

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Maja Peruničić Jovanović

**IMUNOHISTOHEMIJSKI PROGNOŠTIČKI BIOMARKERI U
DIFUZNOM B KRUPNOĆELIJSKOM LIMFOMU**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Maja Peruničić Jovanović

**IMMUNOHISTOCHEMICAL PROGNOSTIC BIOMARKERS
IN DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2015.

MENTOR:

Prof. dr Biljana Mihaljević, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu.

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Ivan Boričić, redovni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

2. Prof. dr Milena Todorović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

3. Prof. dr Slavica Knežević Ušaj, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Novom Sadu

DATUM ODBRANE: _____

Zahvaljujem se mentoru, Prof. dr Biljani Mihaljević, na stručnim savetima tokom oblikovanja teme i izrade disertacije, kao i na podršci i razumevanju uloge patologije u svakodnevnom kliničkom radu.

Zahvaljujem se cenjenim članovima komisije, Prof. dr Ivanu Boričiću, Prof. dr Slavici Knežević Ušaj i Prof. dr Mileni Todorović na stručnim savetima i veoma korisnim sugestijama prilikom izrade i korekcije ovog rada.

Posebno se zahvaljujem kolegama sa Klinike za Hematologiju, Kliničkog Centra Srbije,

Prof dr Andriji Bogdanoviću, dr Ljubomiru Jakoviću, dr Bošku Anđeliću, dr Darku Antiću i dr Jeleni Jeličić na dragocenoj pomoći u tehničkoj realizaciji i obradi rezultata istraživanja.

Veliku zahvalnost dugujem dr Vesni Čemerikić Martinović, što je na mene prenela svoju ljubav prema hematopatologiji i nesebično podelila svoje znanje. Dr sci biologu Mariji Denčić Fekete se zahvaljujem na obradi i prezentovanju rezultata FISH analize. Takođe se zahvaljujem laboratoriji Beo-lab na tehničkoj podršci, a dr Vanji Zeremski na ustupljenom antitelu c-Myc.

Dr Novici Boričiću i Doc dr Tatjani Terzić se zahvaljujem na stručnoj pomoći i korisnim savetima prilikom izrade tkivnog mikroniza.

Zahvaljujem se Prof dr Sanji Milenković, na korisnim savetima koji su doprineli uspešnom završetku istraživanja u formi koja je prezentovana.

Veliku zahvalnost dugujem mojim laborantkinjama, Branki Rakonjac i Borki Konstantinović, koje su svojim vrhunskim umećem doprinele izradi ovog rada, na nesebičnoj stručnoj i prijateljskoj podršci.

Svojoj porodici se zahvaljujem na podršci i razumevanju.

SAŽETAK

Difuzni B krupnoćelijski limfom (DBKL) je najčešći limfoidni tumor i čini oko 30-40% svih non-Hodgkin limfoma (NHL) kod odraslih, sa petogodišnjim preživljavanjem oko 50%. Difuzni B krupnoćelijski limfom je bolest sa značajnom kliničkom, morfološkom, genetskom i molekularnom heterogenošću.

Uprkos različitim kliničkim, morfološkim i molekularnim parametrima koji se koriste u klasifikaciji humanih maligniteta danas, pacijenti sa identičnom dijagnozom imaju značajno različit klinički tok bolesti i odgovor na terapiju. Iako je u poslednje dve decenije postignut značajan napredak u terapiji, dodavanjem rituximab-a standardnoj hemioterapiji, ishod bolesti je fatalan za skoro polovinu pacijenata sa DBKL.

Mnoge studije su ispitivale prognostičke faktore koji bi predvideli preživljavanje i optimizovale terapijsku strategiju kod pacijenata sa DBKL. Do sada, samo se Internacionalni Prognostički Indeks (IPI), rutinski koristi kao prediktor preživljavanja kod bolesnika sa DBKL.

Cilj našeg istraživanja je bio da se utvrdi klinički značaj i prognostička vrednost imunofenotipskih profila DBKL, baziranog na konceptu porekla ćelije (na osnovu algoritma Hans i saradnika): GCB i non-GCB, kao i analiza korelacije ovih grupa sa IPI, onkogenim, proliferativnim i markerima uključenim u apoptozu. Takođe, cilj je bio analiza ekspresije onkogenih, proliferativnih i markera uključenih u apoptozu i njihova korelacija sa ishodom bolesti.

Analizirali smo imunohistohemijsku ekspresiju CD20, CD79 α , CD3, CD5, CD10, bcl-2, bcl-6, MUM-1, CD138, CD30, HLA-DR, Survivin, BAX, p53, MYC i Ki 67 na parafinskim uzorcima biopsija 115 pacijenata sa DBKL koji su dijagnostikovani i lečeni na Institutu za Hematologiju Kliničkog Centra Srbije u Beogradu u periodu od 2000-2006. godine. Metoda fluorescentne in situ hibridizacije za MYC i bcl-2 urađena je na 67 uzoraka primenom metode tkivnog mikroniza (tissue microarray -TMA).

Grupa analiziranih bolesnika je bila relativno mlada, sa posečnom starošću od 56 godina. Na prezentaciji, 85 (74%) pacijenata je bilo u III i IV kliničkom stadijumu, a 30 (26%) u I i II kliničkom stadijumu. Visok IPI je bio prisutan kod 54 (47%) pacijenta, B simptome je imalo 90 (78%), a povišenu LDH 74 (65%) pacijenta.

U analiziranoj grupi pacijenata bilo je 106 (92,17%) DBKL NOS, (103 centroblastni, 1 imunoblastni, 2 anaplastična), 4 (3,47%) T ćelijama /histiocitima bogat B limfom, 2 (1,73%) primarna medijastinalna, 2 (1,73%) primarna DBKL centralnog

nervnog sistema i 1 (0,86%) intravaskularni. U grupi DBKL NOS centroblastnih (103), u skladu sa algoritmom Hans i saradnika, GCB fenotip je ustanovljen kod 28 (27%) i non GCB kod 75 (73%) pacijenata.

Subklasifikacija na bazi porekla ćelije (COO) nije imala značajan uticaj na preživljavanje ni u grupi pacijenata lečenih samo standardnom terapijom bez rituximab-a (GCB vs non GCB, log rank, $p=0,787$), kao ni u R CHOP terapijskoj grupi (OS 72% vs 57%, GCB vs non GCB, log rank, $p=0,256$).

Visok IPI značajno utiče na ukupno preživljavanje (75% vs. 25%, $p=0,000$) u obe terapijske grupe i identifikovan je kao nezavisan prognostički faktor preživljavanja.

Petogodišnje ukupno preživljavanje u grupi pacijenata koji su lečeni hemoterapijom i Rituximab-om je bilo značajno bolje u odnosu na pacijente koji su lečeni standardnom hemoterapijom bez Rituximab-a (61% vs 38%, $p=0,007$).

Dodavanje rituximab-a standardnoj hemioterapiji nije poboljšalo ukupno preživljavanje pacijenata sa Bcl-6 pozitivnim DBKL, (51% vs 47%, $p=0,568$), ali pacijenti sa Bcl-6 negativnim DBKL su imali značajno bolje ukupno preživljavanje u R CHOP u odnosu na CHOP grupu (73% vs 25%, $p=0,001$).

Ekspresija Bcl-2 proteina nije imala uticaj na ukupno preživljavanje ni u grupi pacijenata lečenoj imunochemioterapijom ($p=0,901$), ni u CHOP grupi ($p=0,267$). Dodavanje rituximab-a standardnoj hemioterapiji je značajno poboljšalo ukupno preživljavanje pacijenata koji su imali Bcl-2 pozitivan DBKL (60 vs 29%, $p=0,008$), ali ne i onih koji su imali Bcl-2 negativan DBKL (59% vs 53%, $p=0,456$).

Nije uočena statistički značajna korelacija BCL2 i MYC genskih alteracija i MYC proteinske ekspresije sa ishodom bolesti.

Potvrdili smo da je IPI nezavisan prediktor preživljavanja kod pacijenata sa DBKL i da dodavanje rituximab-a standardnoj hemioterapiji značajno poboljšava ishod bolesti i produžava preživljavanje. Takođe, pacijenti sa BCL2 pozitivnim i BCL6 negativnim DBKL imaju značajan benefit od terapije R-CHOP.

Subklasifikacija na bazi porekla ćelije (COO) nije imala značajan uticaj na preživljavanje ni u jednoj terapijskoj grupi.

Ključne reči: DBKL, IHH algoritmi, BCL2+, BCL6-, R-CHOP

ABSTRACT

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common lymphoma with significant clinical, morphologic, immunohistochemical, and molecular heterogeneity. In the last two decades there has been a significant improvement in the outcome of these patients after the addition of rituximab to the standard chemotherapy. Despite major advances in treatment of DLBCL, approximately one third of patients progress or die, suggesting the existence of additional oncogenic events.

By now, only the International Prognostic Index (IPI), based on 5 independent clinical and laboratory parameters, was routinely used as a predictor of survival. However, a substantial variability in outcome has been observed despite IPI subgroups.

The aim of the study was to identify new immunohistochemical prognostic biomarkers in diffuse large B cell lymphoma and to evaluate the prognostic value of the immunohistochemical (IHC) algorithm based on the cell-of-origin (COO) concept, and BCL2 and MYC protein expression and gene alterations in DLBCL patients treated with CHOP or R-CHOP chemotherapy, and to correlate these parameters with IPI.

We analyzed immunohistochemical expression of CD20, CD79 α , CD3, CD5, CD10, bcl-2, bcl-6, MUM-1, CD138, CD30, HLA-DR, Survivin, BAX, p53, MYC and Ki 67 on paraffin-embedded formaline fixed tumor samples from 115 patients with DLBCL, diagnosed and treated at the Clinic for Haemathology, Clinical Center of Serbia, over a five year period. Fluorescence in Situ hybridization for MYC and BCL2 gene alterations was performed on 67 samples using TMA.

The cohort consisted of relatively young patients with a median age of 56 years. High IPI was present in 54 (47%) patients, advanced Ann Arbor stage (III-IV) in 85 (74%), B-symptoms in 90 (78%), and high serum LDH levels in 74 (65%) patients.

In the cohort, there were 106 (92,17%) DLBCL NOS, (103 centroblastic, 1 immunoblastic, 2 anaplastic), 4 (3,47%) T cell rich B lymphoma, 2 (1,73%) mediastinal large B cell lymphoma, 2 (1,73%) CNS lymphoma and 1 (0,86%) intravascular type. DLBCL with centroblastic morphology (103), were selected to provide morphological homogeneity of the cases, and according to the Hans algorithm, a GCB phenotype was observed in 28 (27%) and non-GCB in 75 (72%) cases.

Forty six (44,66%) patients received CHOP or CHOP- like therapy, and 57 (55,33%) patients received R-CHOP therapy.

High IPI significantly influenced poor outcome and it was identified as independent prognostic factor for survival (75% vs 25%, $p=0.000$). Unfavorable variables predicting OS were: high IPI, bulky disease, high serum LDH levels and B-symptoms in the CHOP group ($p=0.000$, $p=0.02$, $p=0.000$, $p=0.05$, respectively) and high IPI, advanced Ann Arbor stage (III-IV) and B-symptoms in the R-CHOP therapy group ($p=0.002$, $p=0.01$, and $p=0.05$, respectively).

The 5-year OS was 61% in the rituximab group and 38% in the group treated with standard chemotherapy alone ($p=0.007$). The 5-year EFS was 60 and 36% for the rituximab and chemotherapy-alone groups, respectively ($p=0.007$).

Rituximab-treated patients in the GCB subgroup had better OS and EFS than those in the non-GCB subgroup (OS 72 vs 57%, $p=0.256$; EFS $p=0.332$), but the difference did not reach statistical significance. Subclassification on the basis of the COO was not predictive of survival in patients treated with standard chemotherapy alone (GCB vs non-GCB, $p=0.7$).

The addition of rituximab to standard chemotherapy did not improve the OS of patients in the BCL6 positive group, (51 vs 47% $p=0.568$), but patients with BCL6 negative DLBCL had significantly better survival in the R-CHOP group than those treated with standard chemotherapy alone (73% vs 25%, $p=0.001$).

Our study showed that expression of BCL2 protein was not predictive of OS in either group treated with rituximab ($p=0.901$), or the group treated with standard chemotherapy alone ($p=0.267$). Additionally, we confirmed that rituximab significantly benefits BCL-2 positive but not BCL-2 negative cases.

We have confirmed that IPI is independent prognosticator for DLBCL patients and that the addition of rituximab significantly improves survival. Furthermore, patients with BCL2+ and BCL6- DLBCL had benefit from R-CHOP.

Neither single antigen expression nor the differentiation profile assessed by IHC algorithms was able to predict OS significantly.

Key words: DLBCL, IHC algorithm, BCL2+, BCL6-, R-CHOP

1. UVOD	1
1.1. Definicija	1
1.2. Istorijat klasifikacije limfoma	1
1.3. Zrele B ćelijske neoplazme	2
1.4. Razvoj i sazrevanje B ćelija	3
1.5. Difuzni B krupnoćelijski limfom (DBKL)	4
1.5.1. Difuzni B krupnoćelijski limfom, NOS	7
1.5.1.1. Morfološke varijante	7
1.6. Imunofenotip i genska ekspresija	9
1.6.1.1. B ćelijska diferencijacija	9
1.6.1.2. Apoptotski proteini	12
1.6.1.3. Molekuli regulatori ćelijskog ciklusa	13
1.6.1.4. Imunohistohemijska dijagnostika DBKL	15
1.6.1.5. Molekularne podgrupe	16
1.6.1.6. Imunohistohemijske podgrupe	16
1.7. Podtipovi Difuznog B krupnoćelijskog limfoma	19
1.8. Ostali limfomi krupnih B ćelija	20
1.9. Neklasifikovani tipovi DBKL	23
1.10 Infiltracija kostne srži kod limfoproliferativnih bolesti	26
1.11 Klinički prognostički faktori	28
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3. MATERIJAL I METODE	32
3.1. Histološka i imunohistohemijska analiza	32
3.2. Tkivni mikroniz (tissue microarray -TMA)	33
3.3. Imunohistohemijski algoritmi	34
3.4. Metoda Fluorescentne in situ hibridizacije (FISH)	34
3.5. Klinički parametri	35
3.6. Statistička obrada rezultata	36
4. REZULTATI	37
4.1. Kliničke karakteristike ispitivanih pacijenata	37
4.2. Lokalizacija DBKL	42
4.3. Morfološka i imunohistohemijska analiza	45
4.4. Terapijski pristup	48
4.5. Prognostički značaj imunohistohemijskih markera	53
4.6. Subklasifikacija na bazi COO (GCB, non GCB podtip)	57
4.7. Analiza ekspresije Bcl-2	59

4.8. Analiza ekspresije MYC	62
4.9. Analiza ekspresije Ki 67	66
4.10. Analiza ekspresija p53, Bax i survivina	67
5. DISKUSIJA	70
6. ZAKLJUČAK	79
7. LITERATURA	80
SKRAĆENICE	96

1. UVOD

1.1. Definicija

Difuzni B krupnoćelijski limfom (DBKL) je bolest sa značajnom kliničkom, morfološkom, genetskom i molekularnom heterogenošću (1,2).

