



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Лавиника Атанасковић**

**УДРУЖЕНОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЕНА ЗА ИНТЕРЛЕУКИНЕ 2  
И 6, CD14 И ГЛУТАТИОН ТРАНСФЕРАЗУ S СА КЛИНИЧКИМ  
КАРАКТЕРИСТИКАМА, РЕЗУЛТАТИМА ЛЕЧЕЊА И  
ПРОГНОЗОМ ОБОЛЕЛИХ ОД ДИФУЗНОГ В ЛИМФОМА  
ВЕЛИКИХ ЋЕЛИЈА**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Ментор: др сци.мед. Оливера Тарабар, доцент**

**Крагујевац, 2019.**

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Лавиника Атанасковић
Датум и место рођења: 03.08.1974, Београд, Република Србија
Садашње запослење: Клиника за хематологију, Војномедицинска академија ВМА
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Удруженост полиморфизама гена за интерлеукине 2 И 6, CD14 и глутатион трансферазу S са клиничким карактеристикама, резултатима лечења и прогнозом оболелих од дифузног В лимфома великих ћелија
Број страница: 89
Број слика: 8
Број библиографских података: 264
Установа и место где је рад израђен: на Војномедицинској академији у Београду и обухватило и Институт за медицинска истраживања, Институт за патологију и судску медицину, Централну клиничку лабораторију и Институт за радиологију, а терапијске процедуре и праћење болесника су спроведене у Клиници за хематологију у ВМА. Београд
Научна област (УДК): Медицина (Онкологија)
Ментор: др сци.мед. Оливера Тарабар, доцент
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 16.03.2017. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-584/27 од 07.06.2017. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"><li><b>проф. др Наташа Ђорђевић</b>, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник</li><li><b>проф. др Слободан Марјановић</b>, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан</li><li><b>проф. др Иван Јовановић</b>, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан</li><li><b>доц. др Светлана Ђукић</b>, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан</li><li><b>НС Бојана Цикота-Алексић</b>, научни сарадник Војномедицинске академије у Београду, Институт за медицинска истраживања, за ужу научну област медицинских наука-хумана генетика, члан</li></ol>

Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:

- 1. Проф.др Наташа Ђорђевић**, редни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник;
- 2. Проф. др Слободан Марјановић**, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
- 3. Проф. др Иван Јовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан
- 4. Доц. др Светлана Ђукић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан
- 5. НС Бојана Цикота-Алексић**, научни сарадник Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, Институт за медицинска истраживања, за ужу научну област медицинских наука-хумана генетика, члан

Датум одбране дисертације:

## Апстракт

Увод: Дифузни В лимфом великих ћелија (DLBCL) су агресивне неоплазме лимфоног ткива са хетерогеном клиничком сликом, одговором на терапију, преживљавањем. У основи ове разноликости лежи комплексна биологија тумора. Проналажење нових прогностичких маркера болести води ка напретку у контроли болести.

Пацијенти и методе: У истраживање је било укључено 156 болесника са новодијагностикованим DLBCL, лечени R-CHOP имунохемиотерапијом, подељени у две прогностичке групе: 1) са параметрима лоше прогнозе и 2) без параметара лоше прогнозе. *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *CD14-159 C/T*, *IL6-597G/A* и *IL2-330T/G* генотипови анализирани су методама које се заснивају на ланчаној реакцији полимеризације (PCR). За статистичку значајност је узета вредност  $< 0.05$ . Сви резултати испитивања су статистички обрађени коришћењем SPSS software for Windows, version 15.

Резултати: Учесталост генотипова у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2 - 330T/G*, *IL6 - 597G/A* и *CD14 - 159C/T* идентична као у оболелих од лимфопролиферативних болести и здравих испитаника у Европи. *GSTM1null genotip* чешћи у болесника млађих од 60 година. У екстранодалној болести чешће присуство *CD14-159 CT/TT* генотипа у поређењу са *CC* генотипом. *TT* генотип удружен са дужим преживљавањем без болести и укупним преживљавањем у поређењу са *CC/CT* генотипом. Медијана до постизања комплетне ремисије у *GSTP1 Val/Val* и *Ile/Val* генотипу је краћа у односу на *Ile/Ile* генотип. Полиморфизми у генима за *GSTT1*, *IL2-330T/G* и *IL6 - 597G/A* без удружености са клиничким карактеристикама и исходом лечења.

Закључак: полиморфизми у генима за *GSTs* (*GSTP1* и *GSTM1*) и *CD14-159* су повезани са иницијалним клиничким карактеристикама, исходом лечења болесника са DLBCL који су примали R-CHOP имунохемиотерапију

Кључне речи: „NHL B cell diffusum“, „IL 2, IL6, CD 14, GSTT1,M1,P1“, „gene polymorphisms“



## Abstract

Introduction: Diffuse B lymphoma of large cells (DLBCL) are aggressive lymphatic tissue neoplasms with heterogeneous clinical picture, response to therapy, survival. Basically this diversity lies in the complex biology of the tumor. Finding new prognostic markers of disease leads to progress in disease control.

Patients and methods: 156 patients with newly diagnosed DLBCL, treated with R-CHOP immunochemotherapy, were divided into two prognostic groups: 1) with parameters of poor prognosis and 2) without parameters of poor prognosis. GSTT1, GSTM1, GSTP1, CD14-159 S / T, IL6-597G / A and IL2-330T / G genotypes were analyzed by methods based on chain reaction polymerization (PCR). The value <0.05 was taken for statistical significance. All test results were statistically processed using SPSS software for Windows, version 15.

Results: Frequency of genotypes in GST genes (GSTT1, GSTP1, GSTM1), IL2 -330T / G, IL6 -597G / A and CD14 -159C / T are identical to those in patients with lymphoproliferative diseases and healthy subjects in Europe. GSTM1null genotype is more common in patients under the age of 60 years. In the extranodal disease, the CD14-159 CT / TT genotype is more commonly compared to the CC genotype. TT genotype associated with longer survival without disease and overall survival compared to CC / CT genotype. Median until achieving complete remission in GSTP1 Val / Val and Ile / Val genotype is shorter compared to Ile / Ile genotype. Polymorphisms in genes for GSTT1, IL2-330T / G and IL6-597G / A without association with clinical characteristics and treatment outcome.

Conclusion: polymorphisms in the GSTs genes (GSTP1 and GSTM1) and CD14-159 were associated with initial clinical characteristics, the outcome of treatment of patients with DLBCL who received R-CHOP immunochemotherapy

Key words: "NHL B cell diffusum", "IL 2, IL6, CD 14, GSTT1, M1, P1", "gene polymorphisms"

### Захвалница

Ова докторска дисертација је резултат вишегодишњег истраживања, а у њеној изради помогли су ми породица, пријатељи и колеге.

Највећу захвалност дугујем свом бившем начелнику, проф.др Слободану Марјановићу, без чије подршке и помоћи не би било ни овог рада.

Неизмерно хвала драгој пријатељици Бојани Цикоти-Алексић, која ми је својим стручним и пријатељским саветима била велика подршка у раду.

Искрену захвалност дугујем и проф. др Наташи Ђорђевић и доц. др Снежани Ђукић на стручној и колегијалној помоћи.

Неизмерно хвала мојој менторки доц. др Оливери Тарабар, која је била уз мене у сваком тренутку и пружила ми непроцењиву стручну и пријатељску помоћ.

Велико хвала мојим родитељима и сестри који су били подршка за све моје одлуке.

Посебну захвалност дугујем својој породици, супругу Александру и деци Андрији и Лени, на бескрајној љубави и стрпљењу.

**Садржај**

<b>I. УВОД.....</b>	<b>10</b>
<b>1. ЕПИДЕМИОЛОШКИ АСПЕКТИ DLBCL.....</b>	<b>13</b>
<b>2. ЕТИОЛОШКА ПРИЗМА DLBCL .....</b>	<b>13</b>
2.1 Инфективни агенси.....	13
2.2 Поремећај имунорегулације .....	14
2.3 Експозиција хемијским агенсима .....	15
2.4 Утицај генетских фактора.....	16
2.5 Генски полиморфизам.....	16
2.6 Фактори животног стила.....	18
<b>3. ПАТОФИЗИОЛОШКИ МЕХАНИЗМИ DLBCL .....</b>	<b>18</b>
3.1 Диференцијација Б лимфоцита .....	18
3.2 Механизам малигне трансформације .....	19
3.2.1 Хромозомске абнормалности.....	19
3.2.2 Молекуларна основа генске експресије .....	22
3.2.3 Улога GSTу патогенези DLBCL .....	23
3.2.4 Интерлеукин 2 у патогенези DLBCL .....	25
3.2.5 Интерлеукин 6 у патогенези DLBCL .....	27
3.2.6 CD14 у патогенези DLBCL .....	29
3.2.7 Полиморфизми у генима за цитокине.....	31
3.2.8 Генски полиморфизам IL6.....	31
3.2.9 Генски полиморфизам IL2.....	32
3.2.10 Генски полиморфизми GST .....	32
3.2.11 Генски полиморфизамCD14.....	34
<b>4. КЛАСИФИКАЦИЈА DLBCL.....</b>	<b>34</b>
<b>5. ДИЈАГНОСТИКА DLBCL.....</b>	<b>35</b>

5.1	Имунохистохемијске анализе.....	35
5.2	Клиничке карактеристике болести .....	36
5.3	Лабораторијска и рентгенолошка дијагностика .....	36
<b>6.</b>	<b>ТЕРАПИЈСКИ ПОТЕНЦИЈАЛИ DLBCL .....</b>	<b>37</b>
<b>7.</b>	<b>ПРОГНОСТИЧКИ ИНДИКАТОРИ DLBCL .....</b>	<b>38</b>
7.1	Интернационални прогностички индекс.....	38
7.2	Имунофенотип као прогностички параметар болести.....	39
<b>II.</b>	<b>ДЕФИНИЦИЈА ПРОБЛЕМА И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА.....</b>	<b>40</b>
1.	ХИПОТЕЗА.....	42
2.	ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....	42
<b>III.</b>	<b>ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДОЛОГИЈА РАДА.....</b>	<b>43</b>
1.	ИСПИТАНИЦИ .....	43
2.	МЕТОДОЛОГИЈА РАДА.....	45
3.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО ИСТРАЖИВАЊА .....	46
3.1	Коришћене хемикалије .....	46
3.2	Изолација ДНК.....	47
3.3	Одређивање <i>GST</i> генотипова.....	48
3.4	Одређивање <i>IL6</i> и <i>IL2</i> генотипова.....	49
3.5	Одређивање <i>CD14</i> генотипова .....	50
4.	СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	51
<b>IV.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>52</b>
1.	АНАЛИЗА <i>GST</i> ГЕНА.....	52
1.1	Учесталост <i>GST</i> генотипова .....	52
1.2	Повезаност <i>GST</i> генотипова са клиничким карактеристикама.....	52

1.3	Повезаност <i>GST</i> генотипова са одговором на терапију и током болести .....	53
<b>2.</b>	<b>АНАЛИЗА <i>CD14</i> ГЕНА.....</b>	<b>54</b>
2.1	Учесталост <i>CD14</i> генотипова .....	54
2.2	Повезаност <i>CD14</i> генотипова са клиничким карактеристикама .....	55
2.3	Повезаност <i>CD14</i> генотипова са одговором на терапију и током болести....	56
<b>3.</b>	<b>3.АНАЛИЗА <i>IL6</i> ГЕНА .....</b>	<b>59</b>
3.1	Учесталост <i>IL6</i> генотипова .....	59
3.2	Повезаност <i>IL6</i> генотипова са клиничким карактеристикама .....	59
3.3	Повезаност <i>IL6</i> генотипова са одговором на терапију и током болести.....	60
<b>4.</b>	<b>АНАЛИЗА <i>IL2</i> ГЕНА .....</b>	<b>60</b>
4.1	Учесталост <i>IL2</i> генотипова .....	60
4.2	Повезаност <i>IL2</i> генотипова са клиничким карактеристикама .....	61
4.3	Повезаност <i>IL 2</i> генотипова са одговором на терапију и током болести.....	61
<b>V.</b>	<b>ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>62</b>
<b>VI.</b>	<b>ЗАКЉУЧЦИ .....</b>	<b>87</b>
<b>VII.</b>	<b>ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>88</b>
<b>БИОГРАФИЈА .....</b>	<b>111</b>	
<b>БИБЛИОГРАФИЈА.....</b>	<b>112</b>	
<b>ПРИЛОЗИ.....</b>	<b>113</b>	

## I. УВОД

Дифузни Б лимфом великих ћелија (DLBCL) је агресивна и најзаступљенија неоплазма лимфног ткива, са учесталошћу од око 30% свих неХочкин-ских лимфома (NHL) (Stein и сар, 2008). Представљају неоплазму великих трансформисаних Б-ћелија које својом клоналном пролиферацијом и дифузним растом потпуно нарушавају нормалну архитектуру лимфног чвора (Hunt и сар., 2008). Ови лимфоми се карактеришу хетерогеним морфолошким, имунофенотипским и генетским одликама из којих произилази и веома различита клиничка слика болести, одговор на примењену терапију и преживљавање. Разумевање основа ове хетерогености представља критичан корак ка даљем напретку у контроли ове болести, која остаје клинички изазов у више од једне трећине болесника са DLBCL који неће одговорити на терапију прве, нити на следеће терапијске линије.

Стални напредак у патоморфолошким, имунофенотипским и биолошким студијама је омогућио поделу DLBCL у подгрупе и различите клиничке ентитете који су инкорпорирани у класификацију тумора хематопоетског и лимфног ткива Светске здравствене организације (WHO), укључујући и најновију класификацију из 2016 године (Swerdlow и сар., 2008; Swerdlow и сар., 2016).

У последњих петнаестак година, развој технологија високе резолуције је обезбедио значајну помоћ у идентификовању генетских лезија и/или нарушених сигналних путева који су потребни за покретање и прогресију DLBCL. Према профилу експресије гена издвојена су два подтипа DLBCL, један са профилом експресије гена порекла герминативног центра Б-ћелија (GCBDLBCL) и други под тип чине DLBCL са генским профилом активисаних Б-ћелија периферне крви, означених као ABC DLBCL. Наведене две подгрупе DLBCL се карактеришу различитим морфолошким, имунофенотипским али и хромозомским аберацијама. Такође, ове две подгрупе DLBCL се карактеришу и значајно различитим одговором на примењено лечење (Rosenwald и сар., 2003; Alizadeh и сар., 2000; Wright и сар., 2003).

DLBCL се проучава као модел мултифакторијалне етиопатогенезе који укључује генетске факторе, поремећај имуног одговора, факторе животне средине, изложеност инфективним агенсима, професионалну изложеност и навике у исхрани, који могу допринети развоју лимфома (Swerdlow и сар., 2008; Swerdlow и сар., 2016).

Између наведених фактора повезаних са патогенезом болести, дисрегулација имуног система је најбоље приказана, о чему сугерише и податак да око 8% оболелих од Б-ћелијског NHL испољавају различите аутоимуне феномене и исто тако, оболели од реуматоидног артритиса имају двоструки ризик за развој Б ћелијског лимфома, највероватније као последица хроничне Б ћелијске активације и стимулације (Cunningham-Rundles, 2012; Dias and Isenberg, 2011).

Чешћа појава болести у појединим породицама сугерише улогу и наслеђених генетских варијанти, полиморфизама гена, о чему сведоче резултати бројних епидемиолошких студија које су испитивале улогу варијација у једном нуклеотиду ДНА секвенце (SNP), појединачних или у склопу хаплотипова и њихову удруженост са појавом NHL и DLBCL (Rothman и сар., 2006; Skibola и сар., 2007; Cerhan и сар., 2012; Cerhan и сар., 2014).

Цитокини имају значајну улогу у пролиферацији и диференцијацији нормалних Б ћелија (Cohen and Shachar, 2012). Имајући у виду њихову улогу у Б-ћелијском развоју, посебном интересовању изложени су полиморфизми у генима за проинфламаторне и имунорегулаторне цитокине, као и полиморфизми у генима укљученим у урођени имуни одговор. Функционално важне полиморфне варијанте у генима за цитокине могу да доведу до промене у експресији, структури и активности генског продукта, да мењају Б-ћелијску функцију, али и да делују на бројне реактивне ћелија у миљеу лимфног чвора и да доприносе трансформацији, пролиферацији и еволуцији малигног Б ћелијског клона (Scott and Gascoyne, 2014; Nielsen и сар., 2015).

Клиничка слика оболелих од DLBCL је, такође, веома различита. Болест се најчешће испољава безболним порастом једне или више периферних лимфних жлезда, али и туморским променама различитих нодалних и екстранодалних регија са оштећењем захваћених органа. Док поједини болесници имају локализовану болест, 50-60% оболелих испољиће

узнапредовали стадијум болести што је параметар значајно лошијег исхода лечења (Green и сар., 2014).

Применом комбиноване имунохемиотерапије, базиране на моноклонском CD20 антители, ритуксимабу и комбинованој хемиотерапији, комплетна (CR) и дуготрајна ремисија се може постићи у око 60% лечених болесника. Међутим, више од 30% болесника неће реаговати на терапију прве линије или ће обновити болест након претходно постигнуте CR, тако да приближно 50% оболелих од DLBCL остају са данашњим терапијским приступом, неизлечени (Shaffer и сар., 2012). Сазнања о генетском профилу сваког оболелог, укључујући генске полиморфизме, могу допринети нашем разумевању различите ефикасности имунохемиотерапије у оболелих и разјаснити различито испољене токсичне ефекте исте. Због тога значајно место у истраживању наследних варијанти заузимају полиморфизми у генима укљученим у метаболизам и детоксикацију различитих неопластичних лекова (Falduto и сар., 2017).

У свакодневној клиничкој пракси се ради процене агресивности болести употребљава Интернационални прогностички индекс (IPI) који је базиран на карактеристикама оболелог, али и на карактеристикама саме болести. Ради стратификације болесника у групе ризика уз IPI скор, користе се и други параметри прогнозе базирани на патохистолошкој анализи туморског ткива са имунохистохемијом, FISH (*fluorescentna in situ hibridizacija*) и PCR (*polymerase chain reaction*). Међутим, ниједан од данас установљених прогностичких параметара није се показао користан у погледу најбоље терапијске опције за сваког болесника посебно која би допринела најбољем терапијском одговору у оболелих од DLBCL.

Због тога се намеће потреба сталних и нових истраживања како би се разоткрила комплексна и хетерогена природа болести.

Стицање нових сазнања из области полиморфизама у генима који су укључени у имунски одговор и детоксикацију канцерогена би могла да допринесу бољем разумевању хетерогене природе болести али и развоју рационалних циљаних терапија.



## 1. ЕПИДЕМИОЛОШКИ АСПЕКТИ DLBCL

У готово свим земљама за које су подаци доступни, уочена је повећана годишња стопа инциденце NHL (Zelenetz, 2010). Последње две деценије нарочито је уочена појава болести ван лимфних чворова, у екстранодалним локализацијама (Yuan и сар., 2014).

На DLBCL отпада око 1/3 свих NHL одраслих што га чини најчешћом Б-ћелијском неоплазмом са инциденцом од 3-4 случаја на 100 000 становника годишње (Cerchiatti and Leonard, 2013.). Карактеристика је старије животне доби са медијаном појављивања болести у доби од 65 година.

Од свих лимфома DLBCL је показао највећи пораст инциденце у последње 2 деценије за 50-100% (Bumera-Ciećkiewicz и сар., 2014). Овај пораст инциденце не може се објаснити развојем савремених дијагностичких процедура, већ се евентуално може повезати са повећаним коришћењем имуносупресивне терапије и већој експозицији факторима као што су ултраљубичасто зрачење, пестицидима и хербицидима.

## 2. ЕТИОЛОШКА ПРИЗМА DLBCL

Етиопатогенеза болести није у потпуности разјашњена. Повећан ризик за настанак лимфома је примећен код болесника са урођеним и стеченим поремећајем имунитета, аутоимуним болестима, вирусним инфекцијама, као и код особа изложених различитим хемијским канцерогенима (Swerdlow и сар., 2008; Swerdlow и сар., 2016).

### 2.1 Инфективни агенси

Лимфоми удружени са Синдромом стечене имунодефицијенције (AIDS) представљају једну од најчешћих болести удружених са AIDS у САД (Hentrich и сар., 2014). Болесници са AIDS имају 165 пута већи релативни ризик за настанак лимфома у периоду од три године од дијагнозе AIDS у поређењу са особама који нису носиоци вируса. Пре увођења високоактивне антиретровиралне терапије, инциденца свих подтипова NHL је била повећана до 200 пута код пацијената инфицираних HIV-ом (Gopal и сар., 2014).

Добро је познато да EBV доприноси настанку лимфома када се његов геном угради у геном Б-ћелије (Ouyama и сар., 2003), мада су потребни и други предуслови како у оквиру инфицираног клона, тако и код домаћина. DLBCL који настају у стањима имунодефицијенције су значајно чешће EBV позитивни, док је заступљеност EBV у DLBCL без имунодефицијенције присутна само у 10% случајева.

HHV-8 носи неколико гена који се могу понашати као онкогени, укључујући и ген хомолог ћелијском гену за циклин из групе D (Woo и сар., 2010). Примарни ефузиони лимфом је повезан са HHV-8 инфекцијом (Shah и сар., 2014).

Инфекција HCV је често повезана са мешовитим криоглобулинемијама и Б-ћелијским NHL лимфомима и указује да HCV може да зарази Б ћелије и утиче на њихову функцију. Ћелијске линије заражене HCV показују значајно израженију апоптозу (Petruzzo и сар., 2014).

Неколико инфективних агенаса је повезано са одређеним подтипovima лимфома. Тако је бактерија *H. Pylori* повезана са лимфомима желуца MALT типа (Park и сар., 2010), *Borrelia burgdorferi*, удружена са NHL коже, *Chlamydia psittaci*, повезана са лимфомом ока (Zhu и сар., 2013), као и *Campylobacter jejuni* инфекција (Coeuret и сар., 2014). За већину ових агенаса се сматра да испољавају своје малигне механизме првенствено или делимично путем хроничне стимулације имуног система (Nakamura и сар., 2013).

### 2.2 Поремећај имунорегулације

Повећана учесталост NHL код болесника са урођеним или стеченим облицима имунодефицијенције јасно показује улогу сниженог имуног одговора у настанку лимфома. Проучавањем болесника инфицираних HIV-ом и болесника након трансплантација ткива и органа показала су битност три фактора у утицају имунодефицијенције на настанак лимфома: степен, трајање и тип имунодефицијенције (Kaneko и сар., 2013; Hentrich и сар., 2014).

NHL је најчешћи малигнитет код младих особа са атаксија-телеангиектазија синдромом или *Wiskott-Aldrich syndrome* (WAS) који се карактерише примарном имунодефицијенцијом (Cossia и сар., 2012). Чешћа појава NHL је уочена код деце са *X linked* лимфопролиферативним

синдромом или комбинованом имунодефицијенцијом (Ajisawa, 2012). EBV је важан ко-фактор. Поред тога, дефекти у имунорегулацији који су резултат неравнотеже производње цитокина и генетских дефеката, непрецизно и / или неефикасно преуређење гена имуноглобулина и Т-ћелијског рецептора током лимфопоезе, доприносе развоју лимфома.

Поједине студије сугеришу и чешћу појаву NHL у оболелих од аутоимуних и хроничних инфламаторних болести (Cunningham-Rundles, 2012; Dias and Isenberg, 2011). Додатна и често дуготрајна имуносупресивна терапија којом су изложени болесници са аутоимуним болестима, или пак болесници након трансплантације ткива и органа повећава ризик за настанак DLBCL (Cuccaro и сар., 2014).

Поремећаји имунорегулације доводе до поликлоналне активације Б-ћелија која у даљем току еволуира у моноклоналну малигну пролиферацију.

### **2.3 Експозиција хемијским агенсима**

Упадљиво повећање учесталости NHL запажено је у последњих 30 година што повећава интерес у идентификацији фактора спољашње средине и фактора повезаних са различитим професионалним делатностима који могу бити повезани са овим трендом. Пољопривредници имају низак укупни морталитет, али високу стопу за неке врсте неоплазми, посебно за NHL, што указује да изложеност различитим хемијским агенсима у пољопривреди може бити од значаја за развој NHL (Сосо и сар., 2013). Новије мета-аналитичке студије у многим земљама су показале да постоји конзистентан доказ позитивних асоцијација између NHL и различитих инсектицида, линдана и фенокси хербицида (Sterne и сар., 2011).

Резултати објављене студије су показали да NHL са транслокацијом 14;18 су повезани са експозицијом диелдрину, линдану, атразину и фунгицидима (Schinasi и сар., 2014).

Иако је удео пољопривредних радника у популацији релативно мали, излагање опште популације пестицидима је у све већем порасту. Употреба пестицида који се користе за негу зелених површина се повећава по стопи од 5-8%, односно концентрација пестицида који се користе за негу травњака је 5 пута већа него што се примењује за обраду пољопривредног земљишта (Alavanja и сар., 2014).

## 2.4 Утицај генетских фактора

Чешћа појава неоплазми лимфног ткива у неким породицама сугерише да генетска предиспозиција може имати значај у настанку DLBCL. Ризик за настанак NHL је повећан код особа са породичном историјом хематопоезног малигнитета. Претходна истраживања су показала да је пораст ризика за настанак DLBCL у рођака првог степена сродства 3-4 пута већи уколико је позитивна породична историја тумора хематопоезног ткива (Levine и сар., 2009). Такође, постоје подаци да имигранти задржавају стопу инциденце лимфома из земље свог порекла (Zhang и сар., 2014).

Породична историја болести, мада не искључиво, може бити везана за наслеђе и вероватно је сурогат генетске предиспозиције, посебно ако фактори ризика делују у заједничком породичном окружењу (Ali и сар., 2013; Bassig, и сар., 2012).

Чешћа појава лимфома у оквиру једне породице указује да утицај генетске предиспозиције, али и присуство других фактора повезаних са навикама у исхрани, околностима животне и радне средине, могу допринети повећаном ризику за настанак болести. Резултати објављених студија су показали да пестициди и професионална изложеност бензену дају већи ризик за NHL међу појединцима са позитивном породичном историјом тумора (Rusiecki и сар., 2009). Међутим, фамилијарна предиспозиција, самостално или у комбинацији са другим факторима спољашне средине, чине мали удео у настанку NHL (мање од 5%) и, стога, не може да објасни већу инциденцу NHL.

## 2.5 Генски полиморфизам

Велики број до данас објављених асоцијационих студија је испитивала улогу генетских варијанти, полиморфизама, у ризику од настанка лимфома. Полиморфизам једног нуклеотида (SNP) је еволуцијски стабилна варијација у једном нуклеотиду DNA секвенце која се појављује у најмање 1% опште популације. Геном човека садржи више од 10<sup>7</sup> SNP, и они чине и до 90% свих генетских варијација у људи (Robert, и сар., 2014).

Иако велики део откривених полиморфизама гена не припадају функционално важним на основу њиховог биолошког значаја, резултати *in*

*vitro* студија су показали да неки SNP, сами или у склопу хаплотипова, могу мењати експресију гена или пак функцију генског продукта и доприносити патогенези лимфома, утицати на фенотипске одлике болести или резултате лечења (Skibola, 2007). Потенцијално функционално важни SNP смештени су у промотер регионима гена. Полиморфизми у промотер регионима гена могу деловати на везивање транскрипционих фактора и довести до промене експресије гена. Уколико су SNP смештени у кодирајућим регионима гена могу довести до промена у структури и функцији протеина, док SNP који се налазе у некодирајућим секвенцама могу утицати на *splicing* гена (Nilsen, и сар., 2015). SNP могу интерферирати са *microRNA* или дугим некодирајућим местима везивања RNA и доводити до епигенетских модификација (Smith, и сар., 2012).

У погледу ризика за настанак лимфома, испитивани су полиморфизми у генима који утичу на ДНА интегритет и метилацију. Другу велику групу од интереса за настанак лимфома чине полиморфизми у генима који утичу на преживљавање и раст Б-ћелија и обухватају полиморфизме у генима за проинфламаторне и имунорегулаторне цитокине, гене укључене у природни имунитет, оксидативни стрес, регулисање енергије и производњу хормона. Важну групу полиморфизама гена чине гени укључени у ксенобиотички метаболизам (Hill и сар., 2006). Генски полиморфизми појединих ксенобиотичких ензима који учествују у метаболизму неких канцерогена могу допринети услед промењене ензимске функције појачаном деловању канцерогена и његових метаболита и утицати на већу стопу настанка NHL и DLBCL (Chiu and Blair, 2009).

Резултати до сада највеће објављене асоцијационе студије Rothman-а и сар., *InterLymph* студија, утврдила је повезаност SNP у генима за фактор некрозе тумора (TNF)- $\alpha$  и интерлеукин (IL)10 са склоношћу за настанак лимфома (Rothman и сар., 2006). Ова студија на великом броју испитаника је потврдила повезаност присуства TNF- $\alpha$  308AA генотипа са повећаним ризиком од 25% и 65% за настанак NHL, односно DLBCL, ретроспективно. Такође, резултати исте студије су показали повезаност полиморфизама у дисталном и проксималног региону гена за IL10 са повећањем DLBCL ризика за 28%. *InterLymph* студија је потврдила повезаност између полиморфизма *IL-6* (-174 G/C; rs1800795) промотера и ризика за NHL (Rothman и сар., 2006).

Такође, резултати студије указују да полиморфизам *IL-2* (-330T/G и +114T/G) гена може бити повезан са повећаном осетљивошћу према инфламаторним и малигним болестима (Serhan и сар., 2007).

Генски полиморфизам ензима из мултипле породице цитохрома P450 (CYP) и глутатион S-трансферазе (GST) има своје место, према резултатима студија, у лимфогенези (Ihsan и сар., 2014). CYP1A1 ензим је критичан у активирању полицикличних ароматичних угљоводоника и диоксида, и повезан је са леукемијом у детињству (Aschebrook-Kilfoy и сар., 2012). CYP3A4 је укључен у оксидацију паратиона и других орнанофосфатних инсектицида, који су повезани са NHL (Kyle и сар., 2013).

### 2.6 Фактори животног стила

Све више се истражује и повезаност исхране са етиологијом NHL. Показано је да ризик од NHL може бити повезан са повећаним уносом животињских протеина (Skibola, 2007), док повећан унос воћа и поврћа богатог каротеном је показао инверзну повезаност са NHL (Chiu и сар., 2011; Charbonneau, 2013).

## 3. ПАТОФИЗИОЛОШКИ МЕХАНИЗМИ DLBCL

### 3.1 Диференцијација Б лимфоцита

Б-лимфоцити настају у коштаном сржи диференцијацијом прекурсорних ћелија под стимулативним дејством *IL7* секретованог од стране стромалних ћелија коштане сржи. У току матурације долази до реаранжирања генских локуса, прво за тешке (IgH), а за тим за лаке ланце имуноглобулина (IgL). У току реаранжирања гена избор генског сегмента IgH са варијабилног (V) локуса који се комбинује са сегментом разноликости (D) и једним спојним (J) сегментом случајно се врши (Eibel, и сар., 2014). Рекомбинација је иницирана од стране специфичних RAG1 и RAG2 протеина, који сарађују са специфичним секвенцама препознавања (рекомбинантне сигналне секвенце, RSSS) (Martin, 2002). Прекурсорске Б-ћелије поседују на мембрани имуноглобулине (IgM и IgD), који функционишу као антиген рецептори, улазе у процес позитивне



селекције, преживљавају и придружују се популацији наивних Б-ћелија. Ћелије које подлегну негативној селекцији улазе у процес апоптозе у коштаном сржи.

Наивне Б-ћелије напуштају коштану срж и насељују периферне лимфне органе, претежно лимфне чворове. Лимфоцити улазе у герминативни центар лимфног чвора бивају стимулирани антигеном након чега постају центробласти, пролиферишу и сазревају у центроците (Giltiaу, и сар., 2012). Током диференцијације антигеном активираних Б-ћелија, у реаранжираним генским локусима накупљају се тачкасте соматске мутације, које се називају соматске хипермутације (SHM) и којом се мења афинитет мембранских имуноглобулина за антиген. Процес CSR је завистан од бројних ћелијама посредованих и цитокинских сигнала које луче фоликуларне дендритичне целије продукујући IL2, IL4, IL10, IL12, IL13, IL17, IL21, INF gamma, TGF beta i TNF alfa. Међусобна интеракција фактора раста и цитокина је неопходна за преживљавање и пролиферацију у поступку стицања различитих антигена (Moensand Tanguе, 2014).

Центробласт експримира *BCL-6* и *CD10* ген на којима се дешавају хипермутације. У даљем току долази до експресије и *BCL-2* гена. Кључни моменат за сазревање Б-ћелија у герминативном центру је нисходна регулација *BCL-6* која је подстакнута контролном функцијом CD40 и CD23 лиганда на које делују цитокини Т-хелпер лимфоцита (IL4). Поремећаји током процеса рекомбинација могу да доведу до иницијације малигне трансформације и настанак лимфома (Linderoth и сар., 2003).

### **3.2 Механизам малигне трансформације**

DLBCL настају малигном трансформацијом Б ћелија током процеса диференцијације у прегерминативним, герминативним и пост герминативним центрима секундарних лимфних органа.

#### **3.2.1 Хромозомске абнормалности**

Соматске мутације у важним регулаторним секвенцама гена, амплификације и хромозомске транслокације су најчешће промене на генима које утичу и мењају нормалан развој Б ћелија.

Хромозомске транслокације представљају главни механизам активације протоонкогена укључених у настанак NHL-а, а настају као резултат узајамне замене тачно одређених секвенци између два различита

хромозома. У току ових транслокација, протоонкоген је у близини места прекида (новог споја) и најчешће не долази до настанка фузионог гена, већ се прото-онкоген поставља у близину хетерологе регулаторне секвенце (Gaidano и сар., 2000). Најчешће је то регулаторна секвенца гена рецептора за антигенали може бити и било која друга секвенца на датом нивоу диференцијације ћелије од које лимфом води порекло. Последично долази до грешке у преписивању прото-онкогена које може бити хомотропно и хетеротропно (Kuppers and Dalla Favera, 2001). Док се хомотропни поремећај односи на прото-онкогене који се иначе преписују у нормалним ћелијама, хетеротропни поремећаји се односе на прото-онкогене који се не преписују у нормалним ћелијама и од чијег измењеног клона потиче лимфогенеза. Механизам ове хромозомске транслокације се још увек не зна прецизно, али новија истраживања потврђују претходне хипотезе да је поремећај ензима учесника рекомбинације гена (*AID - activation induced cytidine deaminase*) одговоран за погрешна спајања (Nagaoka и сар., 2002).

Како су хромозомске транслокације присутне и код здравих људи који немају лимфом, присуство ових кариотипских промена није довољно за настанак лимфома (Marculescu и сар., 2002).

Процес соматске хипермутације доводи углавном до супституција нуклеотида у преуређењу варијабилних региона гена док делеције и дуплирања чине око 5% мутација (Sherry и сар., 2011). Мутације се јављају са веома високом стопом,  $10^3$  до  $10^4$  парова база по једној ћелији по једној деоби у региону око 1-2 kb низводно од транскрипционог промотера (Xie и сар., 2014). Изгледа да хипермутација зависи од присуства Ig појачивача за транскрипцију Ig гена, и да посебно изазива иницијацију транскрипције (Hu и сар., 2013). Недавно је показано да се хипермутација јавља због грешке ДНА полимеразе (Chen и сар., 2014).

Упркос кључној улози хипермутација репараторних гена, постоји недовољно доказа који подржава њихово директно учешће у пропагирању геномске нестабилности у Б-ћелијама лимфома. Насупрот томе, појединци са биалелским герминалним мутацијама у неким од гена за поправку ДНА често показују уз имунодефицијенцију повећан ризик за развој лимфома (de Miranda и сар., 2011).

Гени укључени у поправку ДНА продукују NHEJ (*nonhomologous end-joining*) протеине и ензиме који су делимично склони грешкама зато што



поправљају нехомологе прекинуте ланце ДНА и овај пут поправке је константно активан за разлику од HR (*homologous recombination*) која је активна само у S фази ћелијског циклуса за репарацију хомологих ланаца ДНА (Lieber и сар., 2010). Дефицит у овим протеинима у оквиру p53 гена дају предиспозицију за развој имунодефицијенције и про-Б-ћелијских лимфома. Многе студије сугеришу да NHEJ/V(D)J мутације могу да учествују у лимфогенези (Nähnel и сар., 2014).

Код DLBCL најчешће су захваћени *BCL-6*, *BCL-2* и *Myc* онкогени. Хромозомске аберације које обухватају *BCL-6* су једне од најчешћих и повезане су са повећаним ризиком за развој DLBCL. *BCL-6* је прото-онкоген који је смештен на хромозому 3q27 и експримиран је на нормалним Б-ћелијама герминативног центра (Green и сар., 2014). Његова улога је да блокира гене укључене у прогресију ћелијског циклуса у одговору на оштећење ДНА (Lenz and Staudt, 2010). Хромозомске транслокације које укључују *BCL-6* ген јављају се у 30% до 40% случајева. Промене у експресији *BCL-6* протеина услед хромозомских аберација могу да доведу до неуспеха у диференцијацији ћелија, и последично до активације и пролиферације ћелија. Сходно томе, промовишући опстанак ћелија доприносе генетској нестабилности и малигној трансформацији (Guo и сар., 2014).

*BCL-2* се налази на хромозому 18q21 у региону промотора гена који кодира тешки ланац Ig на хромозому 14q32. Прекомерна експресија *BCL-2* протеина због транслокације 14;18 налази се у 15% до 30% свих DLBCL (Iqbal и сар., 2006). *BCL-2* ген, који кодира анти-апоптозни протеин игра важну улогу у патогенези DLBCL. Овај протеин је укључен у механизме који се односе на отпорност на хемотерапију и показано је да је укупно преживљавање код DLBCL боље уколико је смањена експресија *BCL-2* гена и циклина D2 (Amen и сар., 2007). Међутим, други аутори су показали негативан ефекат експресије *BCL-2* гена само у подгрупи лимфома са генским профилем ABC DLBCL (Meier и сар., 2008).

Мутације *cMyc* онкогена су обично удружене са комплексним променама кариотипа. Најчешћа дисрегулација *cMyc* онкогена је последица транслокације 8;14 током које се *Myc* ген у позицији 8q24 ставља под контролу промотер региона гена за тежак ланац имуноглобулина. Реаранжмани *Myc* гена се могу наћи у 2% до 16% DLBCL, нарочито код екстранодалних лимфома (Friedberg and Fisher, 2008).

У лимфомагенези су присутни и други механизми активације прото-онкогена. Један од њих је амплификација тус онкогена и представља лош прогностички параметар у DLBCL. Мутације могу захватити кодирајуће и регулаторне секвенце и тиме променити биолошке особине протеинског продукта (Cabanillas, 2011).

Поремећај активности тумор супресорских генау DLBCL најчешће је резултат биалелске инактивације. Она настаје делецијом једног и мутацијом другог алела тумор супресорског гена, мада се могу јавити и друге комбинације. Најчешће је у патогенези DLBCL укључен тумор супресорски ген *p53*, код 30 % DLBCL (Nogai, и сар., 2011). Ген *p53* може бити инактивиран од стране *BCL-6* гена током генезе лимфома. Протеин *p27*, који је укључен у регулацију прогресије ћелијског циклуса из G1 у S фазу заједно са циклином D1, један је од новооткривених тумор супресорских гена (Rendleman и сар., 2014). Протеини *p16*, *p18* и *p21*, такође регулатори ћелијског циклуса, продукти су тумор супресорског гена чија делеција и/или мутација доводи до њихове инактивације (Nogai и сар., 2011).

