značajna ($p=0,094$).

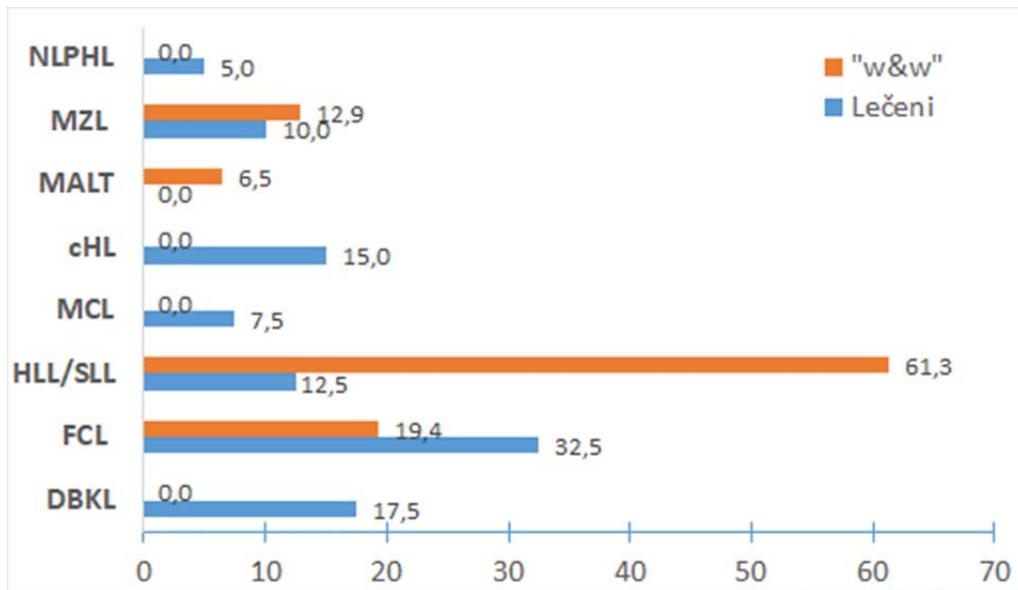
Utvrđena je značajna razlika u stadijumu između dve grupe ispitanika ($\chi^2 = 21,654$, $p<0,001$). Svaki drugi lečeni ima IV stadijum bolesti, 17,5% ispitanika ima III stadijum bolesti, svaki četvrti (25%) ima II stadijum, a svaki trinaesti (7,5%) je u I stadijumu bolesti. Za razliku od grupe lečenih, svaki drugi ispitanik „w&w“ grupe ima I stadijum bolesti,

manje od trećine (29%) ima II stadium, 3,2% ispitanika stadium III, a svaki šesti stadium IV. Podaci su prikazani na grafikonu 1.



Grafikon 1. Klinički stadijum bolesti ispitanika u obe grupe

U grupi lečenih većina ispitanika je imala indolentnu LPN 27/40: folikularni limfom (FCL), hroničnu limfocitnu leukemiju/sitnoćelijski limfom (HLL/SLL), limfom marginalne zone (MZL), mantl ćelijski limfom (MCL), 2 ispitanika su imala nodularni limfocitima predominirajući Hočkinov limfom (NLPHL), dok je 13 ispitanika imalo agresivnu LPN: difuzni B krupnoćelijski limfom (DBKL) ili klasični Hočkinov limfom (cHL). U „watch and wait“ grupi ispitanika koji nisu imali indikaciju za započinjanje terapije većinu (61,3%) su činili ispitanici s HLL/SLL. (grafikon 2)



Grafikon 2. Tip LPN u grupi lečenih i „watch & wait” grupi (%)

Legenda: NLPHL-nodularni limfocitima predominirajući Hočkinov limfom, MZL-marginalne zone limfom, MALT-ekstranodalni marginalne zone limfom MALT tip, cHL-klasičan Hočkinov limfom, MCL-mantl ćelijski limfom, HLL/SLL-bronična limfocitna leukemija/sitnoćelijski limfom, FCL-folikularni limfom, DBKL-difuzni B krušnoćelijski limfom

Utvrđena je značajna razlika u prisutvu B simptoma između dve grupe ispitanika ($p<0,001$). Prisutni su kod više od trećine lečenih (37,5%), odnosno kod nijednog ispitanika u „watch and wait” grupi. Infiltracija kostne srži je značajno prisutnija u „watch and wait” u odnosu na grupu lečenih (71% vs 45%; $p=0,029$). Slezina je uvećana kod skoro svakog drugog lečenog (48,7%) odnosno kod skoro svakog desetog pacijenta u „watch and wait” grupi (9,7%) i ova razlika je statistički značajna ($p<0,001$). Nije utvrđena značajna razlika u prisustvu hepatomegalije između dve analizirane grupe ($p=0,165$). Podaci su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Prisustvo B simptoma i infiltracije sekundarnih limfatičnih organa u obe grupe

Karakteristike	Grupa lečenih		“Watch and wait” grupa		p
	N	%	N	%	
B Simptomi					
Prisutni	15	37,5	0	0	$\chi^2 = 15,218,$ $p < 0,001$
Odsutni	25	62,5	31	100	
Infiltracija kostne srži					
Da	18	45	22	71	$\chi^2 = 4,788,$ $p = 0,029$
Ne	22	55	9	29	
Hepatomegalija					
Da	5	12,8	8	25,8	$\chi^2 = 1,926,$ $p = 0,165$
Ne	34	87,2	23	74,2	
Splenomegalija					
Da	19	48,7	3	9,7	$\chi^2 = 12,215,$ $p < 0,001$
Ne	20	51,3	28	90,3	

4.2. DESKRIPTICIJA

Parametri kompletne krvne slike tokom posmatranog perioda u grupi lečenih, zajedno sa testiranjem značajnosti razlike vrednosti po završetku terapije u odnosu na početak posmatranja, prikazane su u tabeli 8.

Tabela 8. Parametri kompletne krvne slike u grupi lečenih tokom posmatranog perioda. Deskriptivni parametri

Parametri	Pre terapije	Sredina terapije	Posle terapije	p
KKS				
Eritrociti ($\times 10^{12}/\text{L}$)	$4,54 \pm 0,62$	$4,20 \pm 0,53$	$4,37 \pm 0,51$	t=1,859, p=0,071
Leukociti ($\times 10^9/\text{L}$)	7,46 (5,61-12,45)	4,15 (2,68-5,84)	4,87 (3,37-6,14)	Z=4,557 p<0,001
ABN ($\times 10^9/\text{L}$)	4,24 (3,18-5,67)	1,74 (0,81-3,34)	2,71 (1,76-3,91)	Z=4,124 p<0,001
ABL _y ($\times 10^9/\text{L}$)	1,81 (1,12-2,82)	1,25 (0,82-1,71)	1,16 (0,83-1,45)	Z=4,530 p<0,001
ABMo ($\times 10^9/\text{L}$)	0,57 (0,43-0,87)	0,55 (0,44-0,62)	0,51 (0,39-0,59)	Z=1,761 p=0,078
Hemoglobin (g/L)	129,00±20,01	122,30±13,91	127,28±12,67	t=0,589, p=0,560
Hematokrit	0,39±0,05	0,37±0,04	0,39±0,04	t=0,615, p=0,542
Rtc ($\times 10^{12}/\text{L}$)	0,07±0,03	0,09±0,03	0,08±0,02	t=1,467, p=0,150
MCV (fL)	86,95±6,95	87,93±4,51	88,98±4,76	t=2,083, p=0,044
MCH (pg/cell)	28,53±2,16	29,16±1,86	29,26±2,16	t=2,196, p=0,034
MCHC (g/L)	328,53±17,33	331,38±11,33	328,75±12,83	t=0,073, p=0,942

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

Legenda: ABN-apsolutni broj neutrofilnih granulocita, ABLy-apsolutni broj limfocita, ABMo-apsolutni broj monocita

Utvrđen je značajno niži broj leukocita ($p<0,001$), neutrofilnih granulocita ($p<0,001$) i limfocita ($p<0,001$) posle terapije u odnosu na period pre lečenja. Značajno su više vrednosti MCV ($p=0,044$) i MCH ($p=0,034$) posle u odnosu na vreme pre terapije.

Tabela 9. Parametri kompletne krvne slike u “watch and wait” grupi tokom posmatranog perioda. Deskriptivni parametri

Parametri KKS	Inicijalno (Mean±SD; Med)	Na kontroli (Mean±SD; Med)	P
Eritrociti ($\times 10^{12}/\text{L}$)	$4,59 \pm 0,55$	$4,58 \pm 0,56$	$t=0,114, p=0,910$
Leukociti ($\times 10^9/\text{L}$)	$13,22 (6,20-29,20)$	$13,40 (6,90-25,06)$	$Z=0,333, p=0,739$
ABN ($\times 10^9/\text{L}$)	$3,52 (2,57-4,43)$	$3,68 (2,93-4,53)$	$Z=1,832, p=0,067$
ABLy ($\times 10^9/\text{L}$)	$9,94 (1,89-23,29)$	$8,69 (1,85-20,41)$	$Z=0,715, p=0,474$
ABMo ($\times 10^9/\text{L}$)	$0,51 (0,40-0,84)$	$0,56 (0,40-0,84)$	$Z=0,872, p=0,383$
Hemoglobin (g/L)	$141,10 \pm 13,20$	$140,90 \pm 12,11$	$t=0,143, p=0,887$
Hematokrit	$0,42 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,04$	$t=0,943, p=0,353$
Rtc ($\times 10^{12}/\text{L}$)	$0,06 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$	$t=0,215, p=0,831$
MCV (fL)	$92,85 \pm 5,70$	$92,14 \pm 5,07$	$t=1,181, p=0,247$
MCH (pg/cell)	$30,98 \pm 2,32$	$30,91 \pm 2,01$	$t=0,265, p=0,793$
MCHC (g/L)	$333,58 \pm 10,48$	$335,65 \pm 11,15$	$t=1,102, p=0,279$

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

Legenda: ABN-apsolutni broj neutrofilnih granulocita, ABLy-apsolutni broj limfocita, ABMo-apsolutni broj monocita

Nije utvrđena značajna razlika u vrednostima parametara kompletne krvne slike u “watch and wait” grupi na kraju posmatranja u odnosu na početne vrednosti (tabela 9).

Tabela 10. Biomarkeri metabolizma gvožđa u grupi lečenih tokom posmatranog perioda. Deskriptivni parametri

Biomarkeri metabolizma gvožđa	Pre terapije (Mean±SD; Med)	Na sredini terapije (Mean±SD; Med)	Posle terapije (Mean±SD; Med)	P
Fe ($\mu\text{mol/L}$)	11,95 (7,50-16,23)	11,25 (9,20-14,68)	12,10 (9,63-14,65)	Z=0,134, p=0,893
Transferin (g/L)	2,33±0,35	2,40±0,40	3,02±3,42	t=1,282, p=0,208
Feritin ($\mu\text{g/L}$)	99,65 (46,80-199,20)	162,30 (81,25-272,20)	123,80 (48,75-297,25)	Z=1,868, p=0,062
sTfR (mg/L)	1,52 (1,20-1,80)	1,85 (1,32-2,06)	1,68 (1,40-2,03)	Z=1,929, p=0,054
sTfR/log(feritin)	0,79 (0,56-1,05)	0,77 (0,65-0,98)	0,81 (0,65-1,10)	Z=1,479, p=0,139

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

Nije utvrđena značajna razlika u promeni vrednosti analiziranih biomarkera metabolizma gvožđa posle terapije u odnosu na početne vrednosti (tabela 10).

Tabela 11. Biomarkeri metabolizma gvožđa u “watch and wait” grupi tokom posmatranog perioda. Deskriptivni parametri

Biomarkeri metabolizma gvožđa	Inicijalno (Mean±SD; Med)	Na kontroli (Mean±SD; Med)	P
Fe ($\mu\text{mol/L}$)	17,50 (15,20-23,30)	14,20 (12,30-20,50)	Z=1,490, p=0,136
Transferin (g/L)	2,70±0,39	2,60±0,35	t=1,570, p=0,127
Feritin ($\mu\text{g/L}$)	91,50 (42,00-142,00)	82,50 (44,00-109,40)	Z=1,532, p=0,125
sTfR (mg/L)	1,55 (1,12-1,86)	1,37 (1,10-1,63)	Z=2,034, p=0,042
sTfR/log(feritin)	0,74 (0,59-1,00)	0,79 (0,53-0,94)	Z=0,666, p=0,505

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

Vrednosti sTfR u "watch and wait" grupi su značajno niže na kraju posmatranja u odnosu na početne vrednosti ($p=0,042$), dok za ostale parametre metabolizma gvožđa nije utvrđena značajna razlika vrednosti tokom posmatranog perioda. Podaci su prikazani u tabeli 11.

Tabela 12. Laboratorijski markeri aktivnosti bolesti u grupi lečenih. Deskriptivni parametri

Markeri aktivnosti bolesti	Na početku th	Na sredini th	Na kraju th	P
CRP (mg/L)	1,70 (0,60-9,70)	3,00 (0,73-7,20)	1,90 (0,83-3,33)	Z=1,110 p=0,267
LDH (U/L)	193,00 (162,5-263,75)	197,50 (161,25-225,75)	206,50 (187,75-253,50)	Z=0,195 p=0,845
β 2M (mg/L)	3,09 (2,29-4,15)	2,56 (2,08-3,16)	2,45 (2,05-2,80)	Z=3,912 p<0,001
Albumin (g/L)	44,51±5,06	42,88 ± 4,01	44,59±3,58	t=0,093 p=0,097
Fibrinogen (g/L)	3,07 (2,53-4,01)	4,21 (3,42-4,85)	3,69 (3,11-4,35)	Z=1,445 p=0,148
SE (mm u 1.satu)	13,50 (6,25-31,50)	24 (14-36)	16,00 (11,25-34,50)	Z=0,300 p=0,764
GDF-15 (pg/mL)	610 (380-839)	748 (482-910)	680 (496-995)	Z=2,205 p=0,027
Hepcidin (pg/mL)	6760 (5050-10800)	6600 (4090-7875)	6530 (2365-7040)	Z=2,547 p=0,011

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

Analiziranjem laboratorijskih markera aktivnosti bolesti (CRP, LDH, beta 2 mikroglobulina, brzine sedimentacije, albumina, fibrinogena), hepcidina i GDF-15 tokom posmatranog perioda u grupi lečenih ispitanika (tabela 12), utvrđene su značajno niže vrednosti β 2M posle u odnosu na vreme pre terapije ($p<0,001$), kao i značajno niže

vrednosti hepcidina ($p=0,011$) posle terapije. Vrednosti GDF-15 su značajno više nakon lečenja u odnosu na početne vrednosti ($p=0,027$).

Tabela 13. Laboratorijski markeri aktivnosti bolesti u “watch and wait” grupi.

Deskriptivni parametri

Markeri aktivnosti bolesti	Inicijalno (Mean±SD; Med)	Na kontroli (Mean±SD; Med)	P
CRP (mg/L)	0,80 (0,50-1,40)	0,80 (0,50-1,60)	Z=0,890, p=0,374
LDH (U/L)	174 (170-209)	188 (161-212)	Z=0,021, p=0,964
β 2M (mg/L)	2,07 (1,80-2,50)	2,07 (1,89-2,20)	Z=0,216, p=0,829
Albumin (g/L)	47,75±3,46; 47,85	46,56±2,99; 46,83	t=1,870, p=0,71
Fibrinogen (g/L)	3,08 (2,59-3,42)	3,20 (2,79-3,75)	Z=1,419, p=0,156
SE (mm u 1.h)	8 (5-11)	8 (4-14)	Z=0,046, p=0,963
GDF-15 (pg/ml)	560 (280-620)	580 (440-800)	Z=1,959, p=0,050
Hepcidin (pg/ml)	6520 (4200-7200)	6520 (2600-6580)	Z=1,059, p=0,290

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

Nije uočena značajna razlika u vrednostima markera aktivnosti bolesti na kraju posmatranja u odnosu na početne vrednosti u “watch and wait” grupi (tabela 13).

Grupa lečenih je podeljena na dve podgrupe: podgrupu s agresivnim LPN i sa indolentnim LPN, isti parametri su poređeni pre i nakon terapije u obe. Ispitanici sa NLPHL su svrstani u podgrupu indolentnih LPN, kao i ispitanici s MCL, dok su ispitanici s cHL i DBKL svrstani u grupu s agresivnim LPN. Tako da je u grupi indolentnih LPN bilo ukupno 27 ispitanika: FCL-13; MCL-3; MZL-4; HLL/SLL-5; NLPHL-2: U grupi s agresivnim LPN bilo je 13 ispitanika: cHL-6 i DBKL-7

Tabela 14. Parametri kompletne krvne slike kod lečenih ispitanika s agresivnim LPN i indolentnim LPN pre i posle terapije

Parametri krvne slike	Agresivne LPN			Indolentne LPN		
	Pre terapije	Posle terapije	P	Pre terapije	Posle terapije	p
Eritrociti ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4,48±0,35	4,56±0,51	t=0,561, p=0,585	4,57±0,72	4,28±0,50	t=2,539, p=0,017
Leukociti ($\times 10^9/\text{L}$)	7,70 (5,49-12,03)	5,04 (3,37-6,83)	Z=2,830 p=0,005	6,83 (5,63- 12,76)	4,74 (3,36-6,11)	Z=3,676 p<0,001
ABN ($\times 10^9/\text{L}$)	5,10 (3,28-9,92)	3,02 (1,89-4,41)	Z=2,667 p=0,008	3,90 (3,17- 5,01)	2,57 (1,56-3,77)	Z=3,243 p=0,001
ABL _y ($\times 10^9/\text{L}$)	1,48 (0,86-2,14)	1,07 (0,74-1,41)	Z=2,097 p=0,036	2,08 (1,28- 4,71)	1,24 (0,87-1,54)	Z=4,061 p<0,001
ABMo ($\times 10^9/\text{L}$)	0,47 (0,37-0,77)	0,39 (0,27-0,52)	Z=1,462 p=0,101	0,57 (0,43- 0,88)	0,55 (0,41-0,69)	Z=0,973 p=0,330
Hemoglobin (g/L)	120,00±13,78	126,92±9,84	t=1,538, p=0,150	133,33±21,28	127,44±14,00	t=1,663, p=0,108
Hematokrit	0,37±0,04	0,39±0,03	t=2,146, p=0,053	0,40±0,06	0,38±0,04	t=2,117, p=0,044
Rtc ($\times 10^{12}/\text{L}$)	0,07±0,02	0,07±0,03	t=0,161, p=0,874	0,07±0,03	0,08±0,02	t=1,694, p=0,102
MCV (fL)	83,05±5,41	87,05±5,73	t=2,390, p=0,034	88,82±6,45	89,91±4,01	t=0,922, p=0,365
MCH (pg/cell)	26,91±2,42	27,98±2,31	t=1,673, p=0,120	29,31±1,53	29,88±1,82	t=1,453, p=0,158
MCHC (g/L)	323,92±14,55	321,69±9,79	t=0,531, p=0,605	330,74±18,37	322,15±12,88	t=0,339, p=0,737

Legenda: ABN-apsolutni broj neutrofilnih granulocita, ABL_y-apsolutni broj limfocita, ABMo-apsolutni broj monocita

Broj leukocita je značajno niži nakon terapije u obe podgrupe pacijenata (agresivni limfomi p=0,005, indolentni limfomi p<0,001). Broj neutrofilnih granulocita je takođe značajno niži nakon terapije u svakoj od grupa (agresivni p=0,008, indolentni p=0,001), kao i broj limfocita (agresivni p=0,036, indolentni p<0,001). Broj eritrocita je značajno niži nakon lečenja u grupi sa indolentnim limfomima (p=0,017), a isto važi i za vrednosti hematokrita (p=0,044). MCV je značajno viši posle terapije kod lečenih sa agresivnim limfomima (p=0,034). Za ostale parametre krvne slike (broj monocita, hemoglobin, broj retikulocita, MCH, MCHC) nije utvrđena razlika u vrednostima pre i nakon lečenja ni u jednoj podgrupi (tabela 14).

Tabela 15. Biomarkeri metabolizma gvožđa pre i posle terapije kod ispitanika s agresivnim i indolentnim LPN

Biomarkeri metabolizma gvožđa	Agresivne LPN			Indolentne LPN		
	Pre terapije	Posle terapije	P	Pre terapije	Posle terapije	p
Fe ($\mu\text{mol/L}$)	6,70 (3,30-11,00)	9,70 (8,40-12,50)	Z=2,237 p=0,025	14,10 (10-18,80)	12,50 (10,60-14,80)	Z=1,177, p=0,239
Transferin (g/L)	2,23 \pm 0,38	4,15 \pm 5,98	Z=2,692, p=0,007	2,38 \pm 0,33	2,47 \pm 0,33	Z=1,827 p=0,068
Feritin ($\mu\text{g/L}$)	149,20 (39-256,30)	107 (34,50-363,50)	Z=0,105, p=0,917	97,30 (45,40-186)	125 (67,10-280)	Z=2,595 p=0,009
sTfR (mg/L)	1,48 (1,16-1,67)	1,59 (1,35-1,79)	Z=0,525, p=0,600	1,60 (1,21-1,80)	1,73 (1,41-2,15)	Z=1,922 p=0,055
sTfR/ log (feritin)	0,78 (0,51-0,93)	0,76 (0,66-1,13)	Z=1,083, p=0,279	0,79 (0,58-1,06)	0,86 (0,61-1,10)	Z=1,081 p=0,280

Podaci prikazani kao Mean \pm SD; Med (IQR)

Koncentracija gvožđa je značajno viša nakon terapije u grupi agresivnih limfoma (p=0,025), a isto važi i za vrednosti transferina (p=0,007), dok nije utvrđena značajna razlika u vrednostima ovih parametara na kraju terapije u odnosu na početne vrednosti u grupi

indolentnih limfoma. Koncentracija feritina je značajno viša nakon lečenja u odnosu na početne vrednosti kod ispitanika s indolentnim ($p=0,009$), dok nije utvrđena značajna razlika u grupi s agresivnim LPN. Nije bilo značajne razlike posle terapije u odnosu na inicijalne vrednosti sTfR, kao ni indeksa feritina u ovim podgrupama lečenih ispitanika. Podaci su prikazani u tabeli 15.

Tabela 16. Standardni labaratorijski markeri aktivnosti bolesti u grupi agresivnih i indolentnih LPN pre i posle terapije

Markeri aktivnost i bolesti	Agresivne LPN			Indolentne LPN		
	Pre terapije	Posle terapije	P	Pre terapije	Posle terapije	P
CRP (mg/L)	10,80 (1,65-110,55)	2,20 (1,45-12,35)	Z=1,642 p=0,101	1,00 (0,30-3,90)	1,40 (0,50-2,00)	Z=0,254 p=0,799
LDH (U/L)	226 (152-308)	204 (176-263)	Z=0,699 p=0,485	185 (163-244)	219 (188-255)	Z=0,865 p=0,387
β 2M (mg/L)	2,27 (1,82-3,76)	2,13 (1,84-2,47)	Z=1,433 p=0,152	3,38 (2,46-4,28)	2,57 (2,22-2,91)	Z=3,700 p<0,001
Albumin (g/L)	40,42±5,16	44,61±3,39	t=2,906 p=0,013	46,48±3,70	44,57±3,73	t=2,785 p=0,010
Fibrinogen (g/L)	4,49 (3,50-6,30)	3,70 (3,52-4,23)	Z=1,852 p=0,064	2,90 (2,30-3,69)	3,67 (3,08-4,39)	Z=3,328 ,
SE (mm u1.h)	28 (19,50-92)	16 (14-27)	Z=2,132 p=0,033	10 (5-20)	14 (9-41)	Z=1,423 p=0,155
GDF-15 (pg/ml)	480 (324-1030)	600 (370-990)	Z=0,594 p=0,552	620 (420-800)	724 (520-1000)	Z=2,193 p=0,028
Hepcidin (pg/ml)	6800 (1900-11600)	6400 (1635-7220)	Z=0,035 p=0,972	6720 (5200-9600)	6600 (3600-7040)	Z=3,061 p=0,002

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

U grupi agresivnih LPN brzina sedimentacije je značajno niža nakon terapije u odnosu na početne vrednosti ($p=0,033$), a vrednosti albumina su značajno više nakon lečenja ($p=0,013$).