Uprkos različitim kliničkim, morfološkim i molekularnim parametrima koji se koriste u klasifikaciji humanih maligniteta danas, pacijenti sa identičnom dijagnozom imaju značajno različit klinički tok bolesti i odgovor na terapiju (2-4). Iako je u poslednje dve decenije postignut značajan napredak u terapiji, ishod bolesti je fatalan za skoro polovinu pacijenata sa DBKL (3).

Mnoge studije su ispitivale prognostičke faktore koji bi predvideli preživljavanje i optimizovale terapijsku strategiju kod pacijenata sa DBKL (3-7).

1.2. Istorijat klasifikacije limfoma

Tokom poslednje četvrtine 20.-og veka došlo je do značajnog napretka u razumevanju i klasifikaciji limfoma, što je, pre svega, rezultat ostvarenog progressa u imunologiji. Pionirskim radom Aleksandra A. Maksimova, prvog hematopatologa, pre više od 100 godina, postavljena je osnova za razvoj tehnika izrade histoloških preparata visokog kvaliteta, koji su preduslov za morfološku dijagnozu, kao i za aplikaciju antitela u imunohistohemijskoj dijagnostici (1, 8-11).

Klasifikacija limfoma stalno evoluirala, još od kako je prvi put prepoznata bolest koja se razlikuje od drugih malignih i ne-malignih stanja, od strane Tomasa Hodgkin-a 1832. godine, kasnije nazvana Hočkinova bolest (9).

Rappaport-ova klasifikacija, iz 1956. godine, bila je morfološka klasifikacija sa nekoliko kategorija. Ranih 1970.-ih godina, došlo je do burne revolucije na polju publikacija, između dve funkcionalne klasifikacije limfoma koje su povezivale maligne limfome i ćelije normalnog imunog sistema- Lukes/Collins klasifikacije iz Sjedinjenih Američkih Država i Kiel klasifikacije profesora Lennert-a i Evropskog Limfomskog Kluba. Klasifikacija NCI (National Cancer Institute) objavljena 1982. godine, bila je korak unazad u odnosu na morfološku klasifikaciju. International Lymphoma Study Group objavila je 1994. godine REAL klasifikaciju, koja je predstavljala state-of-the-art prakse tog vremena, vrlo brzo praćena modernom klasifikacijom Svetske Zdravstvene

Organizacije (SZO, engl. World Health Organization, WHO), objavljenu 2001. i revidiranu 2008. godine (8,9).

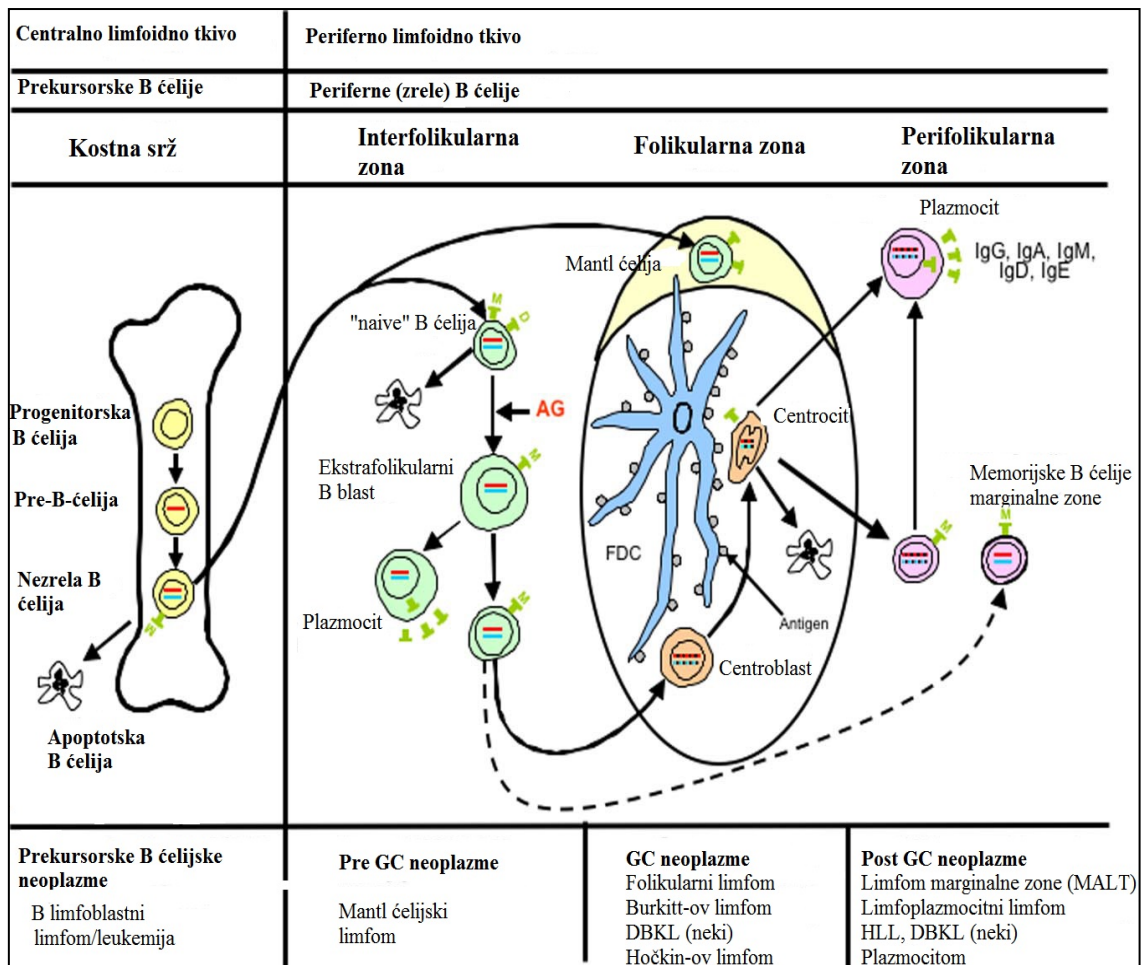
Klasifikacija SZO, koju su kreirali hematopatolozi u saradnji sa kliničkim hemato/onkolozima, prepoznaje brojne različite entitete, definisane na bazi histopatoloških, imunofenotipskih, molekularno/citogenetskih i kliničkih karakteristika (1). Klasifikacija zahteva upotrebu multiparametarskog pristupa dijagnostici limfoma iako se uglavnom oslanja na histopatologiju. Imunofenotipske analize, bilo na parafinskim presecima i/ili protočnom citometrijom su takođe od presudnog značaja skoro u svim slučajevima. Molekularno citogenetske tehnike koje se konstantno menjaju i unapređuju, imaju veoma važnu ulogu u dijagnostici, iako nisu uvek neophodne. Na kraju, ne sme se zaboraviti velika važnost kliničkih podataka u postavljanju adekvatne dijagnoze, u najboljem interesu pacijenta, što je naš prevashodni cilj (8).

1.3. Zrele B ćelijske neoplazme

U klasifikaciji SZO postoji oko 100 različitih varijanti limfoidnih maligniteta (1). Ovakav diverzitet limfoidnih neoplazmi oslikava diverzitet imunog sistema, kako u smislu raznovrsnosti funkcija tako i stadijuma diferencijacije (1, 12, 13).

Za razliku od mnogih drugih malignih tumora, zrele B ćelijske neoplazme ne nastaju kao rezultat transformacije normalne stem ćelije, već nasuprot, nastaju od limfoidnih ćelija koje sazrevaju, pa su onkogene mutacije, kao što su hromozomske translokacije, često uzrok grešaka koje nastaju tokom rearanžmana antigenih receptora. Translokacije udružene sa različitim B ćelijskim neoplazmama nastaju u različito vreme ontogeneze B ćelije (1, 12, 13). Dakle, B ćelijske neoplazme su klonalne tumorske proliferacije zrelih i nezrelih B ćelija u različitim stadijumima diferencijacije, koje u svom nastanku ponavljaju stadijume normalnog sazrevanja B ćelija, tako da je to osnova klasifikacije i nomenklature B ćelijskih neoplazmi (1, 12, 13).

1.4. Razvoj i sazrevanje B ćelija



Slika 1. Dijagramski prikaz sazrevanja B ćelije i povezanost sa B ćelijskim neoplazmama. AG antigen; FDC (engl. follicular dendritic cell); folikulo-dendritske ćelije. Crvena crta predstavlja rearanžman gena teških lanaca imunoglobulina (*IGH*); plava crta predstavlja rearanžman gena lakih lanaca imunoglobulina (*IgL*); crna tačke u crvenim i plavim crtama predstavljaju somatske hipermutacije (adaptirano prema 1).

B ćelijske neoplazme korespondiraju sa stadijumima sazrevanja B ćelije. Razvoj i sazrevanje B ćelija počinje u kostnoj srži, gde "pre-B ćelija" nastaje od progenitorske (Pro) B ćelije, nakon rearanžmana gena teških lanaca imunoglobulina. Posledično, dolazi do rearanžmana gena lakih lanaca, rezultujući ekspresijom celog molekula imunoglobulina na površini ćelije, koji ima ulogu receptora za antigene. Sa produkcijom ovih nezrelih B ćelija, inicijalna faza razvoja B ćelije je kompletirana. Nezrela B ćelija je tako definisana sve dok nije sposobna da inicira imuni odgovor na strane antigene (1).

B ćelija stiče ovu sposobnost samo napuštajući kostnu srž, prolazeći krvnom strujom i ulazeći u periferno limfoidno tkivo, gde migrira u spoljašnji region limfnog

čvora, u primarne folikule i kasnije u mantl zonu limfoidnih folikula. Ovaj diferencijacioni korak je udružen sa dodatnom ekspresijom IgD. Ove IgM+/IgD+ B ćelije su poznate kao „naivne“ zrele B ćelije. Kada ove ćelije dođu u kontakt sa antigenom (AG), koji se vezuje za njihove imunoglobulinske molekule, one se transformišu u proliferišuće ektrafolikularne B blaste, od kojih nastaju kratkoživeće plazma ćelije i „antigen-indukovane“ B ćelije. Ove B ćelije iniciraju i održavaju reakciju germinativnog centra, tokom koje se transformišu u brzo proliferišuće centroblaste. Tokom mitotske proliferacije i diferencijacije centroblasta u centrocite, dolazi do somatske hipermutacije (predstavljene vertikalnim linijama na slici 1). Centroblasti, transformisane ćelije GC, mogu pretrpeti apoptozu ili se razviti u centrocite. Centroцити, uz dodatne mutacije (zbog kojih dolazi do povećanog afiniteta za imunoglobulinski receptor) izlaze iz germinativnog centra i dalje se diferenciraju u dugoživeći plazmocit ili u memorijske B ćelije, koje ostaju u marginalnoj zoni. Mnoge B ćelije se aktiviraju unutar GC, ali aktivacija zavisna od T ćelija koja se dešava van GC, takođe može uticati na nastanak memorijskog tipa B ćelija.

Kao rezultat različitih faza diferencijacije B ćelija i somatskih mutacionih procesa, 3 glavne zrele forme B ćelija se mogu razlikovati:

- „Naivne“ zrele B ćelije (recirkulišući i sesilni podtipovi)
- B ćelije germinativnog centra (GC) (centroblasti i centroцити)
- B ćelije van germinativnog centra (postgerminativne) koje uključuju memorijske B ćelije i dugoživeće plazmocite.

Od svih ovih različitih formi B ćelija nastaju B ćelijski limfomi, koji se među sobom razlikuju klinički i čije biološko ponašanje nije uslovljeno samo transformacionim događajem već i bitnim karakteristikama porekla ćelije. Klasični Hočkin-ov limfom (HL), u kome su fenotipske i kliničke karakteristike predominantno određene transformacionim događajem je izuzetak od ovog pravila (1).

1.5. Difuzni B krupnoćelijski limfom (DBKL)

Difuzni B krupnoćelijski limfom (DBKL) je najčešći limfoidni tumor i čini oko 30-40% svih non-Hodgkin limfoma (NHL) kod odraslih, sa petogodišnjim preživljavanjem oko 50% (1).

Predstavlja grupu tumora, koja je heterogena po svom kliničkom ishodu, morfologiji, imunofenotipu, molekularnoj genetici i citogenetici (1, 2, 5). Morfološka,

biološka i klinička heterogenost DBKL je prepoznata od strane Svetske Zdravstvene Organizacije, tako da u klasifikaciji SZO iz 2008. postoje različite morfološke varijante DBKL, molekularne i imunohistohemijske podgrupe DBKL, kao i različiti klinički entiteti. DBKL koji nisu drugačije specifikovani (engl. not otherwise specified, NOS) obuhvataju one tipove DBKL koji ne pripadaju specifičnim podtipovima ili entitetima (1, 5, 6).

Promene u klasifikaciji limfoma, koje su rezultat novih saznanja nastalih na osnovu kliničkih i laboratorijskih istraživanja, su pokušaj da se bolje definiše heterogenost ovih bolesti. Klasifikacija limfoma iz 2008. godine, predviđa prepoznavanje ranih i *in situ* lezija, prepoznavanje starosne dobi kao karakteristike određenih limfomskih entiteta, kako kod starijih osoba tako i kod dece, kao i prepoznavanje graničnih, (engl. „border-line“) kategorija (5, 6, 14). Takođe, u Četvrto izdanje klasifikacije Tumora Hematopoetskog i Limfoidnog tkiva, uključeni su i neki provizionalni entiteti (1, 5, 6, 14) (Tabela 1).

Tabela 1. Difuzni B krupnoćelijski limfomi:varijante, podgrupe i podtipovi/entiteti *Difuzni*

B krupnoćelijski limfom, (DBKL) NOS

Morfološke varijante

Centroblastni

Imunoblastni

Anaplastični

Retke morfološke varijante

Molekularne podgrupe

* GCB tip

◇ ABC tip

Imunohistohemijske podgrupe

CD5 + DBKL

GCB

□ Non-GCB

Difuzni B krupnoćelijski limfom, podtipovi

DBKL T-ćelijama/histiocitima bogat

Primarni DBKL centralnog nervnog sistema

Primarni kutani DBKL, (engl. leg type)

EBV pozitivni DBKL starijih

Ostali limfomi krupnih B ćelija

Primarni medijastinalni B krupnoćelijski limfom

Intravaskularni B krupnoćelijski limfom

DBKL udružen sa hroničnom inflamacijom

Limfomatoidna granulomatoza

Intravaskularni B krupnoćelijski limfom

ALK+ B krupnoćelijski limfom

Plazmablastni limfom

Krupnoćelijski limfom udružen sa HHV8+ Castleman-ovom bolešću

Primarni efuzioni limfom

Granični slučajevi

B-ćelijski limfom, neklasifikovan, sa karakteristikama između DBKL i Burkitt-ovog limfoma

B-ćelijski limfom, neklasifikovan, sa karakteristikama između DBKL i Hodgkin-ovog limfoma

Skraćenice: * GCB tip (tip B ćelija germinativnog centra) ◇ ABC tip (tip aktiviranih B ćelija) □ Non-GCB (tip koji nije porekla germinativnog centra)

(adaptirano prema 1)

1.5.1. Difuzni B krupnoćelijski limfom, NOS (Diffuse large B cell lymphoma, not otherwise specified; DLBCL, NOS)

Difuzni B krupnoćelijski limfomi, NOS, obično nastaju *de novo*, kao primarni, ali mogu nastati i transformacijom manje agresivnih limfoma kao što su hronična limfocitna leukemija, folikularni limfom, limfom marginalne zone ili limfoplazmocitni limfom. Bolest se prezentuje kao brzorastuća nodalna ili ektranodalna tumorska masa, kod imunokompetentnih, ali i kod pacijenata sa različitim oblicima imunosupresije (1,2).