### 3.2.2 Молекуларна основа генске експресије

Геномска анализа DLBCL је открила висок степен сложености ових лимфома са великом стопом индивидуалне хетерогености. Студије експресије гена су показала да постоје барем три различита подентитета у склопу DLBCL која се карактеришу различитим хромозомским аберацијама и специфичним активним онкогеним путевима. Прву подгрупу чине DLBCL са генским профилем сличним ћелијама герминативног центра (eng. germinal center B-cell-like-GCB), другу лимфоми са генским профилем активираних периферних Б-ћелија (eng. Activated B-cell-like-ABC) и трећој подгрупи припадају примарни медијастинални Б-ћелијски лимфоми (PMBL), који се према профилу експресије гена не могу класификовати ни у GCB ни у ABC DLBCL (Alizadeh и сар., 2000; Rosenwald и сар., 2002; Wright и сар., 2003). Ове подгрупе се такође разликују и у погледу одговора на примењену терапију и исхода лечења. DLBCL GCB имају значајно бољи терапијски одговор и петогодишње преживљавање од око 76%, у поређењу са ABC DLBCL код којих је петогодишње преживљавање само 16% (Bohers и сар., 2014).

ABC DLBCL најчешће имају тризомију 3q и 18q21-q22, као и губитак 6q21-q22, док GCB DLBCL се карактеришу променама на 12q12 (Iwasaki and Medzhitov, 2010).

Карактеристика ABC подтипа је конститутивна активност NF-κB пута. За разлику од нормалних Б ћелија GC и GCB DLBCL, већина ABC DLBCL нема рекомбинације класа имуноглобулина (CSR), тако да на ћелијској површини најчешће експримирају само IgM имуноглобулине (Carbone и сар., 2014). ABC DLBCL стичу генетске лезије које ометају даљу диференцијацију Б ћелија у плазма ћелије што се сматра важним почетним кораком у патогенези ABC DLBCL, мада је природа прекурсорских ћелије нејасна (Younes, 2013). Сматра се да могу да потичу од IgM меморијских ћелија постгерминативног порекла или од прегерминативних Б ћелије (Gloghini and De Leval, 2013).

Лимфоми облика PMBL се манифестују туморском променом медијастинума и карактеристика су младих жена. Туморска маса често садржи остатак тимуса, сугеришући да потиче од ретких тимусних Б-ћелија (Ritz и сар., 2014). Према профили експресије гена сличнији је Хочкин-овом лимфому (Wilson и сар., 2014).

Различите мутације у наведеним подтиповима DLBCL (CD79A, CD79B, MYD88, CARD11, гени за BCR и NF-κB путеве и епигенетски регулатор EZH2) могу да представљају подлогу за циљану терапију лимфома (Bohers и сар., 2014).

### 3.2.3 Улога GSTу патогенези DLBCL

GSTs (*glutathione S-transferases*) је фамилија мултифункционалних ензима који учествују у метаболизму многих ксенобиотика и канцерогена. GSTs такође игра улогу у модулацији индукције других ензима и протеина у ћелији, нпр. код ДНА поправке и у одржавању интегритета генома (Fang и сар., 2011).

У току процеса детоксикације постоје две фазе: прва фаза укључује реакције оксидације за које је задужен микрозомални комплекс ензима цитохром P450, и друга фаза, у којој мултипли ензими GSTs катализују коњугацију ксенобиотика и канцерогена и тако липофилне агенсе метаболишу у хидрофилне како би се лакше елиминисали из организма (Plyas и сар., 2014). Уједно, GSTs може да учествује у елиминацији и

деградацији хипероксида у току оксидативног стреса (Wilkins и сар., 2014). GSTs су такође укључени у биосинтезу леукотриена, простагландина, стероидних хормона, тирозина.

GSTs су димери лоцирани претежно у цитосолу, али постоји и посебна класа ензима који су смештени у митохондријама где имају значајну улогу у регулацији одбране ћелије од оксидативног стреса, али и у регулацији апоптозе (Ye и сар., 2014).

Фамилија GSTs обухвата сложене и распрострањене ензими који су класификованина основу различитих критеријума, укључујући аминокиселине, нуклеотидне секвенце, имунолошке и кинетичке критеријуме (Mashiyama и сар., 2014). Свака подфамилија може да садржи високо хомогене полипептиде, који могу да деле више од 90% идентитета ензима. Аминокиселински остаци на позицијама 60 и 80 су слични у класама GSTs (Abdellaoui и сар., 2014). Различите структуре гена GSTs фамилије и њихове хромозомске локализације упућују на разноликост у величини интрона и егзона и на основу ових карактеристика су подељени на *alpha*, *kappa*, *mu*, *omega*, *pi*, *sigma*, *theta* и *zeta* (Webb и сар., 1996; Licciardello и сар., 2014). Фамилија GSTs *kappa* припада митохондријалној GSTs и независна је група протеина, под називом MAPEG ("мембрана-асоцирани протеини укључени у еикосаноид и глутатион метаболизам") и то су мембранске компоненте микрозоме и митохондрија ћелија. Код сисара, GSTs су присутне у готово свим ткивима. Код људи, највиши ниво цитосолне GSTs активности је изражен у јетри, док бубрег, плућа, и црева имају ниже нивое активности.

Свака GSTs суб јединица се састоји од N-терминалног и C-терминалног домена. Овај последњи домен, који поседује  $\alpha$ -хеликс структуру, садржи део GSTs-везујућег места за везивање хидрофобних електрофила (*H-site*). N-терминални домен везује thioredoxin-like fold ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ ) који гради већи део *H-site*. Овај домен је прилично константан међу различитим класама GSTs за разлику од C-терминалног домена. Варијације у аминокиселинским хидрофобним остацима *H-site* чине подлогу селективности (Dourado и сар., 2008).

Резултати спроведених испитивања указују да ензими из групе GST имају имуномодулаторну улогу у транскрипцији цитокинских гена и у процесима пролиферације ћелија што може довести до неповољног

одговора организма на патогене уколико постоји дефект у *GST* генима. Смањена активност *GST* утиче неповољно и на одговор ћелије на оксидативни стрес. Ензими *GST* су негативни модулатори стреса ћелија и апоптозе изазване лековима и токсинима кроз интеракцију са специфичним сигналним киназама. (Lu, 2014).

*GSTP1-1* инхибира *c-Jun N-terminal kinase (JNK)* кроз директну интеракцију протеин-протеин. *JNK* је митоген-активирана протеин киназа (*MAPK*) укључена у ћелијску диференцијацију и пролиферацију, апоптозу и запаљење. Активиран *JNK* фосфорилише *c-Jun*, компоненту Активатор протеина-1 (*AP-1*), транскрипционог фактора. Ова активација изазива индукцију *AP-1*-зависних циљних гена који доводе до ћелијске пролиферације или ћелијске смрти (Das и сар., 2009).

*GSTP1-1* се повезује и са рецептором *TNF, tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)* и инхибира *TRAF2* индуковану активацију *JNK* и *p38-MAPK* и тако блокира апоптозу (Nie Nie и сар., 2011).

Већина антиканцерских агенса индукује ћелијску смрт или апоптозу туморских ћелија активирањем *MAPK* путева, посебно оних који укључују *JNK* и *p38-MAPK*. Улога *GSTP1-1* као ендемог инхибитора *JNK* активације може инхибирати ове сигналне путеве. Зато, инхибиција *GSTP1-1* обећава као стратегија за лечење канцера.

### 3.2.4 Интерлеукин 2 у патогенези DLBCL

Интерлеукин (*IL*)<sub>2</sub> је откривен 1976 као фактор раста Т-ћелије. *IL2* стварају антигеном активисане Т-ћелије, делује аутокринно стимулишући Т-ћелијску пролиферацију, и такође, потенцира раст и преживљавање *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>* Т-регулаторних ћелија. Према томе, *IL2* је неопходан како за индукцију, тако и за регулацију имуног одговора, посредованог Т-ћелијама. У одсуству *IL2* Т-регулаторна ћелија не може да опстане. *IL2* делује на *IL2* рецептор који има три различите субјединице:  $\alpha$  (55 kDa),  $\beta$  (75 kDa) и  $\gamma$  (64 kDa). Протеолитичким цепањем  $\alpha$  субјединице настаје *CD25* или *sIL2R* који се налази на мембрани *CD4<sup>+</sup>* Т-регулаторних ћелија. Свака субјединица везује се за *IL2* са мањим (*IL2R $\alpha$* ) или интермедијалним (*IL2R $\beta$*  and  $\gamma$ ) афинитетом (Tsuji и сар., 2014, Fujiwara и сар., 2014). *IL2R $\alpha$*  се експримира на Т, Б и НК-ћелијама и моноцитима, тако да само активирани Т и Б лимфоцити експримирају повећан ниво *sIL2* (Yamauchi и сар., 2012).

IL2 је гликопротеин кога секретују Th1 ћелије које имају централну улогу у активирацији Т ћелијама посредованих имуних одговора. Осим што стимулише пролиферацију и диференцијацију Т ћелија, стимулаторно делује и на пролиферацију и диференцијацију урођено убилачких NK ћелија и Б лимфоцита. Уједно доприноси развоју регулаторних Т ћелија и регулише експанзију и апоптозу активираних Т ћелија (de Souza и сар., 2014,; Huang и сар., 2014).

Сва три ланца IL2R су експримирани на активираним Т ћелијама и регулаторним Т ћелијама и везују IL2 са високим афинитетом. Везивање IL2 за рецепторе доводи до активирања најмање три главна сигнална пута: фосфоинозитол 3-киназе (PI3-K)/АКТ, Ras-МАР киназа и ЈАК-STAT путеве са ЈАК1 и ЈАК3 (Wang и сар., 2014).

До сада објављени резултати указују да је ниво солубилног sIL2R (CD25) повећан у болесника са DLBCL и користи се као прогностички индикатор код овог типа лимфома. Матриксметалопротеиназе (MMPs), значајне у ширењу тумора, цепају IL2R $\alpha$  ланце на мембрани ћелија и доприносе повећању нивоа sIL2у DLBCL. Виши ниво sIL2 у серуму оболелих од DLBCL повезан је са мањим терапијским одговором и лошијом прогнозом (Goto и сар., 2012).

MMP производе макрофаги, неутрофили и дендритске ћелије током запаљења и микротуморогенезе. Активност MMP је повећана у лимфомима као и број макрофага (Pennanen и сар., 2008). Повећан број макрофага у ткивима тумора је повезан са лошијом прогнозом у неким облицима лимфома. Уочен је значајно већи број макрофага у ткиву оболелих од DLBCL у поређењу са бројем макрофага у реактивно измењеним лимфним чворовима као и позитивна корелација нивоа sIL-2 у серуму и броја макрофага у екстранодалним ткивима DLBCL (Gloghini и сар., 2013).

Недавно је, међутим, нађено да моноклонално антитело које реагује са IL2 рецепторима на активираним Т ћелијама (анти-TAC) реагује и са одређеним туморским Б ћелија. Рекомбинантни IL2, изведен из *Esherichia coli* која експримира хумани ген, је у стању да промовише јаку пролиферацију хуманих активираних Б ћелија. Осим тога, резултати учињених испитивања су показали да анти-TAC антитела такође реагују са нормалним Б ћелијама активираним *Staphylococcus aureus*-омида



инхибирају пролиферативни одговор таквих ћелија IL2. Коначно, експерименти имунопреципитације су открили да анти-TAC дефинишу сличне молекуле како на активираним Т тако и на Б ћелијама (Miyazaki и сар., 2010).

### 3.2.5 Интерлеукин 6 у патогенези DLBCL

Интерлеукин (IL) 6 је мултифункционални цитокин који регулише имуни одговор, хематопоезу и акутни фазни одговор у инфламацији. Своје биолошке функције остварује преко два рецепторна молекула: IL6R рецептора (gp80,CD126) и gp130. Када се IL6 веже за mIL6R (membrane-bound form of IL6R), долази до хомодимеризације gp130 чиме се повећава афинитет за лиганд. Интересантно је и да се sIL6R (soluble form of IL6R) такође везује за IL6, и комплекс IL6-sIL6R може да формира комплекс са gp130. Хомодимеризација комплекса активира JAKs (Janus kinases) које фосфорилишу тирозинске остатке на цитоплазматској домени gp130. Тако се активирају два пута: први, gp130 Tyr759-SHP-2 (Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2)/ERK (extracellular-signal-regulated kinase) MAPK (mitogen-activated protein kinase) пут и други, gp130 YXXQ-JAK/STAT (signal transducer and activator of transcription) пут (Rose-John и сар., 2004).

Повећање нивоа IL6 је повезано са инфламацијом, аутоимуним оболењима и туморима. IL6 продукују Т и Б ћелије, моноцити, фибробласти, кератиноцити, ендотелне ћелије, мезангијалне ћелије, адипоцити и неке туморске ћелије. Рецептор IL6 (IL6R) је углавном дистрибуиран на хематопоеским ћелијама. Блокатор IL6R, TCZ (tocilizumab; хумано IL6R моноклонално антитело) примењује се у неким аутоимуним болестима и код тумора (Yoshimura и сар., 2009). У циркулацији се налази sgp130 (soluble gp130), који снажно инхибира комплекс IL6-sIL6R са мембранским gp130 (Jostock и сар., 2001).

Рецептор gp130 учествује и у сигналним путевима других цитокина и фактора раста, укључујући LIF (leukaemia inhibitory factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), IL11 и IL27 (Dillon, и сар., 2004). Са другим цитокинима, као што су IL3, IL5 и GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor) користи заједно  $\beta$  рецептор, а са IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 и IL21 користе заједно компоненте  $\gamma$  рецептора (Rochman и сар., 2009). Интерлеукин 6 рецептор, познат као CD126, је протеински комплекс

који се састоји од IL6 рецептор субјединице  $\alpha$  - IL6R $\alpha$ , као и од интерлеукин 6 трансдуктор сигнала, гликопротеина 130 (познат као CD130), који дели са другим цитокинима, члановима IL6 фамилије (Heinric и сар., 1998). Остали чланови фамилије IL6 су: IL11, IL27, цилијарни неутрофилни фактор (CNTF), кардиотрофин-1 (СТ-1), кардиотрофину сличан цитокин (CLC), инхибициони фактор леукемије (LIF), онкостатин М (OSM) и Капошијев сарком асоцирани херпес вирус (KSHV). Везивањем IL6 за његов рецептор се иницира каскада преноса сигнала преко Јанус киназе - ЈАК, као и везивањем STAT, транскрипционог фактора, посебно STAT3. Фосфорилисани STAT3 формира димер који у једру активира транскрипцију гена који садрже елементе STAT3 одговора. Мутације у Јанус кинази су главни молекуларни поремећаји у хематолошким малигнитетима код људи (Hirano и сар., 2000). Други пут преноса сигнала путем активације IL6R је Ras посредовани пут преноса сигнала. Он се одвија преко митогеном активираниог протеина – MAP киназе, који активира транскрипционе факторе као што су ELK-1 и NF-IL-6, који заједно са транскрипционим фактором AP-1 и фактором серумског одговора (SRF), регулишу низ комплексних промотора и енхансера да реагују на IL6 и друге сигналне факторе (Ichiba и сар.,1998). Поред ЈАК/STAT и Ras/MAP путева преноса сигнала, IL6 активира PI3K и протеински комплекс NF-КарраВ (Chan и сар.,1997). PI3K/Акт/NF-Карра В каскада финално утиче на антиапоптотички ефекат IL6 који се приписује фосфорилацији BCL-2. IL6 такође блокира TGF $\beta$  индуквану активацију каспазе 3, која је од суштинског значаја за програмирану ћелијску смрт (Harrington и сар.,2008). Неуспела апоптоза је један од главних разлога настанка тумора и развоја аутоимунских болести, док нежељена апоптоза настаје код исхемија или Алзхеимер-ове болести.

IL6 има плејотропно дејство, може да делује про-инфламаторно и анти-инфламаторно, тј. упално и анти-упално. Читав спектар различитих утицаја IL6 на разне ћелије указује на активност овог цитокина у регулацији имунског одговора и запаљењске реакције. Он такође иницира имунски одговор на трауму, посебно на опекотине, као и на неоплазије. И поред тога што спада у групу Th2 цитокина, IL6 подједнако помаже расти нарочито диференцијацију Т и Б лимфоцита. IL6 не подстиче секрецију цитокина, али повећава осетљивост имунокомпетентних ћелија на друге цитокине, највероватније утицајем на број и афинитет цитокинских



рецептора. Продукција и секреција IL6 се увек повећава у акутној фази запаљења, а његова улога као анти-упалног цитокина се огледа у његовом инхибиторном деловању на TNF $\alpha$  и IL1 и активацијском деловању на IL-1R $\alpha$  и IL10. Про-инфламаторна улога IL6 се огледа у промоцији Th17 диференцијације и инхибицији Т рег диференцијације, што указује да IL6 балансира између ове две популације ћелија и може ублажити симптоме аутоимунских болести.

IL6 повећава синтезу имуноглобулина IgM, IgG и IgA у Б-ћелијама путем повећања активности CD4<sup>+</sup> Т-ћелија и веће IL21 продукције. Анти IL6 антитело инхибира митогенима активiranу синтезу Ig без деловања на ћелијску пролиферацију (Dienz и сар., 2004).

IL6 стимулише Th ћелије и инхибира IL2 продукцију и индукцију Т регулаторних ћелија (Yoshida и сар., 2010).

Резултати више објављених студија указују да је ниво IL6 повишен код неких тумора и да је повезан са неповољном прогнозом код карцинома бубрега, јајника, простате, меланома, алиилимфома (Malinowska и сар., 2009; Ara, 2010). Активирањем ERK1/2, IL6 стимулише не само пролиферацију тумора већ промовише метастазирање, опште симптоме и кахексију код тумора (Dutt, 2009).

Добро је познато да је IL6 главни фактор раста туморских мијеломских ћелија (Kawano и сар. 2000). Биолошка улога IL6 у хуманој Б-ћелијској туморогенези испитивана је на EBV-ом трансформисаним Б-лимфобластима у које је убачен трансфекцијом хумани IL6 ген. Конститутивна експресија IL6 у ћелијама миша је изазвала малигну трансформацију Б-ћелија у условима имунодефицијенције (Ghesquière и сар., 2013).

### 3.2.6 CD14 у патогенези DLBCL

Молекул CD14 је испољен на моноцитима, макрофазима, гранулоцитима и дендритичним ћелијама. Делује као корецептор за бактеријске липополисахариде (LPS). Има улогу у активацији макрофага индуковану LPS. CD14 ћелије имају улогу у стимулацији Т и Б-ћелијске пролиферације. Утицај CD14 моноцитана Б-ћелијски одговори де посредно активацијом антиген специфичних Т ћелија који доприносе формирању CD40 лиганда на Б ћелијама. Активирани CD40 лигандом,

CD14 моноцити могу директно да утичу на Б ћелије и ослобађају цитокине, IL10 који уз сарадњи с aIL2 стимулише пролиферацију Б ћелија (Bergtold и сар., 2005).

BAFF (B cell-activating factor), цитокин из TNF фамилије везује се за CD40L, и стимулише Б ћелијску пролиферацију. Иначе је експримиран на DC, моноцитима и макрофагима (Nardelli и сар., 2001). BAFF спречава апоптозу Б-ћелија.

У туморским ћелијама лимфома експримирана су 3 рецептора: BAFF или APRIL (a proliferation-inducing ligand), који су названи BAFF-R, Б-ћелијски антиген сазревања (BCMA), трансмембрански активатор, калцијум модулатори циклофилин лигандинте реактор (TACI) (Pelekanou и сар., 2013). BAFF и APRIL су експримирани у DLBCL на моноцитима или Б-ћелијама (Maskau и сар., 2004). У ткиву DLBCL је запажен повећан број CD14+ моноцита који продукују активаторе Б-ћелија и тако подржавају развој туморских ћелијаи погоршавају прогнозу (Chris и сар., 2007).

Имајући у виду наведено, присуство CD14+ моноцитаи BAFF рецептора подржава пролиферацију и преживљавање Б-ћелија у DLBCL. Многе студије су показале да присуство повећаног броја CD14+ моноцита у инфилтрату DLBCL је повезано и са појачаном секрецијом CCL5 (C-C chemokine ligand 5 ) који привлачи моноците из крви у тумор (Zhang и сар., 2009). CCL5 је иначе хемокин кога продукују моноцити, Т лимфоцити, тромбоцити, туморске ћелије и друге ћелије и главна је мета NF-κB пута активације.

Полиморфизаму BAFF генима или генима његових рецептора играју значајну улогу у лимфогенези, тако да се све више разматра примена инхибитора овог фактора у терапији лимфома (Pelekanou и сар., 2013).

Испитивањем културе Б ћелија у ткиву DLBCL запажено је да су CD14+ моноцити изузетно ефикасни у активацији Б-ћелија које су активирани са анти-BCR/анти-CD40/IL2 терапијом. У стромалном ткиву тумора доказано је присуство CD14+ моноцита. Култивисање ћелија лимфома без моноцита и егзогеног BAFF/IL2 је доводило до пропадања туморских ћелија и додавање само цитокина није могло да опорави туморске ћелије, што потврђује значај CD14+ моноцита у генези лимфома (Venkatesan, 2014). Показана је повишена експресија CCL5 у ћелијама DLBCL али само у културама ћелија у којима се налазе моноцити и цитокини. Овај хемокин

даље привлачи моноците и Т ћелије чиме се у DLBCL подржава лимфогенеза (Yano и сар., 2014).

### 3.2.7 Полиморфизми у генима за цитокине

Цитокини и њихови рецептори су веома полиморфни (Haukim, и сар., 2002). Бројне до сада објављене асоцијационе студије истраживале су удруженост полиморфизама у генима за различите цитокине са ризиком за настанак или прогнозу различитих хематолошких оболења, укључујући и DLBCL. Обзиром на различите технике и методе примењиване у овим студијама, и даље постоје контраверзе у погледу стварног функционалног значаја SNP у генима за цитокине и њихов утицај на појаву или клинички ток лимфома (Smith and Humphries, 2009).

### 3.2.8 Генски полиморфизам IL6

Један од најчешће испитиваних гена у погледу функционалности је ген за IL6, и нешто мање, ген за IL6R. Ген за IL-6 се налази на кратком краку хромозома 7(7p21) и у геному човека заузима 1.125 bp. Састоји се од пет егзона и четири интрона. До данас је познато 147 полиморфизама у овом гену. Унутар егзона описана су 54 полиморфизама, и то 37 у кодирајућем подручју, 12 испред и 5 иза кодирајућег подручја. Најчешћа до сада испитивања су обуватала 4 SNP у промотер региону *IL6* у позицији -597 (G/A), -572(G/C), -373(A/G), и -174(G/C).

Најчешће је предмет досадашњег истраживања обухватао полиморфизме у *IL6* гену који се налазе у промотер региону гена, и то најчешће, SNP кластер ID броја (rs) 1800795 (-174G/C). Студије на анималним моделима су показале 2.4-3.6 пута пораст у експресији повезан са G алелом-174 IL2SNP, ипак, друге *in vivo* и *in vitro* студије нису биле успешне да прикажу удруженост алела и њихове активности. Могуће да SNP смештени у дисталном промотер региону могу бити одговорни за већину функционалних варијанти у *IL6* гену (Smith, и сар., 2012).

Повишена концентрација IL6 је повезана са лошијом стопом одговора и прогнозом код оболелих од хроничних лимфопрлиферативних оболења као што су хронична лимфоцитна леукемија, Хочкинови и NHL. Giachelia са сарадницима је показала да су резултати оболелих од DLBCL лечених ритуксимабом били повезани са нивоом IL6. Иста студија међутим, није потврдила генотипску-фенотипску повезаност између нивоа IL6 и IL6 rs 1800795 SNP (-174 G/C) (Giachelia и сар., 2012).

### 3.2.9 Генски полиморфизам IL2

Ген за IL2 се налази на хуманом хромозону 4q. Два полиморфизма, -330T / G и +114T / G, идентификована су у IL2 гену, први у региону промотера на позицији -330 (John и сар., 1998), и други у првом ексону на позицији +114 (Matesanz и сар., 2000). Објављени резултати истраживања показали су да G алелска варијанта на позицији -330T/G је била удружена са смањеном продукцијом IL2 *in vivo* (Hoffman 2001, Matesanz 2004), и исто тако повезана са различитим болестима и карциномима, укључујући атрофични гастритис, реуматоидни артритис, карцином желуца и лимфомима (Zhao and Wang, 2015; Shin и сар., 2008; Wu и сар., 2009).

Механизам којим полиморфизам IL2 гена на позицији -330T / G утиче на појаву NHL није у потпуности јасан. Са једне стране, IL2 је укључен у диференцијацију Б ћелија, и на другој страни, IL2 промовише експресију и повећава интринзичну цитотоксичност НК ћелија (Meropol и сар., 1998; Einsebes и сар., 2004). Познато је да НК ћелије посредују у антителима-зависној ћелијској цитотоксичности (ADCC) путем експресије активирајућег рецептора за Fc део IgG антитела (Cooper и сар., 2001). Могуће да смањени ниво IL-2 повезан са генским полиморфизмом IL2 гена може умањити антитуморски одговор путем ADCC код болесника са NHL-ом и, стога, повећати осетљивост на појаву NHL.

### 3.2.10 Генски полиморфизми GST

Ови ензими су производи више гена који се могу сврстати у најмање четири еволуционе класе. Гени који кодирају сваку класу групишу се на различитим хромозомима. Заступљеност различитих класа GST је индивидуална, уочен је недостатак *ти* класе GST1 изоензима у свим расним групама (Sheehan и сар., 2001) и настаје због делеције *GST1* гена.

Постоји кластер од 5 *GSTA* гена који је лоциран на хромозому 12; кластер од 5 *GSTM* гена на 1p13; два *GST-omega* гена на 10q25.1; *GSTP1* на 11q13q; два *GST-theta* гена на 22q11.2; и један ген *GSTZ1* на 14q24.3. Псеудо гени су нађени на различитим хромозомским локацијама од кластера функционалних гена од којих су псеудогени настали (Townsend и сар., 2005).

Генски полиморфизам у ензимској групи GST је повезан са ризиком од многих малигних болести, као што су злоћудне болести плућа, бешике, дебелог црева, али и лимфома (Zhang и сар., 2012). Ова фамилија ензима је

неопходна за детоксикацију цитостатика или њихових метаболит. Њихова детоксикациона активност је круцијална за ефикасност и токсичност циклофосфамида и доксорубицина, који су основни цитостатици за лечење лимфома, и садржани у стандардном CHOP протоколу (Falduto и сар., 2017).

Бројни полиморфизми постоје у генима за *GST*. *GSTM1* и *GSTT1* гени, припадници *GST* супер фамилије, приказују се у две алелске варијанте, првој са хомозиготном делецијом, null генотип, који је повезан са потпуним изостанком функционалног GST ензима и positive алелска варијанта која кодира функционални *GSTM1* или *GSTT1* ензим (Hayes и сар., 1995; Pemble, и сар., 1994; Hayes и сар., 2005).

До сада су спроведене бројне асоцијационе студије које су истраживале повезаност полиморфизма *GSTM1* и *GSTT1* гена и ризика од настанка болести, њихов утицај на резултате лечења новодијагностикованих болесника са DLBCL и токсичне ефекте терапије. Обзиром на биолошку функцију GST, многе епидемиолошких студија су истраживале удружено дејство *GSTM1* и *GSTT1* полиморфизма на исход болесника са DLBCL (Ribrag и сар., 2003; Cho и сар., 2010; Yri и сар., 2013; Yang и сар., 2014). Међутим, резултати различитих студија су донекле дивергентни, што се може преписати различитим ограничењима између студија, као што је различито етничко порекло оболелих, протоколи и фазе лечења, као и различито дизајниране студије (Chin и сар., 2005; Yang и сар., 2014).

Присуство високе активности GST може да допринесе ефикаснијој детоксикацији хемијских канцерогена и заштите ткива од оштећења ДНА (Yang и сар., 2014). Појединци са null генотипом *GSTM1* или *GSTT1* неефикасно елиминишу електрофилне канцерогене, што може да повећа ризик од соматских мутација које доводе до формирања тумора. Такође, показано је да null генотип повећава ризик од DLBCL скоро 4 пута у особа мушког пола (Yang и сар., 2014).

Показано је да прекомерна ензимска експресија GST, нарочито GSTP1-1 је удружена са природном и стеченом резистенцијом на разне структурно несродне антиканцерогене лекове (Ruzza и сар., 2009).

### 3.2.11 Генски полиморфизам CD14

CD14 молекул се експримира на површини моноцита, макрофага, неутрофила и дендритичним ћелијама у форми везан за површину мемембране, али такође, постоји и у облику солубилног протеина. Он има улогу корецептора за бактериски липополисахарид (LPS). Солубилни CD14 може да мења одговор целуларног и хуморалног имунитета директном интеракцијом са Т и В лимфоцитима. Повишене вредности солубилног CD14 су нађене у тешким облицима инфекција и инфламаторним болестима, али и такође у болесника са NHL (Baseggio и сар., 2001).

*CD14* се налази у региону хромозома 5 (5q31.1) који садржи кластере гена који кодирају многе мијелоидне факторе раста. До данас је откривено више полиморфних региона у *CD14* гену, један од њих, *CD14-159C/T* (rs2569190) се налази у промотор региону гена у позицији-159 од стартног места транскрипције, и најчешће је анализиран у асоцијационим студијама. Досадашња испитивања су показала да се ради о функционалном полиморфизму, односно да је присуство Т алела повезано са већим нивоом солубилног CD14 (LeVan и сар.,2001). Показано је да *CD14-159C/T* SNP може бити повезан са развојем карцинома желуца у појединаца са *H. pylori* инфекцијом (Wang и сар.,2014), гастричним MALT лимфомом (Ture-Ozdemir и сар., 2008) и са појавом Хочкиновог лимфома у деце (Andrie и сар., 2009.)

## 4. КЛАСИФИКАЦИЈА DLBCL

Због дифузног раста малигних Б ћелија које мењају нормалну архитектуру оболелог лимфног чвора, према REAL класификацији из 1994. године, по први пут су названи DLBCL. Стални напретци у цитогенетским и молекуларним студијама допринели су да је последних више од двадесет година класификација NHL претрпела многе измене. Од 2016. године у употреби је нова, ревидирана класификација тумора лимфног ткива Светске здравствене организације (WHO)(Swerdlow, и сар., 2016).



**Табела 1. Класификација DLBCL према WHO класификације из 2008.**

***Морфолошки типови***

- A. Центробластни*
- B. Имунобластни*
- C. анапластични*

***Остали***

- I. Т-ћелијски богат хистиоцитима*
- II. Лимфоматоидна грануломатоза*
- III. плазмобластични*
- IV. DLBCL удружен са EBV*
- V. DLBCL удружен са хроничном инфламацијом*
- VI. DLBCL коже доњих екстремитета*
- VII. Примарни DLBCL ЦНС*
- VIII. DLBCL траије животне доби*

***DLBCL субтипови***

- a) медијастинални*
- b) примарни ефузиони лимфом*
- c) интраваскуларни*

***СОО класификација***

- 1) GCBDLBCL*
- 2) ABCDLBCL*
- 3) PMBL*

## **5. ДИЈАГНОСТИКА DLBCL**

Дијагноза болести је заснована на патохистолошкој анализи туморског ткива са имунохистохемијском обрадом ткива. Данас се рутински препоручује употреба FISH анализе у детекцији *MYC* и *Bcl-2* експресије (Swerdlow и сар., 2016).

### **5.1 Имунохистохемијске анализе**

Туморске ћелије у DLBCL експримирају Б-ћелијске антигене (CD19, CD20, CD22, CD79а, PAX5). Површни имуноглобулини (IgM>IgG>IgA) су присутни у 50-75% случајева. Други маркери који се користе у дијагнози и субтипизацији DLBCL су :CD10, Bcl-6, Bcl-2, CD43, CD30, IRF4/MUM1, CD138, MYC, Cyclin D1, EBV, Ki67. Аберантни фенотипови нису неуобичајени у DLBCL, а могу бити одговорни за конфузију у

дијагностици. У неким случајевима, губитак једног или више Б фенотипских маркера је могућ. Око 10% DLBCL испољава CD5 позитивност.

Cyclin D1+, CD5 негативни DLBCL немају карактеристичну t (11; 14) али могу имати додатне копије CCND1/c хромозома 11.18. Такође, за разлику од већине мантлећелијских лимфома (MCL), CyclinD1+ случајеви DLBCL су негативни заSOX11 (Juskevicius и сар., 2014).

Генетске карактеристике као што је реаранжман Bcl-2 је присутан у 20% случајева, реаранжман у Bcl-6 у 30%, мутације Bcl-6 у 70% и реаранжмани MYC у 10% случајева (Ozbalak , 2013).

У неким случајевима, могу постојати аберантне карактеристике фенотипа које је тешко повезати са DLBCL, тако да DLBCL могу делити фенотипске и хистолошке карактеристике са другим лимфомима, највероватније због заједничких патогених путева, као што су лимфоми"сиве зоне" (Tsuji и сар., 2014).

### **5.2 Клиничке карактеристике болести**

Клиничка хетерогеност је значајна одлика DLBCL. Најчешће клиничке манифестације болести су безболно увећани лимфни нодуси, неспецифични знаци системске болести и увећање паренхимних органа и инфилтрованих лимфомом. Екстранодална форма болести се последњих деценија појављује чешће и налази се у око 40% DLBCL (Swerdlow и сар., 2016). Болест може изоловано захватати тонзиле, централни нервни систем, желудац, кости и остала екстранодална места. Током напредовања болести инфилтрација захвата многе органе а посебно јетру, кожу и мозак.

Симптоми су неспецифични и подразумевају фебрилност, анорексију, губитак у телесној маси, ноћно презнојавање.

### **5.3 Лабораторијска и рентгенолошка дијагностика**

Поред лабораторијских (комплетна крвна слика, седиментација, С-реактивни протеин, биохемијски параметри, LDH, имуноглобулини) и вирусолошких анализа, у циљу процене проширености болести спроводе се различите неинвазивне (ултрасонографија, компјутеризована томографија, магнетна резонанца) и инвазивне технике (ендоскопска експлорација гастро и респираторног тракта, анализа ликвора, биопсија



коштане сржи) за дијагностиковање DLBCL. Последњих десетак година користе се и напредније технике коа што је FDG-PET-CT (engl. Fluorine-18-Deoxyglucose Positron Emission Tomography with CT).

У циљу процене проширености болести у употреби је систем стејжирања по AnnArbor класификацији.

## 6. ТЕРАПИЈСКИ ПОТЕНЦИЈАЛИ DLBCL

DLBCL је агресивни лимфом који уколико се не лечи, медијана преживљавања износи мање од 1 године. Алгоритми лечења се дефинишу према степену проширености болести, Интернационалном прогностичком индексу (IPI), старосној доби оболелог и присутним коморбидитетима (Tilly H, Dreyling M, ESMO Guidelines Working Group.). Успешна терапија се спроводи антинеопластичним лековима али и потпорним лечењем које сузбија компликације лимфома и нежељене реакције хемотерапије.

Ритуксимаб је револуционарна терапијска стратегија код DLBCL и примењује се од 1997. године. Поседује неколико механизма антитуморског дејства: везујући се на CD20 антиген који је заступљен у великој концентрацији на површинама нормалних и неопластичних Б ћелија доводи до комплементом индуковане лизе и фагоцитозе, покреће од антитела зависну ћелијску цитотоксичност (ADCC) и индукује секундарну имунуреакцију (Pelekanou и сар., 2014). Последњих година се све више истражује и улога других анти 20, као што су обинутузумаб и офатумумаб.

Код тек откривеног DLBCL, стандардна прва линија је комбинована хемиотерапија по CHOP (циклофосфамид, доксорубицин, винкрестин, преднизон) протоколу. Увођење ритуксимаба, моноклонског анти CD20 уз CHOP терапију допринело је значајно бољем терапијском одговору, продужењу времена до прогресије болести (eng. progression free survival, PFS) и укупном преживљавању (eng. overall survival, OS) болесника са DLBCL. Радиотерапија се примењује у локализованој болести или устањима резидуалне болести након хемиотерапије.

Упркос напретку терапије DLBCL, око 40% болесника је резистентно на терапију прве линије или ће обновити болест након претходне комплетне ремисије. У лечењу резистентне/релапсирајуће болести, примењују се агресивни комбиновани хемиотерапијски протоколи укључујући и

трансплантацију матичних крвних ћелија (Cerchiatti and Leonard, 2013; Nagle и сар., 2013).

## 7. ПРОГНОСТИЧКИ ИНДИКАТОРИ DLBCL

DLBCL је агресивни лимфом са веома хетерогеном прогнозом. У циљу процене проширености болести и одлуке о терапији прилагођеној њеној агресивности, у оболелих од DLBCL се користе бројни прогностички параметри базирани на клиничким, имунохистохемијским и цитогенетским, односно молекуларним маркерима болести.

### 7.1 Интернационални прогностички индекс

Интернационални прогностички индекс IPI (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993) базиран је на лако доступним клиничким параметрима и најчешће се користи у клиничкој прекси за стратификацију болесника у четири групе ризика. У склопу IPI користи се пет клиничких карактеристика болести који одражавају агресивност лимфома (Ann Arbor клинички стадијум болести, ниво лактичне дехидрогеназе у серуму, број оболелих екстранодалних регија), реакцију оболелог на болест ECOG перформанс статус (Eastern Cooperative Oncology Group) и способност оболелог да толерише примењену терапију (старосна доб оболелог).

Како се прогноза оболелих разликује према старосној доби, користи се и Интернационални прогностички индекс за оболеле млађе 60 година, тз. аа IPI (age adjusted IPI). Са овим моделом, базираним на клиничком стадијуму, лактичној дехидрогенази и перформанс статусу, болесници се стратификују у 4 прогностичке групе (Табела бр. 2)

Ризична група	IPI score	Процент пацијената	5-годишња OS стопа	Стопа комплетних одговора
Низак	0	22%	83%	92%
Средње низак	1	32%	69%	78%
Високо средњи	2	32%	46%	57%
Високи	3	14%	32%	46%

Ревидирани IPI (R-IPI) (2005)

Ревидиран Интернационални прогностички индекс (R-IPI) је развијен као модел за предвиђање исхода у болесника који примају терапију базирану на ритуксимабу са хемиотерапијом. Базиран је на истим клиничким карактеристикама које се користе у стандардном IPI, али категорише болеснике у 3 прогностичке групе (Табела бр. 3).

Ризична група	Број IPI фактора	Процент пацијената	4-годишњи PFS	4-годишња OS стопа
Врло добар	0	10%	94%	94%
Добар	1,2	45%	80%	79%
Лош	3,4,5	45%	53%	55%

## 7.2 Имунофенотип као прогностички параметар болести

Имунохистохемијски параметри, експресија bcl-2, X везаних инхибитора апоптозе, CD5, FOXP I, PКСbeta, ICAM 1, HLA DR, c-FLIP, повезују се са лошијом прогнозом, док експресија bcl-6, CD10 и LMO 2 са повољним исходом (Swerdlow и сар., 2016; Stein и сар., 2008).

COO (the cell of origin classification system) је развијени систем хистолошке класификације који дели DLBCL у субтипове GCB DLBCL, ABC DLBCL и PMBL, и значајан је за прогностичку процену болести. Овај систем примењује имунохистохемијски метод TMA (method utilizes immunoperoxidase tissue microarrays). GCB DLBCL субтип је повезан са бољом прогнозом (Bohers и сар., 2014). Резултати објављених студија показују да је петогодишње преживљавање код ABC DLBCL 15-30%, код GCB DLBCL 65-76%, а код PMBL 65% (Bohers и сар., 2014).

## II. ДЕФИНИЦИЈА ПРОБЛЕМА И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

DLBCL је најчешћи Б-ћелијски лимфом са учесталошћу појаве у око 30%. Припадају агресивним неоплазмама лимфног ткива и карактеришу се веома хетерогеном клиничком сликом, одговором на терапију и преживљавањем. У основи ове разноликости се налази комплексна биологија тумора.