U grupi indolentnih LPN značajno su niže serumske koncentracije $\beta2M$ ($p<0,001$), albumina ($p=0,010$) i hepcidina ($p=0,002$), dok su značajno više plazmatska koncentracija fibrinogena ($p=0,001$) i serumska koncentracija GDF-15 ($p=0,028$) posle terapije. Podaci su prikazani u tabeli 16.

4.3. KORELACIJA GDF-15 I HEPCIDINA S PARAMETRIMA KRVNE SLIKE I BIOMARKERIMA METABOLIZMA GVOŽĐA U OBE GRUPE

Tabela 17. Korelacija GDF-15 i parametara krvne slike u grupi lečenih (ρ -koeficijent korelacije)

Parametri KKS	GDF-15		
	Pre terapije	Na sredini th	Posle terapije
Eritrociti	ρ	-0,155	-0,199
	p	0,341	0,218
Leukociti	ρ	0,172	-0,126
	p	0,288	0,440
ABN	ρ	0,115	-0,058
	p	0,482	0,722
ABL _y	ρ	0,115	-0,187
	p	0,481	0,248
ABMo	ρ	0,207	-0,105
	p	0,200	0,519
Hg	ρ	-0,155	-0,124
	p	0,340	0,447
Hct	ρ	-0,168	-0,217
	p	0,300	0,179
Rtc	ρ	-0,172	-0,094
	p	0,288	0,563
MCV	ρ	0,017	-0,068
	p	0,917	0,676
MCH	ρ	-0,093	0,095
	p	0,568	0,559
MCHC	ρ	0,002	0,346
	p	0,990	0,029
			0,373

Legenda: ABN-apsolutni broj neutrofilnih granulocita, ABL_y-apsolutni broj limfocita, ABMo-apsolutni broj monocita

Analiziranjem korelacije GDF-15 i parametara krvne slike u grupi lečenih tokom posmatranog perioda utvrđena je značajna pozitivna korelacija između GDF-15 i MCHC na sredini terapije ($\rho = 0,346$, $p=0,029$). Podaci su prikazani u tabeli 17.

Tabela 18. Korelacija GDF-15 i parametara krvne slike u “watch and wait” grupi

Parametri KKS		GDF-15 Inicijalno	GDF-15 na kontroli
Eritrociti	Q	-0,409	-0,358
	P	0,022	0,048
Leukociti	Q	0,134	0,180
	P	0,473	0,332
ABN	Q	-0,186	0,019
	P	0,316	0,921
ABL _y	Q	0,089	0,156
	P	0,634	0,401
ABMo	Q	0,144	0,208
	P	0,439	0,261
Hg	Q	-0,315	-0,221
	P	0,084	0,231
Hct	Q	-0,400	-0,247
	P	0,026	0,180
Rtc	Q	-0,294	-0,119
	P	0,109	0,524
MCV	Q	0,300	0,400
	P	0,101	0,026
MCH	Q	0,298	0,366
	P	0,104	0,043
MCHC	Q	0,087	-0,027
	P	0,643	0,885

Legenda: ABN-apsolutni broj neutrofilnih granulocita, ABL_y-apsolutni broj limfocita, ABMo-apsolutni broj monocita

Analiziranjem GDF-15 i parametara kompletne krvne slike u “watch and wait” grupi utvrđena je značajna negativna korelacija između GDF-15 i broja eritocita inicijalno ($\rho=-0,409$, $p=0,022$), kao i na kontroli ($\rho=-0,358$, $p=0,048$). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između MCV i GDF-15 na kontroli ($\rho=0,400$, $p=0,026$), kao i MCH i GDF-15 na kontroli ($\rho=0,366$, $p=0,043$). Podaci su prikazani u tabeli 18.

Tabela 19. Korelacija serumske koncentracije GDF-15 i biomarkera metabolizma gvožđa u grupi lečenih

Biomarkeri metabolizma gvožđa		GDF-15 pre terapije	GDF-15 na sredini th	GDF-15 posle terapije
Fe	ρ	-0,089	-0,026	-0,046
	p	0,584	0,875	0,776
Transferin	ρ	-0,105	-0,129	-0,228
	p	0,519	0,426	0,158
Feritin	ρ	0,204	0,185	0,243
	p	0,207	0,252	0,131
sTfR	ρ	-0,055	-0,017	0,119
	p	0,738	0,916	0,466
sTfR/log(feritin)	ρ	-0,170	-0,139	-0,138
	p	0,295	0,392	0,395

Nije utvrđena značajna korelacija između GDF-15 i biomarkera gvožđa u grupi lečenih tokom posmatranog perioda (tabela 19).

Tabela 20. Korelacija serumske koncentracije GDF-15 i biomarkera metabolizma gvožđa u “watch and wait” grupi

Biomarkeri metabolizma gvožđa	GDF-15		GDF-15 na kontroli
	Inicijalno		
Fe	Q	-0,038	0,173
	P	0,840	0,352
Transferin	Q	0,140	0,152
	P	0,453	0,451
Feritin	Q	0,173	-0,093
	P	0,353	0,617
sTfR	Q	-0,241	-0,477
	P	0,192	0,007
sTfR/log(feritin)	Q	-0,307	-0,355
	P	0,093	0,050

Analiziranjem korelacije GDF-15 i biomarkera metabolizma gvožđa u “watch and wait” grupi na početku i kraju praćenja (tabela 20) utvrđena je značajna negativna korelacija između serumskih koncentracija GDF-15 i sTfR na kontroli ($Q = -0,477$, $p=0,007$), pri istom merenju su i koncentracije GDF 15 korelirale s indeksom feritina na granici statističke značajnosti ($Q = -0,355$, $p=0,050$).

Tabela 21. Korelacija serumske koncentracije hepcidina i parametara kompletne krvne slike u grupi lečenih

Parametri kompletne krvne slike		Hepcidin inicijalno	Hepcidin na sredini th	Hepcidin posle th
Eritrociti	Q	0,018	0,147	0,054
	P	0,913	0,365	0,741
Leukociti	Q	0,145	-0,115	0,086
	P	0,373	0,480	0,597
ABN	Q	0,158	-0,094	0,100
	P	0,330	0,565	0,540
ABL _y	Q	-0,130	-0,125	-0,017
	P	0,424	0,442	0,915
ABMo	Q	0,191	0,148	0,187
	P	0,239	0,361	0,247
Hg	Q	-0,113	0,178	0,066
	P	0,486	0,271	0,688
Hct	Q	-0,027	0,140	0,089
	P	0,871	0,388	0,583
Rtc	Q	-0,270	0,264	-0,125
	P	0,092	0,100	0,441
MCV	Q	-0,149	-0,049	0,029
	P	0,360	0,762	0,860
MCH	Q	-0,173	0,029	-0,024
	P	0,287	0,858	0,885
MCHC	Q	-0,212	0,169	-0,092
	P	0,169	0,297	0,573

Legenda: ABN-apsolutni broj neutrofilnih granulocita, ABL_y-apsolutni broj limfocita, ABMo-apsolutni broj monocita

Nije utvrđena značajna korelacija između serumske koncentracije hepcidina i parametara kompletne krvne slike u grupi lečenih tokom posmatranog perioda (tabela 21).

Tabela 22. Korelacija serumske koncentracije hepcidina i parametara kompletne krvne slike u „watch and wait” grupi

Parametri KKS	Hepcidin	
	inicijalno	na kontroli
Eritrociti	Q	0,119
	P	0,303
Leukociti	Q	-0,144
	P	0,440
ABN	Q	-0,188
	P	0,310
ABL _y	Q	-0,178
	P	0,339
ABMo	Q	0,012
	P	0,948
Hg	Q	0,239
	P	0,195
Hct	Q	0,201
	P	0,278
Rtc	Q	0,161
	P	0,386
MCV	Q	-0,076
	P	0,684
MCH	Q	-0,005
	P	0,978
MCHC	Q	0,186
	P	0,317

Legenda: ABN-apsolutni broj neutrofilnih granulocita, ABL_y-apsolutni broj limfocita, ABMo-apsolutni broj monocita

Nije utvrđena značajna korelacija između hepcidina i parametara kompletne krvne slike u „watch and wait” grupi tokom posmatranog perioda (tabela 22).

Tabela 23. Korelacija serumske koncentracije hepcidina i biomarkera metabolizma gvožđa u grupi lečenih

Biomarkeri metabolizma gvožđa		Hepcidin inicijalno	Hepcidin na sredini terapije	Hepcidin posle terapije
Fe	Q	-0,036	0,070	0,082
	P	0,827	0,667	0,616
Transferin	Q	-0,315	-0,191	-0,304
	P	0,048	0,237	0,056
Feritin	Q	0,685	0,602	0,630
	P	<0,001	<0,001	<0,001
sTfR	Q	-0,064	-0,137	-0,133
	P	0,694	0,400	0,414
sTfR/log(feritin)	Q	-0,411	-0,332	-0,483
	P	0,008	0,037	0,002

Nivo feritina značajno korelira sa nivoom hepcidina pre ($\rho = 0,685$, $p < 0,001$), na sredini ($\rho = 0,602$, $p < 0,001$), kao i posle terapije ($\rho = 0,630$, $p = 0,001$). Postoji značajna negativna korelacija između sTfR/log(feritin) i hepcidina tokom posmatranog perioda (inicijalno $\rho = -0,411$, $p = 0,008$; sredina terapije $\rho = -0,332$, $p = 0,037$; posle terapije $\rho = -0,483$, $p = 0,002$). Serumska koncentracija transferina značajno negativno korelira s koncentracijom hepcidina pre lečenja ($\rho = -0,315$, $p = 0,048$). Podaci su prikazani u tabeli 23.

Tabela 24. Korelacija serumske koncentracije hepcidina i biomarkera metabolizma gvožđa u „watch and wait” grupi

Biomarkeri metabolizma gvožđa	Hepcidin		Hepcidin na kontroli
	Inicijalno	Q	
Fe	-0,235	Q	0,052
	0,203	P	0,781
Transferin	-0,241	Q	-0,207
	0,192	P	0,265
Feritin	0,805	Q	0,829
	<0,001	P	<0,001
sTfR	0,078	Q	0,028
	0,678	P	0,879
sTfR/log(feritin)	-0,310	Q	-0,382
	0,090	P	0,034

Koncentracija feritina značajno korelira s koncentracijom hepcidina u serumu inicijalno ($Q=0,805$, $p<0,001$) i na kontroli ($Q=0,829$, $p<0,001$). Utvrđena je značajna negativna korelacija indeksa feritina i hepcidina na kontroli ($Q=-0,382$, $p=0,034$). Podaci su prikazani u tabeli 24.

**4.4. KORELACIJA BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA, GDF-15 I
HEPCIDINA SA STANDARDNIM LABORATORIJSKIM MARKERIMA
AKTIVNOSTI BOLESTI U OBE GRUPE**

Tabela 25. Korelacija biomarkera metabolizma gvožđa, GDF-15 i hepcidina sa standardnim laboratorijskim markerima aktivnosti bolesti u grupi lečenih (pre terapije)

Pre terapije		CRP	LDH	$\beta 2M$	SE	albumin	fibrinogen
Fe	Q	-0,510	-0,156	-0,029	-0,547	0,436	-0,534
	p	0,001	0,336	0,858	<0,001	0,005	<0,001
Transferin	Q	-0,158	-0,115	-0,101	-0,194	0,425	-0,235
	p	0,332	0,479	0,533	0,230	0,006	0,144
Feritin	Q	0,269	0,290	0,259	0,136	-0,038	0,169
	p	0,093	0,070	0,107	0,404	0,815	0,297
sTfR	Q	0,031	0,185	0,117	-0,159	0,346	0,034
	p	0,851	0,254	0,472	0,327	0,029	0,835
sTfR/ log(feritin)	Q	-0,146	-0,022	-0,078	-0,182	0,274	-0,089
	p	0,367	0,893	0,634	0,261	0,087	0,584
GDF-15	Q	0,181	0,178	0,596	0,271	-0,114	0,354
	p	0,264	0,273	<0,001	0,091	0,484	0,025
Hepcidin	Q	0,251	0,191	0,203	0,163	-0,015	0,120
	p	0,118	0,239	0,210	0,316	0,927	0,459

Analiziranjem biomarkera metabolizma gvožđa, GDF-15 i nivoa hepcidina sa markerima aktivnosti bolesti u grupi lečenih pre terapije (tabela 25), uočena je značajna negativna korelacija između serumskih koncentracija gvožđa i CRP ($Q = -0,510$, $p=0,001$), SE ($Q = -0,547$, $p<0,001$), plazmatske koncentracije fibrinogena ($Q=-0,534$, $p<0,001$), kao i pozitivna korelacija između koncentracija gvožđa i albumina ($Q=0,436$, $p=0,005$) u serumu. Koncentracija sTfR značajno korelira sa koncentracijom albumina ($Q=0,346$, $p=0,029$). Koncentracija transferina u serumu značajno korelira s koncentracijom albumina ($Q=0,425$, $p=0,006$). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između $\beta 2M$ i GDF-15 ($Q=0,596$, $p<0,001$), kao i između fibrinogena i GDF-15 ($Q=0,354$, $p=0,025$).

Tabela 26. Korelacija biomarkera metabolizma gvožđa, GDF-15 i hepcidina sa standardnim laboratorijskim markerima aktivnosti bolesti u grupi lečenih (posle terapije)

Posle terapije		CRP	LDH	$\beta2M$	SE	albumin	fibrinogen
Fe	Q	-0,279	0,300	0,034	-0,019	0,129	-0,098
	p	0,081	0,060	0,835	0,908	0,429	0,548
Transferin	Q	-0,138	-0,262	-0,315	-0,352	0,432	-0,399
	p	0,395	0,102	0,048	0,026	0,005	0,011
Feritin	Q	0,065	0,361	0,104	0,216	0,081	0,322
	p	0,600	0,022	0,525	0,181	0,618	0,043
sTfR	Q	-0,264	0,267	0,339	-0,090	0,194	0,009
	p	0,100	0,096	0,033	0,582	0,229	0,956
sTfR/ log(feritin)	Q	-0,189	0,008	0,103	-0,126	0,146	-0,151
	p	0,244	0,969	0,527	0,438	0,369	0,352
GDF-15	Q	0,121	0,163	0,342	0,232	0,137	0,221
	p	0,458	0,315	0,031	0,149	0,399	0,171
Hepcidin	Q	0,002	-0,004	0,231	0,119	-0,116	0,233
	p	0,989	0,982	0,151	0,466	0,474	0,148

Analiziranjem parametara metabolizma gvožđa, GDF-15 i nivoa hepcidina s markerima aktivnosti bolesti u grupi lečenih posle terapije (tabela 26), uočena je značajna pozitivna korelacija između koncentracija feritina i LDH ($Q=0,361$, $p=0,022$), kao i feritina i fibrinogena ($Q=0,322$, $p=0,043$). Koncentracija transferina značajno korelira s brzinom SE ($Q=-0,352$, $p=0,026$), koncentracijom albumina u serumu ($Q=0,432$, $p=0,005$) i fibrinogena u plazmi ($Q=-0,399$, $p=0,011$). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između serumskih koncentracija $\beta2M$ i GDF-15 ($Q = 0,342$, $p=0,031$), kao i $\beta2M$ i sTfR ($Q=0,339$, $p=0,033$).

Tabela 27. Korelacija biomarkera metabolizma gvožđa, serumskih koncentracija GDF-15 i hepcidina sa standardnim laboratorijskim markerima aktivnosti bolesti u „watch and wait” grupi (inicijalno)

		CRP	LDH	$\beta 2M$	SE	albumin	fibrinogen
Fe	Q	-0,077	0,142	-0,410	-0,073	0,256	0,142
	P	0,681	0,444	0,022	0,694	0,165	0,445
Transferin	Q	-0,300	0,234	-0,167	-0,058	0,113	-0,181
	P	0,101	0,206	0,370	0,755	0,543	0,331
Feritin	Q	0,006	-0,153	-0,041	-0,203	0,267	-0,012
	P	0,975	0,410	0,828	0,273	0,147	0,950
sTfR	Q	-0,321	0,219	0,320	-0,138	0,130	-0,404
	P	0,076	0,236	0,079	0,458	0,486	0,024
sTfR/ log(feritin)	Q	-0,266	0,235	0,243	-0,084	-0,064	-0,373
	P	0,148	0,203	0,188	0,653	0,733	0,039
GDF-15	Q	0,178	0,011	0,195	0,230	-0,110	0,223
	P	0,339	0,951	0,293	0,214	0,554	0,228
Hepcidin	Q	-0,085	-0,162	-0,035	-0,086	0,252	0,019
	P	0,651	0,384	0,851	0,848	0,172	0,920

Analiziranjem korelacije parametara metabolizma gvožđa, GDF-15 i hepcidina sa standardnim markerima aktivnosti bolesti u „watch and wait” grupi inicijalno, utvrđena je negativna korelacija između koncentracija gvožđa i $\beta 2M$ ($Q = -0,410$, $p=0,022$), između sTfR i fibrinogena ($Q = -0,404$, $p=0,024$) i sTfR/log(feritin) i fibrinogena ($Q = -0,373$, $p=0,039$). Podaci su prikazani u tabeli 27.

Tabela 28. Korelacija biomarkera metabolizma gvožđa, serumskih koncentracija GDF-15 i hepcidina sa standardnim laboratorijskim markerima aktivnosti bolesti u “watch and wait” grupi na kraju posmatranja

		CRP	LDH	β 2M	SE	albumin	fibrinogen
Fe	Q	-0,052	-0,038	0,132	0,140	0,315	0,086
	P	0,780	0,840	0,478	0,085	0,085	0,648
Transferin	Q	-0,017	-0,199	-0,104	0,006	0,063	-0,165
	P	0,927	0,283	0,578	0,976	0,735	0,375
Feritin	Q	-0,127	-0,085	0,108	0,096	-0,003	0,088
	P	0,496	0,650	0,563	0,606	0,986	0,637
sTfR	Q	-0,328	-0,013	0,202	-0,245	0,016	-0,462
	P	0,072	0,946	0,276	0,185	0,930	0,009
sTfR/ log(feritin)	Q	-0,159	-0,012	0,016	-0,274	0,018	-0,382
	P	0,392	0,948	0,932	0,135	0,922	0,034
GDF-15	Q	0,259	0,166	0,286	0,261	0,106	0,174
	P	0,160	0,372	0,119	0,156	0,570	0,348
Hepcidin	Q	-0,116	-0,245	0,052	0,064	0,091	0,051
	P	0,535	0,183	0,782	0,731	0,628	0,786

Postoji negativna korelacija između koncentracije sTfR u serumu i plazmatske koncentracije fibrinogena ($Q=-0,462$, $p=0,009$) i sTfR/log(feritin) i fibrinogena ($Q =-0,382$, $p=0,034$) u “watch and wait” grupi na kraju posmatranja (tabela 28).

**4.5. TESTIRANJE RAZLIKE U SERUMSKOJ KONCENTRACIJI
BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA, GDF-15 I HEPCIDINA IZMEĐU
DVE GRUPE**

Tabela 29. Serumske koncentracije biomarkera metabolizma gvožđa, GDF-15 i hepcidina u grupi lečenih i “watch and wait” grupi tokom posmatranog perioda

	Inicijalno			Na kraju posmatranja		
	Grupa lečenih	“Watch and wait” grupa	P	Grupa lečenih	“Watch and wait” grupa	P
Fe (µmol/L)	11,95 (7,50-16,23)	17,50 (15,20-23,30)	Z=3,936, p<0,001	12,10 (9,63-14,65)	14,20 (12,30-20,50)	Z=3,165 p=0,002
Transferin (g/L)	2,33±0,35	2,70±0,39	Z=3,682, p<0,001	3,02±3,42	2,60±0,35	Z=1,670, p=0,095
Feritin (µg/L)	99,65 (46,80-199,20)	91,50 (42,00-142,00)	Z=1,287, p=0,198	123,80 (48,75-297,25)	82,50 (44,00-109,40)	Z=2,122 p=0,034
sTfR (mg/L)	1,52 (1,20-1,80)	1,55 (1,12-1,86)	Z=0,331, p=0,741	1,68 (1,40-2,03)	1,37 (1,10-1,63)	Z=3,241, p=0,001
sTfR/ log (feritin)	0,79 (0,56-1,05)	0,74 (0,59-1,00)	Z=0,301, p=0,763	0,81 (0,65-1,10)	0,79 (0,53-0,94)	Z=1,368, p=0,171
GDF-15 (pg/ml)	610 (380-839)	560 (280-620)	Z=1,375, p=0,169	680 (496-995)	580 (440-800)	Z=1,392 P=0,164
Hepcidin (pg/ml)	6760 (5050-10800)	6520 (4200-7200)	Z=1,102, p=0,271	6530 (2365-7040)	6520 (2600-6580)	Z=0,058 P=0,954

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

Utvrđena je značajna razlika u serumskoj koncentraciji gvožđa inicijalno ($Z=3,936$, $p<0,001$), kao i na kraju posmatranog perioda ($Z=3,165$, $p=0,002$), sa značajno nižim vrednostima u grupi lečenih. Koncentracija transferina je značajno niža u grupi lečenih inicijalno ($Z=3,682$, $p<0,001$), a nije utvrđena značajna razlika na kraju posmatranog perioda ($p=0,095$).

Koncentracija sTfR je značajno niža u “watch and wait” grupi na kraju posmatranja ($Z=3,241$, $p=0,001$), dok je nije bilo na početku posmatranog perioda.

Nije utvrđena značajna razlika u nivou sTfR/log(feritin) između dve grupe, ni na početku ni na kraju posmatranja.

Koncentracija feritina na početku posmatranog perioda se ne razlikuje između dve grupe ($p=0,198$), a vrednosti su značajno više u grupi lečenih na kraju perioda posmatranja ($Z=2,122$, $p=0,034$).

Vrednosti GDF-15 i hepcidina se ne razlikuju između dve grupe ispitanika ni inicijalno, ni na kraju posmatranja. Podaci su prikazani u tabeli 29.