Iako se DBKL NOS javlja u svim životnim dobima, najčešće se javlja u sedmoj deceniji. Nešto je češći kod muškaraca u odnosu na žene. Često se prezentuje kao uvećanje limfnih čvorova, mada oko 40% pacijenata u vreme postavljanja dijagnoze ima dokazano prisustvo bolesti van limfnih čvorova. Najčešća ektranodalna lokalizacija je gastrointestinalni trakt, ali se infiltracija javlja i u respiratornom traktu, kostima, testisima, slezini, Waldeyer-ovom prstenu, pljuvačnim žlezdama, jetri, štitastoj žlezdi, bubrezima, itd. (1, 2).

Kao i kod većine limfoma, makroskopski izgled tkiva zahvaćenog difuznim B krupnoćelijskim limfomom pokazuje beličastu, homogenu površinu preseka. Limfni čvorovi su uvećani, a ponekad se mogu videti područja krvavljenja, nekroze ili fibroze.

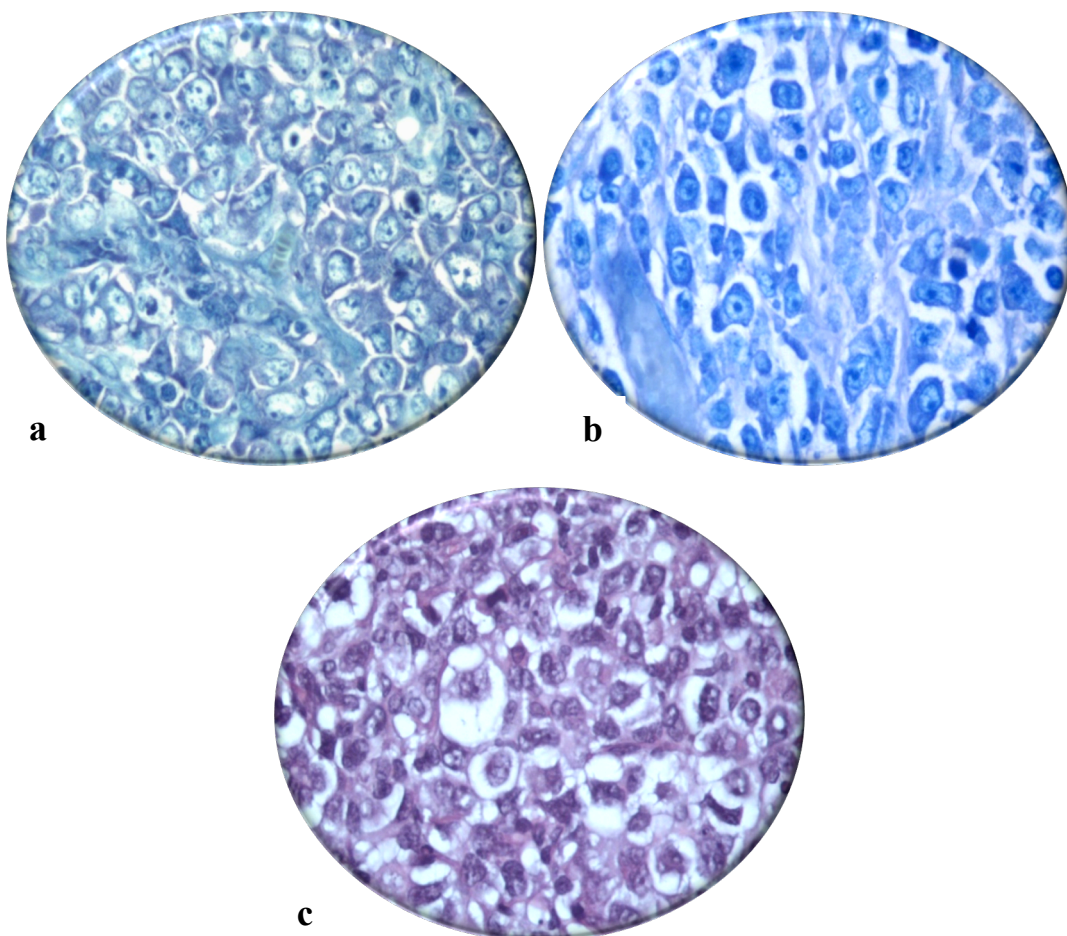
Difuzni B krupnoćelijski limfom često kompletno zamenjuje normalnu arhitekturu limfnog čvora, mada se u pojedinim slučajevima može videti parcijalna zahvaćenost limfnog čvora. Takođe, infiltracija može biti interfolikularna ili sinusoidalna. Često je zahvaćeno perinodalno tkivo.

DBKL je neoplazma difuznog tipa rasta, sastavljena od krupnih limfoidnih ćelija, krupnog jedra veličine jedra makrofaga ili dva i više puta veće od normalnog limfocita, koje eksprimiraju B ćelijske antigene (CD20, CD79 α ili Pax-5) (1, 2, 5, 6, 15, 16).

1.5.1.1. Morfološke varijante

Citomorfološki, DBKL je raznolik i može biti podeljen na grupu uobičajenih i retkih morfoloških varijanti. Uobičajene morfološke varijante su: centroblastni, imunoblastni i anaplastični tip. Ovakva podela nema veliki klinički značaj (1, 5).

Centroblastni tip je najčešća morfološka varijanta DBKL, sastavljena dominantno od ćelija tipa centroblasta, koji su srednje veličine i krupne, sa ovalnim ili okruglim, vezikularnim jedrima, sa dva do četiri nukleolusa koji se nalaze uz jedrovanu membranu (Slika 2a). Citoplazma je oskudna, amfofilna do bazofilna. U nekim slučajevima tumor je monomorfan, sastavljen skoro u potpunosti (>90%) od ćelija tipa centroblasta. U većini slučajeva, tumor je polimorfan, sastavljen od ćelija tipa centroblasta i imunoblasta. Polimorfni tip se karakteriše prisustvom mešovite ćelijske populacije i imunoblasti su prisutni u različitom broju (>10%-<90%). Tumorske ćelije mogu imati multilobulirana jedra (1).



Slika 2. Uobičajene morfološke varijante DBKL.

a) centroblastni (Giemsa x400), b) imunoblastni (Giemsa x400), c) anaplastični (HE x400)

Imunoblastni tip je relativno retka morfološka varijanta. Više od >90% ćelija su imunoblasti koji se karakterišu krupnim svetlim jedrom, sa jednim, centralno lokalizovanim nukleolusom i oskudnom, bazofilnom citoplazmom (Slika 2b).

Centroblasti mogu biti prisutni, ali predstavljaju <10% tumorskih ćelija. Imunoblasti mogu pokazivati plazmocitoidnu diferencijaciju, komplikujući dodatno postavljanje dijagnoze. Iako neke studije pokazuju da imunoblastni limfom ima goru prognozu nego centroblastni, druge to nisu potvrdile (1).

Anaplastični tip je retka varijanta koja se karakteriše krupnim, pleomorfnim ćelijama koje se pretežno nalaze unutar sinusa i pokazuju kohezivni način rasta (Slika 2c). Neke od ovih ćelija mogu podsećati na Hočkinove i Reed-Sternberg-ove ćelije. U svakom slučaju, ovi slučajevi se biološki razlikuju od anaplastičnog krupnoćelijskog limfoma T/nultog fenotipa koji pokazuje ekspresiju ALK-1 proteina. Velika većina ovih slučajeva pokazuje ekspresiju CD30.

Retke morfološke varijante. U retkim slučajevima, DBKL NOS, može imati mikroidnu stromu ili fibrilarni matriks. U nekim slučajevima tumorske ćelije mogu formirati pseudorozete. Ponekada su tumorske ćelije vretenaste ili imaju izgled ćelija pečatnog prstena (engl. „signet-ring“) (1).

1.6. Imunofenotip i genska ekspresija

Dijagnostika limfoproliferativnih bolesti po klasifikaciji SZO, podrazumeva obaveznu detaljnu imunofenotipsku analizu tkiva, tako da se dijagnoza postavlja na osnovu morfološkog izgleda i imunohistohemijskih karakteristika. Imunohistohemijska analiza je postala integralni deo dijagnostičke hematopatologije i neophodna je u dijagnostici limfoma (16, 17). Ograničen panel antitela (CD20, CD79 α , CD10, BCL-6, MUM-1/IRF-4 i CD138) može mnogo pomoći u svrstavanju različitih tipova limfoma u skladu sa morfološkim izgledom i stepenom diferencijacije (16-18). Određeni markeri korespondiraju sa setom ključnih proteina uključenih u ćelijski ciklus, apoptozu i B ćelijsku diferencijaciju (18).

1.6.1.1. B ćelijska diferencijacija

CD20 je protein koji se eksprimira na membrani B limfocita i učestvuje u njihovoj aktivaciji i proliferaciji. Ne eksprimira se na pro-B ćelijama, hematopoetskim ćelijama i plazmocitima (1,2, 16-18).

CD79 α je protein koji se nalazi na površini B limfocita i to od nezrelih pre-B do zrelih B ćelija i plazmocita. Odsutan je na drugim zdravim humanim ćelijama tako da se može koristiti kao visoko specifičan marker B ćelija (1,2, 16-18).

CD5 je protein koji se nalazi na T limfocitima ali se eksprimira na ćelijama B limfoma (17, 18). Ekspirira se kod većine pacijenata sa hroničnom limfocitnom leukemijom i mantl ćelijskim limfomom, ali samo u 10% DBKL (1, 17, 18). CD5 pozitivni DBKL se najčešće javljaju kod starijih žena, u uznapredovalom stadijumu bolesti, sa visokim nivoom serumske laktat dehidrogenaze (LDH) i visokim IPI skorom.

BCL6 je proto-onkogen koji se eksprimira u normalnim B ćelijama germinativnog centra (1, 16, 17, 20, 21). BCL6 je najčešća hromozomska translokacija detektovana kod DBKL. Neophodan je u formiranju germinativnog centra. Normalna funkcija BCL6 u B ćelijama germinativnog centra (GC) je da olakšava somatsku hipermutaciju, proces koji generiše raznovrsnost antitela i povećava afinitet antigena supresijom apoptoze uzrokovane posredstvom p53, kao odgovor na oštećenje DNK. BCL6 je odgovoran za diferenciranje normalne B ćelije germinativnog centra u memorijske B ćelije ili plazmocyte (1, 16, 17, 20, 21). Ekspresija BCL6 kao rezultat translokacije, mutacije ili drugih mehanizama može doprineti limfomogenezi preko zastoja u sazrevanju ili patološke ekspanzije B ćelija germinativnog centra (20,21).

BCL6 se eksprimira skoro uvek u limfocitima GC ili limfomima porekla germinativnog centra (8,9). Ekspirira se u oko 30% DBKL, u obe grupe (porekla germinativnog centra i postgerminativni). Prognostički značaj ekspresije BCL6 je kontroverzan, ali je obično udružen sa boljom prognozom kod pacijenata sa DBKL (8, 9, 16, 17, 20, 21).

CD10 protein je metaloproteinaza na površini ćelije, koja redukuje ćelijski odgovor na peptidne hormone (1, 2, 5, 6). Takođe poznat kao CALLA (engl. common acute lymphoblastic leukemia antigen), neutralna endopeptidaza, prvi se pojavljuje na pro-B ćelijama tokom diferencijacije limfocita i prvi se gubi tokom sazrevanja B ćelije (8). CD10 se ponovo pojavljuje na površini ćelije tokom antigen-zavisnog sazrevanja u germinativnom centru i tako služi kao marker ćelije koja je porekla GC (8). Među hematopoetskim ćelijama, CD10 se eksprimira u nezrelim B i T ćelijama, B ćelijama GC, granulocitima i različitim limfoidnim malignitetima. CD10 se eksprimira u skoro svim Burkitt-ovim limfomima, u većini folikularnih limfoma i u oko 30-40% DBKL, dok je u limfomima marginalne zone i mantl ćelijskom limfomu CD10 negativan.

Analiza ekspresije CD10, markera ćelija porekla GC kao prognostičkog faktora kod DBKL dala je konfliktne rezultate (7, 8, 16, 17, 21-25).

MUM1/IRF4, član familije Interferon regulatornih faktora (IRF4), je onkogen koji se aktivira kao rezultat translokacije t(6;14)(p25,q32) (1,8). To je transkripcioni faktor specifičan za ćelije hematopoeze koji reguliše sazrevanje i diferencijaciju imunih ćelija. Članovi IRF familije su uključeni u važne ćelijske procese kao što su odgovor na patogene činioce, citokine i apoptozu (1,8). U kulturi ćelija i tkivima, MUM1 se jako eksprimira u jedru, što je očekivano s obzirom na to da MUM1 deluje kao transkripcioni faktor. U normalnim limfohematopoetskim tkivima, MUM1 protein se eksprimira uglavnom u B ćelijama. Najupečatljivija karakteristika MUM1 antitela u tkivnim isečcima je da se eksprimira u jedru i citoplazmi zrelih plazmocita, dok drugi B ćelijski tipovi, kao što su GC B ćelije, kao i „virgin“ B limfociti mantle zone limfnih folikula ne ekspimiraju MUM1 protein (16,17). Ovakav nalaz govori o tome da MUM1 protein igra ključnu ulogu terminalnoj fazi diferencijacije B limfocita u pravcu plazmocita. MUM1 je marker terminalne diferencijacije B ćelija (8).

Ekspresija MUM1 proteina je udružena sa mnogim limfoidnim neoplazmama. (16, 17, 25, 26) Oko 75% DBKL eksprimira MUM1 protein (27, 28). Nasuprot normalnim B ćelijama kod kojih ekspresija Bcl-6 i MUM1 isključuje jedna drugu, tumorske ćelije u oko 50% DBKL koekspimiraju MUM1 i Bcl-6 (20, 21, 29, 30).

MUM1 protein se eksprimira i u Hočkinovim i Reed-Sternberg-ovim ćelijama klasičnog HL, što podržava koncept da tumorske ćelije klasičnog HL nastaju kao rezultat klonalne ekspanzije neoplastičnih B ćelija, vezanih za neki od stadijuma diferencijacije B ćelija germinativnog centra. Takođe, MUM1 protein se eksprimira u limfomima koji nastaju iz aktiviranih T ćelija (25, 26).

CD138 je transmembranski proteoglikan iz sindekan familije koja učestvuje u interakcijama između ćelije i ekstracelularnog matriksa (1, 8). U normalnom limfoidnom tkivu, CD138 protein se eksprimira u plazmocitima i B prekursorima iz kostne srži. Među B ćelijskim neoplazmama, CD138 se eksprimira na površini tumorskih ćelija u multiplom mijelomu, Hočkinovom limfomu i nekim limfomima udruženim sa HIV infekcijom, dok su DBKL vrlo retko pozitivni (27, 29, 31, 32). CD138 protein ima važnu ulogu u rastu, preživljavanju, adeheziji i invaziji tumorskih ćelija u multiplom mijelomu (31, 32).