Премда је болест сензитивна на терапију, ипак, 30-40% оболелих неће постићи излечење са стандардном R-CHOP терапијом, или ће по постизању ремисије обновити болест, односно релапсирати. Међутим, најмање 30% њих неће одговорити ни на другу терапијску линију, укључујући и аутологу трансплантацију МСН. Очекивано преживљавање болесника који релапсирају након аутологе трансплантације МСН је око 9 месеци (Nagle, и сар. 2013).

У клиничкој пракси користе се различити прогностички параметри базирани углавном на клиничким карактеристикама болести и на патохистолошкој анализи тумора. Међутим, иако корисни за одлуку о терапији, ипак нису довољни да предвиде индивидуалну ефикасност и токсичност за сваког појединачног болесника са DLBCL, обично доводећи до различитих резултата чак и у условима сличног клиничког стадијума и патохистолошког типа болести.

Запажена чешћа појава лимфома у појединим породицама које су изложене истим условима животне средине и навикама, допринела је да је последњих готово двадесетак година значајно повећано интересовање за истраживање генетских варијанти, полиморфизама гена, како у погледу ризика за настанак болести, тако и у погледу њихове повезаности са клиничком сликом болести или пак одговором на стандардну CHOP терапију са ритуксимабом.

Генски полиморфизми представљају варијације у секвенци DNA (Robert и сар. 2014) које се у општој популацији појављују са учесталошћу већом од 1%, и доводе до промена у експресији, структури и активности протеина који је производ гена. Имајући у виду патогенезу DLBCL и различит терапијски одговор на исту R-CHOP терапију, посебном интересовању изложени су полиморфизми у генима који генеришу и контролишу

имунски одговор. Другу циљну групу од интереса чине полиморфизми у генима који контролишу ензимске процесе и метаболизам бројних канцерогена, укључујући и хемиотерапијске агенсе који су саставни део R-СНОР протокола.

Више студија се бавило истраживањима повезаности полиморфизама у генима чији производи контролишу имуни одговор и инфламацију са ризиком за настанак NHL, укључујући и DLBCL (Rothman и сар., 2006; Purdue и сар. 2007; Wang и сар., 2007; Thunberg и сар., 2010; Skibola и сар., 2010). Објављени резултати бројних студија су указали на могућу удруженост полиморфизама, како у генима за цитокине, тако и у генима укљученим у метаболизам различитих канцерогених супстанци са ризиком за настанак лимфома, као и њихову потенцијалну повезаност са клиничким карактеристикама и резултатима лечења оболелих од лимфома, укључујући DLBCL (Rothman и сар., 2006; Purdue и сар. 2007; Aschebrook-Kilfoy и сар., 2012; Cho и сар., 2010). Међутим, резултати наведених студија нису били конзистентни, како у погледу удружености полиморфизама гена са ризиком за настанак болести, тако и у погледу њиховог утицаја на клиничке карактеристике и прогнозу оболелих од DLBCL.

Како је примарни циљ у лечењу оболелих од DLBCL постизање комплетне клиничке ремисије и излечење болести, важно је у време дијагнозе стратификовати болеснике у групе ризика и применити терапију прилагођену њеној агресивности. Иако се у клиничкој пракси употребљавају бројни прогностички параметри базирани на клиничким, патохистолоским и цитогенетским обележјима, ни један није показао да у потпуности корелира са преживљавањем оболелих од DLBCL.

Нова сазнања о удружености полиморфизама гена са исходом лечења оболелих од DLBCL могу да допринесу бољој процени ефикасности и токсичности појединих лекова и пруже могућност примене терапије прилагођене поједином болеснику у зависности од порекла и поднебља.

## 1. ХИПОТЕЗА

На основу досадашњих сазнања из литературе у којима није јасно дефинисана повезаност полиморфизма у генима који контролишу имунске процесе и метаболизам хемијских агенаса са клиничким карактеристикама и прогнозом оболелих од DLBCL, постављена је следећа радна хипотезе:

Присуство полиморфизама у генима за *GST*, *IL2*, *IL6* и *CD14* у болесника са DLBCL је удружено са клиничким карактеристикама, резултатима лечења и прогнозом оболелих.

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Да бисмо проверили хипотезу постављени су следећи циљеви:

- Испитати учесталост полиморфизама у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2* -330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T код болесника са DLBCL.
- Код болесника са DLBCL испитати постојање повезаности између полиморфизама у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2* -330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T и клиничких карактеристика болести.
- Истражити удруженост полиморфизама у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2*-330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T са одговором на терапију, током и исходом лечења у оболелих од DLBC

### III. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДОЛОГИЈА РАДА

#### 1. ИСПИТАНИЦИ

Ово истраживање је обухватило 156 болесника са DLBCL. Клинички подаци о болесницима са DLBCL су приказани у табели 4.

Карактеристике болесника/DLBCL (n=156)	n (%)
Жене	81 (51.9)
Мушкарци	75 (48.1)
≤60 година	106 (67.9)
>60 година	50 (32.1)
IPI 0, 1, 2	104 (66.7)
IPI 3, 4, 5	52 (33.3)
Клинички стадијум I/II	80 (51.3)
Клинички стадијум III/IV	76 (48.7)
Присуство екстранодалне болести	102 (65.4)
Одсуство екстранодалне болести	54 (34.6)
Туморски облик болести ( <i>Bulky disease</i> )	68 (43.6)
Није присутан туморски облик болести	88 (56.4)
Апсолутни број лимфоцита <sup>a</sup>	
<1220/mm <sup>3</sup>	73 (50)
≥1220/mm <sup>3</sup>	73 (50)
Апс. бр. лимфоцита/апс. бр. моноцита <sup>a</sup>	
<2870/mm <sup>3</sup>	88 (60)
≥2870/mm <sup>3</sup>	58 (40)
Одговор на терапију	
комплетна клиничка ремисија	92 (59.0)
парцијална ремисија	37 (23.7)
прогресија болести током терапије	27 (17.3)
Релапс	37 (28.6)



Према детерминисаним прогностичким параметрима болесници су подељени у две прогностичке групе :

1. група болесника са дефинисаним параметрима лоше прогнозе:

- животна доб већа 60 година
- Ann Arbor клинички стадијум (CS) III-IV
- IPi скор 3-5
- туморски облик болести дефинисан величином патолошког периферног лимфног чвора већег од 7 cm или туморским обликом болести медијастинума дефинисаног као попречни промер медијастиналне туморске масе већи од 1/3 промера грудног коша
- присуство општих тегоба при дијагнози болести ( презнојавање, губитак у телесној тежини, повишена телесна температура)
- присуство екстранодалне болести у > 1 локализације

2. група болесника без параметара лоше прогнозе

У истраживање су укључени болесници код којих је дијагноза, лечење и систематско праћење спровођено у Клиници за хематологију ВМА у периоду од маја 2005 год. до децембра 2014.

Из испитивања су искључени болесници: 1) са претходном дијагнозом нискоагресивног лимфома који је трансформисао у DLBCL, 2) болесници са удруженим вирусом имунодефицијенције (HIV) и DLBCL, и 3) болесници са системском болести везивног ткива и DLBCL.

У истраживање су укључени болесници код којих је уводна терапија била rituximab (R)-CHOP (ciklophosphamide, adriamycin, vincristin, pronizon) протокол (6-8 циклуса). Радиотерапија у дози од 30-36 Gy је спроведена у болесника који су у време дијагнозе имали одлике туморског раста болести или су задржавали локално резидуалну болест по спроведеном лечењу.

Сви болесници или чланови њихове уже породице су потписали пристанак за ово истраживање, након чега је добијена и сагласност Етичког комитета ВМА (од 18.05.2010, ВМА/06-10/А.2).

## 2. МЕТОДОЛОГИЈА РАДА

Дијагноза болести је постављена у складу са критеријумима за класификацију тумора лимфног ткива Светске здравствене организације из 2008. године на основу патохистолошке анализе патолошког лимфног чвора или екстралимфатичне туморске промене са имунохистохемијском обрадом ткива (Swerdlow, и сар., 2008). Код болесника код којих је дијагноза DLBCL постављена пре 2008 године спроведена је патохистолошка ревизија тумора са додатном имунохистохемијом.

Анамнеза је подразумевала присуство општих тегоба (повишена телесна температура, присутно презнојавање и губитак у телесној тежини) и податак о придруженим болестима, породичној анамнези са посебним освртом на присуство малигних болести лимфног ткива у најближих сродника.

У клиничком налазу су се пратиле периферне лимфне жлезде, величина јетре и слезине, промене на кожи или поткожном ткиву и неуролошки налаз.

У свих болесника су спроведена стандардна хематолошка (крвна слика са размазом периферне крви), биохемијска (параметри бубрежне функције, гликемија, укупни билирубин, укупни протеини, електролити, ензими јетре, лактична дехидрогеназа, алкална фосфатаза), имунолошка (имуноглобулини, електрофореза протеина серума, Coombsov тест) и вирусолошка испитивања (HBV, HCV, HIV, EBV, CMV).

У циљу процене проширености болести спровођена су комплекса радиолошка дијагностика (RTG срца и плућа, компјутеризована томографија грудног коша, трбуха и мале карлице, централног нервног система), у случају екстралимфатичних манифестација ендоскопска испитивања као што су гастроскопија, колоноскопија, бронхоскопија, анализа ликвора и биопсија коштане сржи.

Клинички стадијум болести (CSI-IV) одређиван је према Ann Arbor класификацији (Carbone и сар., 1971), а опште тегобе, ткз. Б симптоми на основу присуства повишене телесне температуре, губитка у телесној тежини за више од 10% у последњих 6 месеци и присутног ноћног

презнојавања. Туморски облик болести смо дефинисали према уздужном промеру патолошке промене (лимфни чвор и/или екстралимфатична промена) која је већа од 7 цм и /или према попречном промеру средогруђа који је био већи од трећине укупног попречног промера грудног коша. Интернационални прогностички индекс (PI скор) је одређиван на основу пет установљених параметара: животна доб, Ann Arbor CS, ниво лактичне дехидрогеназе у крви, перформанс ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) статус и више од једног захваћеног екстралимфатичног органа према критеријумима Shipp-а и сарадника из 1993 године.

Процена клиничког одговора базирана је према установљеним критеријумима Chesona и сарадника из 2007 године (Cheson и сар., 2007).

Наведена клиничка испитивања спроведена су у Централној клиничко-биохемијској лабораторији у ВМА, Институту за радиологију и радиотерапију ВМА и Институту за патологију ВМА. Анализе полиморфности гена спроведене су у Институту за молекуларна и експериментална истраживања ВМА.

### **3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО ИСТРАЖИВАЊА**

#### **3.1 Коришћене хемикалије**

Током израде експерименталног дела овог рада коришћене су следеће хемикалије:

- 2 x PCR Master Mix ( Qiagen, Немачка)
- Агароза (Serva, Немачка)
- Акриламид (Bio-Rad Laboratories, САД)
- Амонијум-персулфат (Bio-Rad Laboratories, САД)
- Азотна киселина ( Merck, Немачка)
- Бис-акриламид (Serva, Немачка)
- Борна киселина (Sigma, САД)
- Бром-фенол плаво (Serva, Немачка)
- EDTA (Bio-Rad Laboratories, САД)

- Етанол (Зорка, Србија)
- Етидијум-бромид (Serva, Немачка)
- Фикол 400 (Pharmacia LKB, Шведска)
- Формалдехид (Алкалоид, Македонија)
- Ксенил-цијанол ( Bio-Rad Laboratories, САД)
- Маркер молекулне тежине ДНК- O'RangeRuler™ DNA Ladders
- Натријум-карбонат (Serva, Немачка)
- Прајмери за PCR (Metabion, Немачка)
- Сирћетна киселина (Зорка, Србија)
- Сребро-нитрат (Serva, Немачка)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, САД)
- TaqMan R SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, САД)
- TEMED (Bio-Rad Laboratories, САД)
- Трис-база (Serva, Немачка)
- Трис- Cl (Serva, Немачка)

### 3.2 Изолација ДНК

Периферна крв болесника са DLBCL је узимана у епрувете са EDTA и чувана на  $-40^{\circ}\text{C}$  до изоловања ДНК. ДНК је изолована помоћу комерцијалног кита - PureLink™ Genomic DNA MiniKit (Invitrogen, Carlsbad, САД), према упутству произвођача.

Квалитет изоловане геномске DNA је провераван помоћу електрофорезе на 1% агарозном гелу. Агароза у праху је растварана у 0,5 x TBE пуферу (4.5 mM Tris-baza, 10 mM EDTA, 87 mM борма киселина; pH=8) до кључања. У раствор охлађен до  $70^{\circ}\text{C}$  је додаван етидијум-бромид у финалној концентрацији од  $5\mu\text{g/ml}$ . Гел ( $t \approx 60^{\circ}\text{C}$ ) је изливан у кадицу за електрофорезу и остављен да полимереше. (Sambrook, 1989).

У бунариће гела је стављано по 7  $\mu\text{l}$  геномске DNA и 2  $\mu\text{l}$  боје ( 6 x loading buffer: 0,25% бром-фенол плаво, 0,25% ксилен-цијанол, 20% фикол 400).

Електрофореза се одвијала у 0,5 x TBE пуферу при напону од 80 V и струји од 35- 40 mA око 40 минута (Pharmacia LKB, Шведска). Гел је анализиран под краткоталасном УВ светлошћу трансилуминатора (Pharmacia LKB, Шведска).

Геномска DNA је била одговарајућег квалитета уколико је на гелу након електрофорезе била уочљива јасна трака недалеко од бунарића.

### 3.3 Одређивање *GST* генотипова

У овом истраживању су анализирани *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* генотипови методама које се заснивају на ланчаној реакцији полимеризације (PCR).

Услови PCR-а за умножавање *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* гена су приказани у табели број 5.

За *GSTT1* су описане две алелске варијанте - *GSTT1*-null (делеција гена, повезана са потпуним изостанком функционалног ензима) и *GSTT1*-positive која кодира функционалан ензим. Анализа *GSTT1* генотипа се заснивала на умножавању *GSTT1* региона PCR – ом и детекцији присуства продукта PCR реакције (480 bp) на 2% агарозном гелу након електрофорезе и бојења етидијум бромидом (присуство траке од 480 bp представља *GSTT1*-positive алел, а одсуство *GSTT1*-null алел). Да бисмо са сигурношћу тврдили да одсуство траке од 480 bp представља *GSTT1*- null алел, а не неуспешну PCR амплификацију, паралелно са *GSTT1* секвенцом, умножавао се и део гена за бета актин (289 bp). Узорци у којима није био умножен бета актин су били искључени из студије.

Слично као и за *GSTT1*, за *GSTM1* су описане две алелске варијанте - *GSTM1*-null (делеција гена, повезана са потпуним изостанком функционалног ензима) и *GSTM1*-positive која кодира функционалан ензим, тако да се *GSTM1* генотипизација заснивала на истој методологији, с тим што је величина PCR продукта који представља *GSTM1*-positive алел 132 bp. Пошто *GSTM1*-positive алел има две варијанте *GSTM1*\*A и *GSTM1*\*B, продукти PCR – а су били даље анализирани RFLP методом, која је у овом случају укључивала дигестију са *Hae*II рестрикционом ендонуклеазом према упуству произвођача (ThermoScientific, Литванија) и анализу продукта дигестије на 10% полиакрил амидном гелу након електрофорезе и бојења сребро нитратом. Полиакриламидни гел је

припреман од 30% stock-а акриламида (акриламид : N,N' - метилен бис-акриламид = 29:1), 10 x TBE пуфера (финално у раствору 0.5 x), 10% амонијум-персулфата (350 $\mu$ L у 30 ml раствора), TEMED-а (25 $\mu$ L у 30 ml раствора) и дестиловане воде. Гел је наносен у унапред припремљене калупе за вертикалну електрофорезу и остављен да полимерише. У бунаре гела који су претходно испрани 0.5 x TBE пуфером од остатаката неполимерисаног акриламида, је додавано по 5 $\mu$ L стерилне воде и 2  $\mu$ L боје (6 x loading buffer). Маркер молекулске тежине ДНК је коришћен према упутству произвођача. Електрофореза се одвијала у 0.5 x TBE пуферу око 2 сата при напону од 150- 200 V и струји од 10-20 mA на собној температури (LKB Pharmacia, Шведска). По истеку електрофорезе гел је фиксиран 10 минута у 10% етанолу, 3 минута у 1% HNO<sub>3</sub> и испран дестилованом водом. Бојен је 0.2% раствором AgNO<sub>3</sub> 30 минута на тамном и поново испран дестилованом водом. Као развијач је коришћен 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> са 0.02% формалдехида (5-10 минута). Гел је испран 10% сирћетном киселином и дестилованом водом.

На присуство алела *GSTM1*\*А су указале траке од 112 bp и 20 bp; *GSTM1*\*В трака од 132 bp, а на присуство оба алела (АВ генотип) траке од 132 bp, 112 bp и 20 bp.

Генотипизација *GSTP1A313G* гена се заснивала на дигестији PCR продуката са рестрикционом ендонуклеаром BsmI према упутству произвођача (ThermoScientific, Литванија). Продукти дигестије су анализирани након електрофорезе на 10% PAG-у и бојења сребро-нитратом. Генотип Ile/Ile био је представљен присуством трака од 329 bp, 216 bp, 113 bp и 107 bp, док су Val/Val представљале траке од 216 bp, 113 bp и 107 bp.

### 3.4 Одређивање *IL6* и *IL2* генотипова

*IL6*-597G/A (rs1800797) и *IL2*-330T/G (rs2069762) генотипови су одређивани алелском дискриминацијом на апарату 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, САД) помоћу TaqMan предизајнираних есеја, према упутству произвођача (Applied Biosystems, САД).

### 3.5 Одређивање *CD14* генотипова

*CD14*-159 C/T (rs2569190) генотипови су одређени помоћу PCR-RFLP методе. Секвенце прајмера, услови амплификације и величина продукта PCR-а су приказани у табели 5. Продукти PCR-а (166 bp) били инкубирани са *HaeIII* рестрикционом ендонуклеазом према упутству произвођача (ThermoScientific, Литванија). Продукти дигестије су анализирани на 10% полиакрил амидном гелу након електрофорезе и бојења сребро нитратом (постипак припреме гела је описан у пасусу 3.3). Пошто у овом случају, рестрикциона ендонуклеаза сече wild type секвенцу, полиморфни алел је био представљен траком од 166 bp.

Табела 5. Секвенце прајмера и услови PCR-а за умножавање *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* и *CD14* гена

ГЕН	СЕКВЕНЦА ПРАЈМЕРА ЗА PCR	УСЛОВИ PCR-а	ВЕЛИЧИНА PCR ПРОДУКТА
<b>GSTT1</b>	5'-TTCCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' 5'-TTGGGAAGGCGTCCAAGCGC-3'	94°C 5 min. (1 x); [94°C 1 min, 66°C 1 min, 72°C 1 min] (39 x); [94°C 1 min, 66°C 1 min, 72°C 1 min] (1 x)	480 bp
<b>GSTM1</b>	5'-TTGGGAAGGCGTCCAAGCGT-3' 5'-GCTTCACGTGTTATGAAGGTTTC-3'	94°C 4 min. (1 x); [94°C 45 sek, 62°C 1 min, 72°C 1 min 30 sek] (5 x); [94°C 30 sek, 62°C 30 sek, 72°C 45 sek] (1 x)	132 bp
<b>GSTP1</b>	5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3' 5'-AGCCACCTGAGGGGTAAG-3'	94°C 3 min. (1 x); [94°C 15 sek, 64°C 30 sek, 72°C 1 min] (5 x); [94°C 15 sek, 59°C 30 sek, 72°C 1 min] (30 x); 72°C 5 min (1 x)	329 bp
<b>CD14</b>	5'-TGCCAGGAGACACAGAACCC-3' 5'-TGTCATTTCAGTTCCTCCTC-3'	96°C 3 min. (1 x); [96°C 40 sek, 56°C 40 sek, 72°C 50 sek] (38 x); 72°C 10 min (1 x)	166 bp
<b>β -aktin</b>	5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3' 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3'		289



#### 4. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

За анализе повезаности полиморфизма у испитиваним генима са клиничким карактеристикама болести и резултетима лечења, употребљавани су стандардни параметријски и непараметријски тестови:  $\chi^2$  или Fisher-ов тест, Kolmogorov-Smirnov и Mann-Whitney тест. Ризик да болесници са одређеним полиморфизмима имају неку клиничку карактеристику је исказан рачунањем OR (odds ratio) и RR (risk ratio) вредности за интервал поузданости од 95% (95% CI).

Укупно преживљавање (OS) се рачуна од дана дијагнозе до датума смрти или датума последње контроле. Преживљавање без болести (DFS) се рачуна од тренутка постизања комплетног одговора до релапса, смртног исхода или датума последње контроле. Време до неповољног догађаја током лечења (EFS) укључује период од датума започињања лечења до датума релапса, прогресије болести или смрти од било којег узрока. Процена вероватноће преживљавања, DFS и EFS је израчунавана према Kaplan-Meier – овој методи (1958). За упоређење крива преживљавања између група од интереса коришћен је log-rank тест. За удруженост прогностичких параметара са резултатима лечења примењиваће се униваријантна и мултиваријантна Cox регресиона анализа.

За одређивање cut-off у случају одређивања апсолутног броја лимфоцита, апсолутног броја моноцита и лимфоцитно/моноцитног односа коришћена је Ros анализа.

За статистичку значајност ( $p$ ) је узета вредност  $< 0.05$ .

Сви резултати испитивања су статистички обрађени коришћењем SPSS software for Windows, version 15 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

#### IV. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

##### 1. АНАЛИЗА *GST* ГЕНА

###### 1.1 Учесталост *GST* генотипова

Генотипизација сва три *GST* (*GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1*) гена је била успешна код 82 болесника са *DLBCL* (успешне амплификације и подударање резултата у дупликатама за сва три гена). У овој групи, *GSTT1*-null генотип је детектован код 20 (24,4%) болесника док су *GSTM1*-null генотип имала 52 (63,4%) болесника. У групи *GSTM1*-позитивних болесника (n=30), 16 (19,5 %) је имало *GSTM1* AA генотип, четири (4,9 %) *GSTM1* AB, а 10 (12,2 %) болесника је имало *GSTM1* BB генотип. Код 20/82 (24,4 %) болесника је детектован *GSTP1* Ile/Ile генотип, Ile/Val генотип су имала 44/82 (53,6 %) болесника, док је 18/82 (22,0 %) болесника имало Val/Val генотип. Добијене учесталости *GSTP1* генотипова су биле у Hardy-Weinberg - овој равнотежи (p=0.83,  $\chi^2$  тест).

###### 1.2 Повезаност *GST* генотипова са клиничким карактеристикама

Дистрибуција *GST* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама је приказана у табели 6.

**Табела 6.** Дистрибуција *GST* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама *DLBCL*

КАРАКТЕРИСТИКЕ БОЛЕСНИКА	<i>GSTT1</i>			<i>GSTM1</i>			<i>GSTP1</i>		
	+	Null	P	+	null	p	Ile/Ile	Ile/Val+ Val/Val	P
Пол, бр. М/Ж	36/26	8/12		17/13	27/25		13/7	31/31	
Старост > 60 година, бр. (%)	15 (18)	4 (5)	0,77	11 (13)	8 (10)	<b>0,03*</b>	4 (5)	15 (18)	0,77
CS III/IV, бр. (%)	47 (57)	12 (15)	0,17	19 (23)	40 (49)	0,19	15 (18)	44 (54)	0,73
Присутни В симптоми, бр. (%)	44 (54)	14 (17)	0,92	19 (23)	39 (48)	0,26	41 (50)	17 (21)	0,16
IP1 IH/H <sup>a</sup> , бр. (%)	34 (42)	10 (12)	0,71	16 (20)	28 (34)	1,00	10 (12)	34 (42)	0,71
Екстранодална места ≥2, бр. (%)	52 (63)	12 (15)	0,21	24 (29)	40 (49)	0,74	17 (21)	47 (57)	0,54
Туморски обл. болести ( <i>Bulky disease</i> ), бр. (%)	29 (35)	10 (12)	0,81	15 (18)	24 (29)	0,74	12 (14)	27 (33)	0,20

р вредности су добијене помоћу  $\chi^2$  теста или Fisher-овог егзактног теста;

<sup>a</sup>И/Н – средњи-висок/висок (*intermediate-high/high*)

\**GSTM1 null* генотип је био чешће присутан код болесника код којих се *DLBCL* развио пре 60 године (OR 3,12, 95% CI 1,11–9,17;  $p=0,03$ );  $p$  вредност је добијена помоћу  $\chi^2$  теста;

### 1.3 Повезаност *GST* генотипова са одговором на терапију и током болести

У групи 82 болесника којима је извршена генотипизација *GST*, одговор на терапију (overall response rate - ORR) је забележен код 70 (85,4%) болесника, код 69 (84,1%) болесника постигнута је комплетна клиничка ремисија (CR), док је код једног (1,2%) болесника постигнута парцијална ремисија (PR). Код 12 (14,6%) болесника је дошло до прогресије болести током примене R-CHOP терапије.

Примењеним обликом лечења, CR је постигнута код 85 % болесника са *GSTT1*-null генотипом, односно 88 % *GSTT1* –позитивних болесника; 80 % болесника са *GSTM1*-null генотипом, као и 89 % болесника са *GSTM1*-позитивним генотипом; 82 % болесника са *GSTP1* Ile/Ile генотипом и 88 % болесника који су носиоци барем једног *GSTP1* Val алела. Статистичком анализом је показано да *GST* генотиповине утичу на одговор на терапију (комплетна ремисија, парцијална ремисија или прогресија болести) одлагањима терапијских циклуса ( $p=1$  за сва три гена).

Када је анализиран период до постизања ремисије, утврђено је да је истим модалитетом лечења CR брже постигнута код болесника са *GSTT1* –позитивним (90-390 дана, медијана 210 дана) него код болесника са *GSTT1*-null генотипом (180-330 дана, медијана 300 дана), међутим, ова разлика у броју дана до постизања комплетног одговора није била статистички значајна ( $p=0,22$ ).

Када је анализиран *GSTP1* генски полиморфизам у односу на брзину постизања CR, уочена је статистички значајна разлика у трајању периода до постизања CR. Медијана постизања CR у болесника са Val алелом *GSTP1* полиморфизма (Val/Val и Ile/Val генотипом) је била 219 дана (90-360), и значајно краћа у односу на болеснике са Ile/Ile генотипом (150-390 дана, медијана 300 дана) ( $p=0,05$ , Mann-Whitney U test).

Упоредјујући период до постизања CR у болесника са *DLBCL* у односу на полиморфизам *GSTM1* гена, није уочена статистички значајна разлика

између болесника са *GSTM1*-null генотипом (90-390, медијана 210) у односу на болеснике носиоце *GSTM1*-позитивног генотипа (90-360, медијана 210),  $p=0,53$ .

Такође, у анализираној групи болесника, различити *GST* генотипови нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама, као ни са значајним одлагањима терапијских циклуса ( $p=1$  за сва три гена).

У групи болесника код којих су постигнути CR или PR ( $n=70$ ), до релапса је дошло код 15 (21%) болесника. Учесталост релапса није била повезана са одређеним *GST* генотиповима ( $p=0.47$  за *GSTT1*;  $p=0.44$  за *GSTM1*;  $p=0.48$  за *GSTP1*). Исто тако, *GST* генотипови нису утицали на OS ( $p=0.45$  за *GSTT1*;  $p=0.79$  за *GSTM1*;  $p=0.27$  за *GSTP1*) и DFS ( $p=0.33$  за *GSTT1*;  $p=0.61$  за *GSTM1*;  $p=0.73$  за *GSTP1*). Анализирајући параметре који су утицале на дужину OS болесника са DLBCL, у униваријантној анализи сигнификантни утицај је имао узнапредовали CS (log-rank,  $p=0,04$ ) инеповољан, интермедијално-висок/висок IPI скор (log-rank test,  $p=0,01$ ). Међутим, мултиваријантна анализа (Cox-ов модел регресије) је издвојила само IPI скор као независни прогностички параметар за OS [средњи-висок/висок IPI vs низак/низак-средњи IPI; hazard ratio (HR) 3,1, 95% CI 1,26-7,6;  $p=0,01$ ].

## 2. АНАЛИЗА *CD14* ГЕНА

### 2.1 Учесталост *CD14* генотипова

Анализа *CD14* гена је била успешна код 114 болесника са DLBCL (успешне амплификације и подударање резултата у дупликатама). У овој групи су добијене следеће учесталости *CD14* генотипова: 23% CC, 41% CT и 36% TT. Добијене учесталости генотипова су биле у Hardy-Weinberg – овој равнотежи ( $p=0.38$ ,  $\chi^2$  тест).

**2.2 Повезаност *CD14* генотипова са клиничким карактеристикама**

Резултати су приказани у табели 7.

**Табела 7.** Дистрибуција *CD14* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама DLBCL

КАРАКТЕРИСТИКЕ БОЛЕСНИКА	<i>CD14</i>		
	CC	CT+TT	P
Пол, бр. М/Ж	16/10	43/45	
Старост > 60 година, бр. (%)	7 (20)	28 (80)	0,63
CS III/IV, бр. (%)	12 (22)	42 (78)	0,89
IPI IH/H <sup>a</sup> , бр. (%)	8 (21)	31 (79)	0,67
Екстранодална места, бр. (%)	13 (16)	67 (84)	<b>0,01</b>
Туморски обл. болести ( <i>Bulky disease</i> ), бр. (%)	12 (23)	41 (77)	1

p вредности су добијене помоћу  $\chi^2$  теста или Fisher-овог егзактног теста;

<sup>a</sup>IH/H – средњи-висок/висок (intermediate-high/high)

\**CD14* CT/TT генотипови су били чешће присутни код болесника са екстранодалним DLBCL (OR 3,19, 95% CI 1,28–7,94; p=0,01); p вредност је добијена помоћу  $\chi^2$  теста;

Имајући у виду улогу *CD14* молекула у имунском одговору, анализирана је и повезаност *CD14*-159 генотипова са иницијалним вредностима C-реактивног протеина (*CRP*), седиментације еритроцита и фибриногена (подаци су били доступни за 101 болесника). Код болесника са CC генотипом (n=24), вредности *CRP* – а су се кретале у опсегу 2,5 - 122 mg/l (средња вредност 24) док су код болесника са CT/TT генотиповима (n=77) биле у опсегу 2,2 - 266 mg/l (средња вредност 39,5). Повезаност између *CRP* вредности и *CD14* генотипова је тежила статистички значајној вредности (one-tailed t-test p=0,038; two-tailed t-test p=0,078). Измерени нивои других параметара запаљења (седиментација еритроцита и фибриноген) нису били статистички значајно повезани са *CD14* генотиповима -159 генског полиморфизма (p=0.77, односно p=0.66).

### 2.3 Повезаност *CD14* генотипова са одговором на терапију и током болести

У групи од 114 болесника са DLBCL, одговор на R-CHOP је постигнут код 98 (86%); код 69 (61%) је постигнута CR док је код 29 (25%) постигнут парцијални одговор. Прогресија болести током терапије је била присутна код 16 (14%) болесника. У групи болесника код којих је постигнут одговор на терапију, до релапса је дошло код 28/98 болесника, а 34/114 (30%) је умрло од DLBCL. Статистичка анализа је показала да *CD14* генотипови (CC vs CT+TT) нису били повезани са одговором на терапију ( $p=0,74$ ), учесталошћу релапса ( $p=0,47$ ).

Присуство инфекција током терапије је забележено код 29 (25%) болесника. Инфекције су биле чешће код болесника са CC него код болесника са CT/TT генотиповима (39% vs 22%), а повезаност инфекција и *CD14* генотипова је тежила статистичкој значајности ( $p=0,083$ ). Такозване ране компликације везаних за терапију (early-treatment-related complications) [присутне код 31 (27%) болесника] су уочене код 42% болесника са CC и код 24% болесника са CT/TT генотиповима ( $p=0,079$ ).

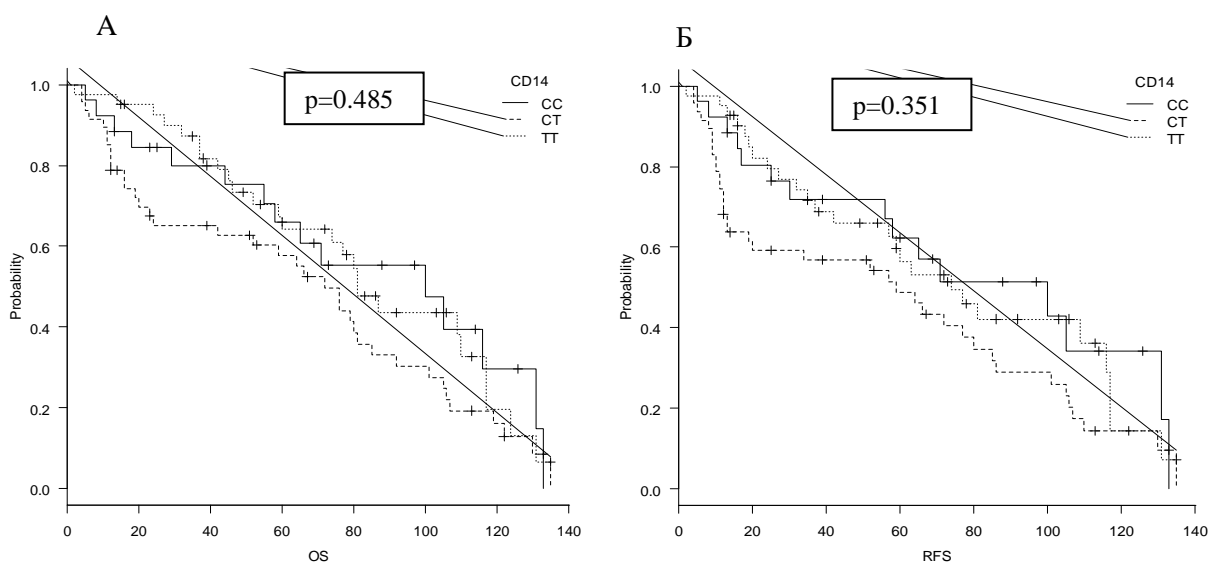
У групи болесника са DLBCL, *CD14*-159 генотип није утицао на DFS ( $p=0,351$ ) као ни на OS ( $p=0,485$ ) (слика 1). У овој групи болесника, у униваријантној анализи на OS су утицали IPI скор ( $p<0,001$ ), клинички стадијум болести ( $p<0,001$ ), апсолутни број лимфоцита ( $p=0,001$ ) и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p<0,001$ ). Мултиваријантна анализа је показала да је од свих наведених фактора највећи утицај на OS имао IPI скор ( $p=0,006$ ).

У групи болесника са екстранодалним DLBCL, дуже укупно преживљавање (OS) је уочено код болесника са TT генотипом (3-годишње OS 84%) него код болесника са CC (3-годишње OS 77%) и CT генотипом (3-годишње OS 68%). Међутим, статистичка анализа није документовала статистички значајну повезаност између *CD14* генотипова и OS ( $p=0,122$ ). Када смо анализирали OS између болесника са TT (3-годишње OS 84%) и болесника са CC/CT генотиповима (3-годишње OS 70%), статистичка анализа је показала значајну повезаност између генотипова и OS ( $p=0,049$ ). Сличан образац је уочен је и за DFS (CC vs CT vs TT,  $p=0,045$ ; CC/CT vs TT,  $p=0,018$ ). У униваријантној анализи за OS болесника са DLBCL уз TT генотип, издвојени су IPI скор ( $p<0,001$ ), клинички стадијум ( $p=0,015$ ), присуство туморског облика болести ( $p=0,032$ ), апсолутни број лимфоцита

( $p=0,01$ ) и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p=0,001$ ). У мултиваријантној анализи IPI [hazard ratio (HR) 2,422, 95 % CI 1,114 – 5,264;  $p=0,026$ ) и *CD14* TT генотип (HR 0,503, 95 % CI 0,262 – 0,963;  $p=0,038$ ) су издвојени као једини параметри који су били повезани са OS код болесника са екстранодалним DLBCL

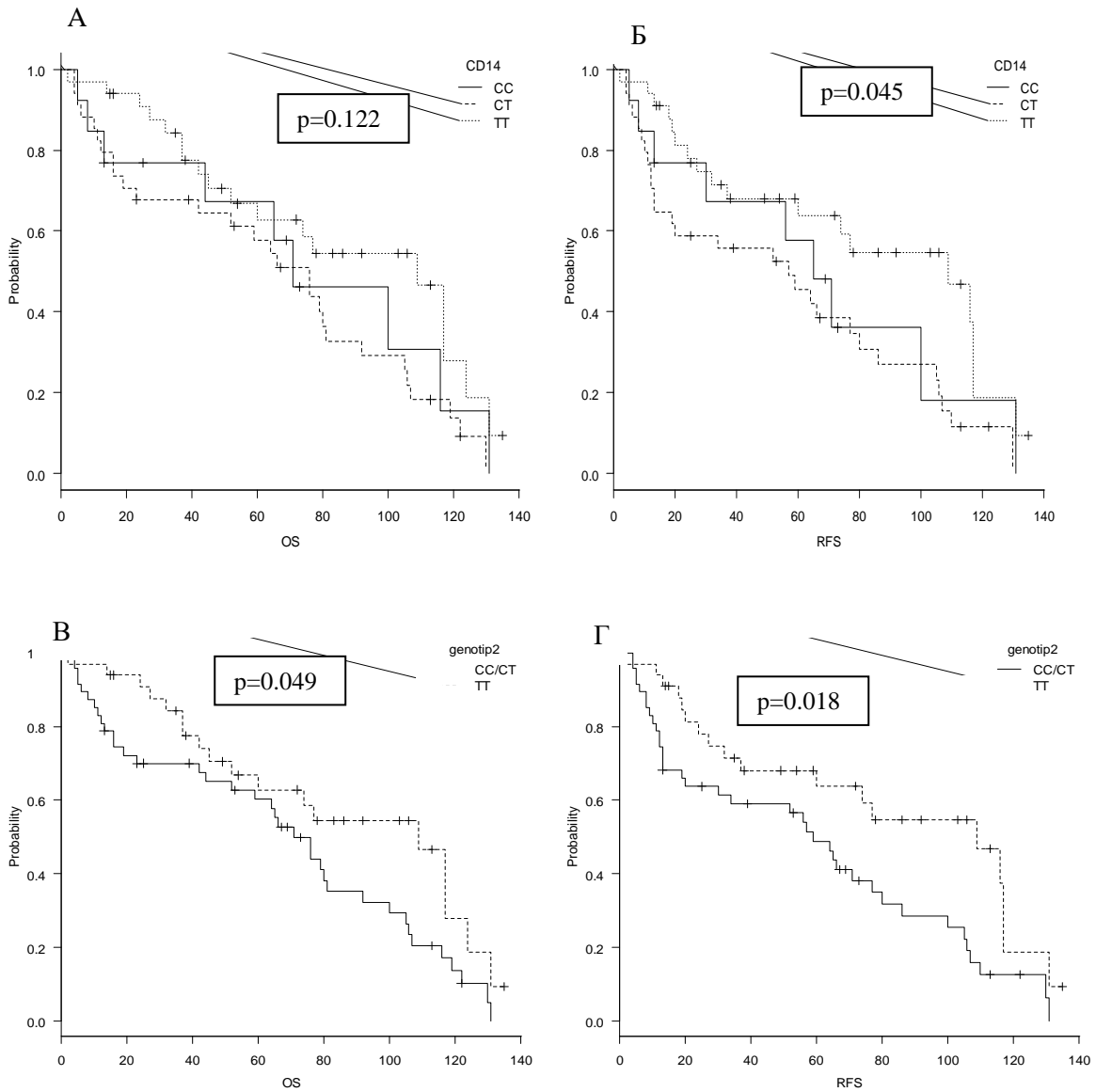
На слици 7 је представљена повезаност *CD14* генотипова и преживљавања.

Слика 7. OS (А) и DFS (Б) болесника са различитим *CD14* генотиповима.