Tabela 30. Parametri kompletne krvne slike na početku i kraju posmatranja u grupi lečenih i „watch and wait“ grupi

Parametri KKS (inicijalno)	Grupa lečenih	„Watch and wait“ grupa	P
Eritrociti ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4,54±0,62	4,59±0,55	t=0,330, p=0,743
Leukociti ($\times 10^9/\text{L}$)	7,46 (5,61-12,45)	13,22 (6,20-29,20)	Z=1,664 p=0,096
ABN ($\times 10^9/\text{L}$)	4,24 (3,18-5,67)	3,52 (2,57-4,43)	Z=2,481 p=0,013
ABL y ($\times 10^9/\text{L}$)	1,81 (1,12-2,82)	9,94 (1,89-23,29)	Z=2,823 p=0,005
ABMo ($\times 10^9/\text{L}$)	0,57 (0,43-0,87)	0,51 (0,40-0,84)	Z=0,487, p=0,626
Hg (g/L)	129,00±20,01	141,10±13,20	t=2,909, p=0,005
Hct	0,39±0,05	0,42±0,03	t=2,880, p=0,005
Rtc ($\times 10^{12}/\text{L}$)	0,07±0,03	0,06±0,02	t=0,759, p=0,450
MCV (fL)	86,95±6,95	92,85±5,70	t=3,941, p<0,001
MCH (pg/cell)	28,53±2,16	30,98±2,32	t=4,581, p<0,001
MCHC (g/L)	328,53±17,33	333,58±10,48	t=1,432, p=0,157
Parametri KKS (kraj posmatranja)	Grupa lečenih	„Watch and wait“ grupa	P
Eritrociti ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4,37±0,51	4,58±0,56	t=1,679, p=0,098
Leukociti ($\times 10^9/\text{L}$)	4,87 (3,37-6,14)	13,40 (6,90-25,06)	Z=5,565 p<0,001
ABN ($\times 10^9/\text{L}$)	2,71 (1,76-3,91)	3,68 (2,93-4,53)	Z=2,638 p=0,008
ABL y ($\times 10^9/\text{L}$)	1,16 (0,83-1,45)	8,69 (1,85-20,41)	Z=6,046 p<0,001
ABMo ($\times 10^9/\text{L}$)	0,51 (0,39-0,59)	0,56 (0,40-0,84)	Z=1,658 p=0,097
Hg (g/L)	127,28±12,67	140,90±12,11	t=4,583, p<0,001
Hct	0,39±0,04	0,42±0,04	t=3,509, p=0,001
Rtc ($\times 10^{12}/\text{L}$)	0,08±0,02	0,06±0,02	t=2,598, p=0,011
MCV (fL)	88,98±4,76	92,14±5,07	t=2,697, p<0,001
MCH (pg/cell)	29,26±2,16	30,91±2,01	t=3,294, p=0,002
MCHC (g/L)	328,75±12,83	335,65±11,15	t=2,375, p=0,020

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

Legenda: ABN-apsolutni broj neutrofilnih granulocita, ABL y -apsolutni broj limfocita, ABMo-apsolutni broj monocita

Analiziranjem parametara kompletne krvne slike (tabela 30) pre i na kraju posmatranja u obe grupe ispitanika, možemo utvrditi da ne postoji značajna razlika u broju eritrocita i broju monocita, ni inicijalno, ni na kraju posmatranja.

Utvrđena je značajna razlika u broju leukocita, Rtc, MCHC na kraju posmatranja između dve grupe, dok nije bilo značajne razlike na početku posmatranja. Značajno su niže vrednosti u grupi lečenih ispitanika za sledeće parametre: leukociti ($p<0,001$), MCHC ($p=0,020$), a značajno više vrednosti za retikulocite ($p=0,011$).

Utvrđena je značajna razlika u ABN, broju limfocita, vrednostima hematokrita, nivou hemoglobina, MCV i MCH između dve grupe ispitanika, inicijalno i na kraju posmatranja. Vrednosti ABN su značajno više u grupi lečenih na početku posmatranja ($p=0,013$), a značajno su niže na kraju ($p=0,008$) u odnosu na „watch and wait“ grupu. Broj limfocita je značajno niži u grupi lečenih u odnosu na „watch and wait“ grupu na početku posmatranja ($p=0,005$), kao i na kraju posmatranja ($p<0,001$). Koncentracija hemoglobina je značajno niža u grupi lečenih u odnosu na „watch and wait“ grupu na početku posmatranja ($p=0,005$) i na kraju posmatranja ($p<0,001$), a isto važi i za vrednosti hematokrita na početku ($p=0,005$), odnosno kraju posmatranja ($p=0,001$). MCV je značajno niži u grupi lečenih u odnosu na „watch and wait“ grupu na početku ($p<0,001$), kao i na kraju posmatranja ($p<0,001$), a isto važi i za MCH (početak posmatranja $p<0,001$, kraj posmatranja $p=0,002$).

Tabela 31. Markeri aktivnosti bolesti u obe grupe na početku i kraju posmatranja

Markeri aktivnosti bolesti (inicijalno)	Grupa lečenih	„Watch and wait“ grupa	P
CRP (mg/L)	1,70 (0,60-9,70)	0,80 (0,50-1,40)	Z=1,974, p=0,048
LDH (U/L)	193,00 (162,5-263,75)	174 (170-209)	Z=0,980, p=0,327
B2M (mg/L)	3,09 (2,29-4,15)	2,07 (1,80-2,50)	Z=3,566, p<0,001
Albumin (g/L)	44,51±5,06	47,75±3,46	t=3,055, p=0,003
Fibrinogen (g/L)	3,07 (2,53-4,01)	3,08 (2,59-3,42)	Z=0,725, p=0,469
SE (mm u 1,h)	13,50 (6,25-31,50)	8 (5-11)	Z=2,549, p=0,011
GDF-15 (pg/ml)	610 (380-839)	560 (280-620)	Z=1,375, p=0,169
Hepcidin (pg/ml)	6760 (5050-10800)	6520 (4200-7200)	Z=1,102, p=0,271
Markeri aktivnosti bolesti (kraj posmatranja)	Grupa lečenih	„Watch and wait“ grupa	P
CRP (mg/L)	1,90 (0,83-3,33)	0,80 (0,50-1,60)	Z=2,252, p=0,024
LDH (U/L)	206,50 (187,75-253,50)	188 (161-212)	Z=2,412, p=0,016
B2M (mg/L)	2,45 (2,05-2,80)	2,07 (1,89-2,20)	Z=2,360 p=0,018
Albumin (g/L)	44,59±3,58	46,56±2,99	t=2,477, p=0,016
Fibrinogen (g/L)	3,69 (3,11-4,35)	3,20 (2,79-3,75)	Z=2,273, p=0,023
SE (mm u 1,h)	16,00 (11,25-34,50)	8 (4-14)	Z=3,191, p=0,001
GDF-15 (pg/ml)	680 (496-995)	580 (440-800)	Z=1,392, p=0,164
Hepcidin (pg/ml)	6530 (2365-7040)	6520 (2600-6580)	Z=0,058, p=0,954

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

Analiziranjem markera aktivnosti bolesti prikazanih u tabeli 31, utvrđene su značajno više koncentracije CRP i β2M i brzine SE u grupi lečenih, kako na početku (CRP: p=0,047; β2M p<0,001; SE p=0,011), tako i na kraju posmatranja (CRP: p=0,024; β2M p=0,018; SE p=0,001). Koncentracija albumina je značajno niža u grupi lečenih u odnosu na „watch and wait“ grupu na početku (p=0,003) i na kraju posmatranja (p=0,016).

Serumska koncentracija LDH i plazmatska fibrinogena su značajno više u grupi lečenih u odnosu na „watch and wait“ grupu na kraju posmatranja (LDH $p=0,016$; fibrinogen $p=0,023$), dok nije utvrđena razlika između dve grupe na početku posmatranja.

Za parametre GDF-15 i hepcidin, nije uočena razlika u koncentracijama između dve analizirane grupe ni inicijalno, ni na kraju posmatranja.

4.5.1. POREĐENJE INICIJALNO. Lečeni s agresivnim LPN, lečeni s indolentnim LPN, „watch and wait“ (međusobna)

Tabela 32. Parametri kompletne krvne slike u grupi lečenih s agresivnim i indolentnim LPN i „watch and wait“ grupi na početku posmatranja

Parametri	Agresivne LPN	Indolentne LPN	„Watch and wait“	p ₁	p ₂	p ₃
KKS						
Eritrociti (x10 ¹² /L)	4,48±0,35	4,57±0,72	4,59±0,55	t=0,408, p=0,686	t=0,630, p=0,532	t=0,112, p=0,912
Leukociti (x10 ⁹ /L)	7,70 (5,49-12,03)	6,83 (5,63-12,76)	13,22 (6,20-29,20)	Z=0,072 p=0,942	Z=1,788 p=0,074	Z=1,154 p=0,249
ABN (x10 ⁹ /L)	5,10 (3,28-9,92)	3,90 (3,17-5,01)	3,52 (2,57-4,43)	Z=1,357 p=0,175	Z=2,367 p=0,057	Z=1,902 p=0,018
ABL _y (x10 ⁹ /L)	1,48 (0,86-2,14)	2,08 (1,28-4,71)	9,94 (1,89-23,29)	Z=1,949 p=0,051	Z=3,525 p<0,001	Z=1,660 p=0,097
ABMo (x10 ⁹ /L)	0,47 (0,37-0,77)	0,57 (0,43-0,88)	0,51 (0,40-0,84)	Z=0,896 p=0,370	Z=0,425 p=0,671	Z=0,912 p=0,362
Hg (g/L)	120,00±13,78	133,33±21,28	141,10±13,20	t=2,054, p=0,047	t=4,776, p<0,001	t=1,693, p=0,096
Htc	0,37±0,04	0,40±0,06	0,42±0,03	t=1,758, p=0,087	t=4,662, p<0,001	t=1,763, p=0,083
Rtc (x10 ¹² /L)	0,07±0,02	0,07±0,03	0,06±0,02	t=0,928, p=0,359	t=1,491, p=0,143	t=0,251, p=0,803
MCV (fL)	83,05±5,41	88,82±6,45	92,85±5,70	t=2,786, p=0,008	t=5,276, p<0,001	t=2,521, p=0,015
MCH (pg/cell)	26,91±2,42	29,31±1,53	30,98±2,32	t=3,842, p<0,001	t=5,241, p=0,001	t=3,172, p=0,002

MCHC	$323,92 \pm 14,55$	$330,74 \pm 18,37$	$333,58 \pm 10,48$	$t=1,171$, $t=2,478$, $t=0,735$, $p=0,249$ $p=0,017$ $p=0,466$
(g/L)				

Podaci prikazani kao Mean \pm SD; Med (IQR)

Legenda: p_1 -poređenje lečeni s agresivnim LPN vs lečeni s indolentnim LPN, p_2 -poređenje lečenih s agresivnim LPN vs „watch and wait“ grupa, p_3 -poređenje lečenih s indolentnim LPN vs „watch and wait“ grupa, ABN-apsolutni broj neutrofilnih granulocita, ABL-apsolutni broj limfocita, ABM-apsolutni broj monocita

Rezultati međusobne komparacije parametara kompletne krvne slike u podgrupama ispitanika s agresivnim i indolentnim LPN i „watch and wait“ grupi na početku posmatranja, prikazani su u tabeli 32. Značajno je niža koncentracija hemoglobina u podgrupi s agresivnim LPN u odnosu na podgrupu s indolentnim LPN ($p=0,047$), kao i vrednosti MCV ($p=0,008$) i MCH ($p<0,001$).

Upoređivanjem vrednosti parametara kompletne krvne slike u podgrupi s agresivnim LPN i „watch and wait“ grupi, uočene su značajno niže vrednosti u podgrupi s agresivnim LPN u odnosu na „watch and wait“ grupu za sledeće parametre: broj limfocita ($p<0,001$), hemoglobin ($p<0,001$), hematokrit ($p<0,001$), MCV ($p<0,001$), MCH ($p<0,001$) i MCHC ($p<0,001$), a značajno više vrednosti broja neutrofilnih granulocita u odnosu na „watch and wait“ grupu ($p=0,018$).

Vrednosti MCV I MCHC su značajno niže u podgrupi lečenih s indolentnim LPN u odnosu na „watch and wait“ grupu ($p<0,001$).

Tabela 33. Biomarkeri metabolizma gvožđa u grupi lečenih s agresivnim LPN, indolentnim LPN i „watch and wait“ grupi na početku posmatranja

Biomarkeri metabolizma gvožđa	Agresivne LPN	Indolentne LPN „Watch and wait“	p ₁	p ₂	p ₃
Fe (μmol/L)	6,70 (3,30-11,00)	14,10 (10,00-18,80)	17,50 (15,20-23,30)	Z=3,769 p<0,001	Z=4,656 p<0,001
Transferin (g/L)	2,23±0,38	2,38±0,33	2,70±0,39	t=1,283 p=0,207	t=3,656 p=0,001
Feritin (μg/L)	149,20 (39,00-256,30)	97,30 (45,40-186,00)	91,50 (42,00-142,00)	Z=0,390 p=0,697	Z=1,132 p=0,258
sTfR (mg/L)	1,48 (1,16-1,67)	1,60 (1,21-1,80)	1,55 (1,12-1,86)	Z=0,795 p=0,427	Z=0,322 p=0,748
sTfR/ log(feritin)	0,78 (0,51-0,93)	0,79 (0,58-1,06)	0,74 (0,59-1,00)	Z=0,563 p=0,573	Z=0,502 p=0,616

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

p₁-poređenje lečeni s agresivnim LPN vs indolentnim LPN, p₂-poređenje lečenih s agresivnim LPN vs „watch and wait“ grupa, p₃-poređenje lečenih s indolentnim LPN vs „watch and wait“ grupa

Analiziranjem biomarkera metabolizma gvožđa između dve grupe lečenih i „watch and wait“ grupe, utvrđena je značajna razlika u serumskoj koncentraciji gvožđa između lečenih ispitanika s agresivnim nasuprot indolentnim LPN (p<0,001), agresivnim LPN i „watch and wait“ grupu (p<0,001) i indolentnim LPN i „watch and wait“ grupu (p=0,013).

Koncentracija transferina je značajno niža u podgrupi lečenih od agresivnih LPN u odnosu na „watch and wait“ grupu (p=0,001), kao i u podgrupi lečenih s indolentnim LPN u odnosu na „watch and wait“ grupu (p=0,001). Podaci su prikazani u tabeli 33.

Tabela 34. Markeri aktivnosti bolesti u podgrupama lečenih i „watch and wait“ grupi na početku posmatranja

Parametri aktivnosti bolesti	Agresivne LPN	Indolentne LPN	„Watch and wait“	p ₁	p ₂	p ₃
CRP (mg/L)	10,80 (1,65-110,55)	1,00 (0,30-3,90)	0,80 (0,50-1,40)	Z=2,805, Z=3,156, Z=0,742, p=0,005	p=0,002	p=0,458
LDH (U/L)	226 (152-308)	185 (163-244)	174 (170-209)	Z=0,534	Z=1,287	Z=0,538 p=0,593 p=0,198 p=0,591
B2M (mg/L)	2,27 (1,82-3,76)	3,38 (2,46-4,28)	2,07 (1,80-2,50)	Z=1,747	Z=0,978	Z=4,202 p=0,081 p=0,328 p<0,001
Albumin (g/L)	40,42±5,16	46,48±3,70	47,75±3,46	t=4,265	t=5,526	t=1,351 p<0,001 p<0,001 p=0,182
Fibrinogen (g/L)	4,49 (3,50-6,30)	2,90 (2,30-3,69)	3,08 (2,59-3,42)	Z=3,278, Z=3,370, Z=1,068, p=0,001	p=0,001	p=0,286
SE (mm u 1. h)	28 (19,5-92,0)	10 (5-20)	8 (5-11)	Z=3,078, Z=3,970	Z=1,024, p=0,002 p<0,001	p=0,306
GDF-15 (pg/ml)	480 (324-1030)	620 (420-800)	560 (280-620)	Z=0,130	Z=0,476	Z=1,560 p=0,897 p=0,634 p=0,119
Hepcidin (pg/ml)	6800 (1900-11600)	6720 (5200-9600)	6520 (4200-7200)	Z=0,014	Z=0,631	Z=1,099 p=0,988 p=0,528 p=0,272

Podaci prikazani kao Mean±SD; Med (IQR)

p₁-poređenje lečenih s agresivnim LPN vs indolentnim LPN, p₂-poređenje lečenih s agresivnim LPN vs „watch and wait“ grupa, p₃-poređenje lečenih s indolentnim LPN vs „watch and wait“ grupa

Koncentracije CRP-a su značajno više u podgrupi s agresivnim LPN u odnosu na podgrupu indolentnih LPN (p=0,005), kao i u podgrupi agresivnih LPN u odnosu na „watch and wait“ grupu (p=0,002). Plazmatske koncentracije fibrinogena su značajno više

u podgrupi agresivnih LPN u odnosu na podgrupu indolentnih LPN ($p=0,001$), kao i u podgrupi agresivnih LPN u odnosu na “watch and wait” grupu ($p=0,001$). Brzina sedimentacije je značajno veća u podgrupi agresivnih LPN u odnosu na podgrupu lečenih zbog indolentnih LPN ($p=0,002$), kao i u podgrupi agresivnih LPN u odnosu na “watch and wait” grupu ($p<0,001$). Koncentracije albumina su značajno niže u podgrupi agresivnih LPN u odnosu na podgrupu indolentnih LPN ($p<0,001$), kao i u podgrupi agresivnih u odnosu na “watch and wait” grupu ($p<0,001$). Serumske koncentracije $\beta2M$ su značajno više u podgrupi lečenih zbog indolentne LPN u odnosu “watch and wait” grupu ($p<0,001$). Podaci su prikazani u tabeli 34.

4.6. KORELACIJA SERUMSKIH KONCENTRACIJA BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA, HEPCIDINA I GDF-15 S TERAPIJSKIM ODGOVOROM

4.6.1. TERAPIJSKI ODGOVOR

Na sredini terapije 33 ispitanika (82,5%) je bilo u parcijalnoj remisiji (PR), svaki osmi u kompletnoj remisiji (CR) (12,5%), a svaki dvadeseti ima stabilnu bolest (SD) (5%). Nakon završetka lečenja je više od polovine ispitanika bilo u kompletnoj remisiji, više od trećine (37,5%) u parcijalnoj remisiji, a 7,5% je imalo progresiju bolesti (PD)(tabela 35).

Tabela 35. Terapijski odgovor na sredini terapije i posle terapije

		Posle terapije			Ukupno
		CR	PR	PD	
Sredina terapije	CR	5	0	0	5
	PR	17^a	13	3^b	33
	SD	0	2^a	0	2
Ukupno		22	15	3	40

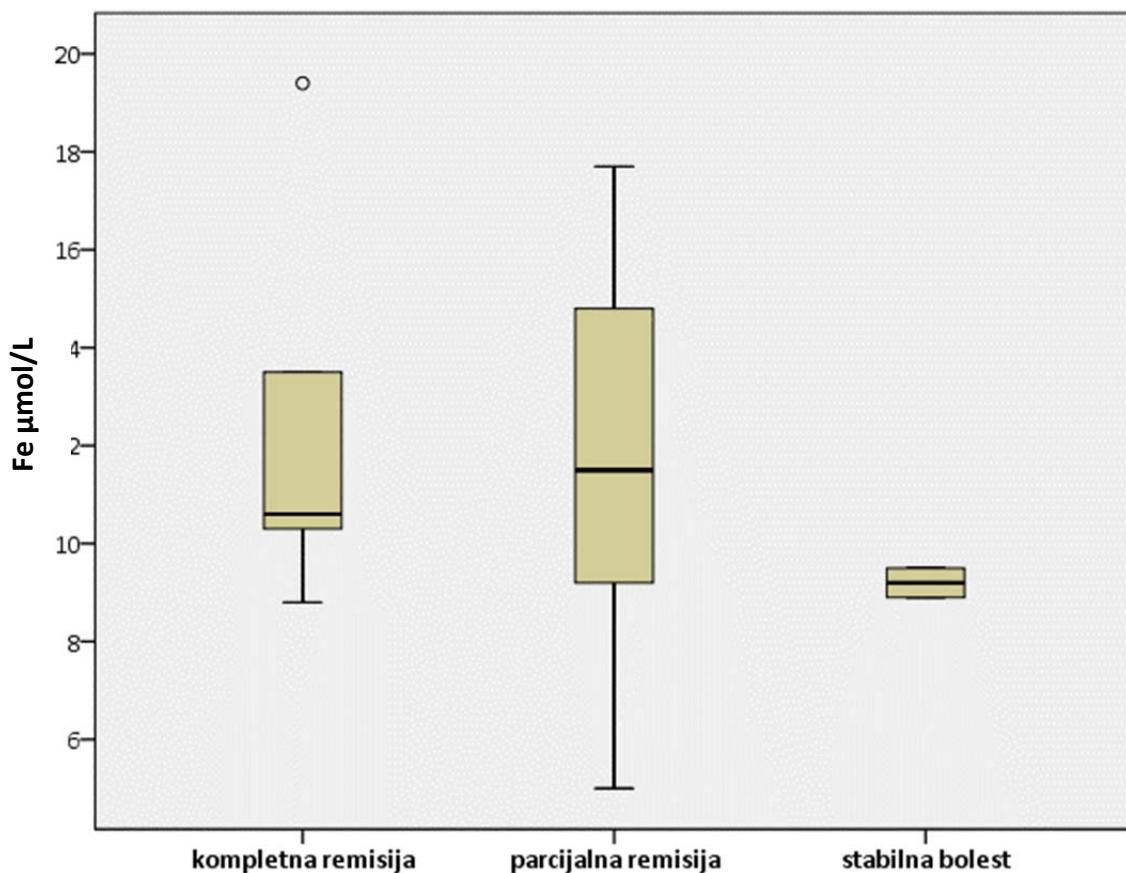
Legenda: CR-kompletna remisija, PR-parcijalna remisija, PD-progresija bolesti, SD-stabilna bolest,

^apoboljšanje u odnosu na sredinu terapije, ^bpogoršanje u odnosu na sredinu terapije

Na osnovu podataka iz tabele 35 zaključujemo da je 17 ispitanika prešlo iz PR u CR, a dvoje ispitanika iz SD u PR, tj. kod skoro svakog drugog ispitanika (n=19; 47,5%) je došlo do poboljšanja stanja nakon završetka lečenja u odnosu na sredinu terapije. Kod 3 ispitanika (7,5%) je došlo do pogoršanja na kraju terapije u odnosu na sredinu, tj. prešli su iz PR u PD.

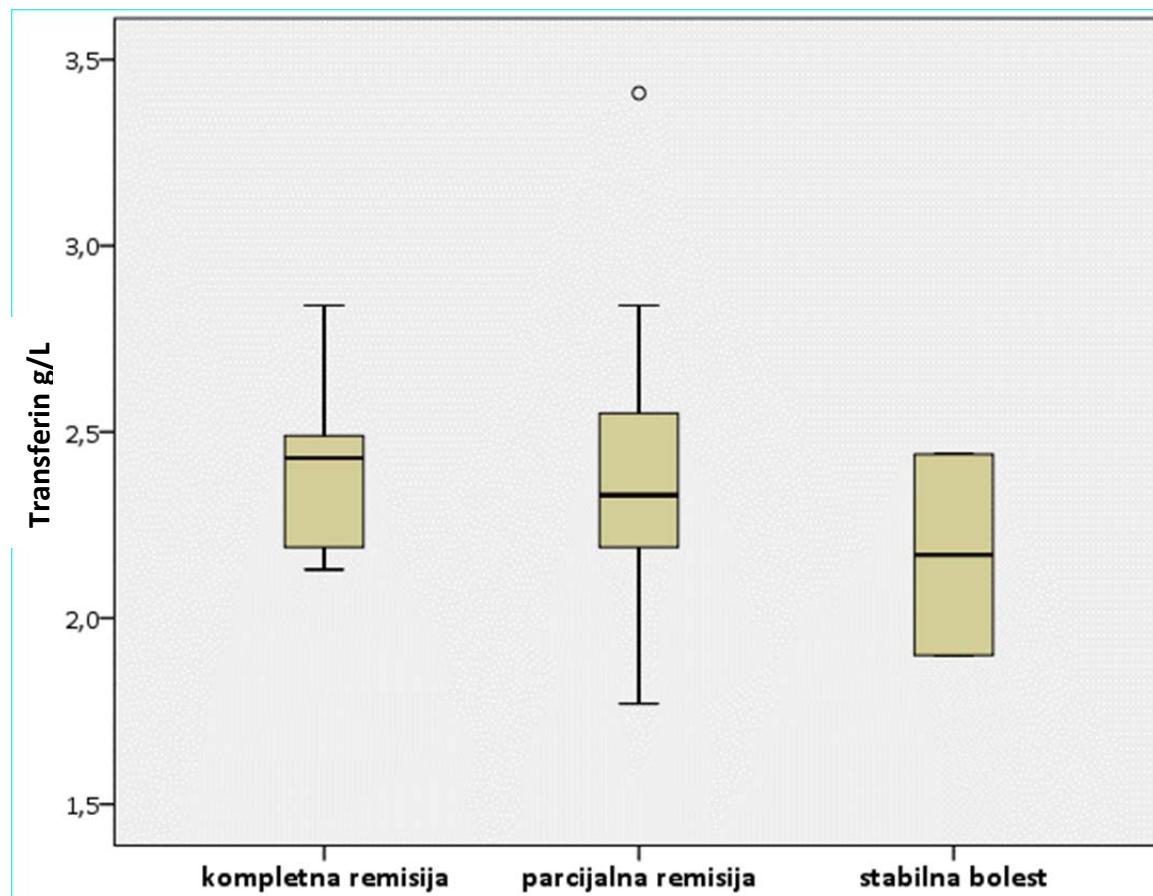
4.6.2. SERUMSKA KONCENTRACIJA BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA I TERAPIJSKI ODGOVOR NA SREDINI TERAPIJE

Rezultati univarijante analize pokazuju da su koncentracije gvožđa niže kod ispitanika sa stabilnom bolesti ($Me=9,20$) u odnosu na one s parcijalnom remisijom ($Me=11,50$), odnosno kompletrenom remisijom ($Me=10,60$), pri čemu dobijena razlika nije statistički značajna ($p=0,424$). Podaci su prikazani na grafikonu 3.