Nekoliko markera uključenih u apoptozu, (Bcl-2, BAX, Survivin), ili regulaciju ćelijskog ciklusa, (MIB-1 i P53), iako nisu specifični za bilo koju morfološku varijantu, mogu imati nezavisan prognostički značaj kod DBKL (1, 2, 17).

Takođe je pokazano da poremećaj apoptotskih, signalnih i efektorskih mehanizama dovodi do povećane rezistencije malignih ćelija na terapijske agense u čitavom nizu malignih oboljenja. Na taj način može da se objasni i slab odgovor na terapiju određenog broja bolesnika sa DBKL (33-35).

1.6.1.2. Apoptotski proteini

BCL2 je prvi put opisan ranih 1980.-ih godina kao translokacija t(14;18)(q32;q21) kod folikularnog limfoma (8). Kao član velike BCL2 familije, ima antiapoptotsku funkciju. Bcl-2 je antiapoptotski protein koji se nalazi na unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani i veoma je važan u normalnom razvoju i diferencijaciji B ćelija (23-24, 33). Sa retkim izuzecima, t(14;18) se pojavljuje rano u razvoju B ćelija. Bcl-2 se ekspresira u nezrelim B ćelijama i memorijskim B ćelijama, ali se privremeno gubi u B ćelijama GC, delom zbog represivne funkcije BCL6 (23,24).

Dokazano je da se ova translokacija može naći na zrelih B ćelijama kod zdravih osoba. Translokacija t(14;18) nije dovoljna da prouzrokuje limfom; ona pre može olakšati nego direktno prouzrokovati malignu transformaciju (33-36).

Ekspresija Bcl-2 proteina je prisutna u oko 40%-60% DBKL (1, 8). Ekspresija Bcl-2 proteina je samo delimično vezana za abnormalnosti BCL2 gena, pa je tako veći broj DBKL sa ekspresijom Bcl-2 proteina nego onih sa t(14;18)(q32;q21) (33-36). U odsustvu BCL2 translokacije, amplifikacija 18q21 i/ili aktivacija NF-κB (nuklearni faktor κB) puta, može prouzrokovati ekspresiju Bcl-2 proteina (37). Prognostički značaj ekspresije Bcl-2 je kontroverzan, mada su neke studije pokazale da je ekspresija Bcl-2 proteina udružena sa lošijom prognozom (36-44).

BAX je proapoptotski član familije Bcl-2 proteina, koji ima važnu ulogu kao agonist apoptoze inhibicijom funkcije BCL2. Balans između BCL-2 i BAX je veoma važan za indukciju programirane ćelijske smrti; kada BCL2 dominira, apoptoza je inhibirana, dok povišeni nivoi BAX iniciraju ćelijsku smrt (33, 36).

Osetljivost ćelija na induktore apoptoze (signal smrti) zavisi od odnosa proapoptotskih i antiapoptotskih članova proteinskih produkata BCL2 familije gena. Proteini ove familije ispoljavaju biološko dejstvo u formi homo- i heterodimera, pa

sudbina ćelije zavisi od međusobnog odnosa homo- i heterodimera (45). Predominantno prisustvo Bcl-2/Bcl-2 homodimera i/ili Bcl-2/Bax heterodimera u ćeliji uzrokuje inhibiciju procesa apoptoze. Suprotno tome, prisustvo Bax/Bax homodimera "u višku" indukuje proces apoptoze. Odnos ovih dimera je veoma značajan i smatra se vrstom autoimunog "ćelijskog reostata" koji opredeljuje vrstu ćelijskog odgovora na apoptotski stimulus (41-46). Prema tome, glavna biološka uloga proteinskog produkta Bcl-2 gena je njegova sposobnost vezivanja za Bax protein i neutralizacija njegovog proapoptotskog dejstva (41-47).

Survivin je član familije inhibitora apoptotskih proteina (IAP) (48). Survivin se eksprimira tokom embrionalnog i fetalnog razvoja, postaje nedetektabilan u normalnim tkivima odraslih osoba i značajno se eksprimira u različitim humanim tumorima. Na molekularnom nivou, survivin se eksprimira tokom mitoze, lokalizovan je u mitotskim mikrotubulama i učestvuje u reakciji inhibicije apoptoze (48-50). Povećana ekspresija survivina je udružena s lošim ishodom kod pacijenata sa određenim tipovima karcinoma pluća, kolorektalnog karcinoma i limfoma. Povećana ekspresija survivina je udružena sa kraćim petogodišnjim preživljavanjem pacijenata sa DBKL (48-51).

1.6.1.3. Molekuli regulatori ćelijskog ciklusa

P53 je tumor supresor gen, koji učestvuje kao multifunkcionalni transkripcioni faktor u prekidu ćelijskog ciklusa, apoptozi, ćelijskoj diferencijaciji, replikaciji, obnavljanju DNA, itd. (8, 46, 52).

Oštećenje DNK izazvano stresom, inicira apoptozu najvećim delom povećanjem propustljivosti mitohondrijalne membrane. U ovom procesu glavnu ulogu ima tumor supresorski gen p53, koji je lokalizovan na 20kb dugoj sekvenci 17. humanog hromozoma (53). P53 inhibira ekspresiju barem jednog antiapoptotskog proteina i vrši ekspresiju proapoptotskih članova Bcl-2 familije BAX, NOXA, PUMA koji se iz citosola translociraju na spoljašnju membranu mitohondrije i indukuju njenu propustljivost (54-58).

Transkripcioni faktor p53 protein ima ulogu kao transkripcioni supresor gen čiji su proteinski produkti potrebni za normalnu propagaciju ćelije kroz faze ćelijskog ciklusa i kao transkripcioni aktivator gena čiji su proteinski produkti uključeni u procese zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G₁ fazi i u indukciji procesa apoptoze (Bax, npr.) (55).

Mutacija TP53 se detektuje u oko 18% do 30% DBKL i u mnogim studijama je udružena sa lošijom prognozom (59-61). S obzirom na to da se prisustvo mutiranog tipa p53 može detektovati imunohistohemijski, mnogi istraživači se oslanjaju na ovu metodu (8, 46, 52, 53, 62).

Ki 67 (MIB-1) je nuklearni antigen koji se eksprimira u ćelijama u deobi, za vreme aktivnih faza ćelijskog ciklusa (G_1 , S, G_2 i M-fazi), ali je odsutan za vreme G_0 faze. Procenat Ki 67 pozitivnih ćelija označava proporciju ćelija koje su u aktivnim fazama ciklusa koje su u deobi (8). Prognostički značaj ekspresije Ki 67 kod pacijenata sa DBKL je kontroverzan (8, 29, 60). Neke studije su pokazale da je trogodišnje preživljavanje pacijenata sa DBKL značajno kraće kod onih kod kojih je ekspresija Ki67 prisutna u više od 80% tumorskih ćelija, dok su drugi autori pokazali da je više 60% pozitivnih tumorskih ćelija loš prognostički parametar (20, 29, 60, 63).

Činjenica da su korišćene različite definicije pozitivnosti može objasniti različite rezultate u objavljenim studijama (64, 65). Osim toga, povezanost ekspresije Ki 67 i ishoda bolesti je kompleksna. Tumori sa niskim prognostičkim indeksom mogu biti rezistentni na terapiju, zbog toga što je većina ćelija u G_0/G_1 fazi ciklusa pa su samim tim rezistentne na citotoksičnu terapiju. Ćelije koje su u G_0/G_1 fazi imaju vremena da poprave oštećenje na DNK indukovano hemioterapijom i tako prežive (8, 20, 29, 62, 63).

MYC je transkripcioni faktor koji kontroliše ekspresiju velike grupe gena koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa, metabolizmu, obnavljanju DNA i sintezi proteina (66). Genomske alteracije MYC gena uključuju hromozomske translokacije, mutacije koje utiču na regulatorne sekvence i regione promotore, kao i povećanje broja kopija (amplifikacije) (66, 67).

Oko 40% B ćelijskih limfoma se karakteriše prisustvom rekurentnih recipročnih hromozomskih translokacija. Neke hromozomske translokacije su patognomonične za određene vrste B ćelijskih limfoma (1,66-87). Translokacija (8;14)(q24;q21) ili različite translokacije koje utiču na lokus imunoglobulinskih lakih lanaca, koja aktivira MYC gen, smatra se za inicijacijski događaj u nastanku Burkitt-ovog limfoma (68).

Genetske abnormalnosti kod DBKL su česte. Mnogi tumori imaju rearanžman gena teških i lakih lanaca imunoglobulina, kao i somatske mutacije različitih regiona. Za razliku od nekih NHL, kao što je mantl ćelijski limfom, koji je definisan prisustvom određenih citogenetskih abnormalnosti, ne postoji genetska aberacija tipična za DBKL. Širok spektar genetskih abnormalnosti se može javiti kod DBKL, koje se detektuju

različitim citogenetskim ili FISH tehnikama. Ove anomalije se odnose na BCL6, koji se javlja u 35-40% slučajeva, BCL2, (13% translokacije i 24% amplifikacije), c-MYC u 15%, i TP53 u oko 16% slučajeva (66-87).

Limfomi sa različitim hromozomskim prekidima koji aktiviraju mnoge onkogene, od kojih je jedan MYC, često se nazivaju „Dual hit“ ili „Double hit“. Slučajevi sa MYC/8q24 i BCL2/18q21 prekidima, (BCL2+/MYC+ DH) su najčešći (66, 72, 77-79, 84, 86, 87).

U svakodnevnoj praksi veoma je važno razlikovati BL od DBKL, zbog različite prognoze i različitih terapijskih modaliteta koji se primenjuju kod ovih pacijenata. To nije uvek moguće uraditi na osnovu morfoloških i imunohistohemijskih karakteristika, pa su neophodne citogenetske analize kao i metoda fluorescentne in-situ hibridizacije (FISH) (88). Ukoliko je čak i posle svih analiza nemoguće postaviti preciznu dijagnozu, mora se upotrebiti kategorija „B ćelijski limfom, neklasifikovani, sa karakteristikama između BL i DBKL“ (1, 68). Novije studije su pokazale da se translokacija MYC gena viđa kod DBKL sa učestalošću 3-16%, što je negativan prognostički faktor, čak i kod pacijenata lečenim imunohemioterapijom (79). Slučajevi DBKL sa MYC translokacijom su heterogeni po svojim morfološkim, imunohistohemijskim, pa čak i molekularnim karakteristikama. Korelacija MYC+ DBKL sa bilo kojom od ovih karakteristika je kontradiktorna u različitim studijama objavljenim u poslednje vreme.

Nedavno je postalo dostupno komercijalno antitelo za imunohistohemijsku analizu parafinskih isečaka tkiva, pa se mnogi istraživači bave analizom prisustva MYC gena detektovanom imunohistohemijski i korelacijom sa genskim statusom (69, 70, 74, 77, 78, 83, 86). S obzirom na to da FISH analiza nije dostupna svim laboratorijama, upotreba imunohistohemije u detekciji ekspresije MYC proteina može postati lako upotrebljiva metoda.

1.6.1.4. Imunohistohemijska dijagnostika DBKL

Imunofenotip DBKL je heterogen (1, 89, 90). Ćelije DBKL ekspiriraju pan-B-ćelijske markere kao što su CD20, CD79 α i PAX 5, s tim da jedan ili više ovih markera može biti odsutan (1, 5, 6). Oko 50-75% slučajeva pokazuje membransku ili citoplazmatsku ekspresiju imunoglobulina, najčešće IgM. Oko 30% DBKL ekspirira CD10, a Bcl-6 u oko 80% slučajeva (16, 17, 20-22). Mnogi DBKL su HLA DR pozitivni. CD38 i CD138 mogu biti prisutni u različitom procentu. U nekim slučajevima

se viđa ekspresija CD30 i EMA, obično udružena sa anaplastičnom morfologijom (15). Ekspresija CD5 se viđa najviše u 10% slučajeva (1, 18, 19). Proliferativni indeks, detektovan ekspresijom Ki 67, je obično visok (više od 40% tumorskih ćelija) (1). Bcl-2 protein se eksprimira u dve trećine slučajeva (24, 29, 34). Neki DBKL su udruženi sa EBV infekcijom (91). Infekcija malignih ćelija Epstein-Barr virusom se može pokazati imunohistohemijskim bojenjem na latentni membranski protein (LMP) ili EBER in situ hibridizacijom (1, 6, 15, 91).

1.6.1.5. Molekularne podgrupe

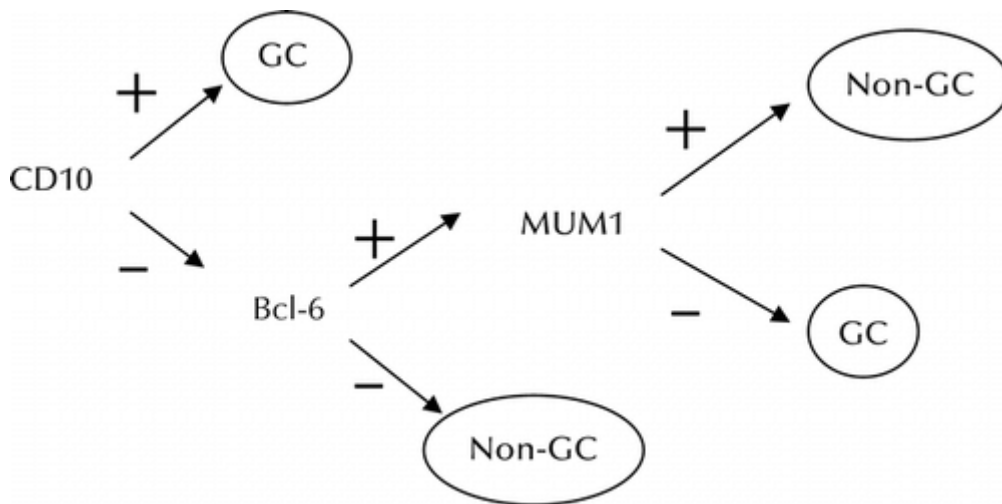
U poslednjih 10 godina, na osnovu istraživanja u oblasti molekularne genetike i imunohistohemije, napravljen je veliki napredak u subklasifikaciji DBKL u klinički relevantne grupe: tip porekla germinativnog centra (GC) i non-GC tip ili aktiviranih B ćelija (ABC) (7, 92). Stadijum diferencijacije B limfocita na kome se dešava neoplastična transformacija može definisati biološko ponašanje i ishod bolesti kod pacijenata sa DBKL (92).

Odkako su prepoznati biološki podtipovi DBKL na bazi „gene expression profiling”, istraživanje kliničkog značaja ovakve podele je postalo predmet mnogih studija (93-101). Mnoge studije su pokazale da podela DBKL na grupu tumora koji imaju profil B ćelija porekla germinativnog centra (GCB) i na grupu tumora koji imaju profil aktiviranih B ćelija (ABC odnosno “non GCB”) ima klinički značaj, odnosno da pacijenti iz GCB grupe imaju značajno bolje preživljavanje (95, 96, 98). Međutim, ovakve analize nisu lako primenljive u svakodnevnoj praksi, jer zavise od dostupnosti zamrznutih uzoraka, kao i sofisticiranih laboratorijskih metoda.