**Слика 8.** OS и DFS болесника саекстранодалним лимфомом у зависности од *CD14* генотипа.



A: OS болесника са екстранодалним DLBCL у односу на *CD14* -159 генотип.

Б: DFS болесника са екстранодалним DLBCL у односу на *CD14* -159 генотип.

В: OS болесника са екстранодалним DLBCL у односу на *CD14* -159 генотип. (CC/CTvsTT).

Г: DFS болесника са екстранодалним DLBCL у односу на *CD14* -159 генотип. (CC/CTvsTT).

### 3. 3.АНАЛИЗА *IL6* ГЕНА

#### 3.1 Учесталост *IL6* генотипова

Анализа *IL6-597G/A* полиморфизма је била успешна код 143 болесника са DLBCL (успешне амплификације и подударање резултата у дупликатима). У овој групи је 39.9% испитаника имало GG генотип, а 60.1% GA генотип.

Добијене учесталости генотипова су биле у Hardy-Weinberg –овој равнотежи ( $p=0.38$ ,  $\chi^2$  тест).

#### 3.2 Повезаност *IL6* генотипова са клиничким карактеристикама

Резултати статистичке анализе су приказани у табели 8.

**Табела 8.** Дистрибуција *IL6-597* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама DLBCL

КАРАКТЕРИСТИКЕ БОЛЕСНИКА	<i>IL6</i>		
	GG	GA	P
Пол, бр. М/Ж	28/29	42/44	
Старост > 60 година, бр. (%)	56 (65)	30 (35)	0,84
CS III/IV, бр. (%)	25 (37)	42 (63)	0,56
IP1 IH/H <sup>a</sup> , бр. (%)	15 (31)	33 (69)	0,14
Екстранодална места, бр. (%)	40 (42)	56 (58)	0,53
Туморски обл. болести ( <i>Bulky disease</i> ), бр. (%)	22 (35)	40 (65)	0,35

p вредности су добијене помоћу  $\chi^2$  теста;

<sup>a</sup>IH/H – средњи-висок/висок (intermediate-high/high)

### 3.3 Повезаност *IL6* генотипова са одговором на терапију и током болести

У групи од 143 болесника са DLBCL, одговор на R-CHOP је постигнут код 117 (82%); код 117 (81%) је постигнута CR док је код једног болесника (7%) постигнут парцијални одговор. Прогресија болести током терапије је регистрована код 26 (18%) болесника. У групи болесника код којих је постигнут одговор на терапију, до релапса је дошло код 25/117 (21%) болесника. Статистичка анализа је показала да генотипови *IL6-597 G/A* генског полиморфизма нису били повезани са одговором на терапију ( $p=0.14$ , Fisher-ов егзактни тест), учесталости релапса ( $p=0.89$ , Fisher-ов егзактни тест), и исходом болести ( $p=0.22$ , Fisher-ов егзактни тест).

Такође, у анализираној групи болесника, GG и GA генотипови *IL6-597 SNP* нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама, као ни са значајним одлагањима терапијских циклуса ( $p=0.11$ , Fisher-ов егзактни тест).

У групи болесника са DLBCL, нити GG нити GA генотип *IL6-597* полиморфизма није био удружен са DFS ( $p=0,57$ ) као ни са OS ( $p=0,74$ ). У униваријантној анализи у овој групи болесника, на OS су утицали IPI скор ( $p<0,001$ ), клинички стадијум ( $p<0,001$ ), апсолутни број лимфоцита ( $p=0,001$ ) и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p<0,001$ ). Мултиваријантна анализа је од свих наведених параметара издвојила за OS издвојила само IPI скор.

## 4. АНАЛИЗА *IL2* ГЕНА

### 4.1 Учесталост *IL2* генотипова

Анализа *IL2-330* гена је била успешна код 143 болесника са DLBCL (успешне амплификације и подударање резултата у дубликатима). У овој групи болесника детектоване су следеће учесталости генотипова: 51% испитаника је имало TT генотип, 45% је имало TG генотип, а код 4% испитаника је детектован GG генотип. Добијене учесталости генотипова су биле у Hardy-Weinberg –овој равнотежи ( $p=0.27$ ,  $\chi^2$  тест).

**4.2 Повезаност *IL2* генотипова са клиничким карактеристикама**

Резултати статистичке анализе су приказани у табели 9.

**Табела 9.** Дистрибуција *IL2-330* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама DLBCL

КАРАКТЕРИСТИКЕ БОЛЕСНИКА	<i>IL6</i>		
	<i>TT</i>	<i>TG+GG</i>	P
Пол, бр. М/Ж	34/39	36/34	
Старост > 60 година, бр. (%)	24 (49)	25 (51)	0,72
CS III/IV, бр. (%)	32 (48)	35 (52)	0,46
IPI <i>IH/H<sup>a</sup></i> , бр. (%)	24 (50)	24 (50)	0,86
Екстранодална места, бр. (%)	49 (51)	47 (49)	1
Туморски обл. болести ( <i>Bulky disease</i> ), бр. (%)	31 (50)	31 (50)	0,35

p вредности су добијене помоћу  $\chi^2$  теста;

<sup>a</sup>IH/H – средњи-висок/висок (intermediate-high/high)

**4.3 Повезаност *IL 2* генотипова са одговором на терапију и током болести**

Анализирајући генотипове у гену за *IL2-330* у односу на терапијски одговор, није забележена статистички значајна разлика у болесника са *TT* генотипом у односу на болеснике са *TT/GG* генотипом у погледу одговора на терапију, учесталост релапса, и исходом болести.

Такође, *IL2* генотипови нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама или са значајним одлагањима терапијских циклуса ( $p=0.21$ , Fisher-ов егзактни тест).

У групи болесника са DLBCL, *IL2-330* генотип није утицао на DFS ( $p=0,46$ ) као ни на OS ( $p=61$ ). У односу на OS, у униваријантној анализи сигнификантни утицај је имао IPI скор ( $p<0.001$ ), клинички стадијум ( $p<0.001$ ), апсолутни број лимфоцита ( $p<0.001$ ), и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p<0.001$ ). Међутим, у мултиваријантној анализи једини параметар који је био повезан са OS је био IPI скор.

## V. ДИСКУСИЈА

Дифузни Б лимфом великих ћелија (DLBCL) су агресивне неоплазме лимфоног ткива и чине око 30-35% свих Б-ћелијских NHL лимфома. Ови лимфоми се карактеришу веома хетерогеном клиничком сликом, одговором на терапију и преживљавањем. У основи ове разноликости лежи комплексна биологија тумора.

DLBCL могу бити подељени на основу цитоморфопатолошких особина, месту примарног настанка болести (нодална и екстранодална болест) и имунолошкој подлози оболелог. Оваква разноликост доприноси широком спектру клиничке презентације болести и веома разноликим резултатима лечења. Последњих година студије експресије гена су издвојиле три различита молекуларна типа болести: DLBCL порекла герминативног центра (GCB), лимфоме са молекуларним профилем активисаних Б ћелија (ABC) и примарне медијастиналне Б ћелијске лимфоме (PMBL) (Rosenwald, и сар., 2002; Lenz, и сар., 2008). Ипак, иако су студије експресије гена донекле разоткриле комплексну молекуларну природу болести, већина лимфома је и даље класификовано у *not otherwise specified* DLBCL (NOS).

Процена агресивности болести која диктира и одлуку о терапији, данас је најчешће базирана на клиничким карактеристикама, стању оболелог и биологији тумора. Међутим, ни један од установљених прогностичких параметара није показао да је у потпуности повезан са преживљавањем оболелих од DLBCL. Годинама уназад комбинована хемиотерапија садржана у CHOP (doxorubicin, cyclophosphamide, vincristin, prednisone) протоколу је основна терапија у лечењу DLBCL и представља први хемиотерапијски режим са куративним потенцијалом. У раним 2000. годинама, rituximab, моноклонско анти CD20 придодато CHOP хемиотерапији је постао, и за све ове године, остао златни стандард у лечењу новодијагностикованих болесника са DLBCL (Coiffier и сар., 2002). И поред напретка у лечењу DLBCL увођењем моноклонског CD20 антитела у спрези са CHOP хемиотерапијом, више од 30% оболелих неће реаговати на имунохемиотерапију или ће релапсирати, односно испољити резистентан ток болести. Премда су студије експресије гена делимично разоткриле комплексну биологију тумора, разумевање хетерогености

представља критичан корак ка даљем напретку у контроли болести, која остаје клинички изазов за бројне научне дисциплине и предмет је истраживања великог броја епидемиолошких, клиничких и биолошких студија (Turturro, 2015).

Полиморфизми гена су варијације у DNA секвенцама гена и појављују се у општој популацији са учесталошћу већом од 1% (Robert и сар., 2014) и могу да доведу до промена у експресији, структури и активности протеинског продукта гена. SNP су најчешће присутни у протеин-кодирajuћим секвенцама гена које су круцијалне за microRNA везивање и регулацију експресије протеина, и исто тако у нивоу секвенци егзона и интрона. Док missense полиморфизми доводе до замене једне аминикиселинске резидуе другом и модификују секвенцу протеина, silent полиморфизми могу да утичу на функцију протеинског продукта. Такође, frameshift полиморфизми као последица инсерције или делеције једног нуклеотида, могу да резултирају настанком ослабљеног или потпуно инактивног протеина (Falduto и сар., 2017).

Етиологија DLBCL и даље остаје непозната. Ипак, између бројних потенцијалних и знаних фактора ризика, дисрегулација имуног система је најбоље показана (Cunningham-Rundles, 2012). Студије спроведене у појединим фамилијама и близанцима нису потвдиле строгу пенетрацију једног гена (Vajdic и сар., 2010). Повећан ризик за настанак лимфома је највероватније узрокован наследним променама генотипа, који укључује више генетских варијанти испољених у виду бројних алела који комбиновано чине високо-ризичан фенотип. Велики број до сада спроведених студија је истраживао повезаност наследних генетских фактора како у погледу ризика за настанак лимфома, тако и у погледу резултата лечења (Rothman и сар., 2006; Wang, и сар., 2007; Cerhan, и сар., 2014; Warzocha и сар., 2012; Ascherbrook-Kilfoy и сар., 2012). Међутим, резултати наведених студија нису конзистентни.

Сазнања о генетској подлози сваког појединачног болесника са DLBCL, укључујући полиморфизме гена, може нам помоћи да предвидимо ефикасност и токсичност примењене терапије и омогући рационалан и индивидуалан приступ сваком болеснику. У основи, многи гени удружени са одговором на терапију имају улогу у комплексним путевима повезаним са транспортом, метаболичком активношћу и детоксикацијом цитостатика. Они могу кодирати не само протеине укључене у дистрибуцију и

метаболизам лекова, већ такође рецепторе, ензиме, протеине укључене у ћелијски циклус и поправку ДНА.

У нашем истраживању анализирани су полиморфизама у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2* -330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T код новодијагностикованих болесника са DLBCL лечених R-CHOP терапијом.

У првом делу истраживања анализирана је учесталост *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2* -330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T генотипова у болесника са DLBCL. У наставку истраживања, анализирали смо да ли постоји повезаности између полиморфизама у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2* -330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T са клиничким карактеристикама болести, одговором на терапију, током и исходом лечења у оболелих од DLBCL.

Резултати до сада објављених студија указују да полиморфизми у ензимама фазе II фамилије *GSTs* су повезани са ризиком од бројних малигних оболења (Bin and Luo, 2013; Wang и сар., 2016; He и сар., 2018). Ради се о фамилији ензима који учествују у детоксикацији широког спектра ксенобиотика, укључујући карциногене агенсе као што су бензени, органохлориди, органофосфати, пестициди и дуван. Такође, неопходни су за метаболизам и детоксикацију великог броја значајних и широко заступљених хемиотерапеутика у лечењу лимфома. Путем коњугације са глутатионом повећава се солубилност лекова, чиме се олакшава њихова екскреција. Њихова детоксикациона активност је круцијална за ефикасност и токсичност *cyclophosphamide* и *doxorubicin*-а који су садржани у R-CHOP имунохемиотерапији која је стожер индукционе терапије у лечењу DLBCL.

Гени за *GSTs* су веома полиморфни. Засуљеност мутација је релативно висока у хуманој популацији и варира између географских региона и етничких група (Klusek и сар., 2018; Bin and Luo, 2013). Наше истраживање варијација у генима ензима *GSTs* је укључивало *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* полиморфизме. Оба, *GSTT1* и *GSTM1* полиморфизма се презентују са две алелске варијанте, null варијантом (*GSTT1*-null; *GSTM1*-null), у којима је делеција гена повезана са потпуним изостанком функционалног ензима, и positive варијантом (*GSTT1*-positive; *GSTM1*-positive), које кодирају функционалан ензим. Резултати мета анализе спроведене у оболелих од карцинома дебелог црева указују да *mi* класа



GSTM1 је најефикаснија у неутрализацији цитотоксичних материја и реактивних комплекса (Li и сар., 2015).

Учесталост *GSTT1*-null и *GSTM1*-null у већине анализираних студија је висока, и креће се у распону од 20-50%. Упоредјујући фреквенције *GSTT1*-null и *GSTM1*-null генотипа широм света, различите етничке групе показују различиту учесталост генотипова, укључујући азијску, европску и афричку популације испитаника. У нашој групи испитаника са DLBCL, *GSTT1*-null генотип је детектован код 24.4% болесника, док су *GSTM1*-null генотип имала 63.4% болесника. Упоредјујући резултате нашег истраживања са резултатима студија спроведеним међу европским становништвом, заступљеност *GSTT1*-null генотипа у нашој групи болесника од 24.4% је била слична са учесталошћу null генотипа у становника Италије (14.5-29.5%) и Шпаније (20.5-33.7%). Уочена је нешто већа стопа *GSTT1*-null генотипа међу становницима афричког порекла у односу на европљане, и кретала се у рангу од 19.7-44.9%.

Анализирајући групу болесника са DLBCL, Chiu, са сарадницима је нашао нешто мању стопа *GSTT1*-null генотипа која је била 18% у односу на нашу стопу од 24.4%, и значајно мању стопу, укључујући како нашу студију, тако и студију Chiu, и сарадника у односу на корејску популацију оболелих од DLBCL, где је учесталост *GSTT1*-null генотипа била 55.3% заступљена (Cho, 2010). Студију Chio, и сарадника је сачињавало 95% болесника припадника беле расе (Chiu и сар., 2005; Bin and Luo, 2013).

*GSTM1*-null генотип је утврђен код 63.4% болесника. Такође, у групи *GSTM1*-позитивних болесника 19.5 % је имало *GSTM1* AA генотип, 4.9 % *GSTM1* AB и 12.2 % болесника је имало *GSTM1* BB генотип. Фреквенција *GSTM1*-null генотипа у италијанској популацији становника се кретала од 30.4-65.3%, са сличном дистрибуцијом *GSTM1*-null генотипа и међу афричким становништвом где је била у распону од 22.9-60.8%. Уочена фреквенција у нашој студији у погледу *GSTM1*-null генотипа од 63.4% је била на горњој граници уочене фреквенције међу италијанском популацијом, и нешто веће фреквенције у односу на резиденте афричког континента (Bin and Luo, 2013). У студији Chiu, и сарадника спроведеној на 89 оболелих од DLBCL који су припадали белој раси, *GSTM1*-null генотип је уочен у 47% оболелих, што је око 16% мања учесталост у односу на наше болеснике са DLBCL (Chiu и сар., 2005). Студија корејске групе на челу са Cho, и сарадницима је анализирала сличну популацију болесника,

како у погледу броја анализираних 94 болесника, тако и у погледу иницијалног лечења DLBCL. Ова студија је, такође, нашла дискретно нижу учесталост *GSTM1*-null генотипа од 56.4% у односу на нашу студију, али и вишу у односу на студију Chiu, и сарадника (Cho и сар., 2010).

Функционалан полиморфизам *GSTP1* гена укључује А-Г супституцију у егзону 5 и конверзију изолеуцина у валин у позицији 105 аминокиселинског ланца (Ile105Val), при чему присуство Val алелске варијанте умањује способност детоксикације карценогених субстанци. Резултати нашег испитивања указују да је wild варијанта *GSTP1* гена, Ile/Ile генотип детектован у 24.4%, Ile/Val генотип је имало 53.6 % болесника, и 22.0 % болесника је имало Val/Val генотип. У односу на студију Chiu, и сарадника која је обухватала белу расу DLBCL болесника, дистрибуција *GSTP1* генотипова је била значајно различито заступљена у односу на дистрибуцију добијену у нашој студији. Резултати ове студије говоре да је wild варијанта *GSTP1* гена, Ile/Ile генотип детектован у 53% оболелих, Ile/Val генотип је имало 44% болесника, и нешто мало више од 2.0 % болесника је имало Val/Val генотип (Chiu, и сар., 2005). Може се запазити да је wild варијанта *GSTP1* гена, Ile/Ile генотип у нашој студији више него два пута мање заступљен (24.4% наспрам 53%) и исто тако, да је Val/Val генотип био десет пута учесталији у наших болесника са DLBCL (22.0% наспрам 2%) у односу на исту популацију болесника беле расе (Chiu и сар., 2005). Корејска популација болесника са DLBCL је према дистрибуцији генотипова *GSTP1* гена (Ile/Ile генотип 58.9%, Ile/Val генотип у 37.5% оболелих и Val/Val генотип у 3.3% пацијената) била сличнија испитиваној популацији у студији Chiu, и сарадника него нашој групи болесника (Cho и сар., 2010). И исто тако, анализа учесталости *GSTP1* полиморфизама у популацији становништва северне Индије је нашла да је Ile/Ile генотип заступљен са учесталошћу од 44.3%, Ile/Val генотип у 50.3% и Val/Val генотип у 5.4% испитаника (Bin and Luo, 2013). Међутим, асоцијациона мета-анализа између *GSTP1* генског полиморфизма и процене ризика за оболевање од карцинома простате је нашла да је преваленца стопе Val алела у здравој популацији била 27.1-27.6% у становника Азије, 38.9-61.1% у популацији становника беле расе и 72.1-93.3% у Афро-Америчког становништва (Mo и сар., 2009). Дистрибуција Val алела (ValVal+IleVal) међу нашом групом испитаника је била око 48.8%, што је у складу са његовом заступљеношћу међу становништвом беле расе и говори да је заступљеност различитих

полиморфизама значајно различита међу различитим расама и поднебљима.

Наследни имунитет као и стечени имунски одговор зависе од биолошке улоге цитокина који функционишу као медијатори имунских и запаљенских реакција. Цитокини имају важну улогу у пролиферацији и диференцијацији бројних ћелија имунског система, укључујући пролиферацију и диференцијацију нормалних Б ћелија (Cohen и сар., 2012). У микросредини лимфног чвора делују многе ћелије које луче различите проинфламаторне и антиинфламаторне цитокине који заједно доприносе Б-ћелијском развоју. Поремећај у регулацији Б-ћелијског развоја је главни патогенетски чинилац у бројним аутоимуним болестима, и бројне аутоимуне болести имају двоструки ризик за настанак Б-ћелијског NHL, највероватније услед хроничне Б-ћелијске активације и стимулације под дејством медијатора инфламације (Dias and Isenberg, 2011; Bugatti и сар., 2014). Објављени резултати указују да удружено деловање различитих цитокина у проинфламаторном миљеу лимфног чвора може да допринесе негативном утицају за ризик за настанак појединих тумора или на резултате лечења (Dave, 2010; Johnsen и сар., 2013).

Имајући у виду значајну улогу цитокина у патогенези DLBCL, велики број до сада објављених студија је истраживао наследне факторе ризика, полиморфизме у генима за различите цитокине и њихову повезаност са ризиком за настанак лимфома. Најчешће до сада експлорисани полиморфизми у асоцијационим студијама лимфома укључивали су полиморфизме у генима за фактор некрозе тумора (*TNF*) алфа, *IL10* и *IL6* (Smith, и сар., 2012; Rothman, и сар., 2006; Wang и сар., 2007).

У нашој студији спроведеној на болесницима са новодијагностикованим DLBCL, анализирали смо учесталост генотипова/алела у генима за *IL2* - 330T/G и *IL6* -597G/A.

У гену за *IL2* откривена су два полиморфна места, један од њих, *IL2*-330T/G је предмет истраживања ове студије и налази се у промотер региону *IL2* гена у близини важног транскрипционог фактора активисаних Т ћелија (John и сар., 1998). Резултати објављених студија указују да се ради о функционалном SNP који може утицати на продукцију *IL2* или експресију протеина и на тај начин допринети ризику за настанак

различитих болести (Hoffmann и сар., 2001). Више асоцијационих студија је доказало да *IL2* SNP у позицији -330 је повезан са ризиком за настанак различитих карцинома и лимфома (Zhao и сар., 2015; Song и сар., 2012; Rahman и сар., 2018), и исто тако, више асоцијационих студија спроведених на болесницима са NHL нису потврдиле удруженост *IL2*-330 генског полиморфизма са ризиком за настанак болести (Wang и сар., 2006; Rothman, и сар., 2006) Такође, резултати нове мета-аналитичке студије нису потврдили повезаност *IL2*-330 генског полиморфизма са повећаним ризиком за настанак карцинома (Wang и сар., 2015).

У нашој студији анализирали смо учесталост генотипова у *IL2*-330T/G гену и запазили следећу дистрибуцију: 51% испитаника је имало TT генотип, 45% је имало TG генотип и код 4% испитаника је детектован GG генотип. Упоређујући наше резултате са резултатима дистрибуције генотипова/алела у популацији Азијског становништва са NHL, уочена је значајна разлика. Резултати Song-а и сарадника указују да је у азијској популацији оболелих од NHL, присуство T и G варијанте алела било заступљено у 59,1% и 40.9% (TT 31.1%, TG 56.2%, GG12.7%), док је у популацији наших болесника запажена превага учесталости T алела 73.5% у односу на значајно мању фреквенцију G алела од 26.5%.Слична дистрибуција алела као у студији Song-а и сарадника је добијена у NHL болесника из Египта (T алел 55%, G алел 45%) (Rahman и сар., 2017). Дистрибуција T/G *IL*-330 алела у становника Мађарске са туморима коже је била у складу са нашим резултатима(T алел 65.8%, G алел 34.2%), и такође, није се разликовала од учесталости T/G алела у здравој популацији становништва Мађарске (Rizzato и сар., 2011).

Откривена су 4 SNP у промотор региону гена за *IL6*, један од њих, *IL6*-597G/A је SNP који је предмет истраживања наше студије.

Анализирајући учесталост генотипова у *IL6* гену на позицији -597 запазили смо да је 39.9% оболелих са DLBCL имало GG генотип, и 60.1% GA генотип. Ни један од наших болесника није био хомозигот за AA генотип *IL6* -597 полиморфизма.

Студија Lan-а и сарадника је истраживала повезаност полиморфизама у генима за различите цитокине у особа женског пола са подручја северне Америке оболелих од NHL. У овој студији 94% испитиване популације су чиниле особе беле расе. Резултати студије су потврдили повезаност

генских полиморфизама, како у склопу SNP, тако и у склопу хаплотипова, у *IL4*, *IL5*, *IL6* и *IL10* гену са ризиком за настанак NHL, и појединих подтипова NHL (Lan и сар., 2006).

У истој студији, дистрибуција GG, GA и AA генотипова у *IL6* -597 гену у оболелих од DLBCL је била 41% наспрам 44% наспрам 16%, и није се значајно разликовала од дистрибуције генотипова *IL6* -597 која је била присутна у здравој популацији становништва северне Америке (Lan и сар., 2006). Слична учесталост генотипова у *IL6*-597 је запажена и у популацији становника Аустралије (36.8% наспрам 46.9% наспрам 16.2%) (Smallwood, и сар., 2008), и значајно различита од дистрибуције генотипова *IL6* -597 у популацији здравих становника Индије (Saxena и сар., 2014). Студија Saxena и сарадника је потврдила доминацију А алела *IL6* -597SNP међу становништвом Индије која је била заступљена са учесталошћу од 87,14% у односу на G алел са учесталошћу од 12.86% (77.14% за AA, 20.0% за AG и 2.86% за GG генотип), што је значајно различито како у односу на резултате дистрибуције генотипова у наших испитаника, тако и у односу на студију Lan-а и Smallwood са сарадницима.

Резултати учесталости *IL2*-330 и *IL6* -597 полиморфизама у нашој анализи су у складу са досадашњим запажањима о различитој дистрибуцији полиморфизама гена везаних са различита поднебља и расе.

Предмет даљег истраживања је био процена учесталости генотипова у гену за *CD14* у позицији-159 у студији наших болесника са DLBCL. Дистрибуција и учесталост генотипова у гену за *CD14* на позицији -159 је била следећа: 23% оболелих је имало CC генотип, 41% је имало CT, и 36% оболелих су били носиоци TT генотипа.

У студији Andrie са сарадницима анализа учесталости генотипа *CD14*-159 полиморфизма је спроведена на популацији деце оболеле од лимфома из регије Грчке, при чему је 65% анализираних болесника припадало старосној доби од 5-12 година. У оболеле деце од NHL учесталост генотипова гена за *CD14* на позицији -159 је била 39.1% наспрам 39.1% наспрам 21.8%, за CC, CT и TT генотип, респективно, и дистрибуција генотипова у контролној групи здраве деце је била 18% наспрам 42% наспрам 23%, у односу на CC, CT и TT генотип (Andrie и сар., 2009).

Дистрибуција и учесталост генотипова у шпанској популацији оболелих од карцинома дебелог црева је била 22% за CC, 53.7% за CT и 24.2% за TT

генотипе, и није се много разликовала од учесталости генотипова у здравој популацији становника Шпаније (Zhou и сар., 2014).

Упоредјујући учесталост генотипова у гену за *CD14-159*, може се закључити да је уочена дистрибуција генотипова у нашој популацији оболелих од DLBCL била упоредива са дистрибуцијом генотипова у деце Грчке оболеле од NHL, као и упоредива са уоченом дистрибуцијом генотипова добијених међу становницима Шпаније.

Фамилија ензима глутатион *S*-трансфераза *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* је значајна у метаболизму и детоксикацији различитих карциногених агенаса, али и антинеопластичних лекова који су стандардна терапија у лечењу лимфома. Функционалне студије генома сугеришу да делеције у *GSTT1* и *GSTM1* генима могу допринети карциногенези променом нивоа имунореактивних протеина (Moyer и сар., 2007). Такође, резултати експерименталних истраживања полиморфизма гена *GSTP1* Ile105Val су показала да је овај полиморфизам функционално важан, односно да доводи до стварања активних, функционално различитих *GSTP1*ri протеина, и тако могу да имају улогу у метаболизму карциногених агенаса, настанку малигнух и других болести у човека (Bin and Luo, 2013).

Досадашња истраживања указују да изложеност пестицидима, хербицидима и различитим оранофосфорним једињењима је повезано са чешћом појавом NHL (Schinasi и сар., 2014; Cocco и сар., 2013; Alavanja и сар., 2014). Претпоставља се да *GSTs* варијације алела са мање ефикасном детоксикацијом потенцијалних карциногених супстанци које су присутне у окружењу, нарочито у условима професионалног рада, могу да допринесу већем ризику за настанак NHL. Ипак, резултати различитих студија су често конфузни и супротни, специјално у условима различитих малигнух оболења и пола. Недавно објављена асоцијациона мета анализа која је пратила болеснике са Ходжкиновим и NHL на серији од 1579 болесника са лимфомима и 2821 здравих субјеката је изнела да null генотип *GSTM1* и носиоци Val алела нису имали повећан ризик за оболевање од лимфома. Ипак, иста мета-анализа је издвојила значајан ризик за оболевање од лимфома у носиоца *GSTT1* null генотипа (odds ratio 2.22; *p* мање од 0.001) (Bin and Luo, 2013). Такође је објављено да носиоци двоструког null генотипа (*GSTT1* и *GSTM1*) додатно повећавају ризик за настанак NHL.



Додатној конфузности доприносе студије *GSTs* полиморфизма спроведене на оболелима од хематолошких болести које износе потпуно опречне резултате у погледу терапијског одговора, од веома повољних до неповољних резултата лечења. Једно од објашњења за различите резултате би могло да буде да присуство null генотипа у *GSTs* ензимском систему може довести до пораста ефикасности хемиотерапије, и тако побољшати резултате лечења. Са друге стране, смањен детоксикациони капацитет повезан са null генотипом може проузрочити акумуляцију генетских оштећења, доводећи до више испољене агресивне природе болести и резистентности на хемиотерапију (Cho, 2010).

У погледу удружености *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* генотипова и клиничких карактеристика у презентацији лимфома у нашој студији [пол, старост  $\leq 60$  vs.  $>60$  година, CSI/II наспрам III/IV, присуство Б симптома, туморски облик болести, присуство лимфома у више од 1 екстранодалне локализације и IPI скор низак/низак-средњи наспрамсредњи-висок/висок] није уочена статистички значајна повезаност. Међутим, уочили смо статистички значајно већа учесталост *GSTM1*-null генотипа у болесника са DLBCL који су имали мање од 60 година [odds ratio (OR) 3.12(3.12-9.17);  $p=0.03$ ].

Неколико до сада објављених студија је истраживало повезаност клиничких карактеристика лимфома у односу на *GSTs* полиморфизме (Cho у и сар., 2010; Ноhaus и сар., 2003). У студији Cho, и сарадника значајна повезаност је уочена између неповољног перформанс статуса оболелог ( $p=0.038$ ) и високог IPI score ( $p=0.012$ ) уколико су имали *GSTT1*-null генотип. Друга студија која је пратила болеснике са DLBCL, студија Yri, и сарадника је потврдила удруженост *GSTM1*-positive генотипа и нискоагресивног IPI score, док остале клиничке карактеристике у презентацији болести нису показале асоцијацију са другим *GSTs* полиморфизмима (Yri и сар., 2013). Такође, присуство *GSTT1* null генотипа у оболелих од Хочкиновог лимфома је било повезано са ниским CS болести и смањеним параметрима упале, односно ниском седиментацијом еритроцита (Ноhaus и сар., 2003). У студији Ноhaus и сарадника, значајно чешће присуство null генотипа *GSTT1* гена је уочено у особа женског пола, млађих од 45 година живота (Ноhaus и сар., 2003). Резултати наше студије су показали да је *GSTM1* null генотип значајно чешће био присутан у оболелих млађих од 60 година, које уједно предсављају старосну границу



садржану у IPI скору (cut off <60 година), односно године мање од 60 у дијагнози лимфома представљају повољнији прогностички параметар. Једно од могућих објашњења за чешћу појаву лимфома у оболелих који су били носиоци *GSTM1*-null генотипа може да буде да је одсуство GST ензимске активности представљало фактор ризика на настанак DLBCL у особа млађих од 60 година. Међутим, резултати до сада објављених студија и мета-анализе нису потврдили удруженост *GSTM1* полиморфизма и појаве DLBCL (Chiu, 2005; Bin and Luo, 2013).

У наставку истраживања анализирали смо да ли постоји повезаност између полиморфизма у генима за *IL2* -330T/G и *IL6* -597G/A са клиничким карактеристикама оболелих од DLBCL.

Анализирајући повезаност *IL2* -330T/G и *IL6*-597G/A генотипова са клиничким карактеристикама оболелих од DLBCL (пол, старост, клинички стадијум, туморски облик болести, присуство екстранодалних локализација и IPI скор), нисмо доказали значајну удруженост ни једне наведене клиничке карактеристике са генотиповима *IL2* и *IL6* генског полиморфизма.

Неколико до сада објављених студија је истраживало повезаност клиничких карактеристика оболелих од NHL, укључујући DLBCL у односу на *IL2*-330 полиморфизам. У студији Rahman и сарадника једина клиничка карактеристика која је значајно била удружена са *IL2*-330 SNP је био перформанс статус оболелог од NHL (Rahman и сар., 2018). Перформанс статус (PS) осликава реакцију оболелог организма на болест, као и способност болесника да толерише примењену терапију. У наведеној студији, болесници који су били носиоци нискосекреторног G алела су имали значајно чешће узнапредовао PS ( $\geq 2$ ) у односу на болеснике носиоце T генотипа *IL2*-330 полиморфизма. Друга студија, Song-а и сарадника није утврдила ни једну повезаност клиничких карактеристика са *IL2*-330 SNP, што је у складу и са резултатима нашег истраживања (Song и сар., 2015).

Анализирајући повезаност *IL6* -597 G/A полиморфизма са клиничким карактеристикама оболелих, ни један од анализираних параметара болести у дијагнози лимфома није показао повезаност са GG или AG генотиповима -597 *IL6* полиморфизмом.

Анализирајући даље повезаност *CD14-159* полиморфизма са клиничким карактеристикама оболелих од DLBCLу дијагнози болести, уочена је значајна удруженост *CD14* полиморфизма са екстранодалним присуством болести ( $p=0.01$ ). У поређењу са хомозиготима С алела (СС генотип) *CD14-159* полиморфизма, присуство Т алела (СТ/ТТ генотип) је било повезано са значајно чешћом екстранодалном презентацијом болести (OR 3.191, 95% CI, 1.282-7.94). Најчешће екстранодално место, односно орган је био желудац, који је био захваћен у 29% оболелих са екстранодалним присуством болести.

Резултати до сада објављених студија су указивали на повезаност *CD14-159* полиморфизма са карциномом желуца (Li и сар., 2013). Резултати мета-аналитичке студије од стране Wang-а и сарадника су потврдили да *CD14-159* полиморфизам може бити удружен са повећаним ризиком од развоја карцинома желуца у појединаца са инфекцијом *H.pylori* (Wang и сар., 2014). Друга студија, студија Türe-Özdemir и сарадника је потврдила повезаност између *CD14* Т алела -159 генског полиморфизма са развојем гастричног МАЛТ лимфома (Türe-Özdemir и сар., 2008). Везивање *CD14* антигена заједно са TLR за бактеријски липополисахарид (LPS) узрокује ослобађање цитокина који доводе до хроничне антигене стимулације и инфламације што представља увод у гастричну карциногенезу и лимфомагенезу. Хронична стимулација антигеном је највероватније и механизам који се наводи у развоју примарног DLBCL желуца. У извештајима о улози *CD14* као протективног антигена у погледу заштите домаћина од инфекције, Zanoni и Granucci су закључили да протективна улога *CD14* је зависна од врсте микроорганизма, али и од места инфекције (Zanoni и сар., 2013).

Анализирајући претретманску вредност CRP као параметра упале у односу на генотипове *CD14-159* полиморфизма, уочена је разлика у средњој вредности CRP тако да је у носиоца СС генотипа CRP био 24(2.5-122)mg/l и 39.5 (2.2-266) mg/l у болесника са СТ/ТТ генотипом, али без статистичке значајности ( $p=0.078$ ). Вредности осталих параметара упале као што су седиментација и фибриноген нису били повезани са различитим генотиповима *CD14-159* полиморфизма.

Трећи, и последњи циљ нашег истраживања је обухватао анализирање удружености полиморфизама у генима за *GST(GSTT1, GSTP1, GSTM1)*,

*IL2-330T/G*, *IL6 -597G/A* и *CD14 -159C/T* са одговором на терапију, током и исходом лечења у оболелих од DLBCL.

У нашој студији болесника са DLBCL униформно лечених R-CHOP терапијом, нисмо потврдили повезаност *GST* генотипова са одговором на примењену терапију, како у погледу стопе CR, тако и у погледу стопе прогресије болести и релапса.

Међутим, резултати нашег истраживања су показали да је *GSTP1* генски полиморфизам био повезан са дужином потребног периода до постизања CR, односно да је медијана до постизања CR у болесника са Val алелом *GSTP1* полиморфизма (Val/Val и Ile/Val генотипом) била статистички значајно краћа у односу на болеснике са Ile/Ile генотипом (219 дана наспрам 300 дана;  $p=0.05$ ). И исто тако, али без потврђене статистичке значајности, утврђено је да је истим модалитетом лечења медијана до постизања CR код болесника са *GSTT1* –позитивним генотипом била краћа у односу на носиоце *GSTT1*-null генотипа (210 наспрам 300 дана;  $p=0.22$ ). Исто тако, *GST* генотипови нису утицали на OS и DFS у наших болесника са лимфомом. Анализирајући параметре који су утицале на дужину OS болесника са DLBCL, у униваријантној анализи сигнификантни утицај је имао узнапредовали CS ( $p=0.04$ ) и неповољан, интермедијално-висок/висок IPI скор ( $p=0.01$ ). Међутим, мултиваријантна анализа је издвојила само IPI скор као независни прогностички параметар за OS [средњи-висок/висок IPI vs низак/низак-средњи IPI; HR 3.1, 95% CI 1.26-7.6;  $p=0.01$ ].

Иако детоксикациона активност GST штити ћелије од одређених болести, такође, може да умањи ефикасност одређених хемотерапеутских лекова који се користе у терапији тумора. Поједини цитостатици из групе алкилирајућих лекова припадају класама електрофилних једињења која су супстрати за GSTs (Eklund и сар., 2007). Прекомерна експресија GST изоензима је повезан са резистенцијом на лекове и, обрнуто, недостатак GST изоензима повећава осетљивост на канцерогене (Sau и сар., 2010).

Резултати до сада спроведених испитивања су показали да ензими из групе GST могу да доведу до резистентности на различите хемотерапијске агенсе као што је melphalan, adriamycin, cyclophosphamide (Rorrlund и сар., 2010). Многа малигна ткива имају висок ниво GSTT1 ензима, независно од примењене хемотерапије и сматра се да могу

да представљају битан multidrug-resistant фактор (Hayes, 2005). Више студија је до сада показало да је експресија GSTP1 ензима у лимфном ткиву израженија у односу на друге GSTs ензиме и такође да постоји повезаност између ниво GSTP1 експресије у ткиву тумора и прогнозе различитих малигних болести (Thieblemont и сар., 2008; Kearns и сар., 2001). Између осталих студија, Рибраг са сарадницима је уочио значајну корелацију између *GSTT1* експресије у туморском ткиву лимфома и резултата лечења 69 болесника са DLBCL (Ribrag, 2003). Висока *GSTP1* експресија, у више од 50% туморских ћелија, била је повезана са мањом стопом CR и краћом дужином преживљавања до прогресије болести, док је одсуство *GSTP1* експресије у ткиву лимфома било удружено са повољним резултатима. У истој студији, *GSTP1* експресија у туморском ткиву је била је једини независан прогностички параметар сензитивности на CHOP терапију (Ribrag и сар.,2003).

Иако у нашој анализи нисмо одређивали ниво експресије *GSTP1* у лимфном ткиву оболелог, резултати студије Ribraga са сарадницима се могу упоредити са резултатима нашег истраживања које је потврдило повољан терапијски одговор у болесника који су имали Val алелску варијанту *GSTP1* гена. Полиморфизам једног нуклеотида, SNP у *GSTP1* гену доводи до супституције изолеуцина у валин у кодону 105 (Ile105Val) и повезана је са смањеном ензимском активношћу у поређењу са изолеуцином (Watson и сар.,1998). Watson са сарадницима је показао да индивидуе са Val генотипом имају мању каталитичку активност у односу на индивидуе са Ile генотипом.

Већина хуманих туморских ћелијских линија које су резистентне на хемиотерапеутске агенсе прекомерно експримирају класу GSTP1. Значајне квантитативне корелације између активности ензима, укупних протеина и mRNA су нађене за GSTP1, посебно у оним ћелијским линијама које су отпорне на алкилирајућа средства као што су мелфалан, хлорамбуцил, циклофосфамид, BCNU и цисплатину (Gaziev и сар.,2015).

Такође, студија Katahira и сарадника је потврдила да је плазматски ниво GSTP1 ензима значајан прогностички маркер за NHL у узрадовалом клиничком стадијуму болести, и исто тако да је укупно преживљавање и преживљавање без болести, као и стопа комплетних ремисија у болесника са повишеним плазматским нивоом GSTP1 била мања у односу на болеснике са нормалним плазматским нивоом GSTP1 ензима (Katahira и

сар., 2004). Ова сазнања потврђују чињенице да је *GSTP1* фактор који доприноси резистентности на *adriamycin* и *cyclophosphamide*, два основна хемиотерапијска агенса који се користе у лечењу NHL, и која су оба саставни део СНОР протокола.