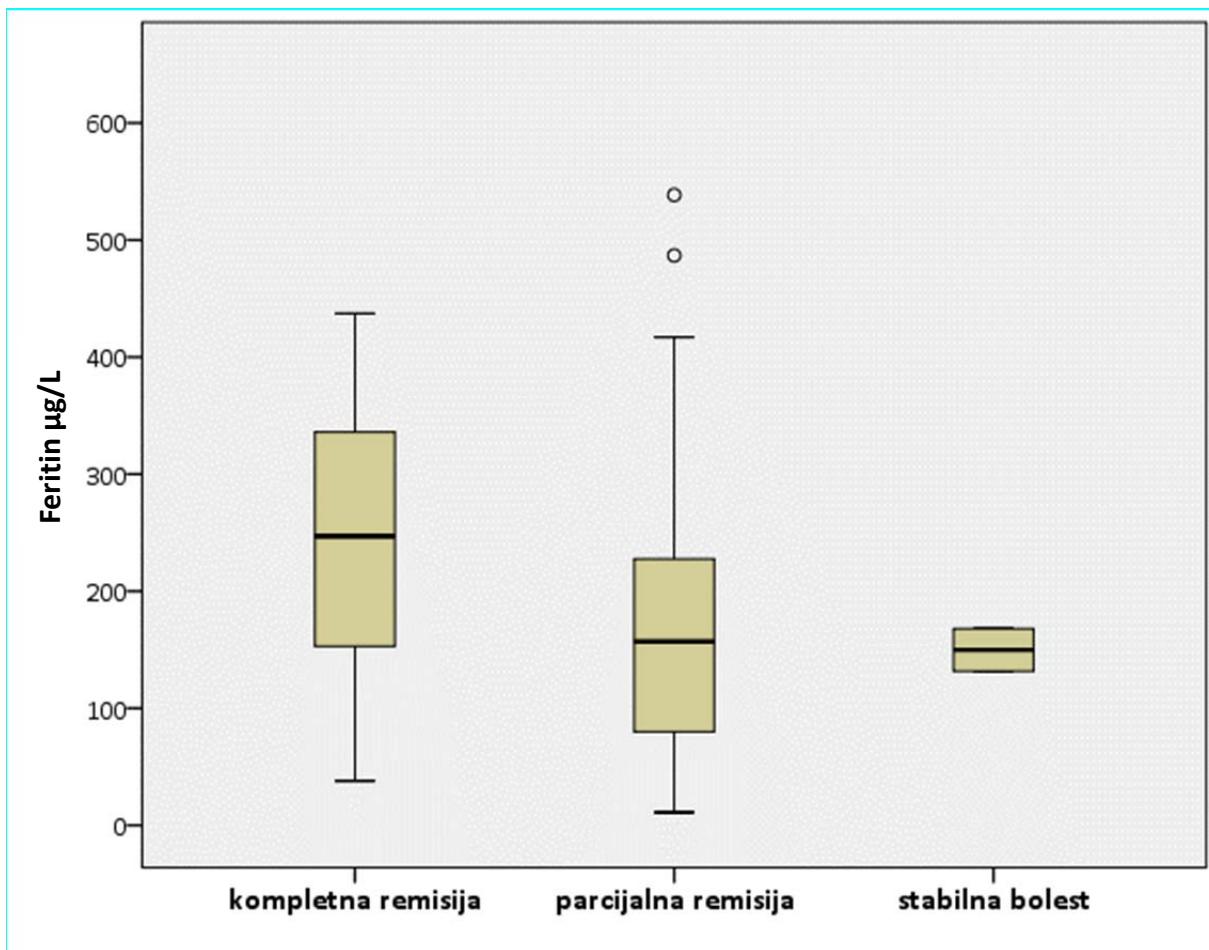
**Grafikon 3. Serumska koncentracija gvožđa u odnosu na terapijski odgovor
(sredina terapije)**

Koncentracije transferina su najviše kod ispitanika s kompletnom remisijom, a najniže kod onih sa stabilnom bolesti, pri čemu dobijena razlika nije statistički značajna ($p=0,724$). Podaci su prikazni na grafikonu 4.



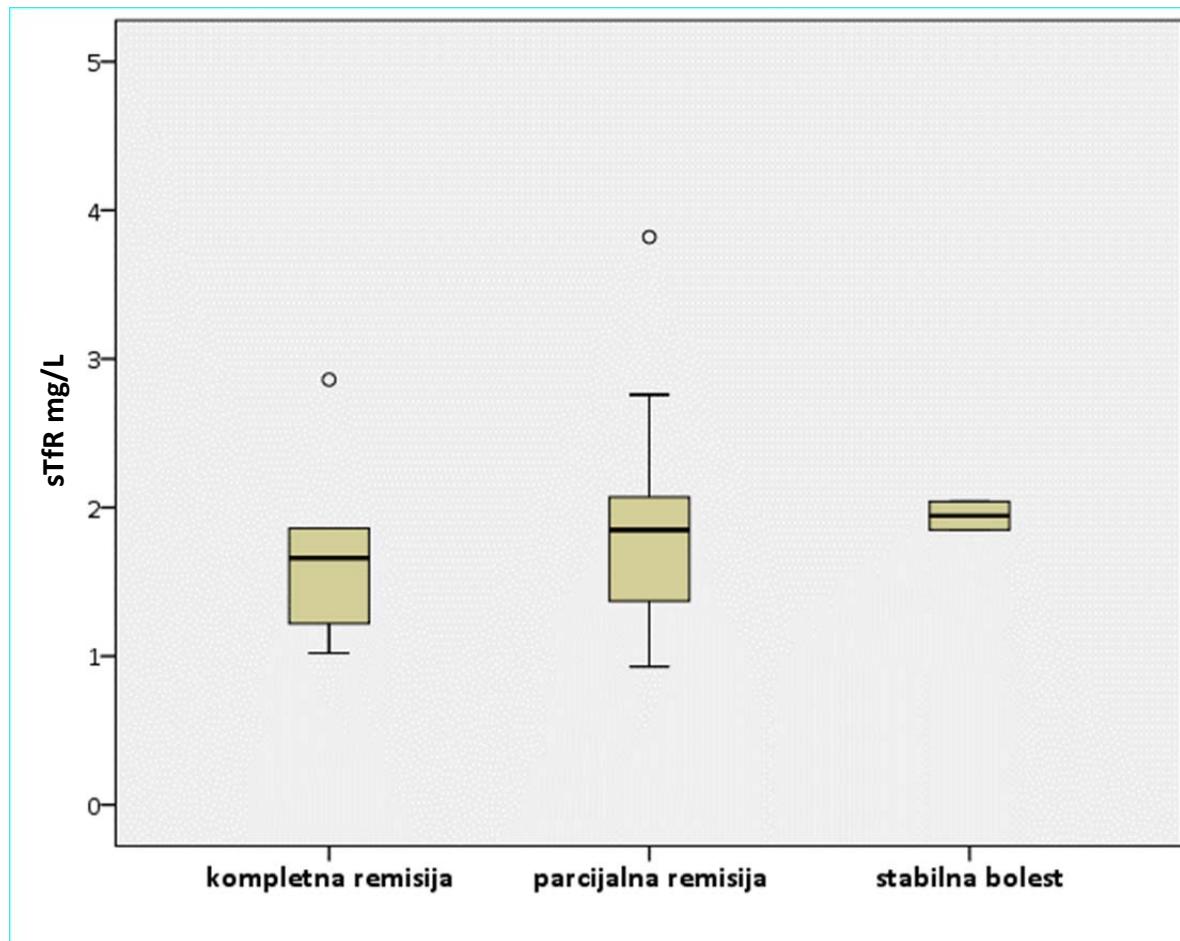
Grafikon 4. Serumska koncentracija transferina u odnosu na terapijski odgovor (sredina terapije)

Kao što je prikazano na grafikonu 5, koncentracija feritina je najviša kod ispitanika s postignutom kompletnom remisijom, a najniža kod onih sa stabilnom bolesti, pri čemu dobijena razlika nije bila statistički značajna ($p=0,699$).



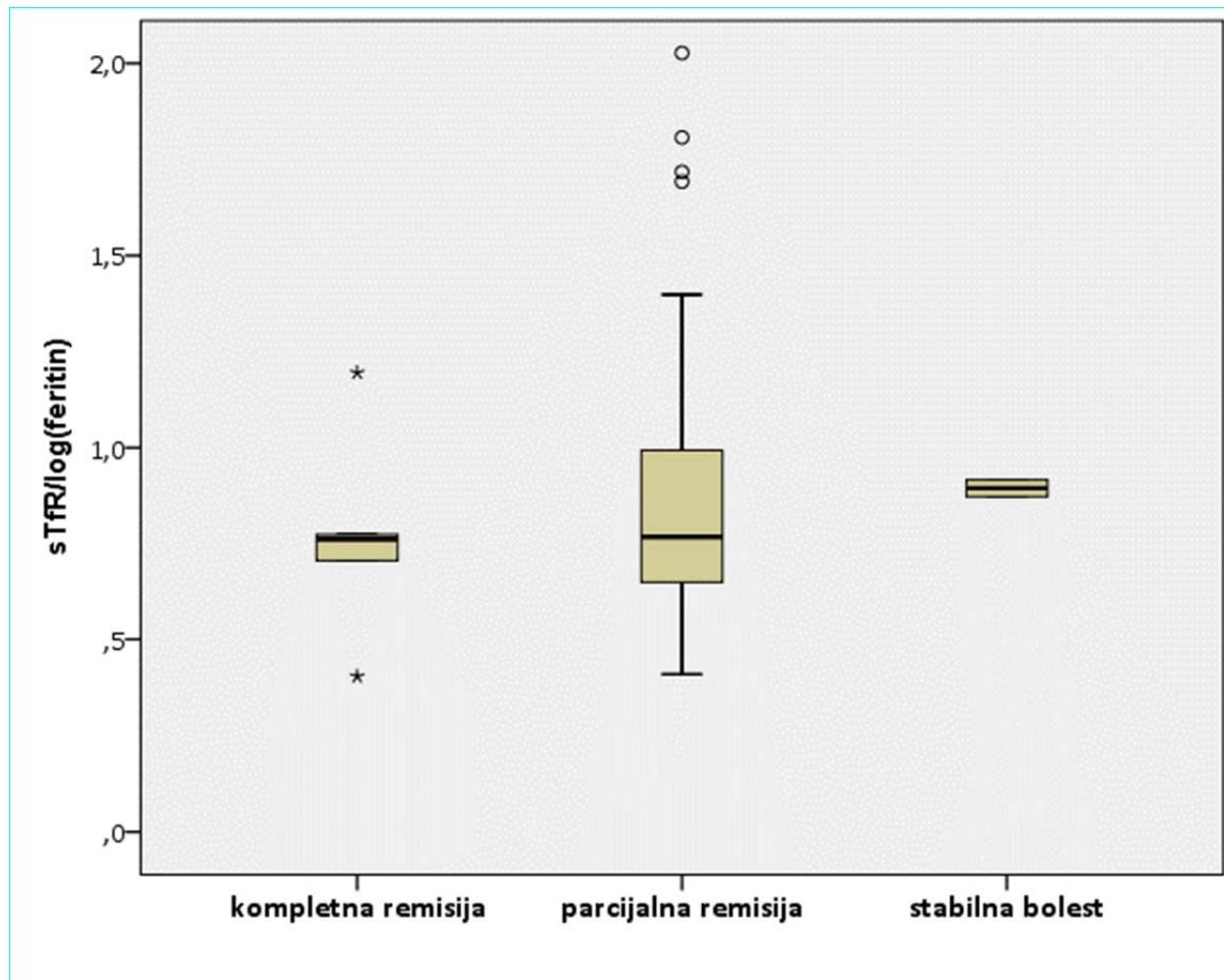
Grafikon 5. Serumska koncentracija feritina u odnosu na terapijski odgovor (sredina terapije)

Koncentracije sTfR su najniže kod ispitanika s kompletnom remisijom, a najviše kod onih sa stabilnom bolesti, ali bez statističke značajnosti ($p=0,728$). Podaci su prikazani na grafikonu 6.



Grafikon 6. Serumska koncentracija sTfR u odnosu na terapijski odgovor (sredina terapije)

Grafikon 7 prikazuje najniže vrednosti sTfR/log (ferritin) kod ispitanika s kompletnom remisijom, a najviše kod onih sa stabilnom bolesti, a dobijena razlika između tri kategorije pacijenata nije statistički značajna ($p=0,558$).

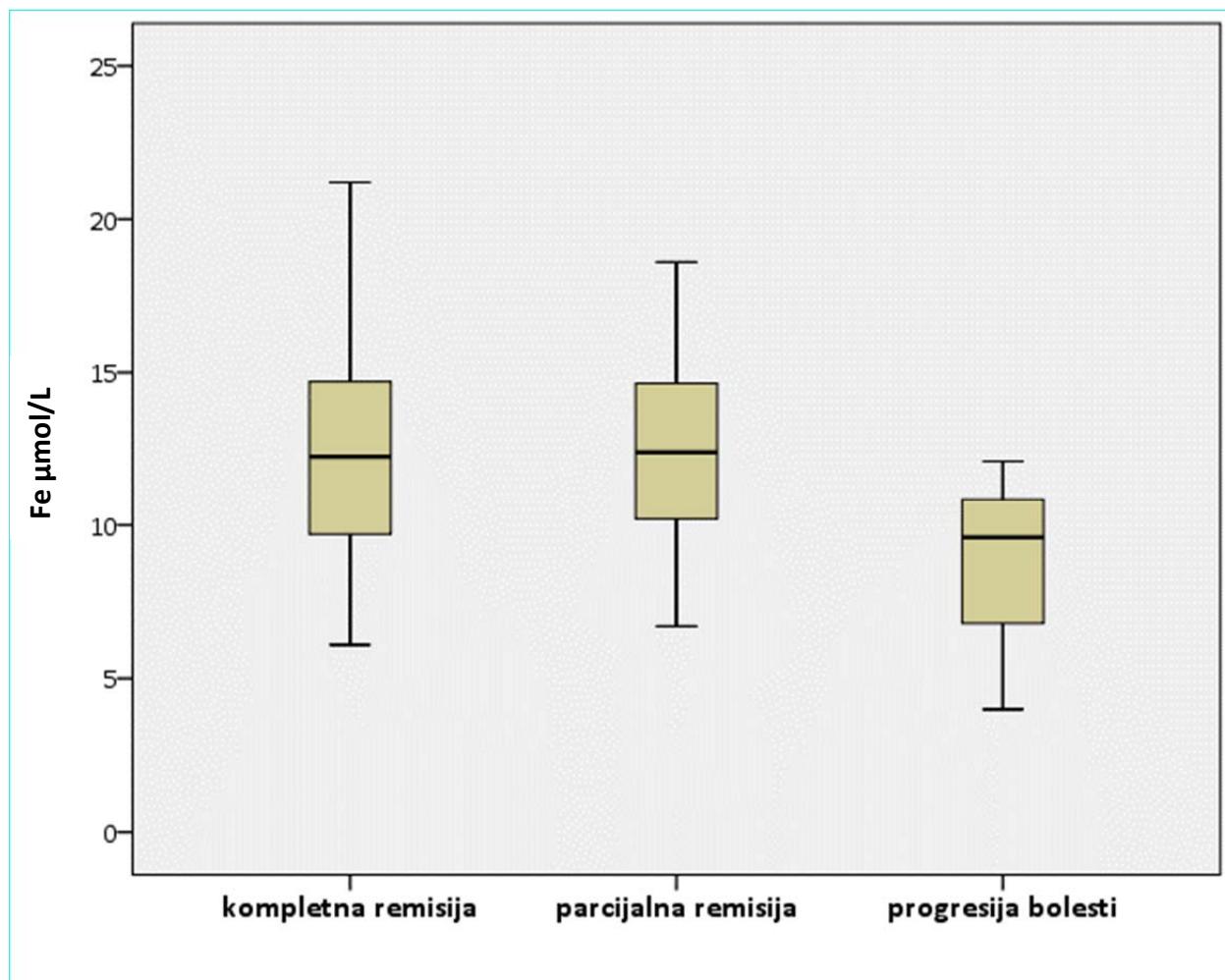


Grafikon 7. Indeks feritina u odnosu na terapijski odgovor (sredina terapije)

4.6.3. SERUMSKA KONCENTRACIJA BIOMARKERA METABOLIZMA GVOŽĐA I TERAPIJSKI ODGOVOR NAKON ZAVRŠETKA LEČENJA

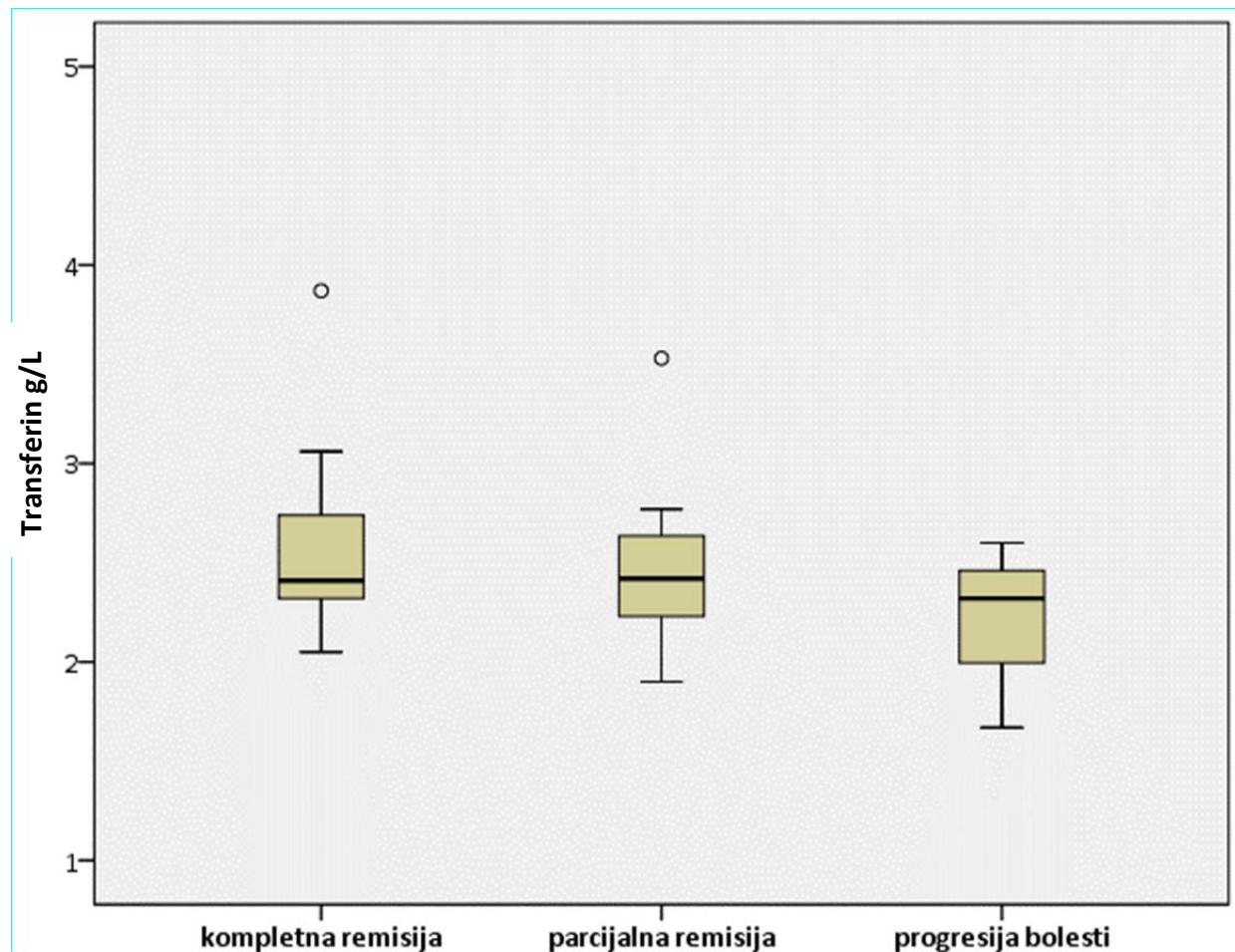
Analiziranjem serumskih koncentracija biomarkera gvožđa u odnosu na odgovor nakon završetka lečenja, uočavamo da su koncentracije gvožđa i transferina najviše kod ispitanika s kompletnom remisijom, a najniže kod onih s progresijom bolesti, dok su koncentracije feritina i sTfR najniže kod ispitanika s kompletnom remisijom, a najviše kod onih s progresijom bolesti, ali bez dobijene statističke značajnosti.

Nije utvrđena značajna razlika u serumskoj koncentraciji gvožđa u odnosu na odgovor na kraju lečenja ($p=0,951$). Podaci su prikazani na grafikonu 8.



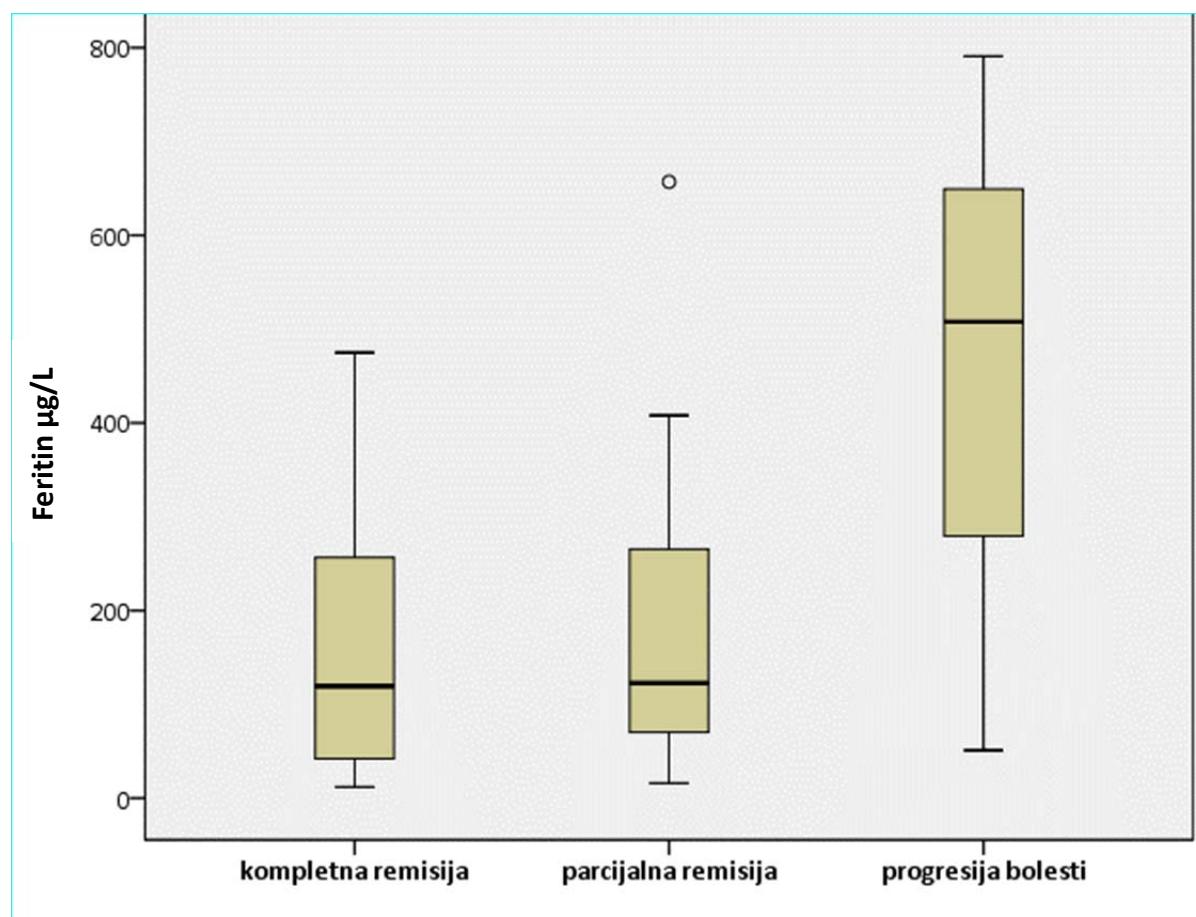
Grafikon 8. Serumska koncentracija gvožđa u odnosu na terapijski odgovor (nakon terapije)

Nije utvrđena značajna razlika u vrednostima transferina u odnosu na odgovor po završetku terapije ($p=0,378$). Podaci su prikazani na grafikonu 9.