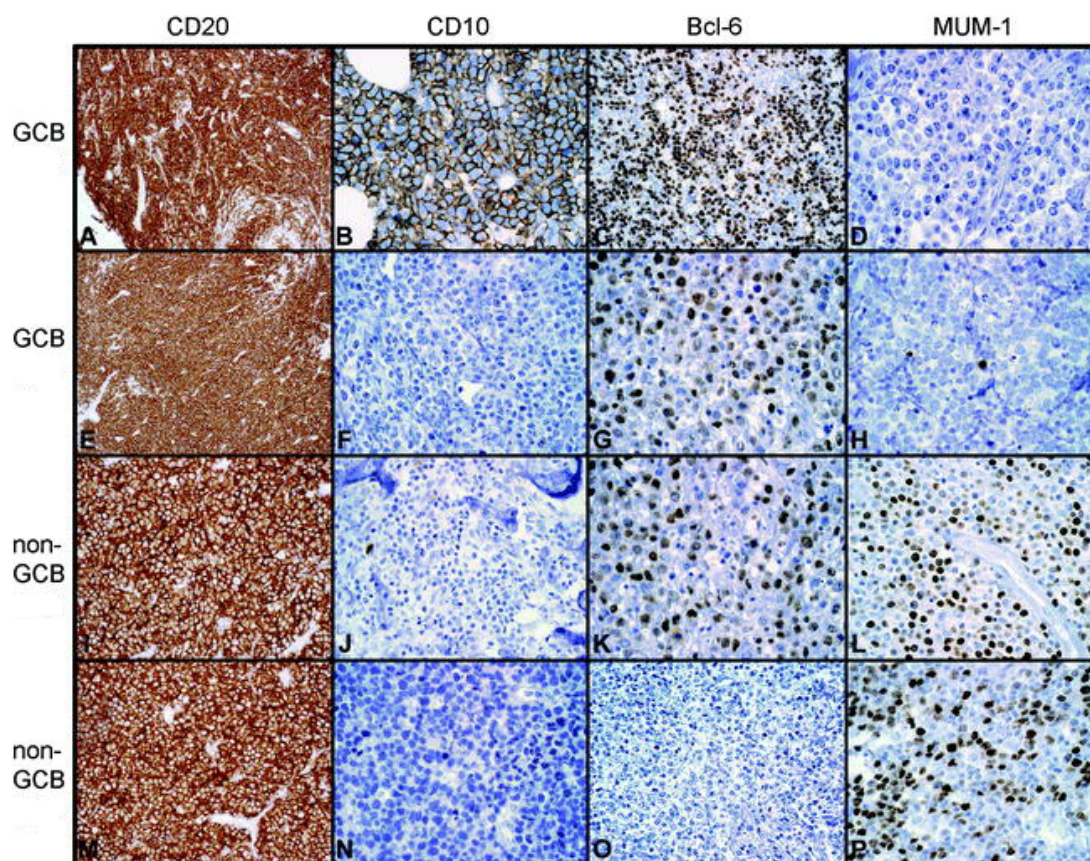
1.6.1.6. Imunohistohemijske podgrupe

Hans i saradnici su predložili algoritam (engl. „Hans Classifier”), koji je baziran na imunohistohemijskoj ekspresiji sledećih markera: CD10, bcl-6 i MUM-1/IRF4, a pomoću koga se mogu razlikovati različite grupe DBKL (102). Kombinovanom analizom ekspresije ovih antitela u skladu sa predloženim algoritmom može biti surogat za genetski potpis prognostički različitih tipova. Difuzni B krupnoćelijski limfomi porekla germinativnog centra su imunohistohemijski CD10+ (>30% ćelija) ili CD10-, Bcl-6+ i IRF4/MUM-1-, dok se svi ostali slučajevi svrstavaju u non-GC tip (1,

102)(Slika 3). DBKL koji imaju profil B ćelija porekla germinativnog centra imaju bolju prognozu od onih koji su non-GC tip (imaju profil aktiviranih B ćelija, ABC), iako neke studije ne potvrđuju ovu hipotezu (7, 8, 9).



Slika 3. “Hans Classifier”, imunohistohemijski algoritam određivanja porekla B ćelije: germinativnog centra (GC) ili ne-germinativnog centra (non-GC) podtipa difuznog B krupnoćelijskog limfoma. Prisustvo CD10 ekspresije određuje GC podtip. Ako je CD10 negativan, Bcl-6 ekspresija uz MUM-1 negativnost određuje GC podtip, dok prisustvo Bcl-6 i MUM-1 ekspresije se interpretira kao non-GC podtip. Gubitak ekspresije CD10 ili Bcl-6, uz MUM-1 pozitivnost, takođe se interpretira kao non-GC podtip (adaptirano prema Hans i sar. 2004, (102)).



Slika 4. Imunohistohemijski profil GCB i non-GCB podtip DBKL. Oba podtipa eksprimiraju CD20 (A, E, I i M). GCB podtip može biti dijagnostikovano ako je prisutna ekspresija CD10 i/ili Bcl-6 i ako je MUM1 negativan (A-D) ili ako je CD10-, Bcl-6+ i MUM1- (E-H). Non-GCB podtip može pokazivati Bcl-6 pozitivnost ali i MUM1 pozitivnost (I-L). Alternativno, non-GCB podtip gubi CD10 i Bcl-6 ekspresiju ali pokazuje MUM1 pozitivnost (M-P) ($\times 100$ [A, E, I, M]; $\times 200$ [C, F, J, O]; $\times 400$ [B, D, G, H, K, L, N, P]) (adaptirano prema Hunt i sar. 2008. (103)).

De novo CD5+ DBKL prvi put je opisan 1995. godine (1). Da li se ovaj limfom zaista razlikuje od drugih tipova DBKL je još uvek nejasno, ali intravaskularna ili intrasinusoidalna infiltracija koja je prisutna u velikom procentu slučajeva preklapa se sa nekim karakteristikama intravaskularnog DBKL. Takođe, značajna morfološka heterogenost je prisutna kod ovog tipa limfoma, tako da se može videti monomorfni, polimorfni, imunoblastni i gigantocelularni tip. Imunofenotipski, *de novo* CD5+ DBKL su obično Bcl-6-, CD10-, IRF4/MUM1+ i Bcl-2+, odnosno non-GC porekla (1). Neke studije su pokazale da ovi limfomi imaju agresivniji tok (18, 19).

1.7. Podtipovi Difuznog B krupnoćelijskog limfoma

Promene u klasifikaciji B ćelijskih limfoma su nastale kao rezultat prepoznavanja važnosti mesta nastanka tumora kao i određenih kliničkih karakteristika (104). U definisanju nekoliko novih entiteta, starosno doba i mesto nastanka tumora igraju veliku ulogu.

Difuzni B krupnoćelijski limfom bogat T ćelijama/histiocitima

U novoj klasifikaciji SZO, difuzni B krupnoćelijski limfom bogat T ćelijama/histiocitima je izdvojen kao poseban entitet (1). Na taj način, naglašena je uloga mikrookoline u biologiji nekih bolesti. Karakteristična morfološka odlika difuznog B krupnoćelijskog limfoma bogatog T ćelijama/histiocitima je obilan inflamatorni reaktivni infiltrat sastavljen od T ćelija i histiocita i mala proporcija (<10%) krupnih tumorskih B ćelija u biopsijskom uzorku (1, 5, 6, 15, 104). Zbog takvih karakteristika, ovaj limfom se diferencijalno-dijagnostički mora razlikovati od perifernog T ćelijskog limfoma i Hodgkin-ovog limfoma. Javlja se kod mlađih osoba, sa prosečnom starošću od 46 godina, predominantno kod muškaraca (1).

DBKL centralnog nervnog sistema

S obzirom na to da nodalni i ekstranodalni DBKL ne infiltruju često centralni nervni sistem (CNS), primarni DBKL centralnog nervnog sistema se mora razlikovati od slučajeva sa sekundarnim širenjem. Primarni DBKL CNS se definiše kao primarni limfom intracerebralnog ili intraokularnog regiona, isključujući limfome dure i limfome vezane za imunodeficijenciju (1). Ovaj tip limfoma se javlja u svim životnim dobima, ali najčešće u šestoj deceniji. Oko 60% slučajeva se prezentuje u infratentorialnoj regiji i izaziva neurološke i neuropsihijatrijske simptome. Postavljanje dijagnoze može biti komplikovano. Stereotaktička biopsija je imperativ u postavljanju dijagnoze. U biopsiji, obično su prisutne krupne B limfoidne ćelije koje u vidu mufa okružuju krvne sudove (5, 6, 15). U najvećem broju slučajeva tumorske ćelije imaju morfologiju centroblasta i eksprimiraju B ćelijske antigene. Bcl-6 je često pozitivan, dok je CD10 pozitivan nešto

ređe. IRF4/MUM1 je pozitivan u 80-90% slučajeva (1). Genska ekspresija kod ovog tipa limfoma se razlikuje od nodalnog DBKL (106, 107).

Primarni kutani DBKL, „leg type“

Javlja se uglavnom kod starijih osoba, obično u osmoj deceniji života (1, 91). Može nastati na koži bilo kog dela tela, ali se najčešće javlja na nozi, u vidu tumorskih nodula ili ređe u vidu potkožnih čvorova, plakova ili ulceracija. Lezije su često multiple i ponekad se mogu javiti na obe noge (108-111). Histološki, tumorske ćelije su tipa centroblasta, retko se može javiti imunoblastna varijanta tumora. Imunofenotipski, ovaj tip DBKL je Bcl-2+, IRF4/MUM-1+. Klinički, primarni kutani DBKL, „leg type“ je agresivan tumor, sa petogodišnjim preživljavanjem od 41% (108-111).

EBV+ DBKL starijih osoba

Klinički agresivan tumor, koji najverovatnije nastaje zbog oslabljenog imunološkog statusa, kod osoba starijih od 50 godina (1, 6, 15). Češće se javlja na ektranodalnim lokalizacijama (koža, pluća, tonzile, želudac). Tumorske ćelije su polimorfne, mogu podsećati na Hočkinove i Reed-Strenberg-ove, uz čestu nekrozu i inflamatorni infiltrat. Klinički tok je agresivan, sa preživljavanjem od oko 2 godine, nezavisno od IPI indeksa (112-114).

1.8. Ostali limfomi krupnih B ćelija

Primarni medijastinalni (thymic) B krupnoćelijski limfom (PMBL)

PMBL je godinama unazad prepoznat kao poseban entitet, zbog svojih jedinstvenih molekularnih i kliničkih karakteristika, iako citomorfološki liči na ostale DBKL (6, 115-118). Najčešće se prezentuje u ranom stadijumu, kao tumorska masa u medijastinumu, sa lokalnim širenjem u pluća, zid grudnog koša, pleuru, perikard (1, 6). Udaljena ekstaranodalna prezentacija bolesti, kao i infiltracija kostne srži je retka. PMBL najčešće nastaje kod mlađih osoba, u trećoj i četvrtoj deceniji života, mada se može javiti i kod dece (119).

Veruje se da je poreklo tumorskih ćelija timusna B ćelija. Tumor se sastoji od ćelija srednje veličine, difuznog tipa rasta, sa različitim stepenom fibroze intersticijuma. U mnogim slučajevima tumorske ćelije imaju obilnu svetlu citoplazmu, ekspimiraju CD20, CD79a i u različitoj meri CD30, a negativne su na IgM, HLA Class I i II i CD5. CD23 je često pozitivan. Ekspresija Bcl-6 i CD10 postoji u određenom broju slučajeva (1, 6, 120, 121). Postoje mnoge sličnosti između klasičnog HL i PMBL, pa diferencijalna dijagnoza ponekad može biti teška. Molekularni potpis PMBL upućuje na bolju prognozu u poređenju sa GCB i ABC tipom DBKL (119-121).

Intravaskularni B krupnoćelijski limfom

Ovaj entitet je izuzetno redak podtip ektranodalnog DBKL koji je najpre opisan u koži i CNS-u (1). Neoplastične ćelije ekspimiraju B ćelijske antigene i isključivo rastu intravaskularno (122, 123). Defekt homing receptora na tumorskim ćelijama je verovatno razlog za intravaskularni rast. Intravaskularni DBKL se tipično viđa u šestoj i sedmoj deceniji života. Na prezentaciji pacijenti često imaju groznicu i različite simptome vezane za karaktersitiku multifokalnog rasta ovog tumora koji obično zahvata CNS, kožu, ali i pluća, bubrege i nadbubrežne žlezde. Tok bolesti je agresivan, sa preživljavanjem koje je obično kraće od godinu dana (1, 6, 122, 123).

DBKL udružen sa hroničnom inflamacijom

Limfoidna neoplazma koja se javlja u kontekstu dugotrajne hronične inflamacije i udružena je sa Epstein/Barr virusom (EBV) (1, 124). Interval između nastanka hronične inflamacije i nastanka limfoma je obično oko 10 godina. Kod većine pacijenata nastaje u telesnim šupljinama. Limfom udružen sa pitoraksom je prototip ovog limfoma (125). U trenutku postavljanja dijagnoze starost pacijenata varira od 5. do 8. decenije života, značajno češće kod muškaraca nego kod žena (6, 124, 125). Najveći broj slučajeva pokazuje centroblastno/imunoblastnu morfologiju (1). Može biti prisutna masivna nekroza i angiocentrični tip rasta. Tumorske ćelije ekspimiraju B ćelijske antigene, mada u nekim slučajevima pokazuju karakteristike plazmablastne diferencijacije (MUM1+/CD138+). DBKL udružen sa hroničnom inflamacijom je agresivna neoplazma, sa petogodišnjim preživljavanjem 20-35% (124, 125).

Limfomatoidna granulomatoza

Angiocentrična i angiodestruktivna limfoproliferativna bolest koja nastaje ektranodalno, najčešće u plućima, zatim u mozgu, bubrezima, jetri i koži. Limfni čvorovi i slezina su izuzetno retko zahvaćeni (1, 6). Ovaj tip limfoma čine EBV pozitivne B ćelije uz brojne reaktivne T ćelije. Histološki gradus i klinička agresivnost variraju, u korelaciji sa zastupljenošću B ćelija. Iako neki pacijenti sa limfomatoidnom granulomatozom dožive spontanu regresiju, kod većine pacijenata bolest ima agresivan klinički tok i mora se lečiti hemioterapijom ili imunohemioterapijom.

ALK+ Difuzni B krupnoćelijski limfom

U ovoj veoma retkoj varijanti DBKL, tumorske ćelije imaju imunoblastnu ili plazmablastnu morfologiju, retko anaplastičnu (126). Ove ćelije gube ekspresiju B ćelijskih antigena i često pokazuju samo slabu LCA (leukocyte common antigen) pozitivnost. Mogu biti EMA+ i CK+, što unosi dodatnu konfuziju u dijagnozu. Imunofenotipizacija je neophodna u dijagnostici ove retke varijante (104, 105, 126, 127).