Иста студија је упоредо са праћењем плазматског нивоа *GSTP1* одређивала и експресију *GSTP1* у лимфном ткиву, и није потврдила сигнификантну корелацију између плазматског нивоа и ткивне експресије *GSTP1* (Katahira и сар., 2004).

У студији спроведеној у болесника са Ходжкиновим лимфом, Ноhaus и сарадници су приказали удруженост између *GSTP1* Ile105Val полиморфизма и клиничких резултата у 97 болесника након примењене хемиотерапије. Резултати ове студије су потврдили значану разлику у 5-годишњем преживљавању болесника са Val/Val генотипом у односу на болеснике са IleVal и IleIle генотипом (100% према 74% према 43%) (Ноhaus и сар., 2005). Резултати ове студије су били у складу са резултатима других студија изведених на болесницима са различитим малигним болестима, које су такође потвдиле повољну прогнозу у односу на терапијски одговор носиоца *GSTP1* Val алела (Stoehlmacher и сар., 2002). Иако у нашем истраживању није уочена повезаност ни једног *GSTs* полиморфизма са дужином преживљавања болесника са DLBCL, ипак, повољан терапијски одговор који се огледао у значајно краћем временском периоду који је био потребан за стицање комплетне ремисије је уочен у болесника са Val алелском варијантом *GSTP1* гена, што је у складу са студијом изведеном на оболелима од Ходжкиновог лимфома.

Резултати нашег истраживања су показали да ни један од испитиваних *GST* полиморфизми није био повезан са OS и DFS. Анализирајући параметре који су утицале на дужину OS болесника са DLBCL, у униваријантној анализи сигнификантни утицај је имао узнапредовали CS ( $p=0.04$ ) и неповољан, интермедијално-висок/висок IPI скор ( $p=0.01$ ). Међутим, мултиваријантна анализа је издвојила само IPI скор као независни прогностички параметар за OS (HR 3.1, 95% CI 1.26-7.6;  $p=0.01$ ) у наших болесника, што је у складу са резултатима Cho и сарадника. У студији Yri и сарадника, низак IPI скор је издвојен као независан прогностички параметар за продужено преживљавање болесника са *GSTM1*-positive генотипом (Yri, и сар., 2013). Међутим, резултати нашег

истраживања нису потврдили повезаност *GSTM1* генотипа и IP1 скорa на укупно преживљавање наших болесника са DLBCL.

Присуство двоструког null генотипа *GSTM1/GSTT1* гена може смањити или одложити метаболизам хемиотерапије у оболелих од лимфома и може се очекивати да води бољој ефикасности терапије уз пораст токсичности. Иако резултати студије Cho и сарадника нису потврдили бољи терапијски одговор у 94 новодијагностикована болесника са двоструким null генотипом лечених R-CHOP имунохемотерапијом, ова студија је показала значајну токсичност у болесника са null генотипом *GSTT1* гена у односу на *GSTT1*-positive генотип, и исто тако значајну токсичност R-CHOP терапије у болесника са двоструким null генотипом (*GSTM1/GSTT1*). Токсични ефекти у болесника са *GSTT1*-null генотипом су се испољили леукопенијом градус III-IV, повишеном температуром и мукозитисом, и у болесника са двоструким null генотипом значајно већом стопом изражене тромбоцитопеније. Иако ни један *GSTs* генотип није био повезан са укупним преживљавањем, уочено је значано лошије преживљавање без нежељених догађају у болесника мушког пола са *GSTM1/GSTT1*-null генотипом (Cho и сар., 2010). Објављени резултати и других студија потврђују да *GSTT1*-null генотип значајно доприноси токсичним ефектима терапије (Morabito и сар., 2012). У нашој студији R-CHOP терапија у новодијагностикованих болесника није била праћена значајним токсичним ефектима, животноугрозавајућим инфекцијама или је захтевала значајније одлагање наредног циклуса имунохемиотерапије.

Резултати до сада спроведених истраживања су показали да метилација *GSTP1* може имати значајну улогу у патогенези Б-ћелијских лимфома (Rossi, и сар., 2004). Инактивација *GSTP1* у гастричном MALT лимфому изазива акумулацију слободних радикала што промовише лимфогенезу. Nakamichi са сарадницима је запазио да учестале абератне метилације *GSTP1* у DLBCL могу да доприносе резистенцији на хемиотерапију (Nakamichi, и сар., 2007). Према овом аутору, *GSTP1* метилација може да буде индикатор одговора на терапију и прогностички параметар за DLBCL. Сходно томе, развој инхибитора GST сепојављује као рационални одговор за превазилажење резистенције многих антитуморских лекова, и повећање њихове ефикасности. Недавно је објављен преглед који сумира напредак у развоју GST инхибитора (Ruzza, и сар., 2010). С друге стране, прекомерна експресија неких GST ензима даје могућност примене пролека



у терапији лимфома. GST активира прекурсоре лекова и ослобађа се активна антитуморска супстенца која делује на тумор. Први пример GST зависне активације прекурсора лека је *cis*-3-(9H-purin-6-ylthio) акрилна киселина (Laschak и сар., 2012), прекурсор цитотоксичног агенса 6-меркаптопурина, ослобађа активни лек након реакције са GST и *in vitro* и *in vivo*, преко два различита пута. Ову активацију обезбеђују GSTA1-1, GSTM1-1 и GSTP1-1 (Laschak, и сар., 2012). Међутим, овај механизам терапије доводи до нежељених ефеката, пре свега леукопеније и агранулоцитозе (Dornian, и сар., 2013). Недавно откривени 7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол деривати спадају у веома ефикасне инхибиторе глутатионС-трансферазе (GSTP1), ензима који испољава антиапоптоличку активност, и такође умањује ћелијски отпор туморске ћелије на хемиотерапију. Ови нови инхибитори показују липофилна својства погодна за пролаз кроз плазма мембрану. Western Blot и имунопреципитацијске анализе су показале да 6 - (7-нитро-2,1,3-бензокадиазол-4-илтио) хексанол промовише у обе ћелијске линије дисоцијацију GSTP1 комплекса са JNK. Овај процес повећава реактивне врсте кисеоника и (ROS)-независноактивирање JNK-посредованог пута што резултира процесом апоптозе. Ниска концентрација овог новог једињења је потребна да покрене цитотоксичне ефекте у ћелији тумора и ниска токсичност на мишевима указују на то да нови 7-нитро-2,1,3-бензокадиазол дериват обећава у терапији тумора (Economiks, и сар., 2010).

У последњих неколико година све више се придаје значај ензимског система GSTs у терапији канцера. Многи антиканцерски лекови су супстрати за GST и могу бити коњуговани са GST. Стога, прекомерна експресија GSTs у туморској ћелијској линији, посебно GSTP1-1, одговорна је за отпорност ћелије на одређене хемиотерапеутске лекове (Tripathy, и сар., 2006). Из ових разлога, постоје више покушаја да се пронађе инхибитор GST са циљем да модулира ћелијску отпорност на антиканцерске лекове и побољша цитотоксичне ефекте антинеопластичних агенаса. Најбоље окарактерисан инхибитори GST су диуретици, етакринска киселина и глутатион аналогни TER199. Етакринска киселина се везује за Н-site, има низак афинитет за ензим, и коњугована са GSH, лако се излучује из ћелије. Клиничка испитивања су показала озбиљну токсичност етакринске киселине, укључујући диурезу, метаболичке поремећаје и мијелосупресију (Guneidy, и сар., 2014). Други



инхибитор (TER 199) је глутатионпептидомиметик који брзо улази у ћелије, и као пролек, се активира интрацелуларном естеразом. Различите класе цитотоксичних GSH аналога неинхибирају GST већ користе њен екатолиничке моћи да се активирају. Пример је TER 286, чија структура има капацитет везивања за GST и активиран овим ензимом показује антиканцерско дејство (Townsend, и сар., 2005).

У наставку, анализирали смо *IL2-330* генски полиморфизам и његову повезаност са одговором на терапију, учесталошћу релапса и исходом лечења оболелих од DLBCL лечених R-CHOP терапијом. Резултати нашег истраживања нису показали значајну повезаност *IL2-330* T/G генотипова са стопом остварених комплетних ремисија и учесталошћу релапса у болесника са DLBCL. Такође, генски полиморфизам *IL2-330* није био удружен са DFS и OS у односу на дистрибуцију генотипова. У мултиваријантној анализи једина варијабла која је утицала на OS је био IPI скор. Такође, *IL2* генотипови -330 полиморфизма нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама или са значајним одлагањима терапијских циклуса.

У погледу других студија, објављени резултати истраживања генских полиморфизама у болесника са Б-ћелијским NHL су показали да полиморфизам *IL2* гена на позицији -330 је удружен са резултатима лечења оболелих од фоликуларног лимфома (Serhan, и сар., 2007), односно, да је присуство TT/GT генотипова у позицији -330 *IL2* гена било значајно повезано са преживљавањем оболелих од фоликуларног лимфома. Друга студија, студија Rahman и сарадника није потврдила повезаност *IL2-330* полиморфизма са резултатима лечења оболелих од NHL (Rahman, и сар., 2017). Иако су носиоци G варијанте алела (GG/TG) имали краће 5-годишње преживљавање без присуства болести (DFS), није уочена статистички значајна разлика у DFS у односу на носиоце TT генотипа (45.3% наспрам 69.2%;  $p=0.211$ ), што је у складу са резултатима нашег истраживања у којима нисмо потврдили удруженост DFS са дистрибуцијом генотипова *IL2-330* полиморфизма.

Физиолошка улога *IL2* је у генерисању антитуморског одговора стимулацијом раста ефекторних (цитотоксичних) Т лимфоцита и НК ћелија. Обзиром на ову физиолошку улогу, његова смањена секреција може бити један од параметара у туморској прогресији. Механизам којим полиморфизам *IL2* гена на позицији -330T / G може да утиче на појаву

NHL није у потпуности јасан. Са једне стране, IL2 је укључен у диференцијацију Б ћелија, и на другој страни, IL2 промовише експресију и повећава интринзичну цитотоксичност НК ћелија (Mehrool, и сар., 1998; Einsebes, и сар., 2004). Познато је да НК ћелије посредују у антителима-зависној ћелијској цитотоксичности (ADCC) путем експресије активирајућег рецептора за Fc део IgG антитела (Cooper и сар., 2001a). Могуће да смањени ниво IL-2 повезан са генским полиморфизмом *IL2* гена може умањити антитуморски одговор путем ADCC код болесника са NHL-ом и, стога, повећати осетљивост на појаву NHL.

Rituximab, химерично IgG1 моноклонско антитело управљено против CD20 антигена је ушло на велика врата почетком 2000 година за лечење Б-ћелијских лимфома. Иако прецизан механизам са којим rituximab испољава своју ефикасност није у потпуности разјашњен, све већи број података сугерише доминантну улогу од антитела зависну ћелијску цитотоксичност (ADCC). Други механизми деловања укључују директну индукцију апоптозе и комплементом посредовану цитолизу. ADCC је посредована бројним ефекторним ћелијама, укључујући макрофаге и НК ћелије које експримирају IL2R (IL2Rbeta) са интермедијарним афинитетом. Интермедијарне дозе IL2 су способне да доведу до експанзије CD16+(FcyRIIIa) НК ћелије и активишу цитотоксичне ефекторне механизме, укључујући ADCC активност. Резултати спроведених студија фазе 1 и фазе 2 указују да додаток IL2 може повећати цитотоксичност и ефикасност rituximaba и побољшати терапијски одговор у болесника са Б-ћелијским лимфомима (Gluck, и сар., 2004). У нашем истраживању није потврђен значајно различит терапијски одговор у болесника лечених R-СНОР терапијом у односу на различите генотипове *IL2-330* полиморфизма, како у погледу стопе остварених комплетних ремисија, тако и у погледу дужине преживљавања.

Солубилни IL2Ralfa(sIL2Ralfa) је солубилни облик IL2Ralfa ланца (CD25) који се ослобађа са активисаних Т и Б лимфоцита, и исто тако, може да води порекло од неопластичних лимфомских ћелија. Студије спроведене у болесника са различитим облицима лимфома су показале удруженост између јасне позитивне експресије CD25 на мембрани лимфомских ћелија и високог нивоа sIL2Ralfa, сугеришући да су извор sIL2Ralfa не само реактивне инфламаторне ћелије у окружењу лимфног чвора већ и лимфомске неопластичне ћелије (Hashimoto, и сар., 2013). Резултати више

објављених студија су показали да повишен ниво sIL2R alfa у серуму оболелих од DLBCL је повезан је са лошијом прогнозом и мањим терапијским одговором (Goto и сар., 2012; Hashimoto, и сар., 2013; Tomita, и сар., 2012). Такође, Tomita са сарадницима је показао да је висок ниво sIL2Ralfa заједно са узрапредовалим клиничким стадијумом и повишеним нивоом лактичне дехидрогеназе, независтан прогностички параметар за преживљавање болесника са DLBCL лечених имунохемио R-CHOP терапијом.

Поред улоге IL2 у генерисању антитуморског одговора стимулацијом раста ефекторних (цитотоксичних) Т лимфоцита и NK ћелија, IL2 је такође веома битан у генерисању CD4+FOXP3+ регулаторних ћелија (Treg) које имају супресорну улогу и посредују у анергији имуног система. Такође, IL2 има инхибиторну улогу наТ фоликуларне хелпер (Tfh) ћелије герминативног центра лимфног чвора где Tfh ћелије промовишу class switch рекомбинације и стицање антигенског репертоара Б ћелија. На другој страни, и саме лимфомске ћелије могу да продукују различите факторе са имуносупресивном функцијом као што су IL10, TGFbeta1 који чине неповољну микросредину за очекивану функцију Т лимфоцита у антитуморском одговору (Liao, и сар., 2013).

Сазнања о улози IL2 стицана током базичних истраживања доприносила су развоју нових потенцијалних терапијских приступа у лечењу различитих болести. Тако промовишућа улога IL2 може да оствари жељени терапијски одговор у лечењу малигних оболења са једне стране, док блокада ефекторских функција IL2 или повећање Трег активности имају потенцијалну улогу у превенцији аутоимуности или масивног инфламаторног одговора. Директна манипулација активности IL2 би могла да импликује његову улогу у контроли комплексног имуног одговора и за имуну терапију широког спектра болести (Liao, и сар., 2013).

У наставку, анализирали смо *IL6-597* генски полиморфизам и његову повезаност са одговором на терапију, учесталост релапса и исходом лечења оболелих од DLBCL лечених R-CHOP терапијом. Резултати нашег истраживања нису показали значајну повезаност *IL6-597* GG и GA генотипова са стопом остварених комплетних ремисија и учесталост релапса у болесника са DLBCL. Такође, генски полиморфизам *IL6-597* није био удружен са DFS и OS у односу на дистрибуцију генотипова. У униваријантној анализи у наших болесника, на OS су значајно утицали IPI

скор ( $p < 0.001$ ), клинички стадијум болести ( $p < 0.001$ ), апсолутни број лимфоцита ( $p = 0.001$ ) и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p < 0.001$ ). Међутим, у мултиваријантној анализи једини параметар који је значајно био повезан са OS је IPI скор.

Такође, GG и GA генотипови *IL6* гена на позицији-597 нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама или са значајним одлагањима терапијских циклуса.

У погледу резултата других студија, студија Aschebrook-Kilfoi и сарадника процењивала је удруженост полиморфизама у генима за различите цитокине са прогнозом оболелих од NHL. Студија је укључила 496 особа женског пола са NHL, од којих су 155 имале DLBCL. Анализирана су три најчешћа SNP у промотер региону гена за *IL6* у позицији -597G/A (rs1800797), -174G/C (rs1800795) и -572 G/C (rs1800796) за које је претходним истраживањима показано да припадају функционалним полиморфизмима који су у linkage disequilibrium-у. Резултати ове студије показују повезаност полиморфизама гена за *IL6* са укупним преживљавањем и преживљавањем без присуства болести за укупну популацију оболелих од NHL. Ова студија је потврдила да је *IL6* -572 полиморфизам значајно удружен (HR 0.42; 95% CI, 0.23-0.77) са смањеним ризиком за смртни исход, и исто тако са смањеним ризиком за настанак релапса између оболелих од NHL. Док је смањени ризик за релапс и смртни исход уочен за болеснике са DLBCL и *IL6*-572 полиморфизмом (HR 0.2, 95% CI, 0.05-0.83), анализа удружености SNP *IL6* гена на позицији -597 и резултата лечења DLBCL није потврђена (HR 1.61, 95% CI, 0.91-2.83) (Aschebrook-Kilfoi, и сар., 2012).

Друга студија, студија Giachelia и сарадника је истраживала повезаност *IL6* полиморфизма rs1800795 са резултатима болесника са DLBCL лечених R-CHOP имунохемотерапијом. Резултати студије спроведене на популацији оболелих беле расе су потврдили да је *IL6* полиморфизам био удружен са укупним преживљавањем и преживљавањем без прогресије болести. Такође, повишена концентрација IL6 у серуму оболелих је била удружена са неповољном прогнозом и инфериорнијим терапијским одговором код DLBCL (Giachelia и сар., 2012). Иста студија, међутим, није потврдила повезаност серумског нивоа IL10 са резултатима лечења оболелих. Студија Giachelia и сарадника, такође, није потврдила генотипску-фенотипску повезаност између IL6 концентрације у серуму

оболелих од DLBCL са *IL6* rs 1800795 SNP. Међутим, резултати ове студије су такође указали да болесници који имају делецију у гену за *NF-kB* (delATTG, rs 28362491) су имали виши серумски ниво IL6 и IL10, што указује да полиморфизам у гену за *NF-kB* може имати улогу у прогнози болесника лечених R-CHOP терапијом.

Познато је да IL6 стимулише синтезу протеина акутне фазе и подстиче раст Б лимфоцита. Фактор некрозе тумора (TNF) је један од првих цитокина који се ослобађа као одговор на инфламаторне процесе, и генерише каскаду даљих дешавања која укључује секрецију IL1, IL6, као и друге медијаторе. Резултати објављених студија указују да IL6 повећава експресију антиапоптоличног *bcl-2* у туморском лимфном ткиву (Tumangi *сар.*, 2002). Резултати више студија говоре да полиморфизми у генима за *IL6* и *IL10* могу бити повезани са ризиком за појаву болести и прогнозу оболелих од Ходжкиновог и NHL (Hohaus, и *сар.*, 2007).

Молекул CD14, рецетор за липополисахарид има значајну улогу у регулацији имунског одговора и инфламацији (Türe-Özdemiri *сар.*; 2008). Солубилни CD14 има способност да мења целуларни и хуморални имунски одговор директном интеракцијом са Т и Б лимфоцитима. Повишени ниво солубилног CD14 је нађен у различитим облицима инфекција, инфламаторних болести као и у пацијената са NHL. Подаци из литературе указују да је присуство одређених алелских облика гена за CD14 удружено са нивоом солубилног CD14 у серуму, као и да је ниво sCD14 значајно повећан у болесника са агресивним NHL (Aoun, и *сар.*, 2004 ; Ara, и *сар.*, 2010).

У даљем току нашег истраживања испитивали смо удруженост *CD14-159* полиморфизма са одговором на примењену R-CHOP имунохемиотерапију. Резултати нашег истраживања су показали да генотипови *CD14-159* полиморфизма нису били повезани са стопом комплетних ремисија, нити удружени са стопом испољене резистентне болести и релапса.

Анализирајући повезаност терапијског одговоа у болесника са DLBCL у односу на генотипове *CD14-159* полиморфизма, нисмо потврдили статистички значајну повезаност дужине преживљавања без релапса болести (RFS) и OS у односу на *CD14-159* генски полиморфизам. Разматрајући параметре који су утицали на OS наших болесника, у униваријантној анализи издвојен је IPI скор, CS болести, апсолутни број

лимфоцита и лимфоцитно/моноцитни однос, међутим, у мултиваријантној анализи IPI скор је био једини параметар повезан са OS у наших болесника.

Солубилни облик CD14 детектабилан је и у крви здравих појединаца. Пораст вредности sCD14 је повезана са различитим инфламаторним болестима. Baseggio са сарадницима је утврдио да болесници са NHL имају значајније веће концентрације sCD 14 у крви него здрави појединци. Такође, интересантно запажање ове студије је да су болесници са агресивним Б-ћелијским лимфомима, као што су DLBCL или Burkitt лимфоми, имали мање вредности sCD14 у односу на болеснике са индолентним облицима лимфома. У додатку, вредности sCD14 су биле значајно повезане са вредностима CRP и TNF, указујући на значај цитокина у инфламаторном одговору оболелог.

У нашем истраживању показали смо да су болесници са високо-продукујућом Т алелском варијантом (СТ/ТТ генотип) *CD14-159* полиморфизма имали више вредности CRP, мада нисмо установили статистичку значајност. Резултати претходних студија су показали да су више вредности CRP при дијагнози болести биле неповољан прогностички параметар за клинички исход (Torran, и сар., 2014).

Инфективне компликације настале током примене R-CHOP терапије су се испољиле код 25% лечених болесника, и биле су чешће удружене са СС него са СТ/ТТ генотиповима (39% наспрам 22%), међутим ова разлика није показала статистичку значајност ( $p=0.083$ ). Такође, праћењем раних компликација током трајања активног лечења (посттерапијски мукозитис, агранулоцитоза, анемија, тромбоцитопенија, акутна бубрежна слабост, повишена температуре, васкуларни и тромбоемболијски конфликти) уочен је тренд њихове чешће појаве у болесника са СС генотипом у односу на болеснике са СТ/ТТ генотиповима (42% наспрам 24%;  $p=0.079$ ).

Велики број студија је истраживао повезаност између CD14 експресије и учесталости/дужине трајања инфекција (Keerthivasan и сар., 2014; Hu, и сар., 2015). Како су резултати нашег испитивања утврдили повезаност између високопродукујућег Т алела -159 полиморфизма гена за *CD14* са екстранодалним присуством болести и повишеним вредностима CRP, можемо закључити да су наши резултати у складу са овим извештајима. Ипак, наши болесници са *CD14-159* Т алелом (СТ/ТТ генотип) су имали



мању стопу инфективних компликација током примене R-СНОР терапије у односу на СС генотип. Такође, и ране компликације које су пратиле имунохемотерапију су биле чешће у болесника са СС генотипом.

Присуство инфективних и раних компликација лечења су према претходним извештајима представљале неповољан клинички догађај ( Pole и сар., 2017; Jung и сар., 2015).

Анализирајући целу популацију болесника са DLBCL, нисмо утврдили повезаност Т/С алела *CD14-159* полиморфизма са дужином преживљавања без појаве релапса болести (RFS) и OS. Ипак, болесници са екстранодалним присуством болести који су били носиоци хомозиготне Т алелске варијанте *CD14-159* су имали сигнификантно дуже RFS (HR 2.422, p=0.026) и OS (HR 0.503, p=0.038).

Резултати претходних студија које су пратиле повезаности између *CD14* генотипова/продукције и преживљавања болесника са малигним болестима су контрадикторни. Док су поједине студије спроведене на болесницима са туморима солидних органа налазиле удруженост нивоа експресије *CD14* на туморским ћелијама са прогресијом болести и лошим исходом (Cheah, и сар., 2015), студија Seiffert-а и сарадника је закључила да је ниво s*CD14* идентификован као нови прогностички параметар за преживљавање болесника са хроничном лимфоцитном леукемијом (Seiffert, и сар., 2010). Ипак, анализирајући ниво експресије *CD14* на препарату примарног тумора при дијагнози дисеминованог неуробластомом, Stigliani и сарадници су изнели супериорни EFS и OS у болесника са високим нивоом *CD14 mRNA*, док су болесници са ниским степеном експресије *CD14mRNA* имали лошије преживљавање. Увидом у наведене резултате, аутори студије су сугерисали да ћелије (макрофаги и дендритичне ћелије) које експримирају *CD14* могу бити одговорне за активацију Т лимфоцита, што ограничава туморску прогресију (Stigliani, и сар., 2015).

Студије спроведене у болесника са DLBCL су закључиле да је повећано присуство макрофага у туморском ткиву лимфома повезано са неповољним исходом лечења. У нашој студији нисмо анализирали степен инфилтрације макрофага у ткиву лимфома, нити смо одређивали експресију *CD14mRNA* у ткиву тумора. Међутим, резултати наше студије потврђују бољи терапијски одговор у оболелих са високопродукујућим ТТ



генотипом, али само у групи болесника са екстранодалним манифестацијама болести.

Студије које су истраживале повезаност *CD14-159* полиморфизма и исхода болесника са солидним туморим, ретке су. Упркос учесталим налазима неповољног исхода у болесника са ТТ генотипом *CD14-159* полиморфизма, Mansur са сарадницима је изнео да је преживљавање код болесника са Т варијантом алела побољшано у односу на С варијанту алела (Mansur, и сар., 2015). Супериорније преживљавање у критично болесних након оштећења опекотинама је, такође, уочено код носиоца ТТ генотипа *CD14-159* гена.

Резултати нашег истраживања указују да полиморфизми у генима укљученим у метаболизам лекова садржаних у R-СНОР протоколу могу, барем делимично, да објасне различит исход терапије. Последњих година се све више истиче да појединачне генетске модификације, као што је полиморфизам једног нуклеотида, нису довољне да објасне толику интериндивидуалну разлику у терапијском одговору, већ да у основи ове разноликости се налазе промене у бројним генима удруженим са транспортом, метаболизмом и детоксикацијом лекова. Генски полиморфизми могу кодирати не само протеине укључене у дистрибуцију и метаболизам лекова, већ и протеинске продукте укључене у рецепторске и сигналне путеве и DNA repair механизме. Стицања нових сазнања из области полиморфизма гена могу предвидети ефикасност и токсичност терапије усмерене према појединцу, етничким групама и различитим поднебљима, чиме се све више баве студије фармакогенетике и фармакокинетике.

У наше истраживање је била укључена етнички хомогена популација болесника код којих је дијагноза DLBCL, униформна R-СНОР терапија и систематско праћење спровођено у једном центру.

Увидом у резултате нашег истраживања може се закључити да полиморфизми у генима за *GSTs* (*GSTP1* и *GSTM1*) и *CD14-159* су повезани са иницијалним клиничким карактеристикама оболелих, и удружени са исходом лечења болесника са DLBCL који су примали R-СНОР имунохемотерапију.

## VI. ЗАКЉУЧЦИ

- Учесталост генотипова/алела у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2* -330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T код наших болесника са DLBCL није се разликовала од њихове учесталости у популацији оболелих од лимфопрлиферативних болести и здравих испитаника у Европи
- Присуство *GSTM1* null генотипа је значајно чешће у болесника са DLBCL млађих од 60 година
- Болесници са *CD14*-159 CT/TT генотипом су имали значајно чешће присуство болести у екстранодалним локализацијама у односу на болеснике са CC генотипом
- У болесика са екстранодалном презентацијом болести присуство TT генотипа у гену за *CD14*-159 је било удружено са значајно дужим преживљавањем без болести (DFS) и укупним преживљавањем (OS) у односу на болеснике са CC/CT генотипом
- Интернационални прогностички скор (IPI) и *CD14*-159 TT генотип су прогностички параметри удружени са преживљавањем болесника оболелих од DLBCL који су имали екстранодалну презентацију болести
- Медијана до постизања комплетне ремисије (CR) у болесника са Val алелом *GSTP1* полиморфизма (Val/Val и Ile/Val генотип) је била значајно краћа у односу на медијану у болесника са Ile/Ile генотипом
- Полиморфизми у генима за *GSTT1*, *IL2*-330T/G и *IL6* -597G/A нису били удружени са клиничким карактеристикама и исходом лечења у оболелих од DLBCL.

## VII. ЛИТЕРАТУРА

1. Abdellaoui R, Yahyaoui F, Neffati M. Population structure and genetic diversity of a medicinal plant species *Retama raetam* in southern Tunisia. *Pak J Biol Sci.* 2014;17(2):182-9.
2. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-511.
3. Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer.* 2010;46(7):1223-31.
4. Ajisawa A. Immunodeficiency related malignant lymphoma. *Nihon Rinsho* 2012;70 Suppl 2:709-14.
5. Alavanja M, Hofmann J, Lynch C, Hines C, Barry K, Barker J, et al. Occupational use of insecticides, fungicides and fumigants and risk of non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med* 2014;71 (Suppl 1):A36.
6. Altieri A, Castro F, Bermejo JL, et al. Number of siblings and the risk of lymphoma, leukemia, and myeloma by histopathology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1281-6.
7. Alizadeh AA, Eisen RE, Davis C, Ma IS, Lossos A, Rosenwald JC, Boldrick H, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403:503–511.
8. Ali A, Al-Belushi BS, Waly MI, Al-Moundhri M, Burney IA. Dietary and lifestyle factors and risk of non-hodgkin's lymphoma in Oman. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(2):841-8.
9. Aschebrook-Kilfoy B, Zheng T, Foss F, Ma S, Han X, Lan Q, Holford T, Chen Y, et al. Polymorphisms in immune function genes and non-Hodgkin lymphoma survival. *J Cancer Surviv.* 2012; 6(1):102-14.
10. Amen F, Horncastle D, Elderfield K, Banham AH, Bower M, Macdonald D, et al. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. *Histopathology.* 2007;51(1):70–79.

11. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. B cell in rheumatoid arthritis: from pathogenesis players to disease biomarkers. *Biomed Res Int* 2014;2014. doi: 10.1155/2014/681679.
12. Bin Q, Luo J. Role of polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma risk: a Human Genome Epidemiology (HuGE) review. *Leukemia and Lymphoma* 2013;54(1):14-20.
13. Barry K.H., Koutros S., Lubin J.H., Coble J.B., Barone-Adesi F., Freeman L.E.B., Sandler D.P., Hoppin J.A., Ma X., Zheng T., Alavanja M.C. Methyl bromide exposure and cancer risk in the Agricultural Health Study. *Cancer Cause. Control.* 2012;23:807–818.
14. Bassig BA, Lan Q, Rothman N, Zhang Y, Zheng T. Current understanding of lifestyle and environmental factors and risk of non-hodgkin lymphoma: an epidemiological update. *J Cancer Epidemiol.* 2012; 2012:978930.
15. Bergtold A., DesaiDD., Gavhane A., Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 2005; 23:503-514.
16. Bumera-Ciećkiewicz A, Gałazka K, Szpor J, Rymkiewicz G, Jesionek-Kupnicka D, Gruchała A, et al. Distribution of lymphomas in Poland according to World Health Organization classification: analysis of 11718 cases from National Histopathological Lymphoma Register project - the Polish Lymphoma Research Group study. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7(6):3280-6.
17. Bohers E, Mareschal S, Bouzelfen A, Marchand V, Ruminy P, Maingonnat C, Ménard AL, Etancelin P, Bertrand P, et al. Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53(2):144-53.
18. Bonner M.R., Williams B.A., Rusiecki J.A., Blair A., Freeman L.E.B., Hoppin J.A., Dosemeci M., Lubin J., Sandler D.P., Alavanja M.C.R. Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. *Cancer Cause Control.* 2010;21:871–877.
19. Bracci PM, Dalvi TB, Holly EA. Residential history, family characteristics and non-Hodgkin lymphoma, a population-based case-control study in the San Francisco Bay Area. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1287-94.

20. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860-867.
21. Cooper M.A. Fehniger T.A. Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001a;22:633–640.
22. Cerchiatti L, Leonard JP. Targeting the epigenome and other new strategies in diffuse large B-cell lymphoma: Beyond R-CHOP. *Hematologica* 2013;2013:591-595.
23. Cabanillas F. Non-Hodgkin's lymphoma: the old and the new. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011; 11 (Suppl 1):S87-90.
24. Cao Y, Luetkens T, Kobold S, et al. The cytokine/chemokine pattern in the bone marrow environment of multiple myeloma patients. *Experimental Hematology.* 2010;38(10):860–867.
25. Cerchiatti L, Leonard JP. Targeting the epigenome and other new strategies in diffuse large B-cell lymphoma: beyond R-CHOP. *Hematologica* 2013;2013:591-5.
26. Carbone A, Gloghini A, Kwong YL, Younes A. Diffuse large B cell lymphoma: using pathologic and molecular biomarkers to define subgroups for novel therapy. *Ann Hematol.* 2014; 93(8):1263-77.
27. Charbonneau B. Dangling the carrot of improved survival in non-Hodgkin lymphoma: does carotenoid consumption make a difference? *Leuk Lymphoma.* 2013;54(12):2577-8.
28. Chatenoud L, Gallus S, Altieri A, et al. Number of siblings and risk of Hodgkin's and other lymphoid neoplasms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):552.
29. Chen X, Fu R, Wang Y, Song W, Ruan E, Qu W, Wang H, Wang G, Song J, et al. Plasma DNA methylation of shp1 in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2014;94(14):1071-5.
30. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, Coiffier B, Fisher RI, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25:579-86.
31. Cerhan JR, Berndt SI, Vijai J, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for diffuse large B cell lymphoma. *Nat Genet* 2014; 46(11):

32. Cohen S, Shaachar I. Cytokines as regulators of proliferation and survival of healthy and malignant peripheral B cells. *Cytokine* 2012;60(1):13-22.
33. Chiu BC, Kwon S, Evens AM, Surawicz T, Smith SM, Weisenburger DD. Dietary intake of fruit and vegetables and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control*. 2011; 22(8):1183-95.
34. Cho HJ, Eom HS, Kim HJ, Kim IS, Lee GW, Kong SY. Glutathione-S-transferase genotypes influence the risk of chemotherapy-related toxicities and prognosis in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;198(1):40-6.
35. Chris G. Mueller, Charlotte Boix, Wing-Hong Kwan, Cécile Daussy, Emilie Fournier, Wolf H. Fridman and Thierry J. Molina. Critical role of monocytes to support normal B cell and diffuse large B cell lymphoma survival and proliferation.. *Journal of Leukocyte Biology*.2007; 82(3): 567-575
36. Chiu BC, Kolar C, Gapstur SM, Lawson T, Anderson JR, Weisenburger DD. Association of NAT and GST polymorphisms with non-Hodgkin's lymphoma: a population-based case-control study. *Br J Haematol*. 2005;128(5):610-5.
37. Coccia P, Mastrangelo S, Ruggiero A, Scalzone M, Rosolen A, Maurizi P, Riccardi R. Treatment of pharyngeal non-Hodgkin lymphoma in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59(2):318-9.
38. Cocco P, Satta G, Dubois S, Pili C, Pilleri M, Zucca M, 't Mannetje AM, Becker N, et al. Lymphoma risk and occupational exposure to pesticides: Results of the Epilymph study. *Occup Environ Med* 2013;70:91–98.
39. Coeuret S, de La Blanchardière A, Saguët-Rysanek V, Chèze S, Tavernier M, Arsène D, Criscuolo A, Brisse S, Vergnaud M, Verdon R, Lecuit M. *Campylobacter coli* cultured from the stools of a patient with immunoproliferative small intestinal disease. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 908–91
40. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:235–42.

41. Cozen W, Gill PS, Ingles SA, Masood R, Martinez-Maza O, Cockburn MG, et al. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004;103(8):3216–21.
42. Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, Galli E, Giachelia M, Hohaus S. Prognostic factors in hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6(1):e2014053.
43. Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:301-305.
44. Das P, Shaik AP, Bammidi VK. Meta-analysis study of glutathione-S-transferases (GSTM1, GSTP1, and GSTT1) gene polymorphisms and risk of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009; 50(8): p. 1345–51
45. de Miranda NF, Björkman A, Pan-Hammarström Q. DNA repair: the link between primary immunodeficiency and cancer .*Ann N Y Acad Sci*. 2011;1246:50-63.
46. Dave SS. Host factors for risk and survival in lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010(II):255–258.
47. De Souza TR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Duarte AP, Porter SR, Leão JC, Gueiros LA. Th1 and Th2 polymorphisms in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Oral Pathol Med*. 2014;43(6):418-26.
48. Dienz O., Eaton SM., Bond JP., Neveu W., Moquin D., Noubade R., Briso EM., Charland C., Leonard WJ. and Ciliberto, G. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *J. Exp. Med*. 2009; 206: 69-78
49. Dillon SR., Sprecher C., Hammond A., Bilsborough J., Rosenfeld-Franklin M., Presnell SR., Haugen HS., Maurer M., Harder B. and Johnston J. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat. Immunol*. 2004; 5:752-760
50. Dorniani, Hussein MZ, Kura AU, Fakurazi S, Shaari AH, Ahmad Z. Preparation and characterization of 6-mercaptopurine-coated magnetite nanoparticles as a drug delivery system. *Drug Des Devel Ther*. 2013; 7:1015-26.
51. Dutt SS and Gao AC. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. *Future Oncol*. 2009; 5:1403-1413



52. Dourado D., Fernandes PA., Mannervik B., Ramos MJ. Glutathione transferase: New model for glutathione activation. *Chem. Eur. J.* 2008; 14:9591–9598
53. Dias C, Isenberg DA. Susceptibility of patients with reumatic diseases to B-cell nonHodgkin lymphoma. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(6):360-368.
54. D'Souza W.N. Lefrancois L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol.* 2003;171:5727–5735.
55. Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler AK, Rizzi M. B cell biology: an overview. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014; 14(5):434.
56. Eisenbeis CF, Grainger A, Fisher B, Baiocchi RA, Carrodeguas L, Roychowdhury S, Chen L, Banks AL, et al. Combination immunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interleukin-2: a preclinical and phase I study. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6101–6110.
57. Eklund, B.I.; Gunnarsdottir, S.; Elfarra, A.A.; Mannervik, B. Human glutathione transferases catalyzing the bioactivation of anticancer thiopurine prodrugs. *Biochem. Pharmacol.* 2007, 73, 1829–1841.
58. Eckmann L, Nebelsiek T, Fingerle AA, Dann SM, Mages J, Lang R, Robine S, Kagnoff MF, Schmid RM, Karin M, et al. 2008. Opposing functions of IKK $\beta$  during acute and chronic intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 105:15058–15063.
59. Falduto A, Cimino F, Speciale A, Musolino C, Gangemi S, Saija A, et al. How gene polymorphisms can influence clinical response and toxicity following R-CHOP therapy in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Blood Rev* 2017. In press
60. Fan Y, Zhang W, Shi CY, Cai DF. Associations of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with pancreatic cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013; 34(2):705-12.
61. Fang T, Li DF, Zhou NY. Identification and clarification of the role of key active site residues in bacterial glutathione S-transferase zeta/maleylpyruvate isomerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410(3):452-6.
62. Federico M, Molica S, Bellei M, Luminari S. Prognostic factors in low-grade non-Hodgkin lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep.* 2009 Oct;4(4):202-10.