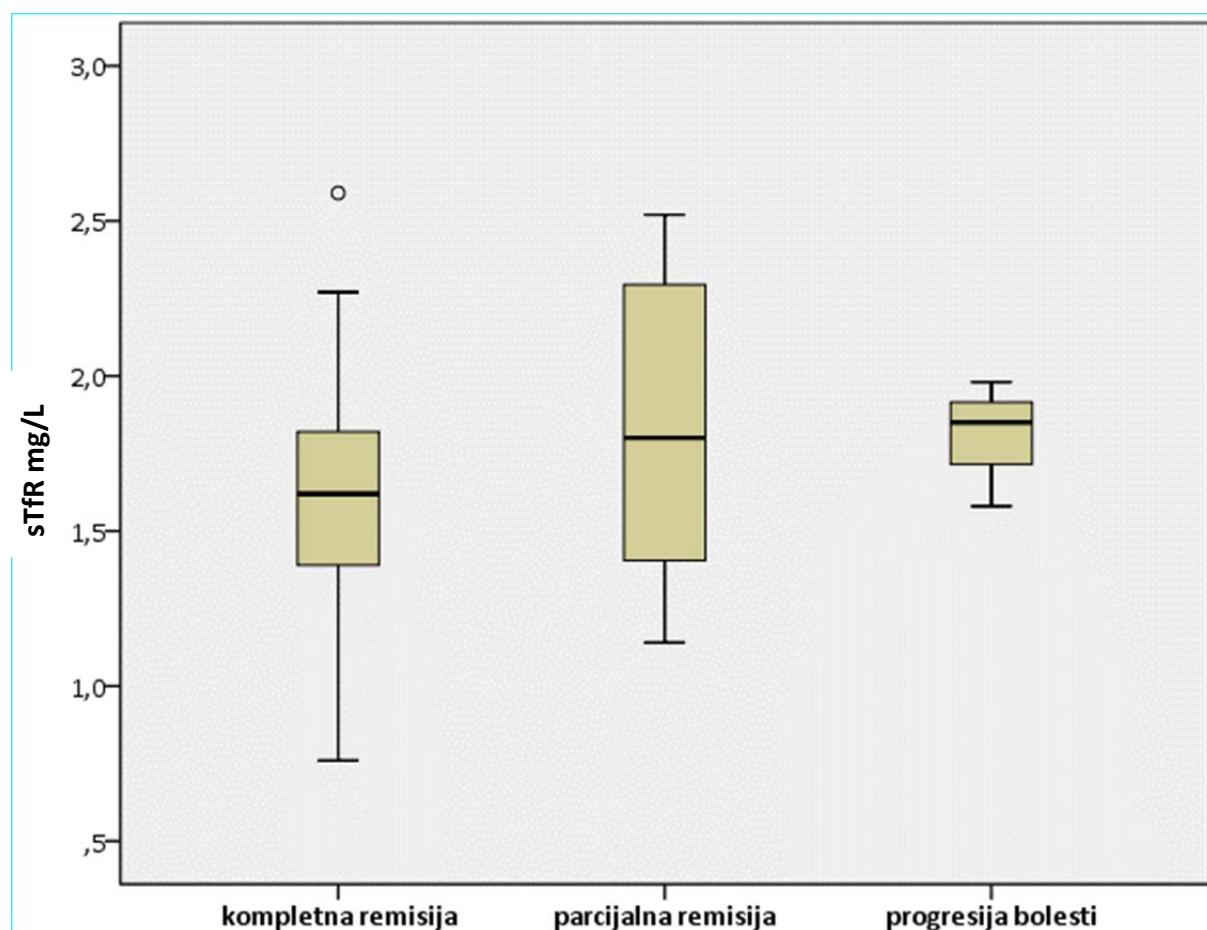
Grafikon 9. Serumska koncentracija transferina u odnosu na terapijski odgovor (nakon terapije)

Nije utvrđena značajna razlika u vrednostima feritina u odnosu na odgovor nakon terapije ($p=0,781$). Podaci su prikazani na grafikonu 10.



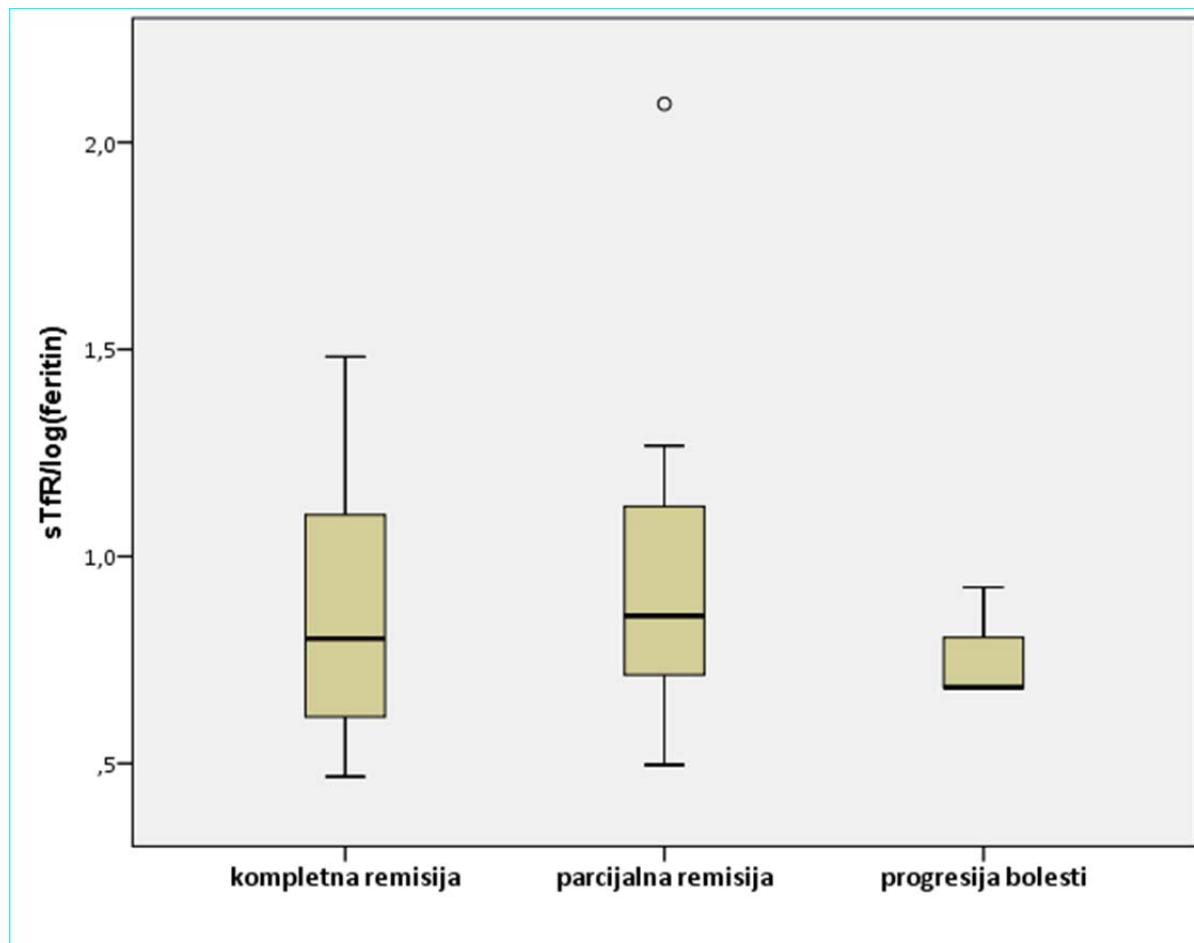
Grafikon 10. Serumska koncentracija feritina u odnosu na terapijski odgovor (nakon terapije)

Nije utvrđena značajna razlika u serumskoj koncentraciji sTfR u odnosu na odgovor po završetku terapije ($p=0,293$). Podaci su prikazani na grafikonu 11.



Grafikon 11. Serumska koncentracija sTfR u odnosu na terapijski odgovor (nakon terapije)

Nije utvrđena značajna razlika u vrednostima indeksa feritina u odnosu na odgovor posle terapije ($p=0,599$). Podaci su prikazani na grafikonu 12.



Grafikon 12. Vrednosti indeksa feritina u odnosu na terapijski odgovor (posle terapije)

4.6.3. MARKERI AKTIVNOSTI BOLESTI I TERAPIJSKI ODGOVOR

Od svih analiziranih markera aktivnosti bolesti (SE, LDH, CRP, $\beta2$ mikroglobulin, fibrinogen, albumin) uključujući GDF-15 i hepcidin utvrđena je statistički značajna razlika u vrednostima fibrinogena ($H=8,944$, $p=0,011$) i brzine sedimentacije ($H=6,682$, $p=0,035$) po završetku terapije u odnosu na terapijski odgovor, pri čemu su vrednosti oba parametra najniže kod ispitanika s kompletnom remisijom, a najviše kod onih s progresijom bolesti. Nije utvrđena značajna razlika u vrednostima analiziranih markera aktivnosti bolesti na sredini terapije u odnosu na terapijski odgovor. Rezultati su prikazani u tabeli 36 (sredina terapije) i tabeli 37 (nakon završetka terapije).

Tabela 36. Brzina SE i serumske koncentracije markera aktivnosti bolesti u odnosu na terapijski odgovor (sredina terapije)

Markeri aktivnosti bolesti	Terapijski odgovor	N	Medijana (interkvartilni rang)
CRP (mg/L)	kompletna remisija	5	1,6 (0,5, 2,5)
	parcijalna remisija	33	3,4 (1,4, 8,3)
	stabilna bolest	2	1,7 (0,3, 3,1)
	Ukupno	40	
LDH (U/L)	kompletna remisija	5	182 (173, 212)
	parcijalna remisija	33	198 (165, 225)
	stabilna bolest	2	218,5 (132, 305)
	Ukupno	40	
$\beta2M$ (mg/L)	kompletna remisija	5	2,33 (1,84, 2,92)
	parcijalna remisija	33	2,49 (2,09, 3,17)
	stabilna bolest	2	3,11 (2,72, 3,49)
	Ukupno	40	
Fibrinogen (g/L)	kompletna remisija	5	4,39 (4,15, 4,55)
	parcijalna remisija	33	4,13 (3,37, 4,85)
	stabilna bolest	2	4,22 (3,88, 4,56)
	Ukupno	40	
Albumin (g/L)	kompletna remisija	5	43,41 (43,4, 44,29)

	parcijalna remisija	33	42,00 (41,30, 45,47)
	stabilna bolest	2	40,55 (37, 44,1)
	Ukupno	40	
SE (mm u 1.h)	kompletna remisija	5	27 (21, 36)
	parcijalna remisija	33	24 (13, 36)
	stabilna bolest	2	25 (20, 30)
	Ukupno	40	
GDF15 (pg/ml)	kompletna remisija	5	760 (740, 1000)
	parcijalna remisija	33	756 (500, 880)
	stabilna bolest	2	368 (256, 480)
	Ukupno	40	
Hepcidin (pg/ml)	kompletna remisija	5	8900 (6540, 9200)
	parcijalna remisija	33	6600 (4000, 7200)
	stabilna bolest	2	8350 (7200, 9500)
	Ukupno	40	

Tabela 37. Brzina SE i serumske koncentracije markera aktivnosti bolesti u odnosu na terapijski odgovor (posle terapije)

Markeri aktivnosti bolesti	Terapijski odgovor	N	Medijana (interkvartilni rang)
CRP (mg/L)	kompletna remisija	22	1,65 (0,80, 2,20)
	parcijalna remisija	15	1,90 (0,75, 3,25)
	progresija bolesti	3	10,50 (6,3, 61,35)
	Ukupno	40	
LDH (U/L)	kompletna remisija	22	213,5 (194, 255)
	parcijalna remisija	15	202 (172,5, 243,5)
	progresija bolesti	3	167 (166,5, 266,5)
	Ukupno	40	
β 2M (mg/L)	kompletna remisija	22	2,14 (1,93, 2,57)
	parcijalna remisija	15	2,72 (2,38, 2,92)
	progresija bolesti	3	2,45 (2,45, 2,62)
	Ukupno	40	
Fibrinogen (g/L)	kompletna remisija	22	3,54 (3,08, 3,81)
	parcijalna remisija	15	4,30 (3,19, 4,60)
	progresija bolesti	3	5,25 (4,81, 5,82)
	Ukupno	40	
Albumin (g/L)	kompletna remisija	22	44,19 (42,85, 47,25)
	parcijalna remisija	15	43,95 (42,09, 46,12)
	progresija bolesti	3	42,22 (41,61, 47,26)
	Ukupno	40	
SE (mm u 1.h)	kompletna remisija	22	14 (11, 16)
	parcijalna remisija	15	36 (15, 49,50)
	progresija bolesti	3	22 (17,50, 46,00)
	Ukupno	40	
GDF15 (pg/ml)	kompletna remisija	22	680 (480, 980)
	parcijalna remisija	15	840 (556, 1010)
	progresija bolesti	3	572 (440, 746)

	Ukupno	40	
Hepcidin (pg/ml)	kompletna remisija	22	6300 (1900, 7000)
	parcijalna remisija	15	6500 (4200, 7020)
	progresija bolesti	3	7040 (6800, 7220)
	Ukupno	40	

5. DISKUSIJA

Istraživanje je obuhvatilo ukupno 71 ispitanika: 40 u grupi kod kojih je bila indikovana, a potom i sprovedena antilimfomska/antileukemijska terapija i 31 u „w&w“ grupi. Žena je bilo više u obe grupe. U grupi lečenih 52,5%, a u „w&w“ 58,1%. Nije postojala signifikantna razlika u polnoj strukturi između dve grupe ispitanika, ali veći procenat ženskih osoba nije bio očekivan s obzirom da je veća učestalost LPN kod osoba muškog pola [203]. Moguće objašnjenje nalazimo u kriterijumima za isključivanje iz istraživanja. Isključene su osobe s komorbiditetima koji su povezani s povišenim vrednostima hepcidina i GDF-15: šećernom bolesti, skorašnjim infarktom miokarda i srčanom insuficijencijom koji su po podacima iz literature u ovim starosnim kategorijama takođe češći kod muškaraca [204, 205].

Iako nije postojala statistički značajna razlika u starosnoj strukturi ispitanici u grupi lečenih su bili mlađi ($55,80 \pm 11,14$ vs. $59,90 \pm 8,53$). Ispod 45 godina je imalo 6 ispitanika (15%) iz grupe lečenih i samo jedan (3,2%) iz „w&w“ grupe. Četvrtina u grupi lečenih i trećina u „w&w“ grupi je imala ≥ 65 godina. Indolentne LPN, prvenstveno HLL su češće u starijoj populaciji, a kako se oboleli od ove vrste LPN, ako su bez simptoma i ne leče očekivan je veći broj starijih ispitanika u ovoj grupi.

U trećem ili četvrtom kliničkom stadijumu bolesti je bilo 67,5% ispitanika iz grupe lečenih i svega 19,3% iz „w&w“ grupe. B simptome nije imao niko u „w&w“ grupi, a pre započinjanja terapije su bili prisutni kod 37,5% lečenih. Infiltracija kostne srži je bila prisutna kod 45% lečenih u odnosu na 71% iz „w&w“ grupe što je bilo statistički značajno ($p=0,029$), ali i očekivano s obzirom da je 19/31 (61,3%) ispitanika imalo HLL, LPN koja podrazumeva infiltraciju u kostnoj srži. Splenomegalija je bila prisutna kod 19 (48,7%) ispitanika u grupi lečenih i 3 (9,7%) u „w&w“ grupi što je bilo visoko statistički značajno ($p<0,001$) i očekivano. Uvećana slezina koja izaziva kompresivne smetnje je indikacija za terapiju kod obolelih od indolentnih LPN, a bila je prisutna i kod 6/13 ispitanika s agresivnom LPN iz grupe lečenih.

Analizom parametara kompletne krvne slike u grupi lečenih vidi se da broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, vrednost hematokrita i broj retikulocita nije bio statistički značajno promenjen u periodu pre, na sredini i po završetku terapije. Broj leukocita, apsolutni broj limfocita i neutrofilnih granulocita je niži na sredini i posle završetka terapije

u odnosu na broj pre započinjanja lečenja ($p<0,001$). Jedan od ciljeva primene imunohemoterapije ili hemoterapije kod obolelih od LPN sa limfocitozom i jeste normalizacija broja limfocita. Međutim, terapija nije strogo selektivna i vrlo često se kao posledica lečenja javlja neutropenija različitog stepena. Pored toga, oboleli od agresivnih LPN, prvenstveno cHL pre započinjanja lečenja mogu da imaju reaktivnu leukocitozu sa prisutnim većim brojem neutrofilnih granulocita što je bio slučaj i kod 5/6 ispitanika s ovom bolesti u našem istraživanju. Nakon primljenih prvih nekoliko ciklusa terapije (2 do 4), na prvoj reviziji nalazimo normalan apsolutni broj leukocita i neutrofilnih granulocita i ovaj rezultat se zadržava i na drugoj reviziji čak i kod dva ispitanika kod kojih je nakon prve revizije kad je postignut parcijalni odgovor (PR), došlo do progresije bolesti (PD). Broj eritrocita, koncentracija hemoglobina i vrednost hematokrita je bila najniža na prvoj reviziji posle primljene dve do četiri terapijske kure, a potom nešto viša na kraju terapije, ali i dalje niža u odnosu na vreme pre započinjanja lečenja, no ova razlika nije bila statistički značajna. Drugi autori takođe prikazuju manji broj eritrocita, nižu koncentraciju hemoglobina i nivo hematokrita nakon primene hemoterapije, a stepen sniženja zavisi od mijelotoksičnosti primenjenih lekova [206-208]. Nalazimo da su eritrocitni indeksi MCV i MCH značajno viši nakon lečenja u odnosu na inicijalno rađene: za MCV nivo statističke značajnosti $p=0,044$, za MCH $p=0,034$. Ovo je u skladu s istraživanjima drugih i objašnjenje se nalazi u hemoterapijom indukovanim mogućem deficitu folata, vitamina B9 ili B12 [206, 209]. Broj retikulocita nije bio statistički značajno promenjen ni u jednoj grupi. S obzirom na supresivni efekat citostatske terapije na eritrocitopoezu moglo se očekivati da broj retikulocita u grupi lečenih na kraju ispitivanja bude niži u odnosu na inicijalni. Bitnije nepromenjene vrednosti parametara kompletne i diferencijalne krvne slike u „w&w“ grupi na kraju posmatranja u odnosu na inicijalne, ne iznenađuju s obzirom da u ovoj grupi nije bilo primene terapije, a ispitanici kod kojih je došlo do progresije bolesti u posmatranom periodu su isključeni iz ove grupe i pre primene hemoterapije ukoliko su ispunjavali kriterijume za uključenje uključeni su u grupu lečenih.

Vrednosti posmatranih parametara metabolizma gvožđa pre terapije, tokom terapije i po završetku lečenja: Fe, transferin, feritin, sTfR, indeks feritina nisu se statistički značajno razlikovali u grupi lečenih. Uočavamo da su vrednosti Fe i transferina najviše po završetku lečenja. Medijana koncentracije feritina pre terapije je 99,65 (IQ 46,8-199,2), na sredini lečenja 162,3 (IQ 81,25-272,2) i po završetku terapije 123,8 (IQ 48,75-297,25), ovo je bilo

na granici statističke značajnosti ($Z=1,868$, $p=0,062$), kao i razlika koja se primećuje u koncentraciji sTfR dobijena u tri merenja: pre terapije medijana je 1,52 (IQ 1,2-1,8), na prvoj reviziji 1,85 (IQ 1,32-2,06) i na drugoj reviziji 1,68 (IQ 1,4-2,03) ($Z=1,929$, $p=0,054$). Radi preciznijeg uvida u promene ovih parametara posmatrali smo i promenu parametara odvojeno kod lečenih ispitanika s agresivnim LPN i lečenih ispitanika s indolentnim LPN. Nakon terapije bila je signifikantno viša koncentracija serumskog Fe ($p=0,025$) i transferina ($p=0,007$) u podgrupi s agresivnim LPN, dok nije postojala signifikantna razlika u koncentracijama pre i nakon terapije kod ispitanika s indolentnim LPN. Koncentracija feritina je bila signifikantno viša nakon terapije ($p=0,009$) u podgrupi s indolentnim LPN. Sartori i saradnici opisuju inicijalno povećanje serumske koncentracije Fe i feritina tokom i neposredno nakon hemoterapije cisplatinom i objašnjenje nude u smanjenoj utilizaciji Fe zbog suprimiranja eritropoeze, a i uticajem na ćelije retikuloendotelskog sistema i oslobođanjem Fe u cirkulaciju [210]. Miya i koautori porast serumske koncentracije Fe dovode u vezu s izraženijom postterapijskom emezom i statistički značajniji porast nalaze kod visokoemetogenih lekova [211]. Međutim, u tom istraživanju merenja su vršena drugog i osmog dana nakon hemoterapije te, bez obzira što se u terapiji agresivnih LPN više koriste lekovi s većim emetogenim potencijalom ne možemo sa sigurnošću ovo objašnjenje primeniti i na naše istraživanje, pogotovo jer je u našem istraživanju serumska koncentracija transferina bila signifikantno izraženije povišena, dok se u navedenom radu objašnjenje za emetogenu vezu nalazi u visokoj koncentraciji Fe koje nije vezano za transferin i time dovodi do slike koja se viđa kod trovanja gvožđem [211]. Grupa japanskih autora nalazi signifikantno povećanje vrednosti serumskog gvožđa i hepcidina nakon primene hemoterapije kod obolelih od karcinoma kolona, ali bez signifikantne promene u koncentraciji feritina i sTfR [212]. Objašnjenje takođe vide u smanjenom preuzimanju Fe zbog suprimirane eritropoeze, a potom kompenzatornog povećanje hepcidina radi sprečavanja daljeg povećanja serumske koncentracije Fe, pri čemu povišene vrednosti hepcidina povratnom spregom dovode do sniženja koncentracije IL-6 [212]. Kell i Pretorius postavljaju pitanje porekla feritina u serumu i ukazuju na činjenicu da nema jasnih dokaza da je feritin nastao sekrecijom, ali da ih je dosta koji ukazuju da je poreklom iz razorenih ćelija. Isti autori pitaju i gde je i na koji način serumski feritin izgubio deo gvožđa koji se u njemu nalazio s obzirom da ga sadrži značajno manje nego intraćelijski feritin [213]. Ako razmišljamo na taj način, onda bismo povećanje koncentracije Fe i feritina

nakon hemoterapije mogli objasniti razaranjem tumorskih ćelija, a i posledičnim oštećenjem zdravih.