Plazmablastni limfom

Najčešće se javlja kod HIV+ osoba, ali može nastati i u drugim imunodeficientnim stanjima (1, 6, 104, 105). Plazmablastni limfom se najčešće javlja kod osoba oko 50 godine života, agresivnog je toka sa preživljavanjem manjim od jedne godine. Ova varijanta je heterogena i uključuje mnoge entitete (104, 105). Sastoji se od slučajeva koji se samo na osnovu morfologije ne mogu razlikovati od imunoblastnog limfoma ili plazma ćelijske neoplazme. Štaviše, plazmablastni limfom usne duplje, koji se viđa kod HIV+ pacijenata predstavlja poseban entitet (128). Osim usne duplje, gde se najčešće javlja, može nastati i na drugim lokalizacijama, kao što su sinonazalne šupljine, gastrointestinalni trakt, orbita, koža, kosti i meka tkiva (129). Nodalna prezentacija je retka. Većina pacijenata je u uznapređovalom kliničkom stadijumu i sa visokim IPI indeksom na prezentaciji. Morfološki su veoma raznoliki, sa ćelijama koje liče na imunoblaste do onih sa upadljivom plazmocitnom diferencijacijom (130). Mitotska aktivnost je obično visoka i često se uočavaju apoptotska tela i makrofagi koji

fagocituju apoptotski debri. Plazmablastni limfom pokazuje imunofenotip plazma ćelija (CD20-, CD79a+/-, CD138+, CD38+, MUM-1+) (130). Proliferativni indeks je obično visok (Ki 67>90%) (1, 6, 129, 130).

Krupnoćelijski limfom udružen sa HHV8+ multicentričnom Castleman-ovom bolešću

Monoklonska proliferacija humanih herpes virus 8 (HHV8) + limfoidnih ćelija koje podsećaju na plazmablaste i eksprimiraju IgM (131, 132). Često je udružen sa HIV infekcijom. Limfom zahvata limfne čvorove i slezinu ali se može širiti na druge organe i putem krvi, tako da se retko manifestuje kao leukemija. Morfološki se manifestuje kao HHV8+ multicentrična Castleman-ova bolest ili kao HHV8+ plazmablastni limfom (6, 131, 132). Klinički je veoma agresivna bolest, sa preživljavanjem od nekoliko meseci (6, 104, 133).

Primarni efuzioni limfom (PEL)

Obično se javlja kod pacijenata sa imunodeficijencijom i originalno su opisani kao neoplastična serozna efuzija bez detektabilne tumorske mase (1, 15, 105). Najčešće mesto nastanka su pleuralna, perikardijalna i peritonealna šupljina. Primarni efuzioni limfom ima jedinstvene morfološke, fenotipske i genotipske karakteristike. Morfologija ćelija može biti imunoblastna, plazmablastna ili anaplastična. Tumorske ćelije ne eksprimiraju B ćelijske antigene, a često je prisutna ekspresija HLA-DR, CD30, CD38, CD138 i EMA. Obično je udružen sa humanim herpes virusom 8 (HHV8) (131, 132). Najčešće se javlja kod mladih homoseksualnih ili biseksualnih muškaraca sa HIV infekcijom. Ishod bolesti je veoma nepovoljan, sa preživljavanjem kraćim od šest meseci (133, 134).

1.9. Neklasifikovani tipovi DBKL

Savremene studije su skrenule pažnju na biološko, morfološko i imunohistohemijsko preklapanje između klasičnog Hočkinovog limfoma i nekih B krupnoćelijskih limfoma, posebno primarnog medijastinalnog B krupnoćelijskog limfoma i medijastinalnog klasičnog Hodgkinovog limfoma, tip nodularne skleroze

(105, 135). Studije na bazi „gene expression profiling” su potvrdile biološku povezanost ovih tumora. Obe neoplazme nastaju u medijastinumu, kod mlađih osoba (1, 7, 9, 14, 15).

Klasifikacija SZO iz 2008. prepoznaje kategoriju tumora nazvanu:

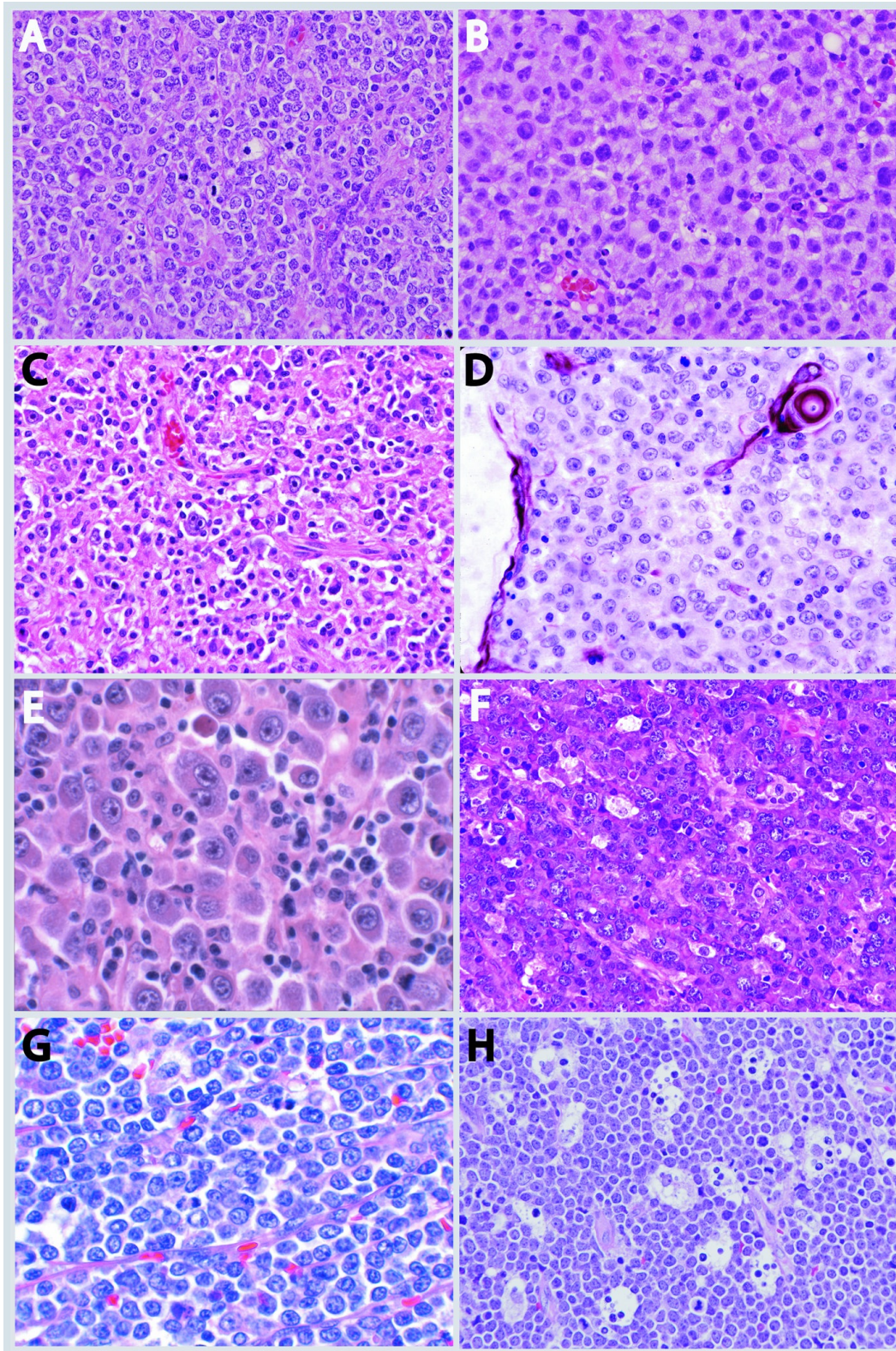
B ćelijska neoplazma, neklasifikovana, sa karakteristikama između DBKL i Hoćkinovog limfoma

Ovi tumori nastaju najćešće kod mlađih muškaraca i ponašaju se agresivnije od PMBL i klasićnog HL. Morfološki, limfom se sastoji od slivenih polja i traka pleomorfnih tumorskih ćelija u fibrotićno izmenjenoj stromi. U istom tumoru mogu se uoćiti polja koja podsećaju na klasićni HL, centroblastnu varijantu DBKL ili PMBL. Inflatarni infiltrat je oskudan i obićno se sastoji od eozinofila, plazmocita, histiocita i T limfoidnih ćelija, u razlićitoj proporciji. Mogu biti prisutna polja nekroze (1, 6). Imunofenotip takode pokazuje preklapanje između HL i DBKL. Prisutna je ekspresija LCA i B ćelijskih antigena. CD10 se ne eksprimira, kao ni ALK. Nasuprot drugim B ćelijskim neoplazmama, u ćelijama koje ekspimiraju B ćelijske antigene, uoćava se ekspresija CD30 i CD15 (1, 6, 136).

Takode, prepoznata je grupa limfoma koju nije moguće klasifikovati ni kao Burkitt-ov limfom ni kao DBKL. Ova kategorija je nazvana:

B-ćelijski limfom, sa karakteristikama između DBKL i Burkitt-ovog limfoma

Ovi limfomi se javljaju kod odraslih osoba (1, 6, 104, 105). Pokazuju imunofenotip germinativnog centra i podsećaju na Burkitt-ov limfom ali nemaju citomorfološke karakteristike Burkitt-ovog limfoma. Ovaj entitet takode ukljućuje slućejeve sa translokacijom i MYC i BCL2 („double hit“) (66, 77). Finalnu dijagnozu je moguće postaviti kao skup morfoloških, imunofenotipskih i molekularnih karakteristika (1, 66, 68, 84). Klinićki tok bolesti je agresivan, sa lošim ishodom, bez obzira na vrstu primenjenog terapijskog protokola (15, 72, 73, 133).



Slika 5. DBKL podtipovi. A) DBKL GCB tip centroblastni B) DBKL non GCB tip imunoblastni C) EBV+ DBKL starijih D) PMBL E) ALK+ DBKL F) Plazmablastni DBKL G) „Double Hit“ DBKL H) Burkitt limfom (adptirano prema Menon i sar. 2013. (6)).

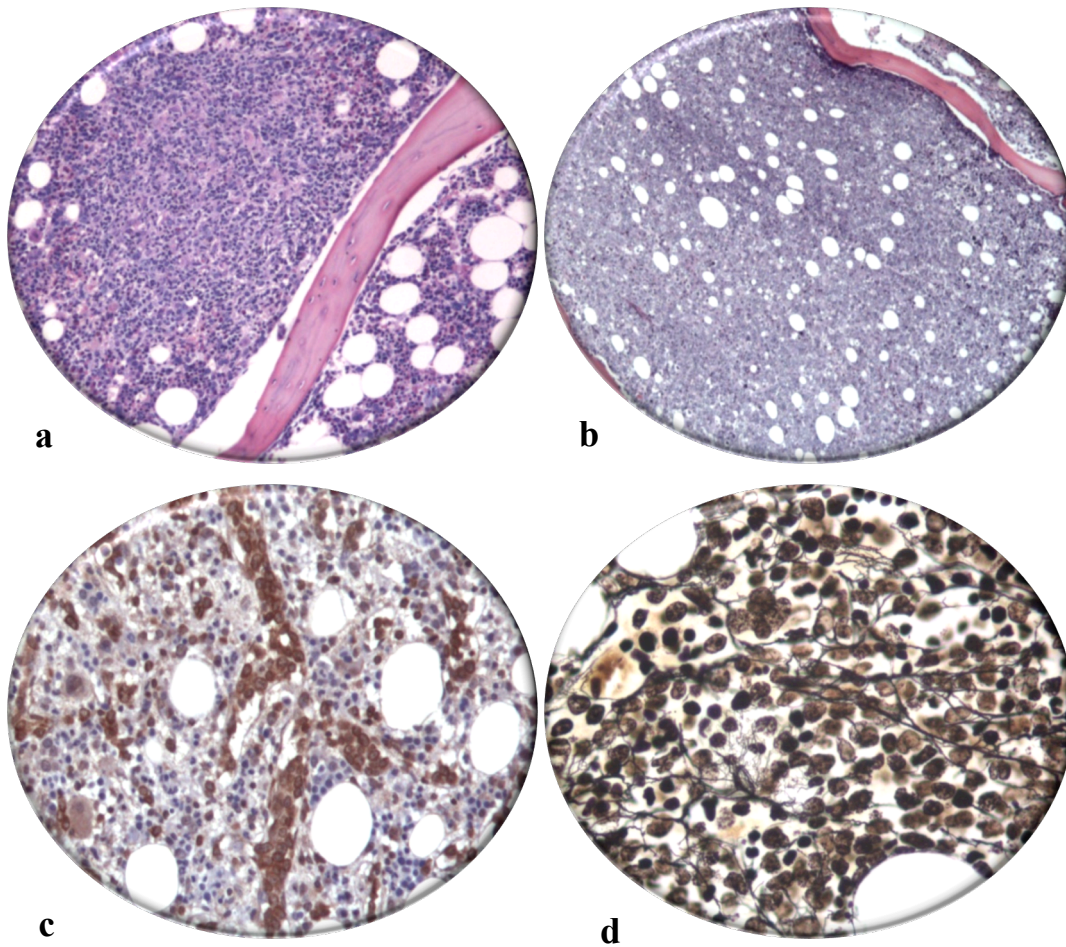
1.10. Infiltracija kostne srži kod limfoproliferativnih bolesti

Biopsija kostne srži (bks) se rutinski primenjuje u određivanju kliničkog stadijuma kao i procene stanja kostne srži nakon primenjene terapije kod pacijenata sa NHL (138-140).

Infiltracija kostne srži je vrlo česta u limfoproliferativnim bolestima i ona može biti detektovana različitim procedurama uključujući mikroskopsko ispitivanje aspirata kostne srži ili biopsije kostne srži. Citološki detalji se mogu analizirati na razmazima aspirata, otiska biopsije ili tankim preseccima aspirata kostne srži (137, 138). Tip infiltracije se može analizirati najkompletnije na biopsijama kostne srži, pa tako može biti fokalni, intersticijski i difuzni (Slika 6a, 6b). Takođe, tip infiltracije kostne srži može biti i mešoviti (nodularno-intersticijski ili difuzno intersticijski). Neuobičajen tip infiltracije je prisustvo limfomskih ćelija unutar sinusoida kostne srži (slika 6c). Pojačana retikularna osnova kostne srži u predelu infiltracije je takođe jedna od karakteristika ovih bolesti (139, 140).

Među zrelim B ćelijskim neoplazmama infiltracija kostne srži je češća kod klinički neagresivnih, indolentnih NHL (137-140). Učestalost infiltracije kostne srži kod DBKL varira od 10-35% (137,141,142). Ispitivanje kostne srži kod pacijenata sa DBKL je važan dijagnostički i prognostički parametar, kojim se utvrđuje stepen proširenosti bolesti kod pacijenata sa novodijagnostikovanim difuznim B krupnoćelijskim limfomom. Morfološki tip i stepen infiltracije, kao i histološka različitost između primarnog limfoma i infiltrata u kostnoj srži su faktori koji mogu imati prognostički značaj (141-144). Stepen infiltracije kostne srži i visok stepen krupnih ćelija su parametri udruženi sa lošim ishodom.

Iako je tradicionalna morfološka evaluacija kostne srži „zlatni standard“ u određivanju kliničkog stadijuma, imunohistohemijska analiza može biti koristan dodatak u preciznijem određivanju stepena infiltracije, posebno u slučajevima kada je infiltracija minimalna ili kad postoji razlika u morfološkom izgledu tumorskih ćelija primarnog tumora i tumorskog infiltrata u kostnoj srži (141-144).