63. Findlay, V.J.; Townsend, D.M.; Saavedra, J.E.; Buzard, G.S.; Citro, M.L.; Keefer, L.K.; Ji, X.H.; Tew, K.D. Tumor cell responses to a novel glutathione S-transferase-activated nitric oxide-releasing prodrug. *Mol. Pharmacol.* 2004, 65, 1070–1079,
64. Fisher SG, Fisher RI. The emerging concept of antigen-driven lymphomas: epidemiology and treatment implications. *Curr Opin Oncol.* 2006 Sep;18(5):417–424.
65. Friedberg JW, Fisher RI Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Hematology/Oncology Clinics of North Americ.* 2008; 22: 941-952.
66. Fujiwara S, Muroi K, Tatara R, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, et al. Clinical features of de novo CD25-positive follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(2):307-13.
67. Gaziev J, Isgro A, Mozzi AF, Petain A, Nguyen L, Ialongo C et al. New insights into the pharmacokinetics of intravenous busulfan in children with sickle cell anemia undergoing bone marrow transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 680–686
68. Giltiay NV, Chappell CP, Clark EA. B-cell selection and the development of autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 2012; 14 Suppl 4:S1.
69. Ghesquière H, Cartron G, Seymour JF, Delfau-Larue MH, Offner F, Soubeyran P, Perrot A, Brice P, Bouabdallah R, et al. Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms. *Blood.*;120(13):2650-7
70. Giachelia M, Voso MT, Tisi MC, Martini M, Bozzoli V, Massini G, D'Aló F, Larocca LM, Leone G, Hohaus S. Interleukin-6 plasma levels are modulated by a polymorphism in the NF- $\kappa$ B1 gene and are associated with outcome following rituximab-combined chemotherapy in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2012;53(3):411-6
71. Gopal S, Patel MR, Achenbach CJ, Yanik EL, Cole SR, Napravnik S, Burkholder GA, et al. Lymphoma immune reconstitution inflammatory syndrome in the center for AIDS research network of integrated clinical systems cohort. *Clin Infect Dis* 2014;59(2):279-86.
72. Gloghini A, De Leval L. Immunophenotyping of non-Hodgkin lymphomas. In: Carbone A, Younes A (eds) *Non-Hodgkin*

- lymphomas: advanced diagnostics and personalized therapies, *Future Medicine* 2013; pp 32–55.
73. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Dec;11(12):1513–30. Grulich AE.
  74. Gluck WL, Hurst D, Yuen A, Levine AM, Dayton MA, Gockerman JP, Lucas J, et al. Phase I studies of Interleukin (IL)-2 and Rituximab in B-cell non-Hodgkins lymphoma: IL-2mediated Natural Killer Cell Expansion correlations with clinical response. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:2253-2264
  75. Goto N, Tsurumi H, Goto H, Shimomura YI, Kasahara S, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) level is associated with the outcome of patients with diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP regimens. *Ann Hematol* 2012; 91: 705–714.
  76. Green MR, Vicente-Dueñas C, Romero-Camarero I, Long Liu C, Dai B, González-Herrero I, et al. Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nat Commun.* 2014 Jun 2;5:3904. doi: 10.1038/ncomms4904
  77. Green MR, Vicente-Duenas C, Alizadeh A, Sanchez-Garcia I. Hit-and-run lymphomagenesis by the Bcl6 oncogene. *Cell Cycle* 2014;13(12):1831-1832.
  78. Guengerich, F. P. (1990) Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 97±153
  79. Guneidy RA, Shahein YE, Aboueilla AM, Zaki ER, Hamed RR. Inhibition of the recombinant cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* glutathione S-transferase. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(5):528-36.
  80. Guo Y, Takeuchi I, Karnan S, Miyata T, Ohshima K, Seto M. Array-comparative genomic hybridization profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alterations. *Cancer Sci.* 2014; 105(4):481-9.
  81. Hähnel PS, Enders B, Sasca D, Roos WP, Kaina B, Bullinger L, Theobald M, Kindler T. Targeting components of the alternative NHEJ pathway sensitizes KRAS mutant leukemic cells to chemotherapy. *Blood.* 2014;123(15):2355-66.

82. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*. 2000; 61(3): p. 154–66
83. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 51–88
84. Haukim N, Bidwell JL, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, et al. Cytokine gene polymorphisms in human disease: on-line databases, Supp2. *Genes Immun* 2002;3:313-330.
85. Hentrich M, Hoffmann C, Mosthaf F, Müller M, Siehl J, Wyen C, Hensel M; German Study Group of Physicians in Private Practice Treating HIV-Infected Patients (DAGNÄ); German AIDS Society (DAIG). Therapy of HIV-associated lymphoma—recommendations of the oncology working group of the German Study Group of Physicians in Private Practice Treating HIV-Infected Patients (DAGNÄ), in cooperation with the German AIDS Society (DAIG). *Ann Hematol*. 2014;93(6):913-21.
86. Hill DA, Wang SS, Cerhan JR, Davis S, Cozen W, Severson RK, et al. Risk of Non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes. *Blood*. 2006;108(9):3161-7.
87. Holtan SG, O'Connor HM, Fredericksen ZS, Liebow M, Thompson CA, Macon WR, Micallef IN, Wang AH, Slager SL, Habermann TM, et al. Food-frequency questionnaire-based estimates of total antioxidant capacity and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*. 2012 Sep 1; 131(5):1158-68.
88. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, Liu WM, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013; 121(20):4021-31
89. Huang Y, Zhao Y, Ran X, Wang C. Increased expression of herpesvirus entry mediator in 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-treated mouse bone marrow-derived dendritic cells promotes the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Mol Med Rep*. 2014;9(3):813-8.
90. Hashimoto Y, Yokohama A, Saitoh A, Nakahashi H, Toyama K, Mitsui T, et al. Prognostic importance of the soluble form of IL-2

- receptor alfa and its relationship with surface expression of IL-2Ralfa(CD25) of Lymphoma cells in diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like regimen with or without Rituximab: a retrospective analysis of 338 cases. *J Clin Exp Hematop* 2013;53(3):197-205.
91. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation*. 2001;72:1444–1450.
  92. He F, Liu Ch, Zhang R, Hao Z, Li Y, Zhang N and Zheng L. Association between the glutathione-S-transferase T1 null genotype and esophageal cancer susceptibility: a meta analysis involving 11163 subjects. *Oncotarget* 2018;9(19):15111-121.
  93. Ihsan R, Chauhan PS, Mishra AK, Singh LC, Sharma JD, Zomawia E, Verma Y, Kapur S, Saxena S. Copy number polymorphism of glutathione-S-transferase genes (GSTM1 & GSTT1) in susceptibility to lung cancer in a high-risk population from north-east India. *Indian J Med Res*. 2014;139(5):720-9.
  94. Ilyas S, Rehman A, Varela AC, Sheehan D. Redox Proteomics Changes in the Fungal Pathogen *Trichosporon asahii* on Arsenic Exposure: Identification of Protein Responses to Metal-Induced Oxidative Stress in an Environmentally-Sampled Isolate. *PLoS One*. 2014;9(7):e102340
  95. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(6):961–968.
  96. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327:291–295.
  97. Johnsen HE, Bergkvist KS, Schmitz A, et al. Cell of origin associated classification of B-cell malignancies by gene signatures of the normal B-cell hierarchy. *Leuk Lymphoma* 2013;1-10.
  98. Jostock T, Müllberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem*. 2001;268(1):160-7.

99. Juskevicius D, Ruiz C, Dirnhofer S, Tzankov A. Clinical, morphologic, phenotypic, and genetic evidence of cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphomas with CYCLIN D1 gene rearrangements. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(5):719-27.
100. John S, Turner D, Donn R, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, Hutchinson IV, Hajeer AH. Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. *Eur J Immunogenet.* 1998;25:419–420.
101. Klusek J, Nasierowska-Guttmejer A, Kowalik A, Wawrzycka I, Lewitowicz P, Chrapek M, Gluszek S. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and colorectal cancer risk in Polish nonsmokers. *Oncotarget* 2018;9(30):21224-21230.
102. Kaneko J, Gozu K, Aoyagi H, Matsui T, Yoshida T, Hasegawa K, Isogai J, Maejima S. A case of iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disease in a patient treated with methotrexate for rheumatoid arthritis for 9 consecutive years, which showed natural remission after discontinuation of MTX therapy. *Gan Kagaku Ryoho* 2013;40(12):2454-6.
103. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):749–59.
104. Kawano M., Hirano T., Matsuda T., Taga T., Horii Y., Iwato K., Asaoku H., Tang B., Tanabe O. and Tanaka H. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988; 332, 83-85.
105. Kuppers R, Dalla-Favera R: Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 2001; 20(40):5580-94.
106. Kyle PB, Smith SV, Baker RC, Kramer RE. Mass spectrometric detection of CYP450 adducts following oxidative desulfuration of methyl parathion. *J Appl Toxicol.* 2013;33(7):644-51.
107. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:22–33.
108. Katsanis E. Anderson P.M. Filipovich A.H. Hasz D.E. Rich M.L. Loeffler C.M. Ochoa A.C. Weisdorf D.J. Proliferation and cytolytic function of anti-CD3?interleukin-2 stimulated peripheral blood mononuclear cells following bone marrow transplantation. *Blood.* 1991;78:1286–1291.



109. Li J, Xu W, Liu F, Huang S, He M, GSTM1 polymorphism contribute to colorectal cancer in Asian populations:a prospective meta-analysis. *Sci Rep* 2015;5:12514
110. Laschak, M.; Spindler, K.D.; Schrader, A.J.; Hessenauer, A.; Streicher, W.; Schrader, M.; Cronauer, M.V. JS-K, a glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide releasing prodrug inhibits androgen receptor and WNT-signaling in prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2012, 12, 130:1–130:10.
111. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med.* 2010;362(15):1417–1429.
112. Lenz G, Wright GW, Emre NC, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13520-5.
113. Levine EG, King RA, Bloomfield CD. The role of heredity in cancer. *J Clin Oncol* 2009;7:527–40.
114. Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N, Tsai AG. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem.* 2010;50:279-96.
115. Licciardello C, D'Agostino N, Traini A, Recupero GR, Frusciante L, Chiusano ML. Characterization of the glutathione S-transferase gene family through ESTs and expression analyses within common and pigmented cultivars of *Citrus sinensis* Osbeck. *BMC Plant Biol.* 2014;14:39.
116. Lindsay M Morton, James R Cerhan, Patricia Hartge,1 Mohammad A Vasef, Vishala T Neppalli, Yasodha Natkunam, et al. Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, NIH, DHHS, Rockville, MDJ *Mol Epidemiol Genet.* Aug 30, 2011; 2(3): 245–252. Liao W, Lin JX and Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013; 38(1): 13-25.
117. Lossos IS. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005;23(26):6351–6357.
118. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.* 2014;66:75-87.
119. Lenardo M.J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature.* 1991;353:858–861.



120. Liu Y, He Z, Feng D, Shi G, Gao R, Wu X, Song W, Yuan W. Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4 Polymorphisms and Susceptibility to Osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* 2011;30:1051–1055.
121. Moens L, Tangye SG. Cytokine-mediated regulation of plasma cell generation:IL21 takes center stage. *Front Immunol* 2014;5:1-13. 2011;29(14):1803-1811.
122. Ma L, Song H, Zhang M, Zhang D. Lysyl Oxidase G473A Polymorphism Is Associated with Increased Risk of Coronary Artery Diseases. *DNA Cell Biol.* 2011;30:1033–1037.
123. Matesanz F, Delgado C, Fresno M, Alcina A. Allelic selection of human IL-2 gene. *Eur J Immunol.* 2000;30:3516–3521.
124. Matesanz F, Fedetz M, Leyva L, Delgado C, Fernandez O, Alcina A. Effects of the multiple sclerosis associated –330 promoter polymorphism in IL2 allelic expression. *J Neuroimmunol.* 2004;148:212–217.
125. Meropol N.J, Barresi G.M, Fehniger T.A, Hitt J, Franklin M, Caligiuri M.A. Evaluation of natural killer cell expansion and activation in vivo with daily subcutaneous low-dose interleukin-2 plus periodic intermediatedose pulsing. *Cancer Immunol Immunother.* 1998;46:318–326.
126. Mackay F1, Tangye SG. The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancers. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(4):347-54.
127. Moyer AM, Salavaggione OE, Hebring SJ, et al. Glutathione S transferase T1 i M1:gene sequence variation and functional genomics. *Clin Cancer Res* 2007;13:7207-7216.
128. Mo Z, Gao Y, Cao Y, et al. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate* 2009;69:662-688.
129. Malinowska K, Neuwirt H, Cavarretta IT, Bektic J, Steiner H, Dietrich H, Moser PL, Fuchs D, Hobisch A, Culig Z. Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Mar;16(1):155-69.
130. Marculescu R, Le T, Simon P, Jaeger U, Nadel B : V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. *J Exp Med* 2002;195(1):85-98.

131. Martin G. V(D)J Recombination : RAG proteins, repair factors, and regulation. *Ann Review Biochemistry* 2002; 71: 101-132.
132. Mashiyama ST, Malabanan MM, Akiva E, Bhosle R, Branch MC, Hillerich B, Jagessar K, Kim J, et al. Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. *PLoS Biol.* 2014;12(4):e1001843.
133. Meier VS, Ruffle A, Gudat F. Simultaneous evaluation of T- and B-cell clonality, t(11;14) and t(14;18), in a single reaction by a four-color multiplex polymerase chain reaction assay and automated high-resolution fragment analysis. *Am J Pathol.* 2008;159(6):2031–2043.
134. Morton LM, Wang SS, Cozen W, et al. Etiologic heterogeneity among non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Blood.* 2008; 112: 5150-5160.
135. Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 2000;102:553–563.
136. Nakamichi I, Tomita Y, Zhang B, Sugiyama H, Kanakura Y, Fukuhara S. et al. Correlation between promoter hypermethylation of GSTP1 and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma. *Ann.Hematol.* 2007; 86, 557–564.
137. Nielsen KR, Steffensen R, Bendtsen MD, Rodrigo-Domingo M, Baech J, Haunstrup TM, et al. Inherited inflammatory response genes are associated with B-cell non Hodgkins lymphoma risk and survival. *PlosOne* 2015;10(10):e0139329.
138. Nielsen KR, Steffensen R, Haunstrup TM, Bodker JS, Dybkaer K, Baech J, et al. Inherited variation in immune response genes in follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2015; 7:1-10.
139. Nagaoka H, Muramatsu M, Yamamura N, Kinoshita K, Honjo T. Activation-induced deaminase (AID)-directed hypermutation in the immunoglobulin Smu region: implication of AID involvement in a common step of class switch recombination and somatic hypermutation. *J Exp Med.* 2002; 195(4):529-34.
140. Nagle SJ, Woo K, Schuster SJ, Nasta SD, Stadtmauer E, Mick R, et al. Outcomes of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell

- lymphoma with progression of lymphoma after autologous stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol* 2013;10:890-4.
141. Nakamura S, Matsumoto T. Helicobacter pylori and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: recent progress in pathogenesis and management. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(45):8181-7.
  142. Nie Nie , Chen Z, Cao C, Cen Y. Absence of association between GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and melanoma susceptibility: a meta-analysis. *DNA Cell Biol.* 2011; 30(10): p. 783–8.
  143. Okamoto T. Tsuburaya A. Yanoma S. Yoshikawa T. Cho H. Takanashi Y. Noguchi Y. Inhibition of peritoneal metastasis in an animal gastric cancer model by interferongamma and interleukin-2. *Anticancer Res.* 2003;23:149–153.
  144. Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, et al. Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition. *Cancer Med.* 2014; 3(1):143-53.
  145. Ozbalak M, Ar MC, Tuzuner N, Salihoglu A, Eskazan AE, Ongoren Aydin S, Baslar Z, Soysal T, Aydin Y, Barak Dolgun A, et al. Detailed analysis of diffuse large B cell lymphoma patients: a single-center, retrospective study. *ISRN Hematol.* 2013; 2013:908191.
  146. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, et al. Human GST theta (GSTT1):cDNA cloning and the characterization of genetic polymorphism. *Biochem* 1994;300:271-276.
  147. Pelekanou V, Notas G, Kampa M, Tsenteliero E, Stathopoulos EN, Tsapis A, Castanas E. BAFF, APRIL, TWEAK, BCMA, TACI and Fn14 proteins are related to human glioma tumor grade: immunohistochemistry and public microarray data meta-analysis. *PLoS One.* 2013; 8(12):e83250.
  148. Petrizzo A, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L. Prediction of individual immune responsiveness to a candidate vaccine by a systems vaccinology approach. *J Transl Med.* 2014; 12:11.
  149. Procházka V, Pytlík R, Janíková A, Belada D, Sálek D, Papajík T, Campr V, Furst T, Furstova J, Trněný M. A New Prognostic Score for

- Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP: The Prognostic Role of Blood Monocyte and Lymphocyte Counts Is Absent. *PLoS One*. 2014 Jul 24;9(7):e102594.
150. Pennanen H, Kuittinen O, Turpeenniemi-Hujanen T. Plasma MMP-2/TIMP-2 complex levels measured during follow-up predict a risk of relapse in patients with malignant lymphoma. *Eur J Haematol*. 2008;80:46–54.
151. Poiré X, Kline J, Grinblatt D, Zimmerman T, Conner K, Muhs C, Gajewski T, Van Besien K, Smith S.M. Phase II study of immunomodulation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and rituximab following autologous stem cell transplant in patients with relapsed or refractory lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2010;51:1241–1250.
152. Robert J, Le Morvan V, Giovannetti E, Peters GJ. PAMM group of EORTC. On the use of pharmacogenetics in cancer treatment and clinical trials. *Eur J Cancer* 2014;50(15):2532-43.
153. Ree AH, Saelen MG, Kalanxhi E, Østensen IH, Schee K, Røe K, Abrahamsen TW, Dueland S, Flatmark K. Biomarkers of histone deacetylase inhibitor activity in a phase 1 combined-modality study with radiotherapy. *PLoS One*. 2014; 9(2):e89750
154. Reed JR, Cawley GF, Ardoin TG, Dellinger B, Lomnicki SM, Hasan F, Kiruri LW, Backes WL. Environmentally persistent free radicals inhibit cytochrome P450 activity in rat liver microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 1;277(2):200-9
155. Rahman HAA, Khorshied MM, Khorshid OMR, Mourad HM. Association of Interleukin-2-330T/G and Interleukin-10-1082A/G genetic polymorphisms with B-cell Non-Hodgkin Lymphoma in a Cohort of Egyptians. *Turk J Hematol* 2018;35:99-108.
156. Reina-San-Martin, B., J. Chen, A. Nussenzweig, and M.C. Nussenzweig. 2007. Enhanced intra-switch region recombination during immunoglobulin class switch recombination in 53BP1(–/–) B cells. *Eur. J. Immunol*. 37:235–239.
157. Rendleman J, Antipin Y, Reva B, Adaniel C, Przybylo JA, Dutra-Clarke A, Hansen N, Heguy A, et al. Genetic Variation in DNA Repair Pathways and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *PLoS One*. 2014; 9(7):e101685.

158. Ribrag V, Koscielny S, Carpiuc I, Cebotaru C, Vande Walle H, Talbot M, Fenaux P, Bosq J. Prognostic value of GST-pi expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*. 2003;17(5):972-7.
159. Ritz O, Möller P, Ushmorov A. Targeting the intratumor heterogeneity in PMBL. *Cell Cycle*. 2014;13(15).
160. Rosenwald AG, Wright K, Leroy X, Yu P, Gaulard RD, Gascoyne WC, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003; 198:851–862.
161. Rosenwald AG, Wright WC, Chan JM, Connors E, Campo RI, Fisher RD, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346:1937–1947.
162. Rochman Y., Spolski R. and Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by  $\gamma c$  family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9:480-490
163. Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT, et al. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol* 2006;7(1):27–38.
164. Rusiecki JA, Patel R, Koutros S, Beane-Freeman L, Landgren O, Bonner MR, Coble J, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect.* 2009; 117(4):581-6.
165. Ruzza P, Rosato A, Rossi CR, Floreani M, Quintieri L. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009; 9(7):763-77.
166. Smith JP, Zheng D, Palmen J, Pang DX, Woo P, Humphries SE. Effects of genetic variation on chromatin structure and the transcriptional machinery: analysis of IL6 gene locus. *Genes Immun* 2012; 13(7):583-586.
167. Smith JP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(1):43-59.
168. Sangrajrang S, Renard H, Kuhaprema T, Pornsopone P, Arpornwirat W, Brennan P. Personal use of hair dyes--increased risk of non-

- Hodgkin's lymphoma in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(9):2393-6.
169. Sau A, Pellizzari Tregno F, Valentino F, Federici G, Caccuri AM. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys.* 2010 Aug 15; 500(2):116-22.
170. Shaffer AL, 3rd, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. A comprehensive review of the molecular pathogenesis of B-NHL. *Annu Rev Immunol* 2012;30:565–610.
171. Shah NN, Harrison N, Stonecypher M, Frank D, Amorosa V, Svoboda J. Extracavitary Primary Effusion Lymphoma Initially Presenting With Hemophagocytic Lymphohistocytosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 15: 92-7.
172. Sheehan D, Meade G, Foley VM and Dowd CA. „Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily“. *Biochem. J.* 2001; 360: 1-16.
173. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K, et al. dbSNP: The NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2011;29(1):308–311.
174. Shiels MS, Engels EA, Linet MS, Clarke CA, Li J, Hall HI, Hartge P, Morton LM. The epidemic of non-Hodgkin lymphoma in the United States: disentangling the effect of HIV, 1992-2009. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013 Jun; 22(6):1069-78.
175. Schinasi L, Leon ME. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2014; 11(4):4449-527.
176. Sterne JA, Sutton AJ, Ioannidis JP, Terrin N, Jones DR, Lau J, Carpenter J, Rucker G, Harbord RM, Schmid CH, et al. Recommendations for examining and interpreting funnel plot asymmetry in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ.* 2011 Jul 22;343:d4002.
177. Sung VM, Shimodaira S, et al: Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol.* 2003; 77(3):2134-46.



178. Swerdlow SH. Lymphoma classification and the tools of our trade: an introduction to the 2012 USCAP Long Course. *Mod Pathol.* 2013 Jan;26 Suppl 1:S1-S14.
179. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Lee Harris N, Srein H, Sieberg R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms, *Blood* 2016; 127:2375-2390.
180. Smallwood L, Allcock R, van Bockxmeer F, Warringfon N, Paalmer LS, Lacopetta B, Norman PE. Polymorphisms of the Interleukin-6 gene promotor and abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;35:31-36.
181. Saxena M, Agrawal CG, Srivastava N, Banerjee M. Interleukin-6 (IL6)-597 A/G (rs 1800797) and -174G/C (rs 1800795) gene polymorphisms in type 2 diabetes. *Indian J Med Res* 2014;140(1):60-68.
182. Sweetenham JW. Molecular signatures in the diagnosis and management of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol.* 2011; 18(4):288-92.
183. Sakaguchi S. Yamaguchi T. Nomura T. Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133:775–787.
184. Shin WG, Jang JS, Kim HS, Kim SJ, Kim KH, Jang MK, Lee JH, Kim HJ, Kim HY. Polymorphisms of interleukin-1 and interleukin-2 genes in patients with gastric cancer in Korea. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:1567–1573.
185. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer* 2014;14(8):517-534.
186. Turturro F. Constitutive NF-kB activation underlines major mechanism of drug resistance in relapsed refractory diffuse large B cell lymphoma. *Biomed Res Int* 2015;2015:484537.
187. Terao S. Shirakawa T. Goda K. Kamidono S. Fujisawa M. Gotoh A. Recombinant interleukin-2 enhanced the antitumor effect of ADV=RSV-HSV-tk=ACV therapy in a murine bladder cancer model. *Anticancer Res.* 2005;25:2757–2760.
188. Thompson CA, Habermann TM, Wang AH, Vierkant RA, Folsom AR, Ross JA, Cerhan JR. Antioxidant intake from fruits, vegetables and other sources and risk of non-Hodgkin's lymphoma: the Iowa Women's Health Study. *Int J Cancer.* 2010; 126(4):992-1003.



189. Tilly H, Dreyling M, (2010) ESMO Guidelines Working Group. Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up *Ann Oncol* (2010) 21(suppl 5): v172-v174.
190. Townsend DM, Findlay VL, Tew KD. Glutathione S-transferases as regulators of kinase pathways and anticancer drug targets. *Methods Enzymol.* 2005;401:287-307.
191. Tomita N, Sakai R, Fujisawa S, Fujimaki K, Taguchi J, Hashimoto Y, Ogawa K, et al. SIL index comprising stage, soluble interleukin-2 receptor, and lactate dehydrogenase is a useful prognostic predictor in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 2012;103:1518-1523.
192. Tsuji T, Hirano T, Yamasaki H, Tsuji M, Tsuda H. A high sIL-2R/ferritin ratio is a useful marker for the diagnosis of lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol.* 2014;93(5): 821-6.
193. Venkatesan G, Balamurugan V, Bhanuprakash V. TaqMan based real-time duplex PCR for simultaneous detection and quantitation of capripox and orf virus genomes in clinical samples. *J Virol Methods.* 2014;201:44-50.
194. Vergnaud AC, Norat T, Romaguera D, Mouw T, May AM, Romieu I, Freisling H, Slimani N, et al. Fruit and vegetable consumption and prospective weight change in participants of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Physical Activity, Nutrition, Alcohol, Cessation of Smoking, Eating Out of Home, and Obesity study. *Am J Clin Nutr.* 2012 Jan; 95(1):184-93.
195. Vajdic CM, Falster MO, Kane E, Smedby KE, Bracci PM, de Sanjose S, Becker N, Turner J, et al. Birth order and risk of non-hodgkin lymphoma--true association or bias? *Am J Epidemiol.* 2010;172(6):621-30.
196. Wang SS, Slager SL, Brennan P, Holly EA, De Sanjose S, Bernstein L, Boffetta P, Cerhan JR, Maynadie M, Spinelli JJ, Chiu BC, et al. Family history of hematopoietic malignancies and risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL): a pooled analysis of 10 211 cases and 11 905 controls from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood.* 2007;109(8):3479-88.
197. Webb G., Vaska V., Coggan M. and Board, P. Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics* 1996; 33:121-123.

198. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(17):9991-9996.
199. Wilkins HM., Brock S., Gray JJ., Linseman DA. Stable over-expression of the 2-oxoglutarate carrier enhances neuronal cell resistance to oxidative stress via Bcl-2-dependent mitochondrial GSH transport. *J. Neurochem.* 2014 Jul; 130(1): 75-86.
200. Wilson WH, Pittaluga S, Nicolae A, Camphausen K, Shovlin M, Steinberg SM, Roschewski M, Staudt LM, Jaffe ES, Dunleavy K. A prospective study of mediastinal gray zone lymphoma. *Blood.* 2014; 124(10):1563-1569.
201. Wright GB, Tan A. Rosenwald EH, Hurt A, Wiestner, and LM Staudt. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:9991–9996.
202. Wang Y, He J, Ma TJ, Lei W, Li F, Shen H, Shen ZY. GSTT1null genotype significantly increases the susceptibility to urinary system cancer: Evidences from 63876 subjects. *J Cancer* 2016; 7(12): 1680-1693.
203. Wang W. Song H. Liu J. Song B. Cao X. CD86 +1057G/A Polymorphism and Susceptibility to Osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* 2011;30:925–929.
204. Wu J, Lu Y, Ding YB, Ke Q, Hu ZB, Yan ZG, Xue Y, Zhou Y, Hua ZL, Shu YQ, et al. Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Mol Carcinog.* 2009;48:626–632.
205. Wang H, Wang Y, Jiang X, Wang Z, Zhong B, Fang Y. The molecular mechanism of curcumol on inducing cell growth arrest and apoptosis in Jurkat cells, a model of CD4(+) T cells. *Int Immunopharmacol.* 2014;21(2):375-82
206. Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, et al. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkins Lymphoma outcome. 2012:3574-3581. Gene sequence variation and functional genomics. *Clin Cancer Res* 2007;13:7207-7216.
207. Wang Y, Shu Y, Jiang H, Sun B, Ma Z, Tang W. Lack of association between interleukin2 (IL2) gene rs 2069762 polymorphism and

- cancer risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8 (8): 12557-565
208. Xie Y, Bulbul MA, Ji L, Inouye CM, Groshen SG, Tulpule A, O'Malley DP, Wang E, Siddiqi IN. p53 expression is a strong marker of inferior survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma and may have enhanced negative effect with MYC coexpression: a single institutional clinicopathologic study. *Am J Clin Pathol.* 2014;141(4):593-604.
209. Yamamura T, Miyake S. B-cell-directed therapy: which B cells should be targeted and how? *Immunotherapy.* 2012 May;4(5):455-7.
210. Yamauchi T, Matsuda Y, Takai M, Tasaki T, Tai K, Hosono N, Negoro E, Ikegaya S, et al. Early relapse is associated with high serum soluble interleukin-2 receptor after the sixth cycle of R-CHOP chemotherapy in patients with advanced diffuse large B-cell lymphoma. *Anticancer Res.* 2012;32(11):5051-7.
211. Yang F, Xiong J, Jia XE, Gu ZH, Shi JY, Zhao Y, Li JM, Chen SJ, Zhao WL. GSTT1 deletion is related to polycyclic aromatic hydrocarbons-induced DNA damage and lymphoma progression. *PLoS One.* 2014;9(2):e89302.
212. Yano H, Thakur A, Tomaszewski EN, Choi M, Deol A, Lum LG. Augments antitumor activity of bispecific antibody-armed T cells. *J Transl Med.* 2014;12:191
213. Yee C., Yang W., Hekimi S. The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans*. *Cell.* 2014; 157: 897–909
214. Yoshida H., Hashizume M., Suzuki M. and Mihara M. Anti-IL-6 receptor antibody suppressed T cell activation by inhibiting IL-2 production and inducing regulatory T cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 634:178-183
215. Younes A. The rationale for combining targeted and biological anti-lymphoma drugs. *Hematol Oncol.* 2013;31(Suppl):181–183.
216. Yuan F, Wei X, Yin Q, Li Y, Mi R, Ai H, et al. A multi-center retrospective study of L-asparaginase-based regimens as first-line treatment in newly diagnosed extranodal NK/T-cell lymphoma *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2014;35(7):614-8.
217. Yri OE, Ekstrom PO, Hilden V, Gaudernack G, Liestol K, Smeland EB, et al. Influence of polymorphisms in genes encoding

- immunoregulatory proteins and metabolizing enzymes on susceptibility and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Leuk Lymphoma* 2013;54(10):2205-2214.
218. Zhang Q, Su B. Evolutionary Origin and Human-Specific Expansion of a Cancer/Testis Antigen Gene Family. *Mol Biol Evol.* 2014 Sep;31(9):2365-75.
219. Zhang ZY, Jin XY, Wu R, Wu LN, Xing R, et al. Meta-analysis of the association between GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms and cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(3): p. 815–9.
220. Zhu D, Lossos C, Chapman-Fredricks JR, Lossos IS. Biased immunoglobulin light chain use in the *Chlamydomphila psittaci* negative ocular adnexal marginal zone lymphomas. *Am J Hematol.* 2013; 88(5):379-84.
221. Zhang Y. Luo C.L. He B.C. Zhang J.M. Cheng G. Wu X.H. Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: a novel vaccine for renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2010;36:133–140.
222. Zhao H, Wang R. IL-2 -330T/G polymorphism and cancer risk: a meta analysis. *OncoTargets and Therapy* 2015;8:1753-1760.

## БИОГРАФИЈА

Др Лавиника Атанасковић је рођена 03.08.1974. године у Београду. Медицински факултет. Универзитета у Београду завршила је октобра 2000. године са просечном оценом 8,17. Специјализацију из Интерне медицине завршила је на Војномедицинској академији у Београду - завршни испит положила је маја 2006. са одличном оценом. Од 15.01.2007 запослена је на Клиници за Хематологију ВМА. Школске 2008/9. године уписала Академске докторске студије смер Онкологија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Усмени докторски испит положила 2009. године са оценом 9. Субспецијалистички испит из Хематологије положила 2016. године са одличном оценом.

**БИБЛИОГРАФИЈА**

1. Živanović-Ivić A, Stamatović D, Tarabar O, Marjanović S, **Atanasković L**, Elez M, Knežević Bošković J, Tatomirović Ž, Radić Tasić O, Balint B, Mijušković Z, Trimčev J, Tukić Lj. Treatment of Bence Jones Multiple Myeloma with Chemotherapy with/witout Stem Cell Transplantation. *Haematologica*, 2014. vol. 99, S 641-642.
2. Marjanović S, Stamatović D, Elez M, Balint B, Tarabar O, **Madjaru L**, Tatomirović Ž, Tukić Lj. Autologous stem cell transplantation in the treatment of patients with multiple myeloma: our experience. *Bone Marrow Transplantation*, 2013. vol. 48, S 212-212.
3. Marjanović S, Mijušković Z, Stamatović D, **Madjaru L**, Ralić T, Mrimčev J, Stojanović J, Radović V. Multiple myeloma invasion od the central nervous system. *Vojnosanitetski pregled*, 2012. vol. 69, S 209-213.
4. Marjanović S, Stamatović D. Tukić Lj, Tarabar O. Elez M, **Madjaru L**, Balint B, Tatomirović Ž, Kuljić-Kapulica N, Andjelković N. Autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze u lečenju multiplog mijeloma – iskustvo jednog centra. *Vojnosanitetski pregled* 2011, vol. 68, S 381-466.

ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број – РБ:

Идентификациони број – ИБР:

Тип документације – ТД: Монографска публикација

Тип записа – ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада – ВР: Докторска дисертација

Аутор – АУ: Лавиника Атанасковић

Ментор/коментор – МН: доц. др Оливера Тарабар

Наслов рада – НР: Удруженост полиморфизама гена за интерлеукине 2 И 6, CD14 и глутатион трансферазу S са клиничким карактеристикама, резултатима лечења и прогнозом оболелих од дифузног В лимфома великих ћелија

Језик публикације – ЈП: српски/ћирилица

Језик извода – ЈИ: српски/енглески

Земља публикавања – ЗП: Република Србија

Уже географско подручје – УГП: Шумадијски округ

Година – ГО: 2019. година

Издавач – ИЗ: Ауторски репринт



Место и адреса – МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физички опис рада – ФО: 89 страна, 11 табела, и 8 слика

Научна област – УДК: Медицина

Научна дисциплина – ДИ: Онкологија

Предметна одредница/кључне речи – ПО: „ NHL B cell diffusum“, „IL 2, IL6, CD 14, GSTT1,M1,P1“, „gene polymorphisms“

Чува се – ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у

Крагујевцу

Важна напомена – ВН:

Извод – ИД: Дифузни В лимфом великих ћелија (DLBCL) су агресивне неоплазме лимфног ткива и чине око 30-35% свих неходкинских (NHL) лимфома. Ови лимфоми се карактеришу веома хетерогеном клиничком сликом, одговором на терапију и преживљавањем, а у основи ове разноликости лежи комплексна биологија тумора. Процена агресивности болести која диктира и одлуку о терапији базирана је на клиничким карактеристикама болести, стању оболелог и биологији тумора. Међутим, ни за један од установљених прогностичких параметара није показао да у потпуности корелира са преживљавањем оболелих од DLBCL. На основу досадашњих сазнања из литературе није јасно дефинисана повезаност полиморфизма у генима који контролишу имунске процесе и метаболизам хемијских агенаса са клиничким карактеристикама и прогнозом оболелих од DLBCL. Ова студија је рађена да би се утврдило да ли присуство полиморфизма у генима за GST, IL2, IL6 и CD14 у болесника са DLBCL удружено са клиничким карактеристикама, резултатима лечења и прогнозом оболелих.

У истраживање јр било укључено 156 болесника са новодијагностикованим DLBCL, који су лечени R-CHOP имунохемотерапијом. Према детерминисаним прогностичким параметрима болесници су подељени у две прогностичке групе: 1) група са параметрима лоше прогнозе (животна доб преко 60 година, Ann Arbor CS III-IV, IPI скор 3-5, туморски облик болести дефинисан величином патолошког лимфног чвора већег од 7cm и присуство општих тегоба при дијагнози болести: презнојавање, губитак

у телесној тежини, повишена телесна температура) и 2) група без параметара лоше прогнозе. У студији су праћене следеће варијабле: 1) клиничке карактеристике болести при дијагнози (пол, старосна доб, Ann Arbor CS, IPI скор, туморски облик болести, општи симптоми), 2) одговор на терапију: укупан одговор (OR); комплетан одговор (CR); парцијални одговор (PR), резистентна/прогресивна болест, релапс болести, 3) преживљавање: укупно преживљавање (OS), преживљавање без болести (DFS) и преживљавање без нежељених догађаја (EFS), и 4) полиморфизми гена.

Добијени резултати указују да учесталост генотипова/алела у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2* -330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T код наших болесника са DLBCL није се разликовала од њихове учесталости у популацији оболелих од лимфопролиферативних болести и здравих испитаника у Европи. Присуство *GSTM1null* генотипа је значајно чешће у болесника са DLBCL млађих од 60 година. Болесници са *CD14-159 CT/TT* генотипом су имали значајно чешће присуство болести у екстранодалним локализацијама у односу на болеснике са *CC* генотипом. У болесника са екстранодалном презентацијом болести присуство *TT* генотипа у гену за *CD14-159* је било удружено са значајно дужим преживљавањем без болести (*DFS*) и укупним преживљавањем (*OS*) у односу на болеснике са *CC/CT* генотипом. Интернационални прогностички скор (*IPI*) и *CD14-159 TT* генотип су прогностички параметри удружени са преживљавањем болесника оболелих од DLBCL који су имали екстранодалну презентацију болести. Медијана до постизања комплетне ремисије (*CR*) у болесника са *Val* алелом *GSTP1* полиморфизма (*Val/Val* и *Ile/Val* генотип) је била значајно краћа у односу на медијану у болесника са *Ile/Ile* генотипом. Полиморфизми у генима за *GSTT1*, *IL2-330T/G* и *IL6* -597G/A нису били удружени са клиничким карактеристикама и исходом лечења у оболелих од DLBCL.

Датум прихватања теме од стране ННВ – ДП: 31.05.2017.

Датум одбране – ДО:

Чланови комисије – КО:

Проф.др Наташа Ђорђевић, редни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник;

Проф. др Слободан Марјановић, ванредни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан

Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан

Доц. др Светлана Ђукић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Интерна медицина, члан

НС Бојана Цикота-Алексић, научни сарадник Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, Институт за медицинска истраживања, за ужу научну област медицинских наука-хумана генетика, члан

KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number – ANO:

Identification number – INO:

Documentation type – DT: Monographic publication

Type of record – TR: Textual printed material

Contents code – CC: Ph. D. Thesis

Author – AU: Lavinika Atanaskovic

Menthor/co-mentor – MN: Assistant professor Olivera Tarabar, M.D. Ph.D.

Title – TI: The association of gene polymorphisms for interleukins 2 and 6, CD14 and glutathione transferase S with clinical characteristics, results of treatment and prognosis of patients with diffuse B lymphoma of large cells

Language of text – LT: Serbian / Cyrillic

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication – CP: Republic of Serbia

Locality of publication – LP: Sumadija Administrative District

Publication year – PY: 2019

Publisher – PU: Author reprint

Publication place – PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description – PD: 89 pages, 11 tables, 8 images

Scientific field – SF: Medicine

Scientific discipline – SD: Oncology

Subject/key words – SKW: „NHL B cell diffusum“, „IL 2, IL6, CD 14, GSTT1,M1,P1“, „gene polymorphisms“

UDC

Holding data: Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note – N:

Abstract – AB: Diffuse B lymphoma of large cells (DLBCL) are aggressive neoplasms of lymphatic tissue and make up about 30-35% of all non-liminal (NHL) lymphomas. These lymphomas are characterized by a highly heterogeneous clinical picture, response to therapy and survival, and this diversity lies in complex biology tumors. The assessment of the aggressiveness of the disease that dictates and the decision on therapy is based on the clinical characteristics of the disease, the condition of the diseased and the biology of the tumor. However, he did not show for any of the established prognostic parameters that he completely correlates with the survival of patients with DLBCL.

Based on the current findings from the literature, the connection between polymorphism in gene that controls the immune processes and the metabolism of chemical agents with clinical characteristics and the prognosis of patients with DLBCL is not clearly defined. This study was conducted to determine whether the presence of polymorphisms in the genes for GST, IL2, IL6, and CD14 in patients with DLBCL were associated with clinical characteristics, treatment outcomes and prognosis of patients.

The study included 156 patients with newly diagnosed DLBCL, who were treated with R-CHOP immunochemical therapy. According to the determined prognostic parameters, the patients are divided into two prognostic groups: 1) a group with poor prognosis parameters (life span over 60 years, Ann Arbor CS III-IV, IPI score 3-5, tumor form of the disease defined by the size of the pathological lymph node greater than 7 cm and the presence of general complaints in the diagnosis of diseases: overweight, weight loss, fever) and 2) a group without parameters of bad prognosis.