U „w&w“ grupi je postojala statistički signifikantna razlika u serumskoj koncentraciji sTfR između dva merenja. Na kraju praćenja vrednosti su bile niže od inicijalnih, drugi biomarkeri metabolizma Fe nisu bili signifikantno promenjeni. Objašnjenje se može nalaziti ili u korigovanju sporadične latentne sideropenije kod ispitanika kod kojih je dijagnostikovana s obzirom da predstavlja, iako retko korišćen, najosetljiviji parametar deficita Fe [214-216]. Pored toga može biti i odraz razlike u eritropoeznoj aktivnosti s obzirom da eritroblasti eksprimiraju TfR 1, a kod veće produkcije eritrocita dolazi i do jačeg eksprimiranja ovog receptora zbog povećanih potreba za Fe. Sazrevanjem eritroblasta se odvaja i nalazimo ga u cirkulaciji kao sTfR i predstavlja meru ukupnih TfR [214, 216-218]. Ako bismo navedenim literaturnim podacima pokušali da objasnimo naš rezultat mogli bi zaključiti da se eritropoezna aktivnost obolelih s indolentnim LPN i bez primene terapije tokom vremena smanjila. Međutim, s obzirom na broj ispitanika i dužinu praćenja, te da je broj retikulocita u istom periodu nepromenjen ovo ostaje samo moguće obrazloženje, a ne i tvrdnja zasnovana na dokazima.

Od posmatranih standardnih laboratorijskih parametara inflamatorne i aktivnosti bolesti: brzine SE, serumske koncentracije CRP, LDH, β 2mikroglobulina, albumina i plazmatske koncentracije fibrinogena u grupi lečenih je postojala signifikantna razlika u vrednostima pre i nakon terapije samo za β 2mikroglobulin koji je bio niži nakon primjenjenog lečenja ($p<0,001$). Serumska koncentracije GDF-15 je u ovoj grupi nakon primjenjene terapije bila viša, što je bilo statistički značajno ($p=0,027$), a serumska koncentracija hepcidina je bila niža nego inicijalno izmerena ($p=0,011$). Ovi parametri su u „w&w“ grupi bili bez statistički značajne razlike u dva merenja.

Kad smo iste markere posmatrali odvojeno u dve podgrupe lečenih uočeno je da je u podgrupi s agresivnim LPN brzina SE bila statistički značajno niža ($p=0,033$), dok je serumska koncentracija albumina bila viša ($p=0,013$) po završenom lečenju. U grupi lečenih sa indolentnim LPN nakon primljene terapije bile su statistički signifikantno niže vrednosti β 2mikroglobulina ($p<0,001$), hepcidina ($p=0,002$) i albumina ($p=0,01$), dok su statistički značajno bile više vrednosti GDF-15 ($p=0,028$) i fibrinogena ($p=0,001$). U prognostičke skorove koji se inicijalno, nakon postavljanja dijagnoze LPN koriste radi procene rizika i

planiranja terapije i kod agresivnih i kod indolentnih LPN ulaze pol i starost, ali se laboratorijski parametri razlikuju. Serumska koncentracija albumina i brzina SE su analize koje se koriste pri proceni rizika kod Hočkinovog limfoma, LDH ulazi u skorove i kod agresivnih i kod indolentnih limfoma, a β 2mikroglobulin kod indolentnih limfoma, multiplog mijeloma i hronične limfocitne leukemije [4-6]. S obzirom na to, očekivano je da nakon primjenjenog lečenja, ako je došlo do poboljšanja stanja brzina SE, LDH i β 2 mikroglobulin budu niži, a serumska koncentracija albumina viša. Plazmatska koncentracija fibrinogena može biti odraz inflamatorne aktivnosti, ali i koagulabilnosti, tako da se nakon lečenja u različitim hematološkim i solidnim malignitetima menja na različite načine [219-225]. Postizanje remisije najčešće dovodi do smanjenja zapaljenske aktivnosti i time snižavanja njegove koncentracije u plazmi, a s druge strane u malignitetima koji su praćeni hiperkoagulabilnošću i utroškom fibrinogena smanjivanje tumorske mase i eradicacija bolesti smanjiće i njegovu potrošnju te će se niže vrednosti fibrinogena nastale zbog potrošne koagulopatije nakon lečenja normalizovati. Pored toga nalazimo radove u kojima se opisuje prisustvo fibrinogena u mikrookolini tumorskih ćelija i njegova uloga u razvoju metastaza u nekim tumorima dojke, pluća, digestivnog trakta [226-229]. S obzirom da su indolentne limfoproliferativne bolesti neizlečive i da je u ovoj podgrupi bilo manje postignutih kompletnih remisija, a da je broj cirkulišućih leukocita i limfocita bio veći možda bi moguće objašnjenje za višu plazmatsku koncentraciju fibrinogena nakon terapije kao i za niži nivo albumina trebalo tražiti u povećanju inflamacije nakon lize većeg broja limfocita. U prilog ovome bi moglo govoriti i povećanje drugih praćenih inflamatornih parametara: brzine SE, serumske koncentracije LDH i CRP koji su u ovoj podgrupi nakon terapije takođe bili viši u odnosu na inicijalne, ali bez dobijene statističke značajnosti. S druge strane serumska koncentracija GDF-15 je u obe podgrupe nakon primjenjene terapije veća od inicijalne i moguće objašnjenje nalazimo u ulozi ovog citokina u ograničavanju inflamatornog odgovora, a u skladu s mišljenjem Luana i saradnika da se radi o inflamaciji indukovanim centralnom medijatoru tkivne tolerancije [143].

Nismo našli statistički značajnu korelaciju serumske koncentracije GDF-15 s brojem leukocita, neutrofilnih granulocita, monocita i limfocita ni u grupi lečenih, ni u „w&w“ grupi, ni inicijalno, niti na kontrolnim merenjima. Pojedini autori su ispitujući ulogu GDF-15 u različitim bolestima i korelirajući ga sa inflamatornim parametrima radili i korelaciju s brojem leukocita, ali su dobijeni rezultati nekonzistentni. Analizom korelacije GDF-15 s parametrima crvene krvne slike nalazimo pozitivnu korelaciju u grupi lečenih samo na

prvoj reviziji, odnosno nakon primljene 2 do 4 terapijske kure sa MCHC ($p=0,029$). U „w&w“ grupi postoji statistički značajna negativna korelacija GDF-15 sa brojem eritrocita i vrednostima hematokrita inicijalno, a na kontrolnim pregledima sa brojem eritrocita ($p=0,048$), kad nalazimo i pozitivnu korelaciju s MCV ($p=0,026$) i MCH ($p=0,043$). Negativnu korelaciju GDF-15 s vrednostima Hg i Htc prijavljuju autori koji su ispitivali vezu ovog citokina s anemijom kod obolelih od srčane i bubrežne insuficijencije, multiplog mijeloma [230-233], talasemije i mijelodisplaznog sindromu [80, 234].

Cui i saradnici ispitujući serumske biomarkere metabolizma gvožđa i eritropoezu kod obolelih od mijelodisplaznog sindroma koji nisu primali transfuzije eritrocita nalaze pozitivnu korelaciju koncentracije GDF-15 sa sTfR i saturacijom transferina [234]. U radu ovih autora se navodi i pozitivna korelacija koncentracije GDF-15 sa brojem eritroblasta u kostnoj srži, odnosno i GDF-15 i sTfR ovde predstavljaju surogat markere nivoa eritropoeze. Theurl i koautori su poredili GDF-15, hepcidin i biomarkere metabolizma gvožđa kod sideropenijske anemije, anemije u hroničnoj bolesti i anemije u hroničnoj bolesti s apsolutnim deficitom gvožđa i kontrolnom grupom zdravih. Nisu našli nikakvu korelaciju GDF-15 s bilo kojim parametrom u kontrolnoj grupi neanemičnih, dok je postojala negativna korelacija s koncentracijom Hg i pozitivna sa sTfR kod sideropenijske anemije [233]. Kod anemije u hroničnoj bolesti postojala je signifikantna pozitivna korelacija sa saturacijom transferina, a kod anemije u hroničnoj bolesti s apsolutnim deficitom Fe, kao i kod sideropenijske anemije nađena je pozitivna korelacija sa sTfR. Naši rezultati su drukčiji, statistički značajnu negativnu korelaciju koncentracija GDF-15 i sTfR i GDF-15 s indeksom feritina nalazimo u „w&w“ grupi pri kontrolnom merenju. Moguće objašnjenje vidimo u tome što su nam ispitanici bili bez anemije, pri ovim merenjima i koncentracije sTfR su bile niže, što može ukazivati i na smanjenu eritropoeznu aktivnost, a i da nije postojao deficit Fe, a s druge strane GDF-15 je kod obe grupe naših ispitanika verovatnije u vezi sa stepenom inflamacije nego nivoom eritropoeze. Rezultati našeg istraživanja su uslovjeni i kriterijumima isključenja. Da bismo dobijene rezultate mogli povezati prvenstveno s LPN isključeni su svi sa stanjima koja se dovode u vezu sa povišenim vrednostima hepcidina i GDF-15, kao i svi koji su u tri meseca pre uključenja u istraživanje primali transfuzije derivata krvi ili preparate Fe što je dovelo do toga da su većinu u obe grupe činili ispitanici bez anemije. Smatramo da iz istih razloga u našem istraživanju nije postojala ni statistički značajna korelacija hepcidina sa parametrima krvne slike ni u jednoj grupi ispitanika. Ispitujući značaj hepcidina u anemiji kod obolelih od

DBKL Tissi s koautorima takođe ne nalazi statistički značajnu korelaciju hepcidina sa koncentracijom hemoglobina [87]. S druge strane drugi autori prikazuju statistički značajnu negativnu korelaciju serumskih koncentracija hepcidina i hemoglobina [86, 98, 99]. Hohaus navodi više vrednosti hepcidina kod obolelih od Hočkinovog limfoma u odnosu na kontrolnu grupu zdravih nezavisno od prisustva anemije, ali statistički značajnu negativnu korelaciju hepcidina s koncentracijom hemoglobina nalazi samo u grupi anemičnih [85, 86]. Pardanani sa saradnicima prikazuje negativnu korelaciju hepcidina sa koncentracijom hemoglobina kod obolelih od mijelofibroze s anemijom i koncentracijom hemoglobina manjom od 100g/L [235]. Nalazimo statistički značajnu pozitivnu korelaciju serumske koncentracije hepcidina i feritina u obe grupe ispitanika pri svim merenjima, kao i statistički značajnu negativnu korelaciju hepcidina s indeksom feritina ($s\text{TfR}/\log \text{feritina}$) u sva tri merenja u grupi lečenih i na kraju praćenja u „w&w“ grupi. Ovi rezultati se poklapaju s istraživanjima drugih kako u limfoproliferativnim [83-87, 98, 99] tako i u drugim klonskim hematološkim bolestima [235, 236]. Santini i koautori u svom istraživanju nivoa hepcidina u različitim podtipovima mijelodisplastičnog sindroma nalaze pozitivnu korelaciju u refrakternoj anemiji s prstenastim sideroblastima (RARS) i 5q- sindromu, ali ne i u hroničnoj mijelomonocitnoj leukemiji (CMMnL) i refrakternoj anemiji s ekscesom blasta (RAEB) [236]. Grupa kineskih autora nalazi takođe statistički značajnu korelaciju hepcidina s feritinom, a negativnu s koncentracijom hemoglobina i $s\text{TfR}$ u grupi ispitanika s akutnom leukemijom [237].

Nalazimo visoko statistički značajnu negativnu korelaciju serumske koncentracije Fe sa CRP, brzinom SE i plazmatskom koncentracijom fibrinogena i nešto slabiju pozitivnu korelaciju koncentracija Fe, transferina i $s\text{TfR}$ sa koncentracijom albumina pre terapije u grupi lečenih. U istoj grupi po završetku lečenja postoji pozitivna korelacija koncentracije transferina s koncentracijom albumina i negativna s brzinom SE i fibrinogenom. Ovi rezultati, kao i dobijena statistički značajna korelacija feritina sa koncentracijom LDH i fibrinogenom u plazmi u grupi lečenih nakon terapije je očekivana ako imamo u vidu prethodno rečeno o metabolizmu gvožđa u inflamaciji i LPN [85, 86]. S druge strane imajući u vidu opisani uticaj IL-6 na regulaciju hepcidina i povezanost ovog interleukina sa CRP očekivali smo, ali nismo dobili pozitivnu korelaciju feritina s CRP. S druge strane ni u grupi lečenih ni u „w&w“ grupi hepcidin nije korelirao ni s jednim od standardnih inflamatornih parametara. Nemamo objašnjenje za pozitivnu korelaciju $s\text{TfR}$ s $\beta 2$ mikroglobulinom u grupi lečenih na kraju terapije, ali nalazimo u literaturi da može i bez

prisustva deficit-a Fe biti povišen u HL i da može predstavljati parametar aktivnosti bolesti [83, 238]. Singh i saradnici su analizirali ekspresiju transferinskih receptora na 60 uzoraka tkiva, po 30 s reaktivnim limfadenitisom i 30 s LPN i visoku ekspresiju nalaze u 75% agresivnih limfoma, uključujući svih 9 uzoraka HL [238]. Ovi rezultati se uklapaju u ranije spomenutu veću ekspresiju TfR 1 na površini maligne u odnosu na normalnu ćeliju [28, 50] što dovodi do toga da maligna ćelija preuzima veću količinu Fe. Imajući ovo na umu, ovakvu korelaciju u našem istraživanju bismo očekivali pre, a ne nakon terapije. Ograničavajući faktor za donošenje jasnih zaključaka je i heterogenost naše grupe lečenih s obzirom da je pored ispitanika s agresivnim LPN obuhvatila i one s indolentnim bolestima koji su imali indikaciju za terapiju. Visoka statistički značajna pozitivna korelacija GDF-15 s β 2mikroglobulinom pre i nešto slabija nakon primene terapije u našoj grupi lečenih je u saglasnosti s rezultatima drugih [183, 232, 239]. Corre i saradnici na grupi od 131 pacijenta s multiplim mijelomom nalaze pozitivnu korelaciju GDF-15 s β 2mikroglobulinom, koncentracijom kreatinina i kalcijuma, negativnu s koncentracijom hemoglobina i albumina, ali ne nalaze korelaciju s brojem plazmocita u kostnoj srži, niti s koncentracijom LDH i CRP [183]. Zhao i Yang kod svojih ispitanika ne nalaze pozitivnu korelaciju GDF-15 s koncentracijama β 2 mikroglobulina, M proteina i kreatinina, ali nalaze negativnu korelaciju s vrednostima hemoglobina. Pritom, u grupi koja je nakon primljene treće terapijske kure smanjila koncentraciju M proteina za $>50\%$ nalaze signifikantno smanjenu koncentraciju GDF-15, za razliku od onih kod kojih nije došlo do PR gde se serumska koncentracija GDF-15 povećala [186].

Testirajući hipotezu o razlici u serumskoj koncentraciji feritina, GDF-15 i hepcidina između dve grupe naših ispitanika dolazimo do zaključka da su se parametri metabolizma Fe pokazali kao osjetljiviji od GDF-15. Na početku posmatranja postojala je statistički visoko značajna razlika u serumskoj koncentraciji Fe i transferina između dve grupe, u grupi ispitanika kod kojih je bila indikovana terapija vrednosti ovih biomarkera su bile niže. Statistički značajna, ali nešto manje izražena razlika u serumskoj koncentraciji Fe je postojala i nakon primenjene terapije. U grupi lečenih su ove vrednosti i dalje bile niže u odnosu na „w&w“ grupu. Serumska koncentracija feritina je bila viša u grupi lečenih i inicijalno i po završetku lečenja, ali je ova razlika bila statistički značajna samo na kraju ispitivanja. U grupi lečenih je po završetku terapije koncentracija sTfR bila statistički značajno viša u odnosu na grupu ispitanika koji su praćeni bez terapije. Inicijalno, pre

započinjanja terapije postoji statistički značajna razlika u koncentraciji Fe između ispitanika obolelih od agresivnih LPN u odnosu na obolele s indolentnim LPN, kao i između ispitanika iz svake od ovih podgrupa u odnosu na „w&w“ grupu. Smatramo da ove razlike odražavaju i suštinske razlike između dve grupe. Naime kod obolelih od LPN s izraženim simptomima i velikom tumorskom masom očekujemo i veće zadržavanje Fe u ćelijama monocitno makrofagnog sistema, veću koncentraciju feritina, a niže serumsko Fe i transferin. Serumske koncentracije GDF-15 i hepcidina iako nešto više i inicijalno i na kraju posmatranja u grupi lečenih nisu bile statistički značajno različite između dve grupe. U obe grupe su na kraju ispitivanja bile nešto više u odnosu na inicijalne vrednosti. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji GDF-15 i hepcidina između obolelih koji zahtevaju terapiju i obolelih koji su na „watch and wait“ režimu ni kad smo analizirali odvojeno rezultate dobijene u podgrupama lečenih. Moguće je da je na manju razliku u koncentraciji GDF-15 između dve grupe uticala i veća starost ispitanika u „w&w“ grupi s obzirom na porast koncentracije ovog citokina s godinama života [200,202].

Razdvajanje podataka po podgrupama lečenih s agresivnim i lečenih s indolentnim LPN i poređenje svake od ovih podgrupa s „w&w“ grupom pokazalo je i očekivane razlike u standardnim parametrima inflamatorne aktivnosti koji ulaze u prognostičke skorove. Statistički je signifikantno veća inicijalna koncentracija $\beta2M$ u podgrupi lečenih s indolentnim LPN nego u „w&w“ grupi, dok se statistički značajno međusobno razlikuju koncentracije CRP, albumina, fibrinogena i brzine SE i između dve podgrupe lečenih i između podgrupe s agresivnim LPN i „w&w“ grupe. Naime, brzina SE, koncentracija CRP i fibrinogena je statistički značajno veća kod lečenih s agresivnim LPN u odnosu na lečene od indolentnih LPN i u odnosu na ispitanike u „w&w“ grupi. Serumska koncentracija albumina je signifikantno niža u podgrupi lečenih s agresivnim LPN u odnosu na podgrupu lečenih s indolentnim LPN, a i na „w&w“ grupu.

Pokušali smo da sagledamo da li koncentracija ispitivanih standardnih laboratorijskih markera aktivnosti bolesti, ali i biomarkera metabolizma Fe, GDF-15 i hepcidina u vreme prve revizije i nakon terapije korelira s terapijskim odgovorom. Na prvoj reviziji nakon primljene dve do četiri terapijske kure 5/40 je bilo u kompletnoj remisiji, 2/40 je imalo stabilnu bolest, a 33/40 je imalo parcijalni odgovor, nijedan od ispitivanih laboratorijskih parametara na sredini terapije nije korelirao s postignutim odgovorom. Po završetku lečenja 19 ispitanika je poboljšalo odgovor, odnosno 17 ih je iz parcijalne prešlo u kompletну

remisiju, a dvoje sa stabilnom bolesti je postiglo parcijalni odgovor, kod troje ispitanika smo imali pogoršanje u odnosu na prvu reviziju, odnosno iz parcijalnog odgovora je došlo do progresije bolesti. Po završetku lečenja imali smo 22/40 ispitanika u kompletnoj remisiji, 15/40 u parcijalnoj i 3/40 s progresijom bolesti. Brzina SE i plazmatska koncentracija fibrinogena su statistički značajno korelirali sa terapijskim odgovorom, najniže vrednosti su imali ispitanici u kompletnoj remisiji, a najviše oni sa progresijom bolesti. Iako analiziranjem nivoa biomarkera gvožđa u odnosu na odgovor nakon terapije zapažamo da su vrednosti gvožđa i transferina najviše kod ispitanika sa kompletном remisijom, a najniže kod obolelih s progresijom bolesti, dok su vrednosti feritina i sTfR najniže kod ispitanika sa kompletnom remisijom, a najviše kod onih sa progresijom bolesti, ali statistički nije bilo značajne razlike. Razlog za ovo je ujedno i nedostatak ovog istraživanja, a ogleda se u ograničenom broju ispitanika i heterogenosti grupe lečenih te malom broju ispitanika sa CR i SD na sredini, odnosno PD na kraju terapije te adekvatna korelacija nije moguća. S druge strane, smatramo da smo nalaženjem pozitivne korelacije GDF-15 s β 2M u grupi lečenih i pre i nakon terapije dali dovoljno osnova za buduće istraživanje značaja GDF-15 prvenstveno u grupi indolentnih LPN koji imaju indikaciju za započinjanje lečenja. Opisanim korelacijama biomarkera metabolizma Fe sa standardnim laboratorijskim markerima inflamatorne aktivnosti ćemo se i u budućnosti baviti s obzirom na čestu dilemu koju u kliničkom radu imamo u pogledu lečenja anemije kod obolelih koji su na terapiji zbog LPN..

6. ZAKLJUČAK

1.
 - a. Ne postoji značajna korelacija GDF-15 sa brojem leukocita i monocita kod naših ispitanika.
 - b. Nedostatak korelacije hepcidina s brojem eritrocita, koncentracijom hemoglobina, hematokritom i brojem retikulocita u našem istraživanju posledica je većeg broja ispitanika bez anemije u obe grupe, a zbog strogih kriterijuma isključivanja s ciljem da se dobijeni rezultati povežu isključivo s LPN.
 - c. Koncentracije hepcidina pozitivno korelira s koncentracijom feritina u obe grupe ispitanika.
2.
 - a. Pozitivna korelacija koncentracije feritina sa LDH i fibrinogenom i negativna korelacija serumske koncentracije transferina s koncentracijom CRP, fibrinogenom i brzinom SE u grupi ispitanika koji imaju indikaciju za lečenje mogla bi biti osnova za dalje istraživanje prognoznog značaja ovih biomarkera kod obolelih od LPN kod kojih je indikovana terapija.
 - b. Ne postoji korelacija hepcidina s markerima aktivnosti LPN ni pre ni posle terapije što navodi na zaključak da određivanja koncentracije hepcidina kod obolelih od LPN bez anemije ne bi bilo klinički značajno
 - c. Statistički signifikantna pozitivna korelacija koncentracije GDF-15 s beta 2 mikroglobulinom i pre i posle lečenja, kao i s koncentracijom fibrinogena pre započinjanja terapije, ukazuje na moguće mesto ovog markera u proceni rizika kod obolelih, prvenstveno od indolentnih LPN kod kojih je indikovano lečenje.
 - d. Ne postoji statistički značajna korelacija koncentracije feritina, hepcidina i GDF-15 sa standardnim laboratorijskim parametrima aktivnosti bolesti u grupi ispitanika kod kojih nije indikovano lečenje.
3.
 - a. Značajno niže serumske koncentracije Fe i transferina u grupi kod koje je indikovano lečenje u odnosu na grupu nelečenih, kao i značajno niža koncentracija Fe kod obolelih s agresivnim u odnosu na obolele s indolentnim LPN pre terapije, kao i obolelih s indolentnim LPN koji imaju indikaciju za lečenje u odnosu na obolele kod kojih terapija nije indikovana mogu biti u vezi s veličinom tumorske mase i agresivnošću LPN.
 - b. Nalazimo značajno više vrednosti feritina i sTfR kod ispitanika koji su primili terapiju u odnosu na nelečene, kao i veće koncentracije feritina i

sTfR nakon primljene terapije u odnosu na inicijalne vrednosti u grupi lečenih što može ukazivati na vezu sa stepenom inflamacije i aktivnosti LPN, ali i na uticaj primenjene terapije.