Slika 6. Infiltracija kostne srži. a) nodularna [HEx100], b) difuzna [HEx100] c) intravaskularna infiltracija [IHH CD20x400] d) pojačana retikularna osnova u predelu infiltracije [Gordon-Sweetx400]

1.11. Klinički prognostički faktori

Internacionalni Prognostički Indeks (IPI), je osnovni klinički parametar koji se koristi za predviđanje ishoda bolesti kod pacijenata sa agresivnim NHL, napravljen kao rezultat internacionalnih multicentričnih studija pre uvođenja rituximab-a u terapiju (145). Bazira se na broju negativnih prognostičkih karakteristika u vreme postavljanja dijagnoze: starosna dob ≥ 60 godina, Ann Arbor tumorski stadijum (III i IV), povišen nivo serumske laktat dehidrogenaze (LDH), Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] performans status ≥ 2 i ≥ 2 ektranodalnih lokalizacija (145-147). Za svaku od navedenih karakteristika daje se 1 poen. Formirane su 4 grupe, sa razlikom u 5-godišnjem preživljavanju od 26-73%.

Tabela 2. Internacionalni Prognostički indeks za agresivne limfome (International prognostic index, IPI) (adaptirano prema 1).

Nepovoljni faktori	Broj poena	Broj poena
Starosna dob >60 godina	1	-
Loš performance status (ECOG) ≥ 2	1	1
Ann Arbor stadijum (III-IV)	1	1
Extranodalna lokalizacija ≥ 2	1	-
Visok serumski LDH (>normal)	1	1
	Svi pacijenti	Pacijenti $\leq 60^*$
Prognostički indeks	IPI	r IPI *
Nizak	0 ili 1	0
Nizak/srednji	2	1
Visok/srednji	3	2
Visok	4 ili 5	3

*Kod pacijenata ≤ 60 primenjuje se "age/adjusted international prognostic index (aaIPI)", na osnovu kojih se sabiraju tri nepovoljne karakteristike koje uključuju loš performans status, Ann Arbor stadijum III i IV i povišen nivo LDH (145, 146).

Trećina pacijenata sa DBKL na prezentaciji je u IV stadijumu bolesti, trećina ima B simptome, a više od polovine povećan nivo serumske laktat dehidrogenaze (LDH) (1, 2, 5, 6).

U svim kliničkim modelima, uključujući IPI, postoji značajna heterogenost u ishodu, koja se ogleda u različitom preživljavanju pacijenata sa identičnim prognostičkim skorom (145-153). Iako značajan procenat pacijenata sa DBKL može biti uspešno lečen kombinacijom različitih terapijskih procedura, ne postoji dostupan ni biološki ni klinički skor koji bi razlikovao pacijente koji mogu biti lečeni standardnom terapijom i one pacijente koji zahtevaju novi terapijski pristup (150-165).

Standardna terapija i predviđanje ishoda

Terapija DBKL se zasniva na upotrebi kombinacije više agenasa koji uključuju antraciklin, alkilirajuće agense i drugo. Pre oko jedne decnije, dodavanje anti-CD20 antitela (Rituximab) hemioterapiji, rezultiralo je poboljšanjem ishoda (3, 37-39).

Standardni terapijski pristup za pacijente sa DBKL je CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone) ili u kombinaciji sa rituximab-om (R-CHOP) (3, 37-39). Pri donošenju odluke koji terapijski protokol primeniti, rukovodimo se mnogobrojnim parametrima u cilju tzv. individualizacije terapije.

Dugoročno praćenje sprovedeno u studiji sprovedenoj na starijim pacijentima (≥ 60 godina) u odmaklom kliničkom stadijumu DBKL, pokazalo je poboljšanje u 10-godišnjem preživljavanju za 16% dodavanjem Rituximab-a. Dodatna istraživanja su potvrdila efekat rituximab-a uspostavljajući R-CHOP (rituximab plus CHOP) kao standard u terapiji (92, 94).

Upotrebljivost IPI indeksa je preispitana kod pacijenata lečenih terapijom na bazi Rituximab-a (3-6, 146). IPI indeks je zadržao prognostički značaj, razlika u ishodu se suzila na trogodišnje preživljavanje bez znakova bolesti od 50% za pacijente sa 4-5 faktora, do oko 90% za pacijente bez rizičnih faktora. Za sada, IPI ima ograničenu mogućnost da identifikuje pacijente sa lošim ishodom, zato što sve rizične kategorije imaju najmanje 50% šanse za izlečenje (146-150).

Odskora, identifikovani su dodatni klinički faktori koji mogu doprineti ishodu posle terapije sa rituximab-om (160-165). Maksimalni dijametar tumorske mase veći od 10cm ima negativan uticaj na ishod bolesti kod mladih pacijenata sa dobrom prognozom. Muški pol takođe ima negativan uticaj na ishod, zbog mnogo bržeg klirensa

rituximab-a u poređenju sa ženskim polom. Infiltracija kostne srži krupnim tumorskim ćelijama, (ali ne i sitnim limfoidnim ćelijama) je nezavisan prediktor preživljavanja po nekim autorima (137-144).

Iako dodavanje kliničkih faktora u nove prognostičke indekse može dovesti do bolje diferencijacije ishoda, klinički faktori su surogat za biološke razlike između pacijenata. Klinički parametri mogu lako biti primenjeni u svakodnevnoj rutinskoj praksi i omogućavaju stratifikaciju u kliničkim studijama, mada oni ipak ne obezbeđuju neophodni biološki uvid u prilagođen terapijski pristup novim ciljnim agensima.

Iako je ishod bolesti poboljšan dodavanjem rituximab-a hemioterapiji, oko 10-15% pacijenata ima primarno refraktarnu bolest (bez odgovora na terapiju ili relaps unutar 3 meseca od terapije) i dodatnih 20-25% pacijenata doživi relaps nakon inicijalnog odgovora na terapiju(145-154). Najveći broj relapsa se javlja unutar prve 3 godine. Oko 10% pacijenata ima progresiju bolesti za više od 5 godina nakon tretmana (145-154).

Visoko-dozna terapija i autologa transplantacija je pokazala najbolji efekat izlečenja kod pacijenata koji su imali relaps bolesti senzitivna na hemioterapiju (160, 161). U svakom slučaju, u skladu sa starijim životnim dobom i komorbiditetima, samo polovina ovih pacijenata može biti lečena ovakvim intenzivnim pristupom, a čak i kad je sproveden, minoran broj pacijenata bude izlečen. Ishod bolesti kod starijih pacijenata koji ne reaguju na terapiju R-CHOP je loš, sa medijanom preživljavanja od oko 0,7 meseci posle progresije bolesti (164-168).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu prethodno iznetih činjenica postavljena je hipoteza da bi određivanje podtipa DBKL (non-GCB ili GCB), kao i stepena proliferacije i apoptoze, u korelaciji sa kliničkim stadijumom bolesti, omogućio identifikaciju onih pacijenata koji mogu imati koristi od agresivnijeg terapijskog pristupa u trenutku postavljanja dijagnoze.

Cilj našeg istraživanja je bio:

1. Utvrđivanje kliničkog značaja i prognostičke vrednosti imunofenotipskih profila DBKL: GCB i non-GCB.
2. Analiza korelacije GCB i non-GCB imunofenotipskih podtipova sa Internacionalnim Prognostičkim Indeksom.
3. Analiza povezanosti ovih grupa sa različitim onkogenim, proliferativnim markerima i markerima uključenim u apoptozu.
4. Analiza ekspresije onkogenih, proliferativnih i markera uključenih u apoptozu i njihova korelacija sa ishodom bolesti.

3. MATERIJAL I METODE

Ispitivanjem je obuhvaćeno 115 bolesnika sa dijagnozom DBKL koji su dijagnostikovani i lečeni na Institutu za Klinici za hematologiju Kliničkog Centra Srbije u Beogradu u periodu od 2000-2006. godine. Lečenje je sprovedeno prema utvrđenim protokolima za DBKL (CHOP/R vs.CHOP). Period praćenja je iznosio do 5 godina, sa srednjim periodom praćenja od 40 meseci za sve pacijente od trenutka početka terapije.

Studija je retrospektivna jer se prati efekat i ishod lečenja bolesnika u naredne 3 godine od trenutka postavljanja dijagnoze i početka lečenja. Dijagnoza DBKL je postavljena histopatološkom i imunohistohemijskom analizom uzoraka limfnog tkiva dobijenog biopsijom tkiva limfnog čvora, biopsije kostne srži ili drugih ektranodalnih lokalizacija, prema kriterijumima klasifikacionog sistema Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) (1). Slučajevi histološke transformacije indolentnih NHL u DBKL nisu uključeni u studiju.

3.1.Histološka i imunohistohemijska analiza

Za analizu su korišćeni tkivni uzorci obrađeni na standardan način: fiksirani u 10% pufersanom formalinu, kalupljeni u parafinu, sečeni na mikrotomu (preseci debljine 3-5 μ m) i obrađeni klasičnim metodama bojenja (hematoksilin eozin, Giemsa, Gordon Sweet), na kojima je inicijalno postavljena histopatološka dijagnoza. Na svim parafinskim isečcima je sprovedena dehidratacija i deparafinizacija u skladu sa standardnim procedurama.

Pre-tretman tkiva i demaskiranje antigena obavljeno je kuvanjem u mikrotalasnoj pećnici. Imunohistohemijska analiza je sprovedena ručno, korišćenjem sledećih monoklonskih antitela: CD20, CD79 α , CD3, CD5, CD10, bcl-2, bcl-6, MUM-1, CD138, CD30, HLA-DR, Survivin, BAX, p53, i Ki67. Imunohistohemijska analiza ekspresije MYC proteina je urađena automatski.

Posle inkubacije primarnim antitelima prema procedurama za svako od primenjenih antitela, imunoreakcija je izvršena primenom standardizovane Streptavidin-Biotin AEC metode, primenom sistema za vizualizaciju (LSAB2 HRP), ili DAKO Envision+ System sa diaminobenzidin (DAB) hromogenom. Na kraju, isecci su

kontrastirani u hematoksilinu. Za svako primenjeno antitelo je korišćena pozitivna kontrola. Karakteristike primenjenih antitela su prikazane u Tabeli 3.

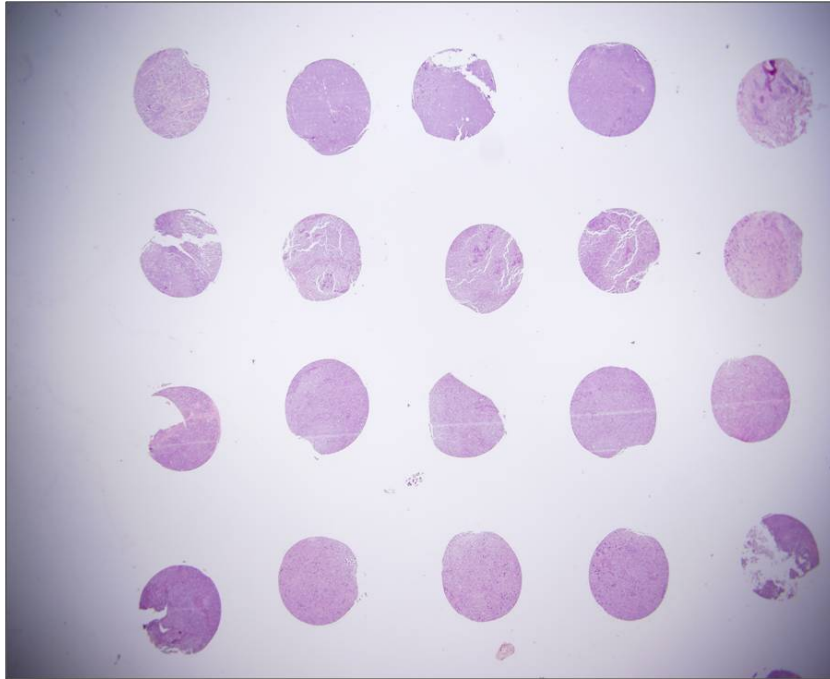
Tabela 3. Karakteristike primenjenih antitela

Broj	Antitelo	Klon	Razblaženje	Proizvođač
1.	CD20	L26	1:20	Dako
2.	CD79 α	JCB117	1:20	Dako
3.	CD3	F7.2.38	1:20	Dako
4.	CD5	4C7	1:50	Dako
5.	CD10	56C6	RTU*	Novocastra
6.	Bcl-2	124	1:25	Dako
7.	Bcl-6	PG-B6p	1:10	Dako
8.	MUM-1	MUM1p(45)	1:25	Dako
9.	CD138	ML 15	1:25	Dako
10.	HLA-DR	TAL.185	1:10	Dako
11.	Ki67	MIB 1	1:50	Dako
12.	c-myc	Y69	1:50	Abcam
13.	Bax	Rb-9206-P1	1:100	NeoMarkers
14.	P53	DP-7+BP53-12	RTU*	Labvision
15.	CD30	Ber-H2	1:25	Dako
16.	Survivin	Rb-9206-P1	1:100	NeoMarkers

3.2. Tkivni mikroniz (tissue microarray -TMA)

Kod 67 pacijenata, za koje je bio dostupan arhivirani biopsijski materijal adekvatan za dalju analizu, sa parafinskog kalupa su odabrana najhomogenija polja tumorskog tkiva za dalju obradu primenom metode tkivnog mikroniza (tissue microarray -TMA) (88, 102). Iz polja najhomogenijeg tumorskog tkiva, uzeto je 1-3 cilindra tkiva (po pacijentu) upotrebom 0,6mm punkcione igle, a zatim umetnuti u novi parafinski blok (TMA kalup), gde se postavlja serija od 20 cilindara. Sa svakog TMA

kalupa su sečeni presecci debljine 3-5 μ m, a zatim, obrađeni imunohistohemijski na ranije opisan način (88, 102).



Slika 7. Tkivni mikroniz, HEx12,5

Svi histološki slajdovi su pregledani od strane 3 patologa. Nakon ponovne analize svi slučajevi su reklasifikovani u skladu sa novim kriterijumima klasifikacionog sistema SZO iz 2008. godine, kao i u odnosu na poreklo (COO) u skladu sa Hans algoritmom (GCB, non-GCB) (1, 102). Procena pozitivnosti imunohistohemijske reakcije vršena je brojanjem pozitivnih tumorskih ćelija, na 10 polja velikog mikroskopskog uveličanja (x400), izraženo u procentima.

3.3. Imunohistohemijski algoritmi

CD10, Bcl-6, i MUM1/IRF4, su markeri korišćeni za određivanje porekla ćelije (COO subtyping), u skladu sa originalnim studijama, u kojima su dati algoritmi i preporuke za njihovo tumačenje, preporučenim od strane Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium (63, 89).

Po algoritmu Hans i saradnika, slučajevi koji su označeni kao GCB fenotip su samo CD10+ ili CD10 i Bcl-6 pozitivni, ali MUM-1 negativni. Ako su i CD10 i Bcl-6 negativni, a MUM-1 pozitivni, slučajevi su označeni kao non-GCB porekla.

Ki-67 (MIB 1) antitelo je korišćeno za određivanje proliferacione frakcije tumora. Određen je procenat tumorskih ćelija koje su pokazivale pozitivno nuklearno bojenje na 10 različitih polja velikog mikroskopskog uveličanja (engl. high power fields, HPF, x400).

Tumori sa više od 50% bcl-2+ ćelija su smatrani pozitivnim.

Za sva druga antitela, imunohistohemijsko bojenje je smatrano pozitivnim, ako je više od 30% tumorskih ćelija bilo pozitivno, u skladu sa preporukama SZO i drugih studija.