The following variables were monitored in the study: 1) clinical characteristics of the disease in diagnosis (sex, age, Ann Arbor CS, IPI score, tumor form of the disease, general

symptoms), 2) response to therapy: total response (OR); complete answer (CR); partial response (PR), resistant / progressive disease, relapses of the disease, 3) survival: total survival (OS), disease-free survival (DFS) and survival without adverse events (EFS), and 4) polymorphisms of the gene.

The obtained results indicate that the incidence of genotypes / allele in GST genes (GSTT1, GSTP1, GSTM1), IL2 -330T / G, IL6-597G / A and CD14 -159C / T in our patients with DLBCL did not differ from their frequency in the population patients with lymphoproliferative diseases and healthy subjects in Europe. The presence of GSTM1null genotype is significantly more common in patients with DLBCL under the age of 60 years. Patients with CD14-159 CT / TT genotype had a significantly more frequent presence of disease in extranodal localization than patients with CC genotype. In patients with extranodal presentation of the disease, the presence of TT genotype in the CD14-159 gene was associated with significantly longer survival-free survival (DFS) and overall survival (OS) compared to patients with CC / CT genotype.

International prognostic score (IPI) and CD14-159 TT genotype are prognostic parameters associated with the survival of patients suffering from DLBCL who have had an extranodal presentation of the disease. Median until complete remission (CR) was achieved in patients with Val allele GSTP1 polymorphism (Val / Val and Ile / Val genotype) was significantly shorter compared to the median in patients with Ile / Ile genotype. Polymorphisms in the genes for GSTT1, IL2-330T / G and IL6-597G / A were not associated with clinical characteristics and outcome in DLBCL patients.

Key words: „NHL B cell diffusum“, „IL 2, IL6, CD 14, GSTT1, M1, P1“, „gene polymorphisms“

L-FABP

Accepted by the Scientific Board on – ASB: 31.05.2017.

Defended on – DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) – DB:

1. Full Professor, Natasa Djordjevic, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences,

University of Kragujevac, Chairman;

2. Full Professor, Slobodan Marjanovic, M.D, Ph.D, Military Medical Academy, University of

Defence, Belgrade, member;

Full Professor, Ivan Jovanović, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member

4. Assistant Professor, Svetlana Djukic, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member;

5. Research associate, Bojana Cikota, Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, member;



Образац 1

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, ЛАВИНИКА АТАНАСКОВИЋ, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**Удруженост полиморфизама гена за интерлеукине 2 И 6, CD14 и глутатион трансферазу S са клиничким карактеристикама, резултатима лечења и прогнозом оболелих од дифузног В лимфома великих ћелија**

која је одбрањена на \_\_\_\_\_

Универзитета у Крагујевцу представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

\_\_\_\_\_  
потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, ЛАВИНИКА АТАНАСКОВИЋ,

- дозвољавам  
 не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**Удруженост полиморфизама гена за интерлеукине 2 И 6, CD14 и глутатион трансферазу S са клиничким карактеристикама, резултатима лечења и прогнозом оболелих од дифузног В лимфома великих ћелија**

која је одбрањена на \_\_\_\_\_

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

- дозвољавам  
 не дозвољавам <sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада <sup>2</sup>

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

---

потпис аутора

---

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs>

**Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)**

- 1. Atanasković Lavinika, Cikota-Aleksić Bojana, Tarabar Olivera, Trimčev Jovana, Živanović-Ivić Anđelina, Marjanović Slobodan, Magić Zvonko** Clinical implications of glutathione S-transferase genotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. JBUON 2016;21(6): 1459-1465
- 2. Atanasković Lavinika, Tarabar Olivera, Magić Zvonko, Stamatović Dragana, Živanović Anđelina, Marjanović Slobodan, Cikota-Aleksić Bojana,** Association of CD14-159 Gene Polymorphism with Characteristics and Outcome of Diffuse Large B-cell Lymphomas. International Journal of Hematology and Oncology, Volume 28, Year 2018, doi:10.4999/uhod
- 3. Anđelina ŽIVANOVIĆ IVIĆ, Lavinika ATANASKOVIĆ, Marija ELEZ, Olga RADIĆ TASIĆ, Bela BALINT and Dragana STAMATOVIĆ,** THE ROLE OF PROGNOSTIC FACTORS IN OVERALL SURVIVAL IN PATIENTS WITH BENCE-JONES MULTIPLE MYELOMA - OUR EXPERIENCE. Med Pregl 2017; LXX (Suppl 1): 57-61. Novi Sad

## ORIGINAL ARTICLE

### Clinical implications of glutathione S-transferase genotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma

Lavinika Atanaskovic<sup>1</sup>, Bojana Cikota-Aleksic<sup>2</sup>, Olivera Tarabar<sup>1</sup>, Jovana Trimcev<sup>3</sup>,  
Anđelina Zivanovic-Ivic<sup>1</sup>, Slobodan Marjanovic<sup>1</sup>, Zvonko Magic<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clinic for Hematology, <sup>2</sup>Institute of Medical Research, <sup>3</sup>Institute of Pathology and Forensic Medicine, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

#### Summary

**Purpose:** Polymorphic deletions in glutathione S-transferase (GST) genes are recognized as a risk factor for lymphoma, other hematological and non-hematological malignancies.

The purpose of the present study was to investigate whether deletions of GSTT1 and GSTM1 as well as GSTP1 Ile-105Val single nucleotide polymorphism influence clinical presentation, response to therapy and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).

**Methods:** The study included a total of 82 DLBCL patients treated with rituximab-CHOP (R-CHOP) therapy (6-8 cycles). GST genes were analyzed with PCR-based methodology.

**Results:** The obtained frequencies of GSTT1 and GSTM1 null genotypes were 24 and 63%, respectively. The variant GSTP1 Val allele was present in 76% of the patients. No association between GST genotypes and clinical presentation was found. However, a higher frequency of GSTM1 null

genotype was observed in patients who developed DLBCL before the age of 60 [odds ratio (OR) 3.12, 95% confidence interval (CI) 1.11-9.17;  $p=0.03$ ]. Patients carrying at least one GSTP1 Val allele achieved remission in a shorter time period than patients with GSTP1 Ile/Ile genotype ( $p=0.05$ ). GST genotypes didn't influence the incidence of relapse and survival. There were no toxic effects, life-threatening infections or significant delay in immunochemotherapy in the analyzed group of patients.

**Conclusion:** The present study showed the association of GSTM1 null genotype and DLBCL development before the age of 60 (prognostic cutoff). GST genotypes didn't influence survival, but patients with at least one low-producing GSTP1 Val allele achieved clinical remission in a shorter time period.

**Key words:** diffuse large B-cell lymphoma, gene polymorphism, glutathione S-transferase

#### Introduction

DLBCL is the most common type of non-Hodgkin lymphoma (NHL), accounting for about one-third of all newly diagnosed lymphoma cases [1]. With respect to clinical features, response to treatment and outcome, DLBCL is highly multifaceted [2]. Clinical studies identified five features as independent parameters for prognosis: age (cut point at 60 years), tumor stage, presence of B-symptoms (fever, night sweats, weight loss

>10% of body weight), LDH level in serum and extranodal involvement. These clinical features are included into the IPI (International Prognostic Index) scoring system to categorize patients into one of four prognostic groups that correlate with both relapse-free survival and overall survival [3]. However, elucidation of etiologic factors and their role in the pathogenesis of DLBCL remains challenging. Molecular studies indicated that, beyond

Correspondence to: Bojana Cikota-Aleksic, PhD. Institute of Medical Research, Military Medical Academy, Crnotravska 17, 11000 Belgrade, Serbia. Tel: +381 11 5608 482, Fax: +381 11 662 722, E-mail: cbojana@pttrs  
Received: 04/03/2016; Accepted: 19/03/2016



clinical and environmental factors, development and prognosis of DLBCL may be affected by genomic variations [4].

Several studies have provided evidence of higher risk for lymphoma in individuals with deletion polymorphisms of genes encoding GSTs [5-8]. GSTs comprise a family of enzymes that catalyze the conjugation of reduced form of glutathione to xenobiotic substrates creating less toxic compounds. Thus, GSTs are involved in the detoxification of a wide range of carcinogens, including benzene, organochlorine compounds, organophosphate pesticides, components of tobacco smoke, chemotherapeutic agents and reactive oxygen species [9]. However, conjugation of substrates is not necessarily beneficial. Some reports indicated that direct binding to alkylating agents and also detoxification of free radicals generated by anthracyclines may increase resistance to anticancer drugs [10].

Certain members of the GST family display phenotypically relevant genetic polymorphisms. Homozygous deletions of GSTM1 or GSTT1 (null genotypes) cause loss of GSTM1 or GSTT1 enzymatic activity [10,11]. If present, GSTM1 allele is represented by the variant GSTM1\*A or GSTM1\*B [12]. Previous studies have reported that GSTM1\*A and GSTM1\*B encode enzymes with similar catalytic activity, but do not necessarily have the same effect on susceptibility to different diseases [13,14]. A single nucleotide polymorphism (SNP) within coding region of GSTP1 (A313G) causes substitution of isoleucine to valine at codon 105 (Ile105Val) and consequently decreases activity of the enzyme [15,16].

Despite a proven association between polymorphisms within GST genes and susceptibility to lymphoma, data about the clinical impact of these polymorphisms are scarce. In the present study, we analyzed the association of polymorphisms within GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genes with clinical characteristics of DLBCL patients. Since GSTs are involved in the conjugation of anticancer drugs, including alkylating agents, anthracyclines and cyclophosphamide, the association of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 gene polymorphisms with the response to therapy and outcome was analyzed.

## Methods

### Patients

This study included 82 patients (45 men and 37 women) with the newly diagnosed DLBCL, aged 18 to

77 years (median 49) who were diagnosed, treated and followed-up at the Clinic for Hematology, MMA, Belgrade, Serbia. All patients were of the same ethnicity. Patients with previous history of hematological malignancy, cancer or HIV-related DLBCL were not included in this study.

Diagnosis of DLBCL was based on histopathology and immunohistochemistry according to the World Health Organization (WHO) classification [17]. All patients underwent clinical examination, laboratory testing, bone marrow biopsy, chest radiograph and computed tomography of the chest and abdomen. The extent of disease was categorized according to Ann Arbor classification and the risk score was determined by the IPI [3]. All patients received R-CHOP (rituximab-cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) therapy (6-8 cycles). Response to therapy was assessed using the International Working Group criteria [18]. The follow-up period ranged from 1 to 147 months (median 55).

The study was approved by the Ethics committee of MMA, Belgrade, in accordance with the Helsinki Declaration (2008). Written consent for participation in the study was obtained from all patients or patients' close relatives.

### Samples and genotyping

Blood was collected in EDTA tubes and stored at -40°C. DNA was extracted by a PureLink™ Genomic DNA MiniKit (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions.

GSTT1 and GSTM1 genes were amplified in parallel with  $\beta$ -actin sequence by polymerase chain reaction (PCR) as previously described [19]. PCR products were analyzed on 2% agarose gels after electrophoresis and ethidium bromide staining.

GSTT1-null as well as GSTM1 - null genotype was visualized as a 289-bp band ( $\beta$ -actin) on the gel. GSTT1 positive genotype showed the presence of two bands (480 bp of GSTT1 and 289 bp of  $\beta$ -actin).

GSTM1-positive PCR products (132 bp of GSTM1 and 289 bp of  $\beta$ -actin) were further digested with restriction endonuclease HaeII according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, Lithuania) and analyzed on 10% polyacrylamide gels (PAGs) after electrophoresis and silver nitrate staining. Genotypes were determined as GSTM1\*A (112 bp, 20 bp), GSTM1\*B (132 bp) or GSTM1\*AB (132 bp, 112 bp and 20 bp). Additional band of 289 bp ( $\beta$ -actin) was present in all samples.

GSTP1 gene was amplified by PCR method as previously reported [19]. PCR products were digested with restriction endonuclease BsmAI according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, Lithuania). After electrophoresis on 10% PAGs and staining with silver nitrate, genotypes were determined as Ile/Ile (329 bp, 113 bp), Ile/Val (329 bp, 216 bp, 113 bp, 107 bp) or Val/Val (216 bp, 113 bp, 107 bp).

Statistics

The observed frequencies of GSTP1 and GSTM1-positive genotypes were tested by Hardy-Weinberg equilibrium. The association between genotypes and clinical characteristics and outcome were analyzed using the chi-square or Fisher's exact test. OR and 95% CI were used to estimate the risk of unfavorable clinical features. Event-free survival (EFS) was defined as the time from the start of treatment to progressive disease (PD) under therapy, relapse or death from any reason. Disease free survival (DFS) was calculated as the time from the start of treatment to relapse. Overall-survival (OS) was defined as the time from the start of treatment to death or to the date of the last follow-up. Survival curves were generated using the method of Kaplan and Meier and compared by the log-rank test. The Cox proportional hazards model was used to estimate the effect of gene polymorphisms along with DLBCL features for OS. Time to remission between patients with different genotypes was compared using the Mann-Whitney U test. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Frequencies of GST genotypes

In the analyzed group of 82 patients with DLBCL, GSTT1 null genotype was found in 20 patients (24%), while GSTM1 null genotype had 52 patients (63%). Among the GSTM1 positive patients (N=30), 16 (20%) had GSTM1 AA, 4 (5%) had GSTM1 AB and 10 patients (12%) had GSTM1 BB genotype. GSTP1 Ile/Ile genotype was found in 20/82 patients (24%), 44/82 patients (54%) were carriers of Ile/Val genotype and 18/82 patients (22%) had Val/Val genotype (Table 1).

The observed frequencies of GSTP1 genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Patient characteristics and clinical presentation

No association was found between GST genotypes and clinical parameters [sex, age ( $\leq 60$  vs  $> 60$  years), clinical stage (CS) of DLBCL (I/II vs III/IV), B symptoms, bulky disease, extra-nodal disease and IPI score (low/low-intermediate vs intermediate-high/high)].

However, there was a higher frequency of GSTM1 null genotype in patients who developed DLBCL before the age of 60 (OR 3.12, 95%CI 1.11-9.17; p=0.03).

Table 1 displays the overall characteristics of the study population and distribution of GST genotypes in patients with different clinical characteristics.

Response to therapy and outcome

In the group of 82 patients analyzed, the overall response rate (ORR) was 85% (70/82) with complete response (CR) rate of 84% (69/82) and partial response (PR) in one patient (1%). PD under R-CHOP therapy was present in 12 patients (15%). CR was achieved in 80% of GSTT1 null and 85% of GSTT1 positive patients; in 81% of GSTM1 null and 90% of GSTM1 positive patients; and in 80% of patients with GSTP1 Ile/Ile genotype and 85% of patients with at least one GSTP1 Val allele. CR rates were not statistically different between patients with different GSTT1, GSTM1 or GSTP1 genotypes. Along with genotypes, the impact of clinical features (sex, age, CS, IPI, B symptoms, extranodal involvement and bulky disease) on the achievement of CR was assessed. CR rate was significantly higher in patients with DLBCL in CS I/II than in patients with CS III/IV (100% vs 78%; p=0.02). Also, patients with favorable low/low-intermediate IPI had higher CR rate than pa-

Table 1. Distribution of GST genotypes in DLBCL patients with different clinical characteristics

Patient characteristics	GSTT1			GSTM1			GSTP1	
	Present N (%)	Null N (%)	p	Present N (%)	Null N (%)	p	IleIle	IleVal/ ValVal
Gender, M/F	36/26	8/12		17/13	27/25		13/7	31/31
Age > 60 years	15 (18)	4 (5)	0.77	11 (13)	8 (10)	0.03*	4 (5)	15 (18)
CS III/IV	47 (57)	12 (15)	0.17	19 (23)	40 (49)	0.19	15 (18)	44 (54)
B symptoms present	44 (54)	14 (17)	0.92	19 (23)	39 (48)	0.26	41 (50)	17 (21)
IPI IH/H	34 (42)	10 (12)	0.71	16 (20)	28 (34)	1	10 (12)	34 (42)
Extranodal sites $\geq 2$	52 (63)	12 (15)	0.21	24 (29)	40 (49)	0.74	17 (21)	47 (57)
Bulky disease present	29 (35)	10 (12)	0.81	15 (18)	24 (29)	0.74	12 (14)	27 (33)

p values were obtained using the chi-square or Fisher's exact test;

\*GSTM1: null genotype was more frequently found in patients who developed DLBCL before the age of 60 (OR 3.12, 95% CI 1.11-9.17; p=0.03); p was obtained using the chi-square test

IH/H: intermediate-high/high, M: male, F: female



**Table 2.** Rate of complete response in relation to GST genotype, clinical stage and IPI score

Genotype	Complete response rate N (%)	p value*
GSTT1 null	16 (80)	0.73
GSTT1 positive	53 (85)	
GSTM1 null	42 (81)	0.56
GSTM1 positive	27 (90)	
GSTP1 Ile/Ile	16 (80)	0.73
GSTP1 Ile/Val + Val/Val	53 (85)	
CS I/II	23 (100)	0.02
CS III/IV	46 (78)	
IPI low/low-intermediate	38 (100)	0.0001
IPI intermediate-high/high	31 (70)	

\*p values were obtained using Fisher's exact test

**Table 3.** Time to remission in patients with diffuse large B-cell lymphoma with respect to genotype

Genotype	Time to remission/days (median)	p value*
GSTT1 null	180-330 (300)	0.22
GSTT1 positive	90-390 (210)	
GSTM1 null	90-390 (210)	0.53
GSTM1 positive	90-360 (210)	
GSTP1 Ile/Ile	150-390 (300)	0.05
GSTP1 Ile/Val + Val/Val	90-360 (219)	

\*p values were obtained using Mann-Whitney U test

tients with unfavorable intermediate-high/high IPI (100% vs 70%;  $p=0.0001$ ). The association between genotypes, CS and IPI score with CR rate is presented in Table 2.

GSTT1 positive patients had a shorter time to CR achievement (90-390 days, median 210 days) than GSTT1 null group (180-330 days median 300 days). However, this difference didn't reach statistical significance. A shorter time period to CR was observed in patients with at least one GSTP1 Val allele (90-360 days, median 219 days) compared to patients with Ile/Ile genotype (150-390 days, median 300 days) ( $p=0.05$ , Mann-Whitney U test) (Table 3).

In respect to the occurrence of side effects, there were no toxic effects, life-threatening infections or significant delay in immunochemotherapy in the analyzed group of DLBCL patients.

In the group of patients who achieved CR ( $N=69$ ), 15 (22%) relapsed. The incidence of relapse wasn't associated with GST genotypes. In addition, no association between clinical features and incidence of relapse was found.

When we analyzed the impact of GSTT1,

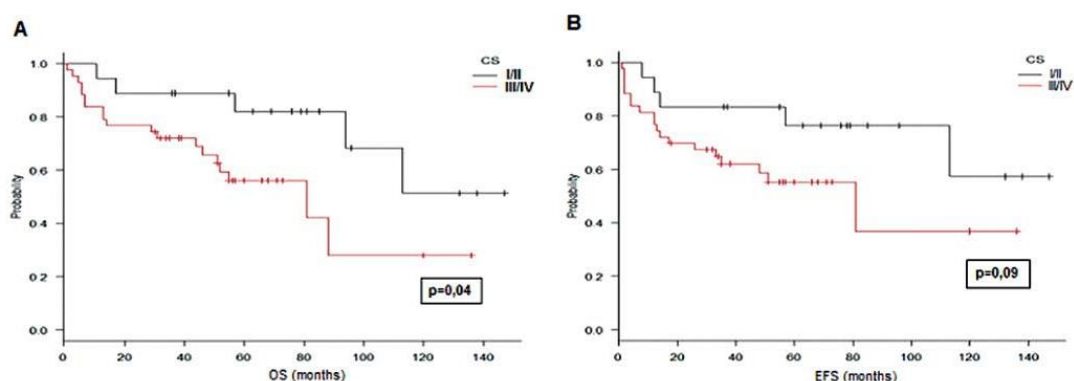
GSTM1 and GSTP1 genotypes on OS, DFS and EFS, no significant statistical association was found. OS and EFS were influenced only by CS (log-rank,  $p=0.04$  for OS and  $p=0.09$  for EFS) and IPI (log-rank test,  $p=0.01$  for OS and  $p=0.04$  for EFS). However, multivariate analysis using Cox regression model showed that only IPI was independent prognostic factor for OS [intermediate-high/high IPI vs low/low-intermediate IPI; hazard ratio (HR) 3.1, 95% CI 1.26-7.6;  $p=0.01$ ] (Figure 1).

## Discussion

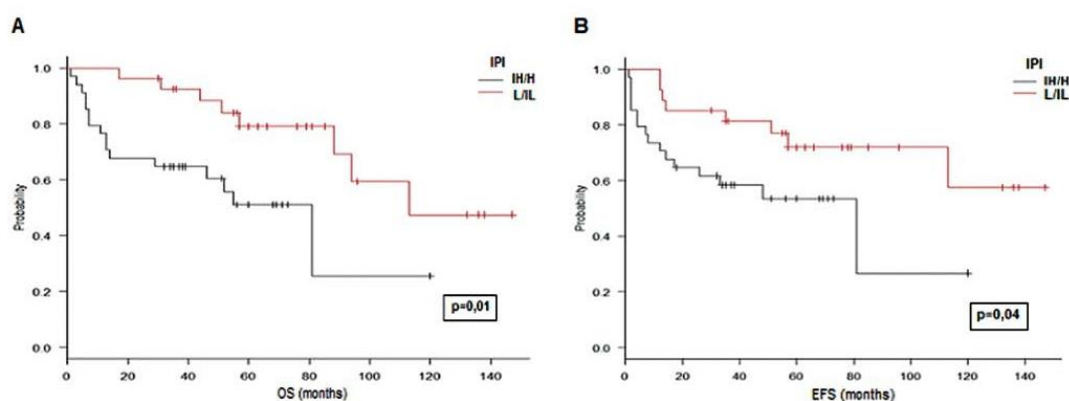
An excessive risk of NHL has been linked to exposure to environmental carcinogens, and particularly in individuals with a positive family history of cancer. Phenotypically relevant polymorphisms in genes encoding GSTs and other enzymes involved in the metabolism of environmental agents have been recognized as factors of individual susceptibility to lymphoma [5]. The present study focused on the association of polymorphisms within GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genes with the DLBCL characteristics and outcome.

According to published data, GSTT1 and GSTM1 genes are homozygously deleted in 15-30% and 40-60% of Caucasian populations, respectively [11]. The frequency of GSTP1 Val allele is about 30% in Caucasians [20]. In the present study that included DLBCL patients of Serbian origin, the obtained frequencies of GSTT1 null and GSTM1 null genotypes were 24% and 63%, respectively. Similar results were reported by Chiu and coworkers. In the case-control study, white ethnicity made more than 95% of the study population. GST1 null and GSTM1 null genotypes were found in 18% and 47% of DLBCL cases, respectively. In the same study, GSTP1 Val/Val was found in 2% of DLBCL cases [21]. In our study, the frequency of GSTP1 Val/Val genotype was 22%. Similar findings were reported for pediatric NHL by a German group [11].

Some previous reports indicated association between GSTT1 null genotype and favorable clinical characteristics. In the study on Hodgkin's lymphoma, Hohaus and coworkers reported the association between GSTT1 null genotype and lymphoma risk particularly in young females, a patient group characterized by favorable prognosis. Also, the GSTT1 null genotype was associated with a limited stage of disease and low erythrocyte sedimentation rate, both well-established favorable prognostic factors [9]. Similar to Hohaus



**Figure 1.** Overall survival (A) and event free survival (B) according to clinical stage. DLBCL patients with clinical stage (CS) I/II had better OS ( $p=0.04$ ) and EFS ( $p=0.09$ ) than patients with clinical stage III/IV.



**Figure 2.** Overall survival (A) and event free survival (B) according to IPI score (low/ low-intermediate vs intermediate-high/high). DLBCL patients with low/low-intermediate (L/L) IPI had better OS ( $p=0.01$ ) and EFS ( $p=0.04$ ) than patients with intermediate-high/high (I/H/H) IPI. In Cox regression model IPI was only independent prognostic factor for OS (HR 3.1, 95% CI 1.26 – 7.6;  $p=0.01$ ).

and coworkers, we found an association between deficit of GST enzymatic activity and age. However, in the present study the GSTM1 null genotype was associated with age under the prognostic cut-off point (<60 years). In addition, this finding may be discussed in the context of susceptibility to lymphoma in GSTM deficient individuals.

Previous reports suggested that GSTT1 deletion may significantly increase the risk of drug-related toxicity after R-CHOP in patients with DLBCL [22,23]. In the present study R-CHOP therapy was not accompanied with pronounced toxic effects, life-threatening infections or required a significant delay of immunochemotherapy. Furthermore, GSTs have been proven as important factors determining the efficacy of cyclophosphamide and doxorubicin, and possibly modulate the therapeutic effects of vincristine and prednisone [22]. In our patients with DLBCL, GSTT1, GSTM1

or GSTP1 genotypes were not associated with remission rate and incidence of relapse. However, patients with at least one GSTP1 105 Val allele had a shorter time period to remission than patients with Ile/Ile genotype. Since the GSTP1 105 Val allele is associated with decreased activity of the enzyme [20], our finding is in concordance with previous reports showing that tumor cells expressing high levels of GST enzymes were more resistant to chemotherapy [24,25]. Many reports have shown that the GSTP1 is largely expressed in lymphoid tissues than other GST isoenzymes, and is elevated in various cell lines resistant to anticancer agents such as adriamycin, cyclophosphamide, melphalan and chlorambucil [10]. Katurahira and coworkers reported that patients with elevated GSTP1 plasma levels had lower complete response rate, OS and DFS rates than patients with normal GSTP1 plasma values [26]. In the



study of Ribrag and coworkers, DLBCL patients with high GSTP1 expression had a worse 5-year PFS and high GSTP1 expression was associated with a trend for lower survival [27]. In the study on Hodgkin's lymphoma, Hohaus and coworkers demonstrated that the GSTP1 Ile105Val polymorphism was associated in a dose-dependent fashion with an improved failure-free survival. The probability of 5-year survival for Val/Val homozygotes was 100%, for heterozygous patients 74% and for patients with the Ile/Ile genotype 43% [20]. In the present study only CS and IPI score significantly influenced CR rate and survival.

In conclusion, the results of the present study are consistent with previous reports indicating the clinical importance of GST genotyping. This study revealed the association of GSTM1 null genotype with DLBCL development before the

age of 60 (prognostic cutoff). Previously, high expression level of GSTP1 was reported to increase resistance to chemotherapy in lymphoma patients and influence OS and DFS. Therefore, GSTP1 was designated as a potential therapeutic target. In this study, patients with at least one low producing GSTP1 105 Val allele achieved clinical remission in a shorter period of time, but GST genotypes didn't influence survival, probably due to the small study population. However, the present study was guided by strict inclusion criteria since all patients with DLBCL were ethnically matched, they were diagnosed, uniformly treated with R-CHOP and followed-up in one institution.

### Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

### References

1. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med* 2010;362:1417-1429.
2. Armitage JO. How I treat patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2007;110:29-36.
3. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostics Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993;329:987-994.
4. Morgensztern D, Martin MG, Lossos IS. Gene expression profiling in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2007;48:669-682.
5. Skibola CF, Curry JD, Nieters A. Genetic susceptibility to lymphoma. *Haematologica* 2007;92:960-969.
6. Ibrahim NY, Sami RM, Nasr AS. GSTP1 and CYP1A1 Gene Polymorphisms and Non-Hodgkin Lymphoma. *Lab Med* 2012;43:22-26.
7. Wu MS, Shun CT, Huang SP et al. Effect of interleukin-1beta and glutathione S-transferase genotypes on the development of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Haematologica* 2004;89:1015-1017.
8. Kerridge I, Lincz L, Scorgie F et al. Association between xenobiotic gene polymorphisms and non-Hodgkin's lymphoma risk. *Br J Haematol* 2002;118:477-481.
9. Hohaus S, Massini G, D'Alo' F et al. Association between glutathione S-transferase genotypes and Hodgkin's lymphoma risk and prognosis. *Clin Cancer Res* 2003;9:3435-3440.
10. Rolland D, Raharijaona M, Barbarat A et al. Inhibition of GST-pi nuclear transfer increases mantle cell lymphoma sensitivity to cisplatin, cytarabine, gemcitabine, bortezomib and doxorubicin. *Anticancer Res* 2010;30:3951-3958.
11. Dieckvoss B-O, Stanulla M, Schrappe M et al. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes in pediatric non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2002;87:709-13.
12. Curran JE, Weinstein SR, Griffiths LR. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer susceptibility. *Cancer Lett* 2000;153:113-120.
13. Deng Q, He B, Pan Y et al. Polymorphisms of GSTA1 contribute to elevated cancer risk: evidence from 15 studies. *J BUON* 2015;20:287-295.
14. Coles BF, Anderson KE, Doerge DR et al. Quantitative analysis of interindividual variation of glutathione S-transferase expression in human pancreas and the ambiguity of correlating genotype with phenotype. *Cancer Res* 2000;60:573-579.
15. Lourenco GJ, Lorand-Metze I, Delamain MT et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase mu 1, theta 1, and pi 1 genes and prognosis in Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2010;51:2215-2221.
16. Zimniak P, Nanduri B, Pikula S et al. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994;224:893-899.
17. Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press, 2001, pp 171-174.

18. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al. Report of an International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphoma. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999;17:1244-1253.
19. Carless MA, Lea RA, Curran JE et al. The GSTM1 null genotype confers an increased risk for solar keratosis development in an Australian Caucasian population. *J Invest Dermatol* 2002;119:1373-1378.
20. Hohaas S, Di Ruscio A, Di Febo A et al. Glutathione S-transferase P1 genotype and prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:2175-2179.
21. Chiu BC-H, Kolar C, Gapstur SM et al. Association of NAT and GST polymorphisms with non-Hodgkin's lymphoma: a population-based case-control study. *Br J Haematol* 2005;128:610-615.
22. Cho HJ, Eom HS, Kim HJ et al. Glutathione-S-transferase genotypes influence the risk of chemotherapy-related toxicities and prognosis in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;198:40-46.
23. Morabito F, Hohaas S, Mammi C et al. Role of glutathione S-transferase (gst) polymorphisms in patients with advanced Hodgkin lymphoma: results from the hd2000 GISEL trial. *Leuk Lymphoma* 2012;53:406-410.
24. Thieblemont C, Rolland D, Baseggio L et al. Comprehensive analysis of GST- $\pi$  expression in B-cell lymphomas: Correlation with histological subtypes and survival. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1403-1406.
25. Kearns PR, Pieters R, Rottier MMA et al. Raised blast glutathione levels are associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2001;97:393-398.
26. Katahira T, Takayama T, Miyanishi K et al. Plasma glutathione S-transferase P1-1 as a prognostic factor in patients with advanced non Hodgkin's lymphoma (stages III and IV). *Clin Cancer Res* 2004;10:7934-7940.
27. Ribrag V, Koscielny S, Carpiuc I et al. Prognostic value of GST- $\pi$  expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia* 2003;17:972-977.

## Association of CD14 -159 Gene Polymorphism with Characteristics and Outcome of Diffuse Large B-cell Lymphomas

Lavinika ATANASKOVIC<sup>1</sup>, Olivera TARABAR<sup>1</sup>, Zvonko MAGIC<sup>2</sup>,  
 Dragana STAMATOVIĆ<sup>1</sup>, Andjelina ZIVANOVIĆ<sup>1</sup>, Slobodan MARJANOVIĆ<sup>1</sup>,  
 Bojana CIKOTA-ALEKSIC<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Military Medical Academy, Clinic of Hematology

<sup>2</sup> Military Medical Academy, Institute of Medical Research, Belgrade, SERBIA

### ABSTRACT

The aim of this study was to assess the association between CD14 -159 genotypes and DLBCL characteristics, clinical course and outcome, respectively. The study included 114 patients with the newly diagnosed DLBCL. All patients received R-CHOP therapy (6-8 cycles). CD14 -159C→T genotyping was performed by using PCR RFLP. Obtained frequencies of CD14 -159 genotypes were as follows: 23% of CC, 41% of CT and 36% of TT. Statistically significant association between CD14 genotypes and clinical characteristics (age, sex, disease stage, extranodal sites, bulky disease, IPI, lymphocyte and lymphocyte/monocyte count) was found only for extranodal disease ( $p=0.01$ ). CT/TT carriers more frequently presented extranodal disease (OR 3.191, 95% CI: 1.282-7.94). In addition, these patients had higher pretreatment values of CRP ( $p=0.078$ ). During the therapy, infections ( $p=0.083$ ), and early-treatment-related complications ( $p=0.079$ ) were more commonly present in carriers of CC genotype. In patients with extranodal DLBCL, TT genotype was associated with superior OS ( $p=0.049$ ) and RFS, ( $p=0.018$ ). Multivariate analysis revealed IPI (HR 2.422, 95% CI 1.114-5.264;  $p=0.026$ ) and CD14 TT genotype (HR 0.503, 95% CI: 0.262 – 0.963;  $p=0.038$ ) as the most prominent factors for OS. Our study reveals the association of CD14-159 T allele with the presence of extranodal DLBCL and elevated CRP level at diagnosis. However, during the treatment T allele manifested protective role since patients with CT/TT genotypes less frequently experienced infections and early-treatment-related complications. In addition, TT genotype was associated with improved survival, but only in patients with extranodal disease.

**Keywords:** Diffuse large B-cell lymphoma, CD14, Genotyping

### INTRODUCTION

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), a heterogeneous group of diseases, constitutes 30-58% of all non-Hodgkin lymphoma cases.<sup>1</sup> In the majority of patients DLBCL is successfully treated with immunochemotherapy composed of rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (R-CHOP). However, most patients who failed R-CHOP have no true curative options and will ultimately die from lymphoma. Thus, there is a need for more effective front-line and salvage strategies.<sup>2</sup> In the majority of cases, pattern of gene

expression reflects the stage of lymphoid differentiation and classifies DLBCL as germinal center B cell (GCB) or activated B cell (ABC) subtype. This molecular distinction has prognostic implications (GCB subtype exhibits superior survival following R-CHOP than ABC subtype) and also reveals oncogenic signaling pathways that could be explored for novel therapeutic strategies.<sup>2-4</sup> However, large body of evidences clearly indicates that both, intrinsic defects affecting the regulation of cell division and/or apoptosis as well as an altered survival-stimulating tumor environment are significant factors of pathogenesis and clinical progression.<sup>5,6</sup>



Thus, molecules included in innate immunity have been identified as candidates for effects on cancer, such as CD14 (cluster of differentiation 14).

The CD14 molecule is expressed on the surface of monocytes, macrophages, neutrophils and dendritic cells as a membrane-anchored form, but also exist as a soluble protein. It acts as a co-receptor for the detection of bacterial lipopolysaccharide (LPS). Soluble CD14 is capable to modulate cellular and humoral immune response by interacting directly with T and B lymphocytes. Increased levels of soluble CD14 were found in a wide variety of infectious and inflammatory diseases, but also in patients with NHL.<sup>7</sup>

There are several polymorphic sites in the CD14 gene, but CD14 -159C/T (rs2569190) in the promoter region is the most commonly studied. Previous studies demonstrated that the presence of T allele is associated with higher level of soluble CD148. The CD14 -159C/T polymorphism may be implicated in the development of gastric cancer in *H. pylori* – infected individuals<sup>9,10</sup>, gastric MALT lymphoma<sup>11</sup> as well as childhood Hodgkin lymphoma.<sup>12</sup>

The aim of this study was to assess the association between CD14 -159 genotypes and DLBCL characteristics, clinical course and outcome, respectively. Since CD14 -159 T allele was associated with extranodal lymphoma, we also analyzed the impact of CD14 genotypes on outcome in this group of DLBCL patients.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

This study was approved by the Ethics committee of MMA, Belgrade. The study confirms the principles outlined in Helsinki Declaration.

The study included 114 patients (59 men and 55 women), aged 18 to 87 (median 52) with the newly diagnosed DLBCL<sup>13,14</sup> who were diagnosed, treated and followed-up at the Clinic for hematology, MMA, Belgrade, Serbia. The patients with previous history of malignant disease or HIV-related DLBCL were not included in this study.

Diagnostic procedure included clinical examination, laboratory testing, bone marrow biopsy, chest radiograph and computer tomography of chest and abdomen. All patients received R-CHOP therapy (6-8 cycles). The follow-up period ranged from 2 to 135 (median 60) months.

### CD14 genotyping

Blood was collected in EDTA tubes and stored at -40°C. DNA was extracted by a PureLink™ Genomic DNA MiniKit (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions.

CD14 -159C→T genotyping was performed by using PCR and restriction enzyme digestion with Hae III (Fermentas, Vilnius, Lithuania) as previously described.<sup>15</sup>

### Statistical Analysis

The association between genotypes and clinical characteristics (age, sex, stage of disease, presence of extranodal sites, bulky disease, IPI score, absolute lymphocyte and absolute lymphocyte/monocyte count), response to therapy, incidence of relapse, the presence of infections and early-treatment-related complications (neutropenia grade III/IV, mucositis, acute renal failure, heart failure) was analyzed using the Pearson chi-squared test. Cutoff values for absolute lymphocyte count (1220 lymphocytes/mm<sup>3</sup>) and absolute lymphocyte count/absolute monocyte count (2870) were determined by receiver operating curve (ROC) analysis.

The association between genotypes and markers of inflammation was analyzed by two-tailed t-test.

Relapse free survival (RFS) was calculated as the time from the start of treatment to relapse. Overall-survival (OS) was defined as the time from the start of treatment to death or to date of last follow-up. Survival curves were generated using the method of Kaplan and Meier and compared by the logrank test. The most prominent factors for survival were determined by Cox proportional hazard regression (Wald test).

The p value < 0.05 was considered statistically significant.

**Table 1.** Association between CD14 -159 genotypes and clinical characteristics

Patient/DLBCL characteristics	(n=114)	CD14 CT+TT n (%)	CD14 CC n (%)	p
Women	55 (48)	10 (18)	45 (82)	
Man	59 (52)	16 (27)	43 (73)	
<60 years	79 (69)	19 (24)	60 (76)	0.632
≥ 60 years	35 (31)	7 (20)	28 (80)	
IPI 0, 1, 2	75 (66)	18 (24)	57 (76)	0.671
IPI 3, 4, 5	39 (34)	8 (21)	31 (79)	
Clinical stage I/II	60 (53)	14 (23)	46 (77)	0.888
Clinical stage III/IV	54 (47)	12 (22)	42 (78)	
Extranodal disease	80 (70)	13 (16)	67 (84)	0.01
No extranodal disease	34 (30)	13 (38)	21 (62)	
Bulky disease	53 (46)	12 (23)	41 (77)	1
No bulky disease	61 (54)	14 (23)	47 (77)	
Absolute lymphocyte count				0.475
<1220/mm <sup>3</sup>	72 (66)	18 (25)	54 (75)	
≥1220/mm <sup>3</sup>	37 (34)	7 (19)	30 (81)	
Abs. lymph/abs. monocyte count				0.386
<2870/mm <sup>3</sup>	66 (61)	17 (26)	49 (74)	
≥2870/mm <sup>3</sup>	43 (39)	8 (19)	35 (81)	

Table 1 presents the association between genotypes (CC vs CT+TT) and clinical characteristics (age, sex, stage of disease, presence of extranodal sites, bulky disease, IPI score, absolute lymphocyte and absolute lymphocyte/monocyte count).

Obtained frequencies of CD14 -159 genotypes were as follows: 23% of CC, 41% of CT and 36% of TT (Hardy-Weinberg equilibrium,  $p=0.883$ ).

Statistically significant association between CD14 genotypes and clinical characteristics was found only for extranodal disease ( $p=0.01$ ). Compared to CC homozygotes, carriers of T allele (CT/TT genotypes) were more likely to have extranodal disease (OR 3.191, 95% CI: 1.282 – 7.94). The most common extranodal site was stomach (23/80).