- c. Nepostojanje značajne razlike u koncentraciji GDF-15 između dve grupe ispitanika, a da pritom postoji signifikantna povezanost s β 2 mikroglobulinom i pre i nakon terapije u grupi lečenih i fibrinogenom pre lečenja verovatno ukazuje da se ne može shvatiti kao marker aktivnosti LPN, ali može biti pokazatelj karakteristika obolelog.
 - d. Nedostatak razlike u koncentraciji hepcidina između ispitanika sa i bez indikacije za terapiju verovatno je posledica malog broja ispitanika s anemijom u obe grupe.
- 4.
- a. Ne postoji statistički signifikantna razlika u koncentraciji biomarkera metabolizma Fe, GDF-15 i hepcidina u odnosu na terapijski odgovor. Više su vrednosti serumskih koncentracija Fe i transferina, a niže feritina i sTfR kod ispitanika kod kojih je postignut terapijski odgovor, parcijalni ili kompletни, u odnosu na ispitanike s progresijom bolesti, ali bez statističke značajnosti. Heterogenost grupe lečenih i mali broj ispitanika s progresijom bolesti, ne dozvoljava donošenje zaključka, ali sugerise potrebu za budućim istraživanjem na većem broju ispitanika.
 - b. Na kraju terapije postoji signifikantna razlika u brzini sedimentacije i plazmatskoj koncentraciji fibrinogena u odnosu na terapijski odgovor. Ispitanici koji su u kompletnoj remisiji imaju najniže, a ispitanici sa progresijom bolesti najviše vrednosti brzine sedimentacije i plazmatske koncentracije fibrinogena.

7. LITERATURA

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375-90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26980727; PMCID: PMC4874220.
2. Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 607-11.
3. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for Initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059–68.
4. Srpska limfomska grupa. Vodič za dijagnostiku i lečenje zrelih B čelijskih neoplazmi i Hočkinovog limfoma. 2017; <https://www.slg.rs>
5. The ESMO Clinical Practice Guidelines on Hematological Malignancies. <https://www.esmo.org>
6. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. <https://www.nccn.org>
7. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et all. Revised Response Criteria For Malignant Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:579-86.
8. Younes A, Hilden P, Coiffier B, Hagenbeek A, Salles G, Wilson W, et al. International Working Group consensus response evaluation criteria in lymphoma (RECIL 2017). *Annals of Oncology* 2017; 28: 1436-47.
9. NCCN Guidelines Version 1.2020. Diffuse Large B-Cell Lymphoma 01/22/20 National Comprehensive Cancer Network (NCCN) cyted 6/23/2020
10. Eichenauer D.A, Aleman B.M.P, Andre M, Federico M, Hutchings M, Ilidge T, et al. Hodgkin Lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis/treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2018; 29(4): 19-29.
11. NCCN Guidelines Version 2.2020. Hodgkin Lymphoma 04/17/20 National Comprehensive Cancer Network (NCCN) cyted 23/6/2020.

12. NCCN Guidelines Version 4.2020. Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma 12/20/19.2019 National Comprehensive Cancer Network (NCCN) cyted 23/6/2020.
13. Oken M, Creech R, Tormey D, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5:649-55.
14. Lin J.C. Approach To Anemia In The Adult And Child in Hematology: Basic Principles and Practice, 7th Edition 2018, 458-67. Hoffman R, Benz E.J. Jr....Syed Ali Abutalib, cyted 2.8.2020. <https://doi.org/10.1016/0978-0-323-35762-3.00034-2>
15. Birgeland G, Gascon P, Ludwig H. Evaluation of anaemia in patients with multiple myeloma and lymphoma: findings of the European Cancer Anaemia Survey. *Eur J Haematol* 2006; 77: 378-86.
16. Hill Q.A, Stamps R, Massey E, Graingen J.D, Provan D, Hill A. British Society for H. The diagnosis and management of primary autoimmune haemolytic anaemia. *Br.J.Haematol*.2017; 176:395-411.
17. Hill Q.A, Hill A, Berentsen S. Defining autoimmune haemolytic anemia: A systematic review of the terminology used for diagnosis and treatment. *Blood Adv*.2019; 3: 1897-906.
18. Vitale C, Montalbano M.Ch, Salvetti Ch, Boccelato E, Griaggio V, Boccadoro M andCoscia M. Autoimmune Complications in Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Targeted Drugs. *Cancers (Basel)*.2020; 12(2):282 doi 10.3390/Cancers12020282 cyted 12.8.2020.
19. Manusow D, Weinerman BH. Subsequent neoplasia in chronic lymphocytic leukemia. *JAMA* 1975; 232: 267-9.
20. Greene MH, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Subsequent cancer in patients with chronic lymphocytic leukemia: A possible immunologic mechanism. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 337-40.
21. Tsimberidou AM, WenS, McLaughlin P, O'Brien S, Wierda WG, Lerner S et all. Other Malignancies in Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27(6):904-10.
22. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal*. 2012; 24:981-90.

23. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(7):579-91.
24. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 2004; 10 Suppl:18-25.
25. Shukla, V., Mishra, S. K., & Pant, H. C. Oxidative stress in neurodegeneration. *Advances in pharmacological sciences.* 2011;572634.
26. Paravicini TM, Touyz RM, Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular Research* 2006; 71 (2), 247–58.
27. Haigis MC, Yankner BA. The aging stress response. *Mol Cell.* 2010; 40(2):333-44.
28. Bogdan RA. Miyazava M, Hashimoto K, Tsuji Y. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3):274-86.
29. Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol Aspects Med.* 2013; 34(2-3):612-9.
30. Jenkitkasemwong S, Wang CY, Mackenzie B, Knutson MD. Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *Biometals.* 2012; 25(4):643-55.
31. Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(37):13612-7.
32. Pinilla-Tenas JJ, Sparkman BK, Shawki A, Illing AC, Mitchell CJ, Zhao N, et al. Zip14 is a complex broad-scope metal-ion transporter whose functional properties support roles in the cellular uptake of zinc and nontransferrin-bound iron. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 301(4):C862-71.
33. Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science.* 2008; 320(5880):1207-10.
34. Leidgens S, Bullough KZ, Shi H, Li F, Shakoury-Elizeh M, Yabe T, et al. Each member of the poly-r(C)-binding protein 1 (PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *J Biol Chem.* 2013; 288(24):17791-802.
35. Kidane TZ, Sauble E, Linder MC. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 291(3):445-55.

36. Asano T, Komatsu M, Yamaguchi-Iwai Y, Ishikawa F, Mizushima N, Iwai K. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol Cell Biol*. 2011; 31(10):2040-52.
37. Kishi-Itakura C, Koyama-Honda I, Itakura E, Mizushima N. Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J Cell Sci*. 2014;127(18): 4089-102.
38. Zhang Y, Mikhael M, Xu D, Li Y, Soe-Lin S, Ning B, et al. Lysosomal proteolysis is the primary degradation pathway for cytosolic ferritin and cytosolic ferritin degradation is necessary for iron exit. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(7):999-1009.
39. Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J, Elling RA, Liu S, Triantafellow E, et al. Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat Cell Biol*. 2014; 16(11):1069-79.
40. Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*. 2014; 509(7498):105-9.
41. Sangkhae V, Nemeth E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Hepcidin. *Advances in Nutrition*. Volume 2017; 8(1): 126–36.
42. Kautz L, Jung G, Valore EV, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014;46:678–84.
43. Kautz L, Jung G, Nemeth E, Ganz T. Erythroferrone contributes to recovery from anemia of inflammation. *Blood* 2014;124:2569–74.
44. Kautz L, Jung G, Du X, Gabayan V, Chapman J, Nasoff M, et al. Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of beta-thalassemia. *Blood* 2015;126:2031–7.
45. Pinnix ZK, Miller LD, Wang W, D'Agostino R Jr, Kute T, Willingham MC, et al. Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Sci Transl Med*. 2010; 2(43):43ra56.
46. Zhang S, Chen Y, Guo W, Yuan L, Zhang D, Xu Y, et al. Disordered hepcidin-ferroportin signaling promotes breast cancer growth. *Cell Signal*. 2014; 26(11):2539-50.

47. Chen Y, Zhang S, Wang X, Guo W, Wang L, Zhang D, et al. Disordered signaling governing ferroportin transcription favors breast cancer growth. *Cell Signal.* 2015; 27(1):168-76.
48. Tesfay L, Clausen KA, Kim JW, Hegde P, Wang X, Miller LD, et al. Hepcidin regulation in prostate and its disruption in prostate cancer. *Cancer Res.* 2015 Jun 1; 75(11):2254-63.
49. Gu Z, Wang H, Xia J, Yang Y, Jin Z, Xu H, et al. Decreased ferroportin promotes myeloma cell growth and osteoclast differentiation. *Cancer Res.* 2015; 75(11):2211-21.
50. Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(5):342-55.
51. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* 2012;149: 1060–72.
52. Dolma S, Lessnick S. L, Hahn W. C, Stockwell B. R. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell.* 2003; 3:285–96.
53. Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang WS, Fridman DJ, et all. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature.* 2007;447(7146):864-8.
54. Yang, W. S, Stockwell, B. R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem. Biol.* 2008; 15:234–45.
55. Li J, Cao F, Yin H, Huang Z, Lin Z, Mao N, and all. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease* 2020; 11:88.
56. Gao M, Monian P, Quadri N, Ramasamy R, Jiang X. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. *Mol Cell.* 2015;59(2):298-308.
57. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, et all. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol.* 2014; (12):1180-91.
58. Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, De Zen F, et all. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(47):16836-41.

59. Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, et al. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):291-317.
60. Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders HJ. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(11):759-67.
61. Skouta R, Dixon S. J, Wang J, Dunn D. E, Orman M, Shimada K, et al. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *Journal of the American Chemical Society*. 2014; 136(12): 4551–56.
62. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 2017;171(2):273-85.
63. Sun X, Ou Z, Xie M, Kang R, Fan Y, Niu X, et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death. *Oncogene*. 2015;34(45):5617-25.
64. Toyokuni S, Ito F, Yamashita K, Okazaki Y, Akatsuka S. Iron and thiol redox signaling in cancer: An exquisite balance to escape ferroptosis. *Free Radic Biol Med*. 2017;108:610–26.
65. Wadsak W, Mitterhauser M. Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT. *Eur J Radiol*. 2010; 73:461–9.
66. Dixon SJ, Patel DN, Welsch ME, Skouta R, Lee ED, Hayano M, et al. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *eLife*. 2014 doi: 10.7554/eLife.02523.
67. Cramer SL, Saha A, Liu J, Tadi S, Tiziani S, Yan W, et al. Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. *Nat Med*. 2017;23:120–7.
68. Liu DS, Duong CP, Haupt S, Montgomery KG, House CM, Azar WJ, et al. Inhibiting the system xC-/glutathione axis selectively targets cancers with mutant-p53 accumulation. *Nat Commun*. 2017;8:14844.
69. Sato H, Tamba M, Ishii T, et al. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem*. 1999; 274(17): 11455-58.
70. Conrad M, Sato H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino Acids*. 2012; 42(1): 231-46.

71. Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(5): 522-55.
72. Xia X, Fan X, Zhao M, Zhu P. The Relationship between Ferroptosis and Tumors: A Novel Landscape for Therapeutic Approach. *Current Gene Therapy*. 2019; 19(2):117-24.
73. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014;156(1-2):317-31.
74. Hass C, Belz K, Schoeneberger H, Fulda S. Sensitization of acute lymphoblastic leukemia cells for LCL161-induced cell death by targeting redox homeostasis. *Biochem Pharmacol* 2016, 105: 14-22.
75. Yu Y, Xie Y, Cao L, Yang L, Yang M, Lotze MT, et al. The ferroptosis inducer erastin enhances sensitivity of acute myeloid leukemia cells to chemotherapeutic agents. *Mol Cell Oncol*. 2015;2(4):e1054549. doi: 10.1080/23723556.2015.1054549. PMID: 27308510; PMCID: PMC4905356.
76. Gout PW, Simms CR, Robertson MC. In vitro studies on the lymphoma growth-inhibitory activity of sulfasalazine. *Anticancer Drugs*. 2003;14(1):21-9.
77. Ooko E, Saeed ME, Kadioglu O, Sarvi S, Colak M, Elmasaoudi K, et al. Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells. *Phytomedicine*. 2015;22(11):1045-54.
78. Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. *Blood* First Edition paper, 2016; 127:2809-13.
79. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood*. 2009; 114:181–6.
80. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med*. 2007; 13:1096–101.
81. Ginzburg Y, Rivella S. Beta-thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. *Blood* 2011; 118: 4321–30.

82. Ruchala P, Nemeth E. The pathophysiology and pharmacology of hepcidin. *Trends Pharmacol Sci*. 2014; 35:155–61.
83. Hohaus S, Massini G, Giachelia M, Vannata B, Bozzoli V, Cuccaro A, et all. Anemia in Hodgkin's Lymphoma: The Role of Interleukin-6 and Hepcidin. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2538-43.
84. Hara M, Ando M, Tsuchiya K, Nitta K. Serum hepcidin-25 level linked with high mortality in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol*. 2015; 94: 603-8.
85. Hohaus S, Giachelia M, Cuccaro A, Voso MT, Leone G. Iron in Hodgkin's lymphoma. Review. *Crit Rev Oncog*. 2013; 18:463-9.
86. Lichtenstein A. Anemia in lymphoma: interleukin-6, hepcidin and erythropoietin. *Leuk Lymphoma*. 2014; 55: 231-2.
87. Tisi MC, Bozzoli V, Giachelia M, Massini G, Ricerca BM, Maiolo E, et all. Anemia in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: the role of interleukin-6, hepcidin and erythropoietin. *Leuk Lymphoma*. 2014; 55:270-5.
88. Ciccarelli BT, Patterson CJ, Hunter ZR, Hanzis C, Ioakimidis L, Manning R, et all. Hepcidin is produced by lymphoplasmacytic cells and is associated with anemia in Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2011; 11: 160-3.
89. Theurl I, Theurl M, Seifert M, Mair S, Nairz M, et al. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood*. 2008; 111(4): 2392-9.
90. Mills C. D, Kincaid K, Alt J.M, Heilman M.J, Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol*. 2000; 164: 6166–73.
91. Mills, C. D. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Crit. Rev. Immunol*.2012; 32: 463–88.
92. Murray, P. J., Wynn T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol*. 2011; 11: 723–37.
93. Wynn, T. A., Chawla A, Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013; 496: 445–55.
94. Ley K. M1 Means Kill; M2 Means Heal. *The Journal of Immunology* 2017; 199(7): 2191-3.
95. Buscher, K., Ehinger E, Gupta P, Pramod A.B, Wolf D, Tweet G, et al. Natural variation of macrophage activation as disease-relevant phenotype predictive of inflammation and cancer survival. *Nat. Commun*. 2017;8:16041

96. Mills, C. D., Lenz L.L, Harris R.A. A breakthrough: macrophage-directed cancer Immunotherapy. *Cancer Res.* 2016; 76: 513–6.
97. Kaneda, M. M, Messer K.S, Ralainirina N, Li H, Leem C.J, Gorjestani S, et al. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression. *Nature* 2016; 539: 437–42.
98. Sharma S, Nemeth E, Chen Y-H, et al. Involvement of hepcidin in the anemia of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2008;14:3262–7.
99. Maes K, Nemeth E, Roodman GD, et al. In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2. *Blood* 2010;116:3635–44.
100. Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:555–9.
101. Wang CQ, Udupa KB, Lipschitz DA. Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J Cell Physiol* 1995;162: 134–8.
102. Hara M, Ando M, Tsuchiya K, Nitta K. Serum hepcidin-25 level linked with high mortality in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol.* 2015;94(4):603-8.
103. Nairz M, Schroll A, Demetz E, Tancevski I, Theurl I, Weiss G. 'Ride on the ferrous wheel'--the cycle of iron in macrophages in health and disease. *Immunobiology*. 2015; 220(2):280-94.
104. Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:500–10.
105. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci.* 2013; 16(9):1211-8.
106. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2014;13(10):1045-60.
107. Crielaard BJ, Lammers T, Rivella S. Targeting iron metabolism in drug discovery and delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(6):400-23.
108. Bergsland N, Tavazzi E, Schweser F, Jakimovski D, Hagemeier J, Dwyer MG, et al. Targeting Iron Dyshomeostasis for Treatment of Neurodegenerative Disorders. *CNS Drugs.* 2019;33(11):1073-86.

109. Casu C, Nemeth E, Rivella S. Hepcidin agonists as therapeutic tools. *Blood*. 2018;131(16):1790-4.
110. Schmidt PJ, Fleming MD. Modulation of hepcidin as therapy for primary and secondary iron overload disorders: preclinical models and approaches. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014;28(2):387-401.
111. Wischhusen J, Melero I, Fridman WH. Growth/Differentiation Factor-15 (GDF-15): From Biomarker to Novel Targetable Immune Checkpoint. *Front Immunol*. 2020;11:951.
112. Bootcov MR, Bauskin AR, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He XY, et al. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:11514-9.
113. Hromas R, Hufford M, Sutton J, Xu D, Li Y, Lu L. PLAB, a novel placental bone morphogenetic protein. *Biochim Biophys Acta*. (1997) 1354:40-4.
114. Lawton LN, Bonaldo MF, Jelenc PC, Qiu L, Baumes SA, Marcelino RA, et al. Identification of a novel member of the TGF-beta superfamily highly expressed in human placenta. *Gene*. (1997) 203:17-26.
115. Moore AG, Brown DA, Fairlie WD, Bauskin AR, Brown PK, Munier ML, et al. The transforming growth factor-ss superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(12):4781-8.
116. Tong S, Marjono B, Brown DA, Mulvey S, Breit SN, Manuelpillai U, et al. Serum concentrations of macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC 1) as a predictor of miscarriage. *Lancet*. 2004; 363:129-30.
117. Kaitu'u-Lino TUJ, Bambang K, Onwude J, Hiscock R, Konje J, Tong S. Plasma MIC-1 and PAPP-a levels are decreased among women presenting to an early pregnancy assessment unit, have fetal viability confirmed but later miscarry. *PLoS ONE*. 2013; 8:e72437. 10.1371/journal.pone.0072437
118. Chen Q, Wang Y, Zhao M, Hyett J, da Silva Costa F, Nie G. Serum levels of GDF15 are reduced in preeclampsia and the reduction is more profound in late-onset than early-onset cases. *Cytokine*. 2016; 83:226-30.
119. Nazarova, N., Qiao, S., Golovko, O., Lou, Y.-R. and Tuohimaa, P. Calcitriol-induced prostate-derived factor: Autocrine control of prostate cancer cell growth. *Int. J. Cancer*. 2004; 112: 951-8.

120. Nazarova NY, Chikhirzhina GI, Tuohimaa P. Calcitriol induces transcription of the placental transforming growth factor β gene in prostate cancer cells via an androgen-independent mechanism. *Mol Biol.* 2006; 40:72–6.
121. Soucek K, Slabakova E, Ovesna P, Malenovska A, Kozubik A, Hampl A. Growth/differentiation factor-15 is an abundant cytokine in human seminal plasma. *Hum Reprod.* 2010; 25:2962–71.
122. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015; 347:1260419. 10.1126/science.1260419
123. Tsai VWW, Husaini Y, Sainsbury A, Brown DA, Breit SN. The MIC-1/GDF15-GFRAL pathway in energy homeostasis: implications for obesity, cachexia, and other associated diseases. *Cell Metab.* 2018; 28:353–68.
124. Emmerson PJ, Wang F, Du Y, Liu Q, Pickard RT, Gonciarz MD, et al. The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. *Nat Med.* 2017; 23:1215–9.
125. Mullican SE, Lin-Schmidt X, Chin CN, Chavez JA, Furman JL, Armstrong AA, et al. GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. *Nat Med.* 2017; 23:1150–7.
126. Adela R, Banerjee SK. GDF-15 as a target and biomarker for diabetes and cardiovascular diseases: a translational prospective. *J Diabetes Res.* 2015; 2015:490842. 10.1155/2015/490842
127. Lerner L, Hayes TG, Tao N, Krieger B, Feng B, Wu Z, et al. . Plasma growth differentiation factor 15 is associated with weight loss and mortality in cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2015; 6:317–24.
128. Lerner L, Tao J, Liu Q, Nicoletti R, Feng B, Krieger B, et al. MAP3K11/GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Musc.* 2016; 7:467–82.
129. Hsu JY, Crawley S, Chen M, Ayupova DA, Lindhout DA, Higbee J, et al. Non-homeostatic body weight regulation through a brainstem-restricted receptor for GDF15. *Nature.* 2017; 550:255–9.
130. Yang L, Chang CC, Sun Z, Madsen D, Zhu H, Padkjaer SB, et al. GFRAL is the receptor for GDF15 and is required for the anti-obesity effects of the ligand. *Nat Med.* 2017; 23:1158–66.

131. Jones JE, Cadena SM, Gong C, Wang X, Chen Z, Wang SX, et al. Supraphysiologic administration of GDF11 induces cachexia in part by upregulating GDF15. *Cell Rep.* 2018; 22:1522–30.
132. Coll AP, Chen M, Taskar P, Rimmington D, Patel S, Tadross J, et al. GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance. *Nature.* 2019; 578:444–8.
133. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, et al. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science.* 2011; 332:243–7.
134. Jung SB, Choi MJ, Ryu D, Yi HS, Lee SE, Chang JY, et al. . Reduced oxidative capacity in macrophages results in systemic insulin resistance. *Nat Commun.* 2018; 9:1551. 10.1038/s41467-018-03998-z
135. Viola A, Munari F, Sanchez-Rodriguez R, Scolaro T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol.* 2019; 10:1462. 10.3389/fimmu.2019.01462
136. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 2009; 15:914–20.
137. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007; 117:175–84.
138. Pavlou, S., Wang, L., Xu, H. et al. Higher phagocytic activity of thioglycollate-elicited peritoneal macrophages is related to metabolic status of the cells. *J Inflamm.* 2017; 14(4)
139. Lackey DE, Olefsky JM. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat Rev Endocrinol.* 2016; 12:15–28.
140. Lee SE, Kang SG, Choi MJ, Jung SB, Ryu MJ, Chung HK, et al. Growth Differentiation Factor 15 Mediates Systemic Glucose Regulatory Action of T-Helper Type 2 Cytokines. *Diabetes.* 2017; 66(11):2774-88.
141. Kempf T, Guba-Quint A, Torgerson J, Magnone MC, Haefliger C, Bobadilla M, et al. Growth differentiation factor 15 predicts future insulin resistance and impaired glucose control in obese nondiabetic individuals: results from the XENDOS trial. *Eur J Endocrinol.* 2012; 167(5):671-8.