Pretreatment values of C-reactive protein (CRP) were available for 101 patients. CRP values ranged 2.5 - 122 mg/l (average 24) in patients with CC genotype ( $n=24$ ) and 2.2 - 266 mg/l (average 39.5) in patients with CT/TT genotype ( $n=77$ ). The association between genotypes and CRP values was of marginal statistical significance (one-tailed t-test  $p=0.038$ ; two-tailed t-test  $p=0.078$ ). Values of other inflammatory markers (sedimentation of erythrocytes and fibrinogen) were not associated with CD14 genotypes.

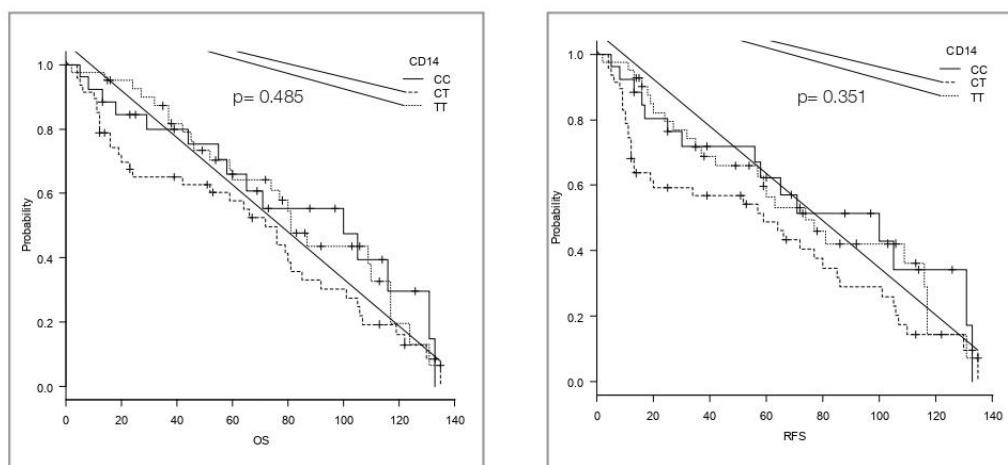
#### CD14 genotypes and course of DLBCL

Of 114 DLBCL patients, 98 (86%) responded to R-CHOP; 69 (61%) achieved complete remission and 29 (25%) had partial response. Disease progression during the therapy was present in 16 (14%) patients. Overall, 28/98 patients had disease recurrence and 34/114 (30%) died. CD14 genotypes (CC vs CT+TT) were not associated with response to therapy, incidence of relapse and outcome.

Infections during the therapy were present in 29 (25%) patients. Infections were more common in patients with CC than in patients with CT/TT genotypes (39% vs 22%). The association between genotypes and infections was of marginal statistical significance ( $p=0.083$ ). Early-treatment-related complications [present in 31 (27%) patients] were observed in 42% of patients with CC and in 24% of patients with CT/TT genotypes ( $p=0.079$ ).

In the group of patients with DLBCL, CD14 -159 genotypes were not associated with the duration of RFS ( $p=0.351$ ) and OS ( $p=0.485$ ) (Figure 1). In this group of patients, OS was affected by IPI score ( $p<0.001$ ), clinical stage ( $p<0.001$ ), absolute lymphocyte count ( $p=0.001$ ) and absolute lymphocyte/absolute monocyte count ( $p<0.001$ ). Multivariate analysis revealed IPI score ( $p=0.006$ ) as the most prominent factor for OS.





**Figure 1. A:** Overall survival in DLBCL patients with different CD14 -159 genotypes; **B:** Relapse free survival in DLBCL patients with different CD14 -159 genotypes

In the group of patients with extranodal DLBCL, superior OS was observed in patients with TT genotype (3-year OS of 84%) than in those with CC (3-year OS of 77%) and CT genotype (3-year OS of 68%). However, statistical analysis didn't show significant association between genotypes and OS ( $p=0.122$ ). When OS was compared between patients with TT (3-year OS of 84%) and CC/CT genotypes (3-year OS of 70%), statistical analysis showed significant association between genotypes and OS ( $p=0.049$ ). Similar pattern was observed for RFS, (CC vs CT vs TT,  $p=0.045$ ; CC/CT vs TT,  $p=0.018$ ). OS of patients with extranodal DLBCL was also affected with IPI score ( $p<0.001$ ), clinical stage ( $p=0.015$ ), the presence of bulky disease ( $p=0.032$ ), absolute lymphocyte count ( $p=0.01$ ) and absolute lymphocyte/ absolute monocyte count ( $p=0.001$ ). In multivariate analysis IPI [hazard ratio (HR) 2.422, 95% CI: 1.114-5.264;  $p=0.026$ ] and CD14 TT genotype (HR 0.503, 95 % CI 0.262-0.963;  $p=0.038$ ) were the most prominent factors for OS in patients with extranodal DLBCL (Table 2). Figure 2 presents the association of CD14 genotypes and survival.

## DISCUSSION

CD14 exerts multiple roles in innate immune cells with a wide range of consequences in physiologic and pathologic conditions.

126

The present study on DLBCL reports the association between CD14 -159 genotypes and the presence of extranodal disease. Extranodal involvement was more frequent in patients with high-producing T allele (CT and TT) genotypes. One quarter of our patients with extranodal disease had gastric DLBCL. The role of CD14 in gastric carcinogenesis and invasion of gastric cancer cells was previously demonstrated.<sup>16</sup> Meta-analysis performed by Wang and coworkers suggested that CD14 polymorphism may increase the risk of gastric cancer in *H. pylori*-infected individuals<sup>9</sup>. Considering lymphoma, Türe-Özdemir and coworkers found association between CD14 T allele and development of gastric MALT lymphoma<sup>11</sup>. As reported, CD14 together with TLR binds to bacterial (*H. pylori* or other) LPS and consequently activates the release of cytokines which may establish chronic inflammation and contribute to gastric carcinogenesis<sup>11</sup>. We can assume that suggested mechanism of carcinogenesis is also applicable for development of gastric DLBCL. In the review on CD14 role in host protection against infection, Zanoni and Granucci outlined that the contribution of CD14 to infection control depends both on the microorganism and the site of infection.<sup>17</sup> To explain the role of CD14 in the development of extranodal DLBCL, better understanding of regional influence exerted by CD14 as well as the functions of CD14 in non-hematopoietic cells is needed.

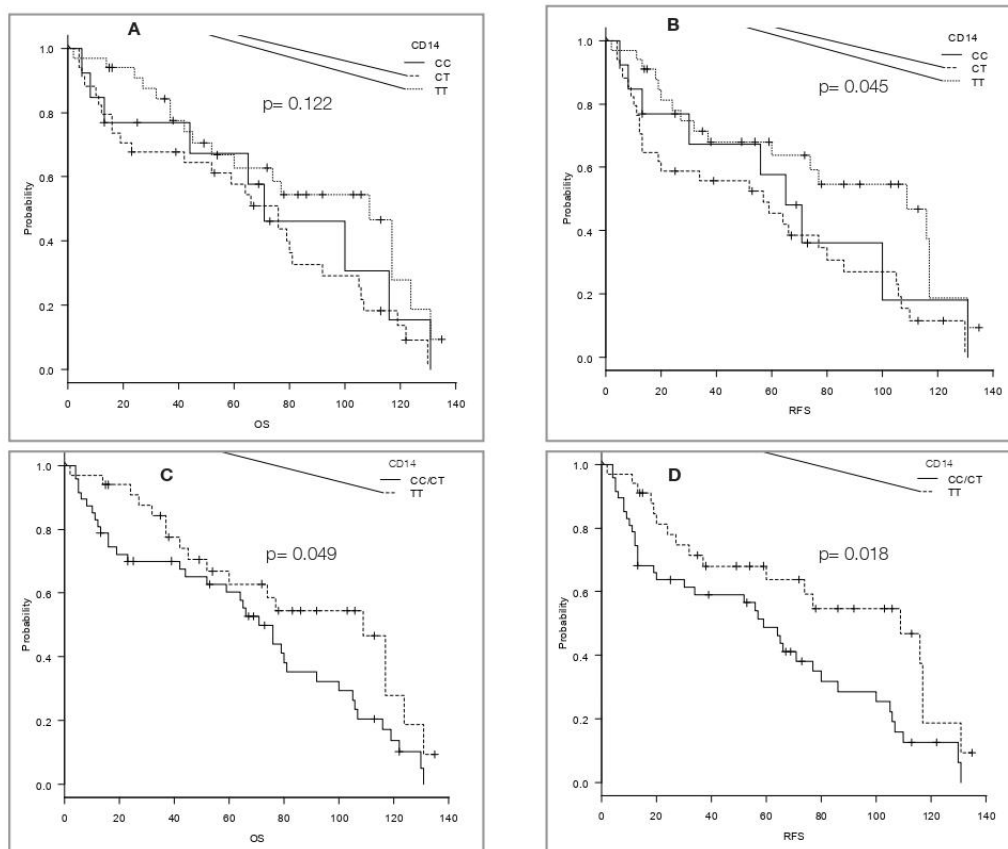
**UJOD** Number: 2 Volume: 28 Year: 2018

**Table 2.** Multiparametric analysis for the most prominent factors for survival in patients with extranodal DLBCL

	Hazard ratio	95%CI	p <sup>a</sup>
Bulky disease	1.047	0.543 - 2.019	0.89
Clinical stage III or IV	0.947	0.405 - 2.217	0.901
IPI 3, 4 or 5	2.422	1.114 - 5.264	0.026
Absolute lymphocyte count >1220 ly/mm <sup>3</sup>	0.859	0.255 - 2.89	0.806
Abs. lymph/abs. monoc count >2870/mm <sup>3</sup>	0.609	0.203 - 1.827	0.376
CD14 -159 TT genotype	0.503	0.262 - 0.963	0.038

Soluble form of CD14 is detectable in the blood of healthy individuals. Increased levels of soluble CD14 seem to be associated with a variety of inflammatory diseases. Baseggio and coworkers reported that NHL patients had significantly higher concentrations of CD14 in the blood than healthy

individuals, while patients with aggressive DLBCL or Burkitt lymphoma had a slightly higher CD14 values than patients with indolent lymphoma. In addition, soluble CD14 levels were significantly correlated with CRP and TNF levels, reflecting the cytokine-mediated inflammation.<sup>7</sup> In our study,



**Figure 2. A:** Overall survival in patients with extranodal DLBCL in regard to different CD14 -159 genotypes; **B:** Relapse free survival in patients with extranodal DLBCL in regard to different CD14 -159 genotypes; **C:** Overall survival in patients with extranodal DLBCL in regard to CD14 -159 genotypes (CC/CT vs TT); **D:** Relapse free survival in patients with extranodal DLBCL in regard to CD14 -159 genotypes (CC/CT vs TT)

patients with CD14 high-producing T allele (CT/TT genotypes) had higher CRP values at diagnosis than patients with CC genotype (marginal statistical significance). Previous reports demonstrated high CRP levels at diagnosis of DLBCL as an independent poor prognostic factor for clinical outcome.<sup>18</sup>

The majority of studies reported association between CD14 overexpression and frequent/prolonged infection, indicating a functional correlation of CD14 overexpression with a dysfunctional innate immune system which may promote tumorigenesis.<sup>19,20</sup> Our findings of association between high-producing CD14 T allele with extranodal DLBCL and elevated CRP values at diagnosis are concordant with these reports. However, our patients with CD14 T allele (CT/TT genotypes) less frequently experienced treatment-related infections as well as early-treatment-related complications, both previously reported as unfavorable clinical events.<sup>21,22</sup>

In our group of 114 patients with DLBCL, CD14 -159 genotypes didn't influence RFS and OS. However, in the group of patients with extranodal disease, homozygous carriers of high-producing T allele (TT genotype) had superior RFS and OS. Previous reports about the association between CD14 genotypes/production and survival in cancer patients brought different conclusions. Thus, overexpression of CD14 on tumor cells was associated with progression of bladder cancer and poor outcome.<sup>23</sup> In the article of Seiffert and coworkers, soluble CD14 has been identified as a novel survival factor for chronic lymphocytic leukemia cells.<sup>24</sup> However, analyzing the gene expression in primary tumors at diagnosis from children with metastatic neuroblastoma, Stigliani and coworkers reported superior event free survival and OS in patients with high levels of CD14 mRNA, whereas low levels of CD14 mRNA identified patients with poor survival. The authors suggested that cells (macrophages and dendritic cells) expressing CD14 may be responsible for the activation of T lymphocytes, which in turn limited tumor progression.<sup>25</sup> The studies on association between CD14 genotypes and outcome in cancer patients are rare. Clinical impact of CD14 genotypes is often studied in critically ill patients, but obtained results were

inconsistent. Despite frequent findings of poor outcome in patients with CD14 -159 TT genotype, Mansur and coworkers reported improved survival in those patients.<sup>26</sup> Similarly, superior survival in critically ill patients after burn injury was noticed in CD14 -159 TT carriers.<sup>27</sup>

In summary, our study indicates the association of CD14 -159 T allele and the presence of extranodal DLBCL and elevated CRP at diagnosis, both previously established as unfavorable clinical parameters. However, during the treatment protective role of T allele was manifested since patients with CT/TT genotypes less frequently experienced treatment-related infections as well as early-treatment-related complications. In addition, TT genotype was associated with improved survival, but only in patients with extranodal disease. Considering this study as well as previous reports, we can conclude that overexpression of CD14 (or the presence of high producing allele/genotype) may lead to different outcomes. The link between CD14 overexpression and chronic inflammation/tumorigenesis was previously established. However, the role of CD14 overexpression and inflammation in clinical course of DLBCL remains to be resolved.

#### **Funding:**

*This work was supported by the University of Defense - Faculty of Medicine, Belgrade, Serbia; under Grant [MFVMA/F19/12-19 and MFVMA/12/16-18].*

#### **REFERENCES**

1. Tilly H, Vitolo U, Walewski J, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 23 (Suppl 7): vii78-vii82, 2012.
2. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* 125: 22-32, 2015.
3. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346: 1937-47, 2002.
4. Pasqualucci L. The genetic basis of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol* 20: 336-344, 2013.

**UHOD** Number: 2 Volume: 28 Year: 2018



5. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nature Rev. Drug Discov* 13: 498-512, 2014.
6. Wu C, Wu X, Liu X, et al. Prognostic Significance of Monocytes and Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP. *Cell Physiol Biochem* 39: 521-530, 2016.
7. Baseggio L, Charlot C, Piccollet J, et al. High circulating tumor necrosis factor levels correlate with increased levels of soluble CD14 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 86: 774-775, 2001.
8. LeVan TD, Bloom JW, Bailey TJ, et al. A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol* 167: 5838-5844, 2001.
9. Wang J, Guo X, Yu S, et al. Association between CD14 Gene Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS One* 9: e100122, 2014.
10. Zhao D, Sun T, Zhang X, et al. Role of CD14 promoter polymorphisms in *Helicobacter pylori* infection--related gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 2362-2368, 2007.
11. Türe-Ozdemir F, Gazouli M, Tzivras M, et al. Association of polymorphisms of NOD2, TLR4 and CD14 genes with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Anticancer Res* 28(6A): 3697-700, 2008.
12. Andrie E, Michos A, Kalampoki V, et al. Genetic variants in immunoregulatory genes and risk for childhood lymphomas. *Eur J Haematol* 83: 334-342, 2009.
13. Gatter KC, Warnke RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, IARC Press, 2001: 171-174.
14. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117: 5019-5032, 2011.
15. Gibot S, Cariou A, Drouet L, et al. Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med* 30: 969-973, 2002.
16. Li K, Dan Z, Hu X, et al. CD14 regulates gastric cancer cell epithelial mesenchymal transition and invasion in vitro. *Oncol Rep* 30: 2725-2732, 2013.
17. Zaroni I, Granucci F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 32, 2013.
18. Troppan KT, Schlick K, Deutsch A, et al. C-reactive protein level is a prognostic indicator for survival and improves the predictive ability of the R-IPI score in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Br J Cancer* 111: 55-60, 2014.
19. Keerthivasan G, Mei Y, Zhao B, et al. Aberrant overexpression of CD14 on granulocytes sensitizes the innate immune response in mDia1 heterozygous del(5q) MDS. *Blood* 124: 780-790, 2014.
20. Hu Y, Yoshida K, Cologne JB, et al. CD14 and IL18 gene polymorphisms associated with colorectal cancer subsite risks among atomic bomb survivors. *Hum Genome Var* 2: 15035, 2015.
21. Pole JD, Gibson P, Ethier MC, et al. Evaluation of treatment-related mortality among paediatric cancer deaths: a population based analysis. *Br J Cancer* 116: 540-545, 2017.
22. Jung YH, Woo IS, Han CW. Clinical characteristics and outcomes in diffuse large B cell lymphoma patients aged 70 years and older: a single-center experience with a literature review. *Korean J Intern Med* 30: 684-693, 2015.
23. Cheah MT, Chen JY, Sahoo D, et al. CD14-expressing cancer cells establish the inflammatory and proliferative tumor microenvironment in bladder cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 4725-430, 2015.
24. Seiffert M, Schulz A, Ohl S, et al. Soluble CD14 is a novel monocyte-derived survival factor for chronic lymphocytic leukemia cells, which is induced by CLL cells in vitro and present at abnormally high levels in vivo. *Blood* 116: 4223-4230, 2010.
25. Stigliani S, Croce M, Morandi F, et al. Expression of FOXP3, CD14, and ARG1 in Neuroblastoma Tumor Tissue from High-Risk Patients Predicts Event-Free and Overall Survival. *Biomed Res Int* 2015: 347867, 2015.
26. Mansur A, Liese B, Steinau M, et al. The CD14 rs2569190 TT Genotype Is Associated with an Improved 30-Day Survival in Patients with Sepsis: A Prospective Observational Cohort Study. *PLoS One* 2015 10(5): e0127761.
27. Barber RC, Aragaki CC, Chang LY, et al. CD14-159 C allele is associated with increased risk of mortality after burn injury. *Shock* 27: 232-237, 2007.

**Correspondence:**

Gikota-Aleksic Bojana, Ph.D.  
 Institute of Medical Research, Military Medical Academy  
 Crnotravska 17  
 11000 Belgrade, SERBIA

Tel: +381 11 3608 339  
 Cell phone: +381 64 143 0 237  
 Fax: +381 11 2662 722  
 e-mail: cbojana@ptt.rs; cbojana@yahoo.com

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/321362501>

## The role of prognostic factors in overall survival in patients with Bence-Jones multiple myeloma – our experience

Article in *Medicinski pregled* · January 2017

DOI: 10.2298/MPNS17S1057Z

CITATIONS

0

READS

41

6 authors, including:



Bela Balint

Serbian Academy of Sciences and Arts

221 PUBLICATIONS 758 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Platelet storage lesions [View project](#)



Blood components [View project](#)

All content following this page was uploaded by Bela Balint on 06 December 2017.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

Military Medical Academy, Belgrade  
 Clinic of Hematology<sup>1</sup>  
 Institute of Transfusiology and Hemobiology<sup>2</sup>  
 Institute of Pathology<sup>3</sup>

UDK 616.15-006.44-036.8  
<https://doi.org/10.2298/MPNS17S1057Z>

**THE ROLE OF PROGNOSTIC FACTORS IN OVERALL SURVIVAL IN PATIENTS WITH BENCE-JONES MULTIPLE MYELOMA - OUR EXPERIENCE**

*UTICAJ FAKTORA PROGNOZNE NA UKUPNO PREŽIVLJAVANJE BOLESNIKA SA BENS-DŽONS MULTIPLIM MIJELOMOM – NAŠE ISKUSTVO*

**Andelina ŽIVANOVIĆ IVIĆ<sup>1</sup>, Lavinika ATANASKOVIĆ<sup>1</sup>, Marija ELEZ<sup>1</sup>, Olga RADIĆ TASIĆ<sup>3</sup>, Bela BALINT<sup>2</sup> and Dragana STAMATOVIĆ<sup>1</sup>**

**Summary**

**Introduction.** Bence-Jones myeloma multiplex is a progressive disease characterized by excessive numbers of abnormal plasma cells in the bone marrow and overproduction of incomplete immunoglobulins, containing only the light chain portion of the immunoglobulins. This type of myeloma occurs 15-20%. The median overall survival is approximately 4 years. Aim of this study was to define prognostic factors affecting overall survival in Bence-Jones multiple myeloma patients. **Material and Methods.** From 1995 to 2015, we treated 75 patients (49 men and 26 female), average age 55.9 years (range 31-85). **Results.** Conventional chemotherapy introductory clinical response was achieved in 54 patients (72%), while in 21 patients (28%) the established disease was resistant. Transplantation was done in 45 patients (60%), while 30 patients (40%) were treated with conventional chemotherapy. In the group of patients with transplantation done, tandem was carried out in 11 patients and secondary stem cell transplantation was done in 5 relapsed patients. With 1 patient with tandem stem cell transplantation allogenic (singen) stem cell transplantation was done. Transplant related mortality is 1.5%. The transplanted patients had significantly longer PFS (mediana 13 months vs 7 months,  $p < 0,05$ ) and longer overall survival (mediana 55 months vs 26 months,  $p < 0,001$ ). Univariate log regression analysis showed that non-transplant patients are 5,1 times more likely to terminate lethal compared to transplant patients (RR 5,1; 95% C.I.43,47-2,52),  $p < 0,001$ . **Conclusion.** Our study showed autologous stem cell transplantation is a more effective method of treatment of patients with Bence-Jones myeloma compared to the conventional chemotherapy.

**Key words:** Prognosis; Survival Rate; Multiple Myeloma; Bence Jones Protein; Risk Factors; Blood Platelets; Cholesterol, HDL; Treatment Outcome

**Introduction**

Multiple myeloma (MM) is a neoplastic monoclonal plasma cell proliferation with typical restric-

**Sažetak**

**Uvod.** Bolest lakih lanaca ili Bens Džouns (Bence Jones) mijelom je progresivna bolest koju karakteriše proliferacija plazma ćelija u koštanoj srži i prekomerna produkcija imunoglobulina lakih lanaca u plazmi i u urinu. Ova vrsta multiplog mijeloma čini 15–20% slučajeva. Medijana preživljavanja iznosi prosečno četiri godine. Cilj istraživanja je da se retrospektivnom analizom definiše uticaj faktora prognoze na ukupno preživljavanje bolesnika sa Bens Džouns multiplim mijelomom i ishod bolesti. **Materijal i metode.** Istraživanjem je od 1995. do 2015. godine obuhvaćeno 75 pacijenata (49 muškaraca i 26 žena), prosečne starosti 55,9 godina (31–85). **Rezultati.** Konvencionalnom hemioterapijom postignut je klinički odgovor kod 54 pacijenta (72%), dok je kod 21 pacijenta (28%) verifikovana rezistentna bolest. Kod 60% pacijenata je sprovedena autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze, dok je 40% pacijenata lečeno konvencionalnom hemioterapijom. U grupi pacijenata kod kojih je sprovedena autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze, kod 11 pacijenata je urađena tzv. tandem, a kod pet pacijenata sekundarna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze. Kod jednog pacijenta sa sprovedenom tzv. tandem transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze, urađena je singena alogena transplantacija matičnih ćelija hematopoeze. Transplantacioni mortalitet je nizak i iznosi 1,5%. Pacijenti kod kojih je urađena autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze imaju signifikantno duže preživljavanje bez progresije bolesti (medijana 13 meseci vs 7 meseci,  $p < 0,05$ ) i duže ukupno preživljavanje (medijana 55 meseci vs 26 meseci,  $p < 0,001$ ). Univarijantna logistička regresiona analiza je ukazala da pacijenti kod kojih nije urađena autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze imaju pet puta veću verovatnoću za letalni ishod u poređenju sa pacijentima kod kojih je urađena transplantacija (RR 5,1; 95% C. I. 43, 47–2,52),  $p < 0,001$ . **Zaključak.** Istraživanje je ukazalo da je autologna transplantacija matičnih ćelija hematopoeze efikasan metod lečenja pacijenata sa Bens Džouns mijelomom u poređenju sa konvencionalnom hemioterapijom.

**Ključne reči:** prognoza; preživljavanje; multipli mijelom; Bence Jones proteini; faktori rizika; trombociti; HDL holesterol; ishod lečenja

tion in the bone marrow and the clinical pentad (anemia, monoclonal M-protein, bone lesions, hypercalcemia, renal insufficiency) [1]. Light chain deposition disease or Bence-Jones myeloma is a

Corresponding Author: Dr Andelina Živanović Ivić, Vojnomedicinska akademija, Klinika za hematologiju, 11000 Beograd, Cmotravska 17, E-mail: andjelinaživanovic73@gmail.com



### Abbreviations

MM	– multiple myeloma
SCT	– stem cell transplantation
ASCT	– autologous stem cell transplantation
MPV	– Melphalan, Bortezomib, Pronison
MPT	– Melphalan, Thalidomide, Pronison
BP	– Bendamustine, Pronison
VCD	– Bortezomib, Cyclophosphamide, Dexasone
VTD	– Bortezomib, Cyclophosphamide, Dexasone
PAD	– Bortezomib, Doxorubicin, Dexasone
RVD	– Bortezomib, Lenalidomide, Dexasone
R-ISS	– Revised International Staging System
OS	– overall survival
PFS	– progression free survival
IMiD	– immunomodulatory imide drug
LDH	– lactate dehydrogenase

progressive disease characterized by plasma cell proliferation in the bone marrow and overproduction of the light chain portion of immunoglobulins (Bence Jones proteins) in plasma and in urine [2]. Multiple myeloma accounts for 1% of all cancers and for 10% of hematologic malignancies. Incidence is 4.5–6.0 /100,000. It is more common among men [3]. The median age is 72. One fifth of MM patients are diagnosed with a type called light chain deposi-

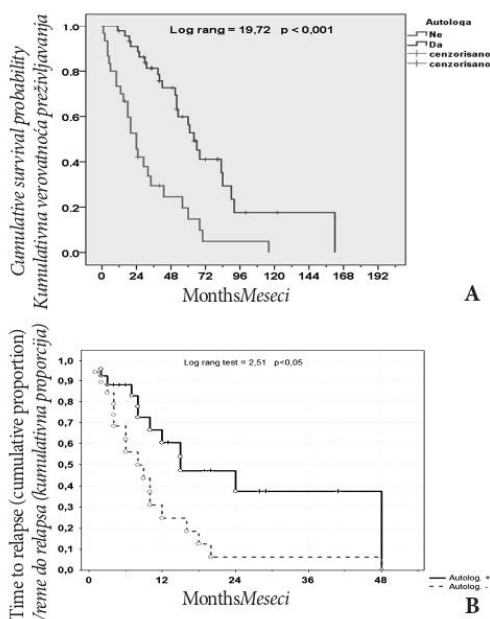
tion disease [4]. Their median overall survival is 4 years [3]. They are diagnosed on the basis of laboratory parameters, bone marrow biopsy, radiographic detection of various sensitivity and specificity levels [3]. After establishing the diagnosis, patients are stratified into risk groups according to the International Prognostic Scoring System (ISS) and the Revised International Prognostic Scoring System (R-ISS) [5]. With patients over 65, the following protocols are applied in the introductory therapy: Melphalan, Thalidomide, Pronison (MPT), Melphalan, Bortezomib, Pronison (MPV), Lenalidomide-Dexasone (Rd), Bendamustine, Pronison (BP). Induction therapy in patients under 65 includes combinations with proteasome inhibitors (Bortezomib, Cyclophosphamide, Dexasone (VCD), Bortezomib, Cyclophosphamide, Dexasone (VTD), Bortezomib, Doxorubicin, Dexasone (PAD), Bortezomib, Lenalidomide, Dexasone (RVD) [1]. A required form of treatment is the application of a “high-dose” chemotherapy supported by autologous cells, with conditioning of 200mg/m<sup>2</sup> of Melphalan. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation was indicated in young high risk and/or resistant myeloma patients [6]. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is at the stage of clinical trials and

**Table 1.** Patients' characteristics  
*Табела 1. Karakteristike pacijenata*

Parameters/Parametri	N (%)
Age (mediana)/Starost (medijana)	55 (31-85)
Sex (M/F)/Pol (M/Ž)	26/49 (35/65)
Platelets/Trombociti (x10 <sup>9</sup> /l)	
<130	44 (59%)
>130	31 (41%)
Risk/Rizik	
Standard/Standardni	17 (23%)
High/Visok	58 (77%)
Light chain/Laki lanci	39 (52%)
Kappa/Lambda/Kapa/Lambda	36 (48%)
Renal failure/Bubrežna insuficijencija	
Yes/Da	42 (56%)
No/Ne	33 (44%)
Bence Jones/Bens Džouns	
≥2 g/daily/dnevno	53 (70%)
<2 g/daily/dnevno	22 (30%)
CRP/C-reaktivni protein (mg/l)	
≥6	45 (60%)
<6	30 (40%)
LDH (U/l)	
>300	24 (45%)
≤300	41 (55%)
Bone lesions/Koštane lezije	
Yes/Da	63 (84%)
No/Ne	12 (16%)
ISS - International Staging System/Internacionalni sistem za određivanje stadijuma bolesti	
I	18 (24%)
II	15 (20%)
III	41 (56%)

**Table 2.** Multivariate regression analysis: Influence of clinical parameters on OS and PFS  
**Tabela 2.** Multivarijantna analiza: uticaj kliničkih parametara na OS i PFS

Parameters/Parametri	PFS	OS
Age/Starost	p>0,05	p<0,05
Sex (M/F)/Pol (M/Ž)	p>0,05	p>0,05
Clinical stage/Klinički stadijum	p>0,05	p>0,05
Myeloma type/Tip mijeloma	p- 0,05-0,1	p>0,05
Renal insufficiency/Bubrežna slabost	p>0,05	p>0,05
Creatinin clearance/Klirens kreatinina	p>0,05	p>0,05
Bence Jones protein	p>0,05	p>0,05
Platelets/Trombociti ( $\times 10^9/l$ )	p>0,05	p<0,05
CRP/C-reaktivni protein	p>0,05	p>0,05
LDH	p-0,05-0,1	p>0,05
Bone lesions/Koštane lezije	p<0,05	p>0,05
ISS - International Staging System/Internacionalni sistem za određivanje stadijuma bolesti	p>0,05	p>0,05
Bone marrow infiltration/Infiltracija koštne srži	p<0,05	p>0,05
Response to primary treatment/Odgovor na primarnu terapiju	p-0,05-0,1	p>0,05



**Graph 1a and 1b.** OS and PFS survival in patients with multiple myeloma (Autologous SCT vs Chemotherapy)  
**Grafikon 1a i 1b.** Ukupno preživljavanje i preživljavanje bez progresije bolesti kod pacijenata sa multiplog mijeloma (ATMČH vs hemioterapija)

it is more efficient if response is achieved before its implementation. The use of consolidated and maintenance therapy is carried out in accordance with disease risk parameters. Application of monoclonal antibodies is considered the treatment of future.

Aim of this study was to define prognostic factors affecting overall survival in Bence-Jones multiple myeloma patients.

#### Material and Methods

The trial was carried out according to a principle of a retrospective study that included patients with newly diagnosed Bence-Jones MM in the period 1995 – 2015. All patients were diagnosed on the basis of histopathological analysis of tissue samples with immunohistochemistry, based on International Myeloma Working Group (IMWG) criteria.

The patients were treated with the following chemotherapy protocols: Doxorubicin-Vincristine-Dexasone (VAD), Melphalan-Pronison (MP), Cyclophosphamide-Thalidomide-Dexasone (CTD), Thalidomide-Doxorubicin-Dexasone (TAD) and protocols with Bortezomib. Autologous hematopoietic stem cell transplantation (AH SCT) was done in 45 patients (60%), of which primary in 65%, "tandem" in 25%, and secondary in 10% patients. Allogeneic "syngeneic" hematopoietic stem cell transplantation was done in one patient. Maintenance treatment with Thalidomide was applied in 30 patients with average application from 4 to 40 months in accordance with recommendations. Interferon lasting for 6 to 12 months was done in 6 patients. Therapy response after initial therapy and upon completed treatment was assessed on the basis of standard recommendations.

Standard parametric and non-parametric tests were used in data processing: Fisher's, chi-square, Mann-Whitney test. Multivariate Cox regression analysis was applied for the inclusion of variables as prognostic parameters of treatment results in the relative risk assessment.

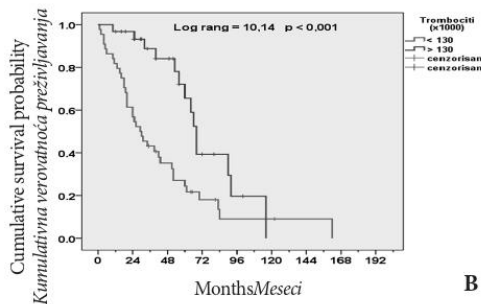
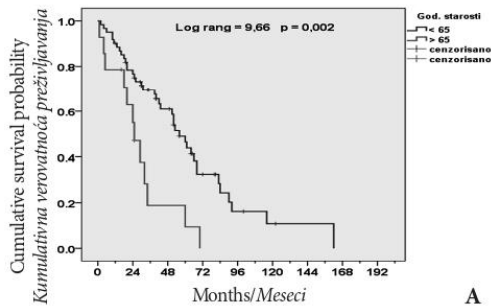
Kaplan-Meier's method was used for the purpose of patients' survival as well as a long-rank test for

the purpose of comparing survivals among tested groups. The value  $p < 0.05$  is used as the statistical significance criterion in all of the applied analytic methods. Overall survival was established starting from the moment of diagnosis until the time of examination or fatal outcome. Event free survival (EFS) was established starting from the moment of diagnosis until disease progression, death or break in treatment for any reason.

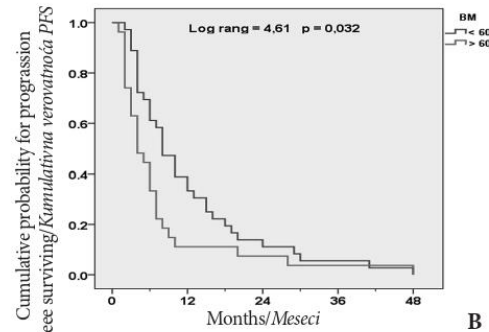
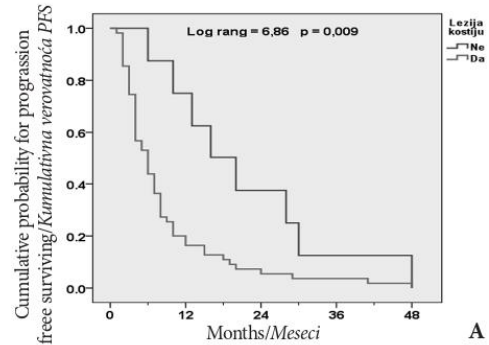
**Results**

This research included 75 patients with newly diagnosed Bence-Jones multiple myeloma who were treated with various chemotherapy protocols.

Patients' clinical presentations are given in **Table 1**. 54 (72%) patients responded to applied therapy, with a complete remission and a very good partial remission (CR+VGPR) achieved in 34 patients, partial response (PR) in 15 patients, molecular response (MR) in 5 patients, and resistant disease (RD) in 21 (28%) patients. Overall survival (OS) in patients with the done AHST amounted to 55 months, whereas in the group of patients treated with chemotherapy protocols OS amounts to 24 months. Transplantation mortality rate is low, amounting to TRM 1.5% (**Graph 1a**). The median time until disease progression – Progression free survival (PFS)



**Graph 2a and 2b.** OS according to age and platelets value in MM patients (Autologous SCT vs Chemotherapy) **Grafiikon 2a i 2b.** OS u skladu sa godinama starosti i brojem trombocita kod pacijenata sa MM (ATMČ naspram hemoterapije)



**Graph 3a and 3b.** Influence of bone lesions and bone marrow infiltration on PFS **Grafiikon 3a i 3b.** Uticaj koštanih lezija i infiltracije srži na PFS

in transplant patients was 13 months while in non-transplant patients it was 7 months (**Graph 1b**).

In the multivariate analysis, we have concluded that OS was affected by the following parameters: age and the number of platelets (**Table 2**). The following parameters proved to be statistically important against PFS: bone marrow infiltration and the presence of bone lesions (**Table 2**).

With respect to the age category, patients over 65 have statistically lower survival rate against patients under 65 ( $p=0.002$ ) (**Figure 2a**). After the test we concluded that overall survival in patients was also affected by the value of the number of platelets, and the patients with the number of platelets under  $130 \times 10^9/l$ , have lower survival rate against the patients with the number of platelets above  $130 \times 10^9/l$  ( $p=0.001$ ) (**Graph 2b**).

Patients with present bone lesions and bone marrow infiltration higher than 60% have statistically lower survival rate without disease progression (**Graph 3a and 3b**).

Fatal outcome was recorded in 50 patients (66.6%), the cause of death being the primary disease in 40 patients (80%), associated diseases in 7 patients (14%) and infections in 2 patients. Fatal outcome during AHST was recorded in one patient.



## Discussion

Light chain deposition disease or Bence-Jones myeloma is a progressive disease characterized by proliferation of plasma cells in the bone marrow and overproduction of light chain immunoglobulins (Bence-Jones proteins) in plasma and urine [2]. For the purpose of assessing disease progression, better stratification of patients diagnosed with Bence-Jones multiple myeloma according to parameters, new prognostic parameters have been established over the past few years based on biohumoral and radiographic characteristics of the disease and on cytogenetic analysis as well. Achievement of substantially higher level of complete remissions and longer survival of patients is related to the use of new drugs in clinical practice (proteasome inhibitors, IMiD, monoclonal antibodies) [1]. Despite this, the optimal treatment of patients with MM is not well defined, in part because these patients are underrepresented in clinical studies. Autologous stem cell transplantation (ASCT) after high dose melphalan chemotherapy can result in prolonged response duration and survival in patients under 65 years of age [6]. Having analyzed our group of patients we have concluded that patients with ASCT carried out have longer Overall survival (OS) and Progression-free survival (PFS) compared to patients treated with standard chemotherapeutic protocols (**Graph 1a and 1b**). OS is also affected by patients' age and the value of platelets. Namely, we

have concluded that patients over 60 and with the number of platelets under  $130 \times 10^9/l$ , are more likely for lower overall survival OS (**Graph 2a and 2b**). A research by the Nordic Myeloma Study group indicated that survival was affected by beta 2 microglobulin values and patients' age.

We have concluded that patients with bone lesions and bone marrow infiltration higher than 60% have less time until disease progression (PFS), but without affecting OS (**Table 2, Graph 3a and 3b**).

Recent results of published studies indicated significant impact of the number of platelets, LDH and CPR values at the moment of diagnosis on the outcome of the treatment of patients with MM. Also it was verified that low MPV (mean platelet volume) values represent unfavorable prognostic parameter for overall survival in patients with MM.

## Conclusion

Our study showed autologous stem cell transplantation is a more effective method of treatment of patients with Bence-Jones myeloma compared to the conventional chemotherapy. Overall survival and progression free survival are affected by the age, the number of platelets, bone lesions and marrow infiltration. It is necessary in the era of new treatment approaches to find additional prognostic parameters for the purpose of projecting survival rate in Bence-Jones multiple myeloma patients.

## References

1. Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3076-84.
2. Cavo M, Palumbo A, Zweegman S, Dimopoulos MA, Hajek R, Pantani L, et al. Upfront autologous stem cell transplantation (ASCT) versus novel agent-based therapy for multiple myeloma (MM): a randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM trial). *J Clin Oncol*. 2016; 34(15 Suppl):ab. 8000.
3. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos MV, Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(Suppl 4):iv52-61.
4. Anderson KC, Alsina M, Atanackovic D, Biermann JS, Chandler JC, Costello C, et al. Multiple myeloma, version 2.2016: Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015 Nov;13(11):1398-435.
5. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863-9.
6. Richardson PG, Laubach JP, Munshi NC, Anderson KC. Early or delayed transplantation for multiple myeloma in the era of novel therapy: does one size fit all? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):255-61.

Rad je primljen 15. IX 2017.

Recenziran 1. X 2017.

Prihvaćen za štampu 5. X 2017.

BIBLID.0025-8105:(2017):LXX:Suppl 1:57-61.