142. Bao X, Borné Y, Muhammad IF, Nilsson J, Lind L, Melander O, et al. Growth differentiation factor 15 is positively associated with incidence of diabetes mellitus: the Malmö Diet and Cancer-Cardiovascular Cohort. *Diabetologia*. 2019; 62(1):78-86.
143. Luan HH, Wang A, Hilliard BK, Carvalho F, Rosen CE, Ahasic AM, et al. GDF15 is an inflammation-induced central mediator of tissue tolerance. *Cell*. (2019) 178:1231–44.
144. Angus D.C., van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369: 840–51.
145. Hsiao EC, Koniaris LG, Zimmers-Koniaris T, Sebald SM, Huynh TV, Lee SJ. Characterization of growth-differentiation factor 15, a transforming growth factor beta superfamily member induced following liver injury. *Mol Cell Biol*. 2000; 20:3742–51.
146. Chung HK, Kim JT, Kim HW, Kwon M, Kim SY, Shong M, et al. . GDF15 deficiency exacerbates chronic alcohol- and carbon tetrachloride-induced liver injury. *Sci Rep*. 2017; 7:17238.
147. Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, McGrath SA, Esquela AF, Koniaris LG. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock*. 2005; 23:543–8.
148. Freeman CM, Martinez CH, Todt JC, Martinez FJ, Han MK, Thompson DL, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are associated with decreased CD4+ & CD8+ T cells and increased growth & differentiation factor-15 (GDF-15) in peripheral blood. *Respir Res*. 2015; 16:94. 10.1186/s12931-015-0251-1
149. Zhang Y, Jiang M, Nouraei M, Roth MG, Tabib T, Winters S, et al. GDF15 is an epithelial-derived biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019; 317:L510–21. 10.1152/ajplung.00062.2019
150. Xu J, Kimball TR, Lorenz JN, Brown DA, Bauskin AR, Klevitsky R, et al. GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res*. 2006; 98:342–50.
151. Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, et al. The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation

- factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2006; 98:351–60.
152. Kempf T, Zarbock A, Widera C, Butz S, Stadtman A, Rossaint J, et al. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat Med.* 2011; 17:581–8.
153. Welsh JB, Sapino LM, Kern SG, Brown DA, Liu T, Bauskin AR, et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:3410–5.
154. Baek KE, Yoon SR, Kim JT, Kim KS, Kang SH, Yang Y, et al. Upregulation and secretion of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in gastric cancers. *Clin Chim Acta.* 2009; 401:128–33.
155. Blanco-Calvo M, Tarrio N, Reboreda M, Haz-Conde M, Garcia J, Quindos M, et al. Circulating levels of GDF15, MMP7 and miR-200c as a poor prognostic signature in gastric cancer. *Fut Oncol.* 2014; 10:1187–202.
156. Ishige T, Nishimura M, Satoh M, Fujimoto M, Fukuyo M, Semba T, et al. Combined secretomics and transcriptomics revealed cancer-derived GDF15 is involved in diffuse-type gastric cancer progression and fibroblast activation. *Sci Rep.* 2016; 6:21681–21681.
157. Lu Z, Yang L, Yu J, et al. Change of body weight and macrophage inhibitory cytokine-1 during chemotherapy in advanced gastric cancer: what is their clinical significance? *PLoS One.* 2014;9(2):e88553.
158. Lu ZH, Yang L, Yu JW, et al. Weight loss correlates with macrophage inhibitory cytokine-1 expression and might influence outcome in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(15):6047–52.
159. Skipworth RJ, Deans DA, Tan BH, et al. Plasma MIC-1 correlates with systemic inflammation but is not an independent determinant of nutritional status or survival in oesophago-gastric cancer. *Br J Cancer.* 2010;102(4):665–72.
160. Li C, Wang J, Kong J, Tang J, Wu Y, Xu E, et al. GDF15 promotes EMT and metastasis in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016; 7:860–72.
161. Wang X, Yang Z, Tian H, Li Y, Li M, Zhao W, et al. Circulating MIC-1/GDF15 is a complementary screening biomarker with CEA and correlates with

- liver metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017; 8:24892–901.
162. Mehta RS, Song M, Bezawada N, Wu K, Garcia-Albeniz X, Morikawa T, et al. A prospective study of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014; 106:dju016. 10.1093/jnci/dju016
163. Mehta RS, Chong DQ, Song M, Meyerhardt JA, Ng K, Nishihara R, et al. Association between plasma levels of macrophage inhibitory cytokine-1 before diagnosis of colorectal cancer and mortality. *Gastroenterology*. 2015; 149:614–22.
164. Liu X, Chi X, Gong Q, Gao L, Niu Y, Chi X, et al. Association of serum level of growth differentiation factor 15 with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0127518. 10.1145/2818302
165. Hogendorf P, Durczynski A, Skulimowski A, Kumor A, Poznanska G, Strzelczyk J. Growth differentiation factor (GDF-15) concentration combined with Ca125 levels in serum is superior to commonly used cancer biomarkers in differentiation of pancreatic mass. *Cancer Biomark*. 2018; 21:505–11.
166. Bansal N, Kumar D, Gupta A, Chandra D, Sankhwar SN, Mandhani A. Relevance of MIC-1 in the era of PSA as a serum based predictor of prostate cancer: a critical evaluation. *Sci Rep*. 2017; 7:16824. 10.1038/s41598-017-17207-2
167. Li J, Veltri RW, Yuan Z, Christudass CS, Mandecki W. Macrophage inhibitory cytokine 1 biomarker serum immunoassay in combination with PSA is a more specific diagnostic tool for detection of prostate cancer. *PLoS ONE*. 2015; 10:e0122249. 10.1371/journal.pone.0122249
168. Gronberg H, Adolfsson J, Aly M, Nordstrom T, Wiklund P, Brandberg Y, et al. Prostate cancer screening in men aged 50-69 years (STHLM3): a prospective population-based diagnostic study. *Lancet Oncol*. 2015; 16:1667–76.
169. Brown DA, Lindmark F, Stattin P, Balter K, Adami HO, Zheng SL, et al. . Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:6658–64.
170. Staff AC, Bock AJ, Becker C, Kempf T, Wollert KC, Davidson B. Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2010; 118:237–43.

171. Zhang Y, Hua W, Niu LC, Li SM, Wang YM, Shang L, et al. Elevated growth differentiation factor 15 expression predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Tumour Biol.* 2016; 37:9423–31.
172. Zhao D, Wang X, Zhang W. GDF15 predict platinum response during first-line chemotherapy and can act as a complementary diagnostic serum biomarker with CA125 in epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2018; 18:328. 10.1186/s12885-018-4246-4
173. Weide B, Schafer T, Martens A, Kuzkina A, Uder L, Noor S, et al. High GDF-15 serum levels independently correlate with poorer overall survival of patients with tumor-free stage III and unresectable stage IV melanoma. *J Invest Dermatol.* 2016; 136:2444–52.
174. Nyakas M, Aamdal E, Jacobsen KD, Guren TK, Aamdal S, Hagene KT, et al. Prognostic biomarkers for immunotherapy with ipilimumab in metastatic melanoma. *Clin Exp Immunol.* 2019; 197:74–82.
175. Huh SJ, Chung CY, Sharma A, Robertson GP. Macrophage inhibitory cytokine-1 regulates melanoma vascular development. *Am J Pathol.* 2010; 176:2948–57.
176. Boyle GM, Pedley J, Martyn AC, Banducci KJ, Strutton GM, Brown DA, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 is overexpressed in malignant melanoma and is associated with tumorigenicity. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:383–91.
177. Shnaper S, Desbaillets I, Brown DA, Murat A, Migliavacca E, Schluep M, et al. Elevated levels of MIC-1/GDF15 in the cerebrospinal fluid of patients are associated with glioblastoma and worse outcome. *Int J Cancer.* 2009; 125:2624–30.
178. Codo P, Weller M, Kaulich K, Schraivogel D, Silginer M, Reifenberger G, et al. Control of glioma cell migration and invasiveness by GDF-15. *Oncotarget.* 2016; 7:7732–46.
179. Roth P, Junker M, Tritschler I, Mittelbronn M, Dombrowski Y, Breit SN, et al. GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:3851–9.
180. Lu X, He X, Su J, Wang J, Liu X, Xu K, et al. EZH2-mediated epigenetic suppression of GDF15 predicts a poor prognosis and regulates cell proliferation in non-small-cell lung cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018; 12:309–18.

181. Liu YN, Wang XB, Wang T, Zhang C, Zhang KP, Zhi XY, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 as a novel diagnostic and prognostic biomarker in stage I and II nonsmall cell lung cancer. *Chin Med J.* 2016; 129:2026–32.
182. Tanno T, Lim Y, Wang Q, Chesi M, Bergsagel PL, Matthews G, et al. Growth differentiating factor 15 enhances the tumor-initiating and self-renewal potential of multiple myeloma cells. *Blood.* 2014;123(5):725-33.
183. Corre j, Labat E, Espagnolle N, Hébraud B, Avet-Loiseau H, Roussel M, et al. Bioactivity and Prognostic Significance of Growth Differentiation Factor GDF15 Secreted by Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma. *Cancer Res* 2012; 72 (6): 1395-406.
184. Breit SN, Tsai VW, Brown DA. Targeting obesity and cachexia: identification of the GFRAL receptor-MIC-1/GDF15 pathway. *Trends Mol Med.* 2017; 23:1065–7.
185. Olsen OE, Skjaervik A, Stordal BF, Sundan A, Holien T. TGF-beta contamination of purified recombinant GDF15. *PLoS ONE.* 2017; 12:e0187349.
186. Zhao N, Yang J. [Expression of serum GDF15 and its clinical significance in multiple myeloma patients]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2014;39(3):270-5.
187. Schneiderova P, Pika T, Gajdos P, Fillerova R, Kromer P, Kudelka M, et al. Serum protein fingerprinting by PEA immunoassay coupled with a pattern-recognition algorithms distinguishes MGUS and multiple myeloma. *Oncotarget.* 2016;8(41):69408-21.
188. Zhou Z, Li W, Song Y, Wang L, Zhang K, Yang J, et al. Growth differentiation factor-15 suppresses maturation and function of dendritic cells and inhibits tumor-specific immune response. *PLoS ONE.* 2013; 8:e78618. 10.1371/journal.pone.0078618
189. Ratnam NM, Peterson JM, Talbert EE, Ladner KJ, Rajasekera PV, Schmidt CR, et al. NF-kappaB regulates GDF-15 to suppress macrophage surveillance during early tumor development. *J Clin Invest.* 2017; 127:3796–809.
190. Husaini Y, Qiu MR, Lockwood GP, Luo XW, Shang P, Kuffner T, et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15) slows cancer development but increases metastases in TRAMP prostate cancer prone mice. *PLoS ONE.* 2012; 7:e43833. 10.1371/journal.pone.0043833

191. Windrichova J, Fuchssova R, Kucera R, Topolcan O, Fiala O, Finek J, et al. Testing of a Novel Cancer Metastatic Multiplex Panel for the Detection of Bone-metastatic Disease - a Pilot Study. *Anticancer Res.* 2016;36(4):1973-8.
192. Børset M, Sundan A, Waage A, Standal T. Why do myeloma patients have bone disease? A historical perspective. *Blood Rev.* 2020;41:100646.
193. Westhrin M, Moen S.H, Holien T, Mylin A.K, Heickendorff L, Olsen O.E, et al. Growth differentiation factor 15 (GDF15) promotes osteoclast differentiation and inhibits osteoblast differentiation and high serum GDF15 levels are associated with multiple myeloma bone disease. *Haematologica.* 2015; 100: e511-e514
194. Hegab HM, El-Ghammaz AMS, El-Razzaz MK, Helal RAA. Prognostic Impact of Serum Growth Differentiation Factor 15 Level in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2021;37(1):37-44.
195. Lu W, Wan Y, Li Z, Zhu B, Yin C, Liu H, Yang S, Zhai Y, Yu Y, Wei Y, Shi J. Growth differentiation factor 15 contributes to marrow adipocyte remodeling in response to the growth of leukemic cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018 Mar 22;37(1):66.
196. Zhai Y, Zhang J, Wang H, Lu W, Liu S, Yu Y, et al. Growth differentiation factor 15 contributes to cancer-associated fibroblasts-mediated chemo-protection of AML cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):147.
197. Albayrak C, Tarkun P, Birtaş Ateşoğlu E, Eraldemir C, Özsoy ÖD, Terzi Demirsoy E, et al. The role of hepcidin, GDF15, and mitoferrin-1 in iron metabolism of polycythemia vera and essential thrombocythosis patients. *Turk J Med Sci.* 2019;49(1):74-80.
198. Uchiyama T, Kawabata H, Miura Y, Yoshioka S, Iwasa M, Yao H, et al. The role of growth differentiation factor 15 in the pathogenesis of primary myelofibrosis. *Cancer Med.* 2015;4(10):1558-72.
199. Wiklund F.E., Bennet A.M., Magnusson P.K.E., Eriksson U.K., Lindmark F., Wu L., et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a new marker of all-cause mortality. *Aging Cell.* 2010; 9: 1057-64.
200. Rothenbacher D, Dallmeier D, Christow H, Koenig W, Denkinger M, Klenk J; ActiFE study group. Association of growth differentiation factor 15 with other key biomarkers, functional parameters and mortality in community-dwelling older adults. *Age Ageing.* 2019;48(4):541-6.

201. Daniels LB, Clopton P, Laughlin GA, Maisel AS, Barrett-Connor E. Growth-differentiation factor-15 is a robust, independent predictor of 11-year mortality risk in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Circulation* 2011; 123: 2101–10.
202. Tanaka T, Biancotto A, Moaddel R, Moore AZ, Gonzalez-Freire M, Aon MA, et al. Plasma proteomic signature of age in healthy humans. *Aging Cell*. 2018;17(5):e12799.
203. https://seer.cancer.gov/explorer/application.html?site=86&data_type=1&graph_type=2&compareBy=sex&chk_sex_2=2&rate_type=2&race=1&age_range=1&stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&advopt_display=2
204. Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*. 2016;37(3):278-316.
205. The EUGenMed, Cardiovascular Clinical Study Group, Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Prescott E, Franconi F, Gerdts E, Foryst-Ludwig A, Maas H.E.M. A, et al. Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes, *European Heart Journal* 2016; 37(1): 24–34.
206. Săftescu S, Popovici D, Oprean C, Negru A, Croitoru A, Zemba M, et al. Endurance of erythrocyte series in chemotherapy. *Exp Ther Med*. 2020;20(6):214. doi: 10.3892/etm.2020.9344. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33149778; PMCID: PMC7604759.
207. Pirker R, Pirolli M, Quigley J, Hulnick S, Legg J, Collins H, Vansteenkiste J. Hemoglobin decline in cancer patients receiving chemotherapy without an erythropoiesis-stimulating agent. *Support Care Cancer*. 2013;21:987–92.
208. Groopman JE, Itri LM. Chemotherapy-induced anaemia in adults: Incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1616–34.
209. Bunn HF: Approach to the anaemias. In: Goldman-Cecil Medicine. Goldman L, Schafer AI (eds.) 25th edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, Chapter 158, 2016.
210. Sartori S, Nielsen I, Masotti M, Malacarne P. Early and late hyperferremia during cisplatin chemotherapy. *J Chemother*. 1991 Feb;3(1):45-50.

211. Miya, T., Kondo, H. & Gemma, A. Serum iron levels increased by cancer chemotherapy correlate the chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Int J Clin Oncol.* 2018; 23: 1196–200.
212. Ochiai T, Nishimura K, Watanabe T, Kitajima M, Nakatani A, Sato T, et al. Mechanism underlying the transient increase of serum iron during FOLFOX/FOLFIRI therapy. *Mol Clin Oncol.* 2014;2(6):968-72.
213. Kell B. D, Pretorius E, Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics.* 2014; 6(4): 748–73.
214. Grootendorst S, de Wilde J, van Dooijeweert B, van Vuren A, van Solinge W, Schutgens R, et al. The Interplay between Drivers of Erythropoiesis and Iron Homeostasis in Rare Hereditary Anemias: Tipping the Balance. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4):2204.
215. Skikne BS. Serum transferrin receptor. *Am J Hematol.* 2008;83(11):872-5.
216. Camaschella C. Iron deficiency. *Blood.* 2019;133(1):30-9.
217. Kohgo Y, Torimoto Y, Kato J. Transferrin receptor in tissue and serum: updated clinical significance of soluble receptor. *Int J Hematol.* 2002; 76(3):213-8.
218. Fertrin KY, Lanaro C, Franco-Penteado CF, de Albuquerque DM, de Mello MR, Pallis FR, Bezerra MA, et al. Erythropoiesis-driven regulation of hepcidin in human red cell disorders is better reflected through concentrations of soluble transferrin receptor rather than growth differentiation factor 15. *Am J Hematol.* 2014; 89(4):385-90.
219. Lyman H.G, Bettigole E.R, Robson E, Ambrus L.J, Urban H. Fibrinogen Kinetics in Patients With Neoplastic Disease. *Cancer.* 1978; 41; 1113-22.
220. Lu DY, Chen XL, Cao JY, Li Z, Xue HW, Luo LJ, et al. Effects of cancer chemotherapy on the blood fibrinogen concentrations of cancer patients. *J Int Med Res.* 2000;28(6):313-7.
221. Beinart G, Damon L. Thrombosis associated with L-asparaginase therapy and low fibrinogen levels in adult acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol.* 2004;77(4):331-5.
222. Pachón V, Trujillo-Santos J, Domènech P, Gallardo E, Font C, González-Porras JR, et al. Cancer-Associated Thrombosis: Beyond Clinical Practice

- Guidelines-A Multidisciplinary (SEMI-SEOM-SETH) Expert Consensus. *TH Open.* 2018;2(4):e373-e386.
223. van Es N, Di Nisio M, Cesarman G, Kleinjan A, Otten HM, Mahé I, et al. Comparison of risk prediction scores for venous thromboembolism in cancer patients: a prospective cohort study. *Haematologica.* 2017;102(9):1494-501.
224. Walton BL, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen, red blood cells, and factor XIII in venous thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2015; 13(1): 208-15.
225. Lee, E.S., Hibsman, B.K. and Liebman, H.A. Acquired bleeding disorder in a patient with malignant lymphoma. *Cancer.* 2001; 91: 636-41.
226. Palumbo JS, Potter JM, Kaplan LS, Talmage K, Jackson DG, Degen JL. Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. *Cancer Res.* 2002;62(23):6966-72.
227. Rybarczyk BJ, Simpson-Haidaris PJ. Fibrinogen assembly, secretion, and deposition into extracellular matrix by MCF-7 human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000;60(7):2033-9.
228. Liu X, Shi B. Progress in research on the role of fibrinogen in lung cancer. *Open Life Sci.* 2020;15(1):326-30.
229. Palaj J, Kečkeš Š, Marek V, Dyttert D, Waczulikova I, Durdík Š. Fibrinogen Levels Are Associated with Lymph Node Involvement and Overall Survival in Gastric Cancer Patients. *Anticancer Research.* 2018; 38 (2): 1097-104
230. Przybyłowski P, Wasilewski G, Bachorzewska-Gajewska H, Golabek K, Dobrzycki S, Małyszko J. Growth differentiation factor 15 is related to anemia and iron metabolism in heart allograft recipients and patients with chronic heart failure. *Transplant Proc.* 2014;46(8):2852-5.
231. Lukaszyk E, Lukaszyk M, Koc-Zorawska E, Bodzenta-Lukaszyk A, Małyszko J. GDF-15, iron, and inflammation in early chronic kidney disease among elderly patients. *Int Urol Nephrol.* 2016;48(6):839-44.
232. Banaszkiewicz M, Małyszko J, Batko K, Koc-Żórawska E, Żórawska M, Dumnicka P, et al. "Evaluating the Relationship of GDF-15 with Clinical Characteristics, Cardinal Features, and Survival in Multiple Myeloma". *Mediators of Inflammation.* 2020; 2020: Article ID 5657864, 13 pages.

233. Theurl I, Finkenstedt A, Schroll A, Nairz M, Sonnweber T, Bellmann-Weiler R, et al. Growth differentiation factor 15 in anaemia of chronic disease,iron deficiency anaemia and mixed type anaemia. *British Journal of Haematology*. 2009; 148: 449-55.
234. Cui R, Gale RP, Zhu G, Xu Z, Qin T, Zhang Y, et al. Serum iron metabolism and erythropoiesis in patients with myelodysplastic syndrome not receiving RBC transfusions. *Leuk Res*. 2014;38(5):545-50.
235. Pardanani A, Finke C, Abdelrahman RA, Lasho TL, Tefferi A. Associations and prognostic interactions between circulating levels of hepcidin, ferritin and inflammatory cytokines in primary myelofibrosis. *Am J Hematol*. 2013;88(4):312-6.
236. Santini V, Girelli D, Sanna A, Martinelli N, Duca L, Campostrini N, et al. Hepcidin levels and their determinants in different types of myelodysplastic syndromes. *PLoS One*. 2011;6(8):e23109.
237. Cheng PP, Sun ZZ, Jiang F, Tang YT, Jiao XY. Hepcidin expression in patients with acute leukaemia. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(5):517-25.
238. Singh S, Singh M, Kalra R, Marwah N, Chhabra S, Arora B. Transferrin receptor expression in reactive and neoplastic lesions of lymphnodes. *Indian J Pathol Micro-biol*. 2007;50:433–6.
239. Tarkun P, Birtas Atesoglu E, Mehtap O, Musul MM, Hacihanefioglu A. Serum growth differentiation factor 15 levels in newly diagnosed multiple myeloma patients. *Acta Haematol*. 2014;131(3):173-8.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Однос фактора раста и диференцијације-15 и хепцидина са биомаркерима метаболизма гвожђа у лимфополиферативним болестима
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
a) Клиника за хематологију, Клинички центар Војводине б) Центар за лабораторијску медицину, Клинички центар Војводине в) Медицински факултет Универзитета у Новом Саду
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Истраживање је спроведено у оквиру израде докторске дисертације и није део другог пројекта
1. Опис података
<i>1.1 Врста студије</i> <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Проспективно истраживање у оквиру докторске дисертације спроведено на укупно 71 испитанику оболелом од зреле Б лимфопролиферативне неоплазме. Праћени су лабораторијски маркери активности лимфопролиферативне болести, биомаркери метаболизма гвожђа, фактор раста и диференцијације-15 и хепцидин. Вршена је корелација биомаркера метаболизма гвожђа, фактора раста и диференцијације-15 и хепцидина са стандардним инфламаторним параметрима код испитаника који су имали индикацију за терапију и код оних без индикације за лечење и међусобно поређени.</u>
<i>1.2 Врсте података</i> а) <u>квантитативни</u> б) <u>квалитативни</u>
<i>1.3. Начин прикупљања података</i> а) анкете, упитници, тестови

- б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи
- в) генотипови: навести врсту _____
- г) административни подаци: навести врсту _____
- д) узорци ткива: навести врсту крв и замрзнути крвни serum
- ћ) снимци, фотографије: навести врсту снимци урађених радиолошких прегледа
- е) текст, навести врсту литература
- ж) мапа, навести врсту _____
- з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

- а) Excel фајл, датотека .xlsx
- б) SPSS фајл, датотека .sav
- с) PDF фајл, датотека .pdf
- д) Текст фајл, датотека .docx
- е) JPG фајл, датотека .jpg
- ф) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли Велики број
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) 71 испитаник

1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је 3 до 6 месеци
- б) варијабле које се више пута мере односе се на процену стања основне болести
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као лечени.xlsx sheet 2, лечени.xlsx sheet 3, без терапије.xlsx sheet 2

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

a) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип ГДФ-15 и хепцидин су одређивани након одмрзавања из претходно замрзнутих серума чуваних на -70⁰Ц ЕЛИСА методом користећи реагенсе произвођача R&D по упутству производа на RYTO анализатору

б) корелационо истраживање, навести тип Спирманов кофицијент корелације је примењен за тестирање повезаности ГДФ-15 и хепцидина и с осталим испитиваним параметрима. Сви тестови су двострани са нивоом значајности p<0.05

ц) анализа текста, навести тип прикупљање података из литературе и на основу њих постављање хипотеза, а потом у дискусији анализа добијених резултата и поређење с резултатима истраживања других

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет лабораторијских резултата је контролисан у складу са стандардима добре лабораторијске праксе и по стандардној лабораторијској процедуре валидације добијених резултата. Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова и валидацијом података

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је контролисана вишеструким личним проверавањима и независним проверавањима од стране сарадника и ментора те поређењем с похрањеним подацима у медицинској документацији

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду

3.1.2. URL адреса <https://cris.uns.ac.rs//searchDissertations.jsf>.

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- a) Да*
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____*
- в) Не*

Ако је одговор не, навести разлог _____ Подаци добијени истраживањем нису још у потпуности

објављени у виду научних радова и биће доступни са сваком публикацијом у складу с етичким принципима заштите поверљивих информација и принципима отворене науке.

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Етички одбор Клиничког центра Војводине 2.2.2017; Етичка комисија Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, 13.2.2017.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
 - б) Подаци су анонимизирани
 - ц) Остало, навести шта
-
-

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- a) јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их

користе:

У случају других истраживања где би подаци били потенцијално корисни комуникацијом с аутором података и након образложења потребе за увидом у податке, омогућиће се приступ анонимизираним подацима.

Ако су подаци доступни само ускому кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима: комуникацијом са аутором

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство-некомерцијално-без прераде _____

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Данијела Агић, danijela.agic@mf.uns.ac.rs _____

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Данијела Агић, danijela.agic@mf.uns.ac.rs _____

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Данијела Агић, danijela.agic@mf.uns.ac.rs _____