3.4. Metoda Fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH)

Osim imunohistohemijske analize na ovim uzorcima urađena je i metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije i to za MYC i BCL2.

Protokol za pripremu tkiva za TMA je izveden prema prethodno opisanoj proceduri (88). Tkivni preseki debljine 2 μm su pripremljeni TMA tehnikom iz odgovarajućih kalupa tkiva i postavljeni na mikroskopska stakla sa pozitivnim naelektrisanjem. Hibridizacija je izvedena pomoću komercijalnih, direktno obeleženih *split* proba, BCL-2 i C-MYC, kao i proba za centromerne regione hromozoma 8 i 18 (Abbott Vysis, Des Plaines, Illinois, USA) (88). Nakon deparafinizacije i rehidratacije, tkivni preseki su kuvani u mikrotalasnoj rerni u 10 mM limunskoj kiselini pH 6.0, 30 minuta, kao što je prethodno opisano (88, 102, 159). Kodenačuracija je izvedena na 77 °C, 3 min, nakon čega je usledila hibridizacija na 37°C, 20 sati. Po završetku hibridizacije, pločice su ispirane u 2 x SSC/0.3% NP-40 na 73°C, 2 minuta i 2 x SSC/0.3% NP-40 na sobnoj temperaturi, 1 minut.

Mikroskopska stakla su analizirana pomoću DM 2500 fluorescentnog mikroskopa (Leica, Wetzlar, Germany) opremljenog pojedinačnim i trostrukim *band pass* filterima. Slikanje fluorescentnih signala je omogućeno Leica DFC3000 G fluorescentnom kamerom (Leica, Wetzlar, Germany), povezanom sa *Leica CW 4000* programom za obradu slika.

3.5. Klinički parametri

U ispitivanoj grupi bolesnika svi klinički parametri su analizirani iz redovne bolničke dokumentacije u trenutku postavljanja dijagnoze, a pre započinjanja terapije.

Kod svih bolesnika je utvrđen Internacionalni Prognostički Indeks na osnovu pet nepovoljnih parametara: starosna dob>60, performance status>2 (PS), Ann Arbor klinički stadijum 3,4, nivo laktat dehidrogenaze (LDH)>460/ μ l, i broj ekстранodalnih lokalizacija >1. Na osnovu IPI indeksa pacijenti su podeljeni u niskorizičnu grupu (0 do 2 faktora) i visokorizičnu grupu (3,4 faktora).

3.6. Statistička obrada rezultata

Svi analizirani parametri su predstavljeni kao atributivna obeležja (odnosno, semikvantitativno određivanje posmatranih varijabli). Kvalitativni parametri, kao na primer, prisustvo ili odsustvo bolesti su posmatrani kao binarna obeležja (relativni brojevi) i zbog toga, svi rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Analize njihove međusobne povezanosti kao i povezanosti sa ishodom lečenja (postojanje remisije) su obavljene primenom metoda neparametrijske statistike (*Fisherov test tačne verovatnoće*, χ^2 test i testovi sume rangova *Mann Whitney U* i *Kruskall Wallis*).

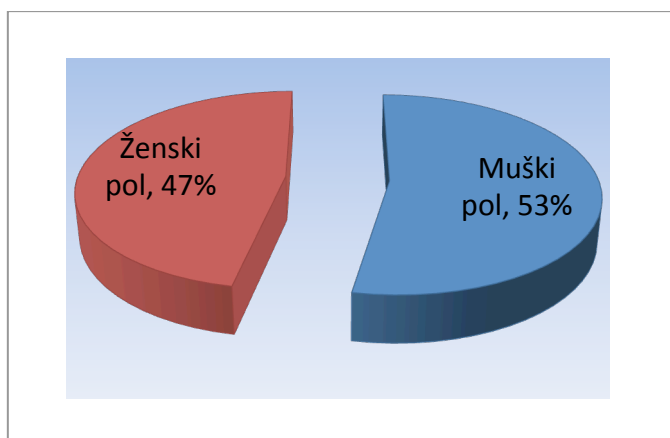
Analiza preživljavanja je obavljena metodom algoritma po *Kaplan-Meier-u*, χ^2 test, medijana test, kao i *Log Rank* testom za poređenje razlika u preživljavanju prema različitim parametrima. Parametri koji su označeni u brojnim studijama kao klinički bitni, kao i analizirani parametri proliferacije i apoptoze, su posmatrani i u multivarijantnoj analizi koristeći regresioni model proporcionalnog rizika metodom po *Cox-u* (169).

4. REZULTATI

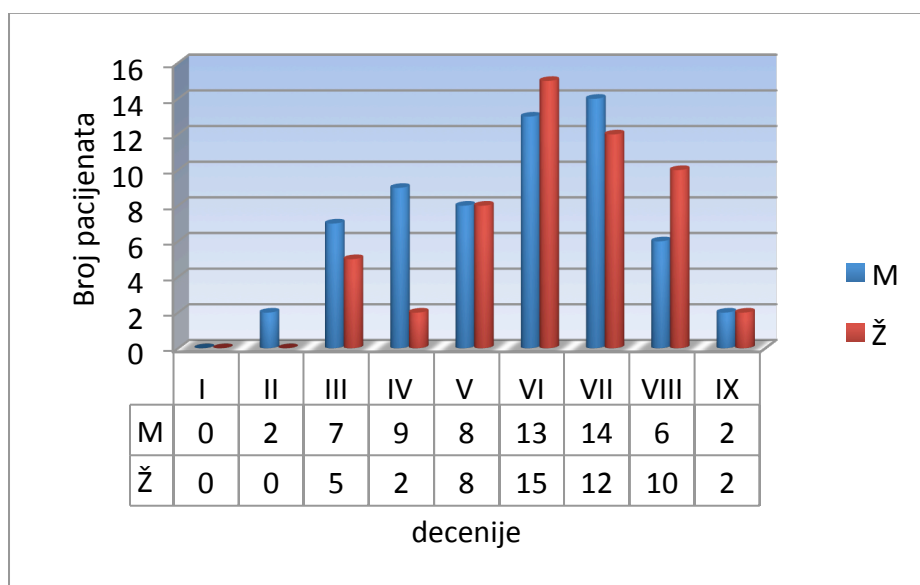
4.1. Kliničke karakteristike ispitivanih pacijenata

U studiji je analizirano 115 pacijenata sa difuznim B krupnoćelijskim limfomom.

Bilo je 61 (53%) muškarca i 54 (47%) žene (Grafikon 1). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju u odnosu na pol (log rank, $p=0,819$). Pacijenti su bili starosti od 17 do 87 godina, prosečne starosti $53,94 \pm 16,38$ godina (medijana 56.0). Najveći broj pacijenata je bio u šestoj i sedmoj deceniji života (Grafikon 2). U grupi mlađih od 60 godina bilo je 69 (60%) pacijenata.



Grafikon 1. Distribucija pacijenata u odnosu na pol



Grafikon 2. Distribucija pacijenata prema starosnim grupama

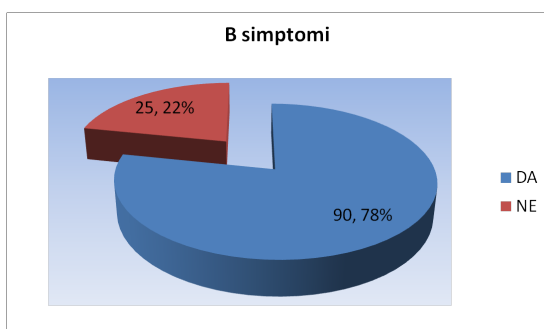
Na prezentaciji, 85 (74%) pacijenata je bilo u III I IV kliničkom stadijumu, a 30 (26%) u I i II kliničkom stadijumu (Tabela 4). Visok IPI je bio prisutan kod 54 (47%) pacijenta (Tabela 5), B simptome je imalo 90 (78%) (Grafikon 3), a povišenu LDH 74 (65%) pacijenta (Grafikon 4).

Tabela 4. Distribucija bolesnika prema Ann Arbor kliničkom stadijumu

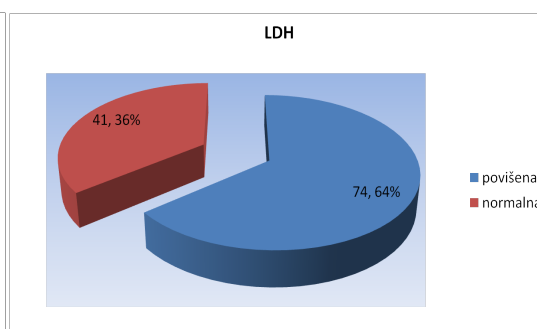
Ann Arbor klinički stadijum	Broj pacijenata	%
1	9	7,8
2	21	18,3
3	22	19,1
4	63	54,8
Ukupno	115	100,0

Tabela 5. Distribucija bolesnika prema IPI

IPI	Broj pacijenata	%
0	5	4,3
1	20	17,4
2	36	31,3
3	33	28,7
4	17	14,8
5	4	3,5
Ukupno	115	100,0

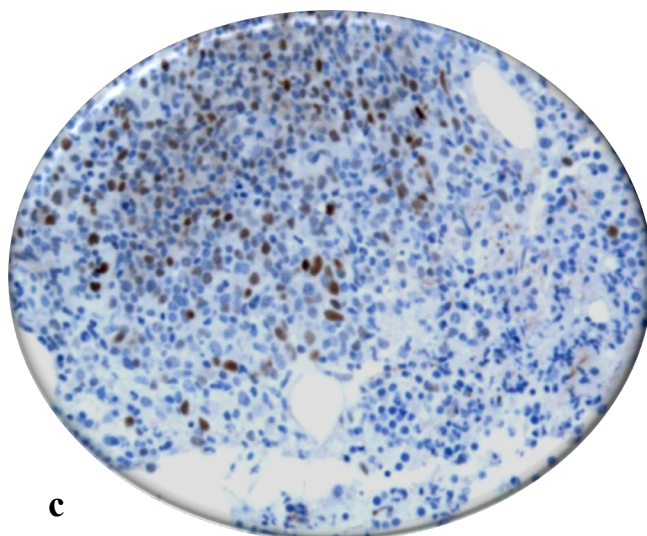
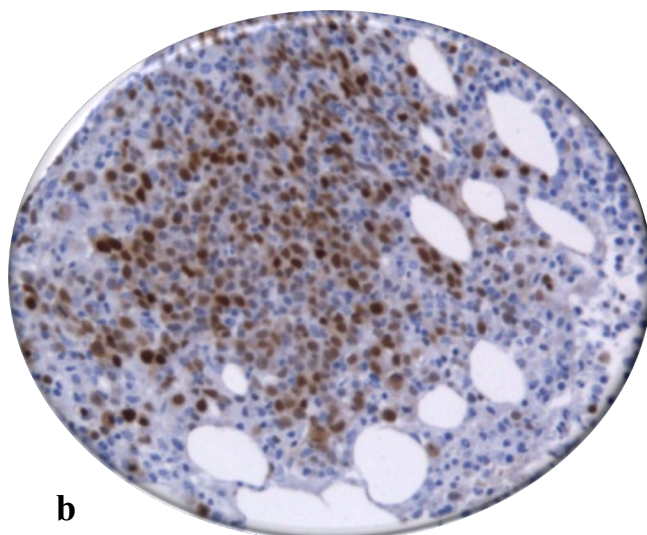
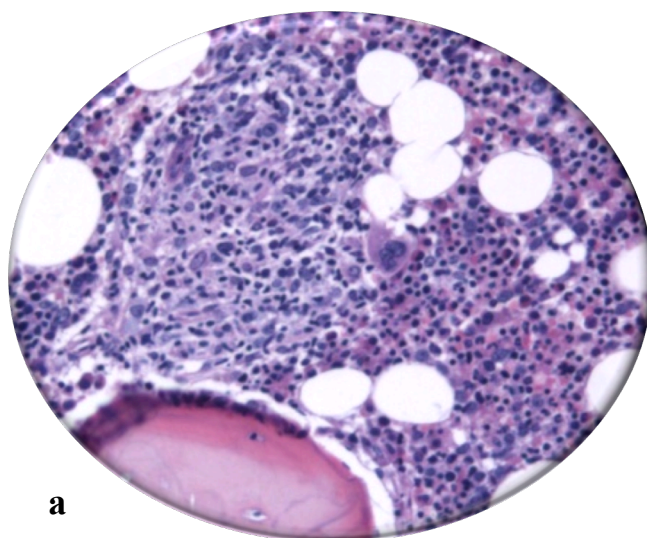


Grafikon 3. Distribucija pacijenata u odnosu na B simptome

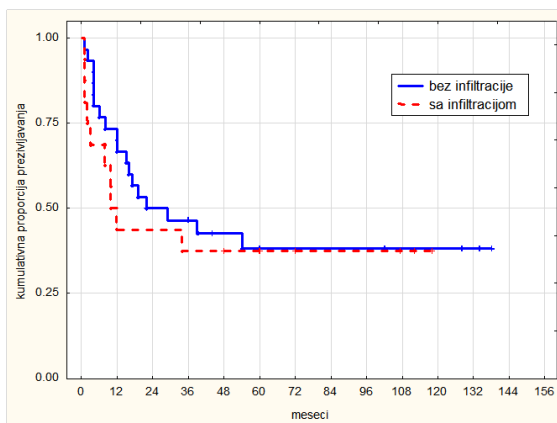


Grafikon 4. Distribucija pacijenata u odnosu na nivo LDH

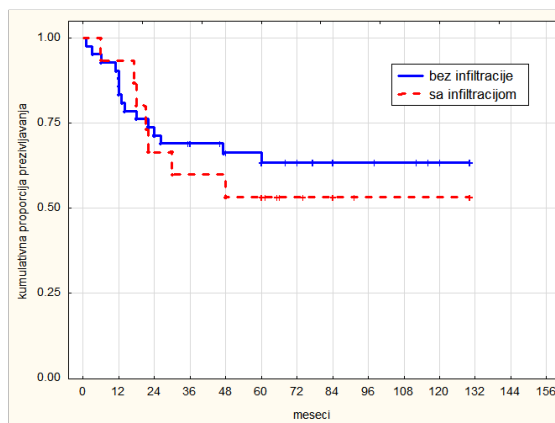
Infiltracija kostne srži na prezentaciji bila je prisutna kod 34 pacijenta (30%) (Slika 8).



Slika 8. Infiltracija kostne srži ćelijama DBKL. Nodularni, paratrabekularno lokalizovan infiltrat a) HEx200 b) MUM-1x200, IHH c) MYCx200 IHH



Grafikon 5. Ukupno preživljavanje u CHOP grupi u odnosu na infiltraciju kostne srži, Log rank test $p=0.564$



Grafikon 6. Ukupno preživljavanje u R-CHOP grupi u odnosu na infiltraciju kostne srži, Log rank test $p=0.597$

U svim slučajevima infiltracija srži je bila krupnoćelijska, dakle u saglasnosti sa morfologijom primarnog tumora. Infiltracija kostne srži nije imala uticaja na preživljavanje ni u jednoj terapijskoj grupi (Log rank, $p=0.564$, $p=0.597$) (Grafikoni 5 i 6).

Univarijantna analiza pokazala je da su visok LDH (OS_{5god} log rank $p=0.004$); visok IPI skor (>2) (OS_{5god} log rank $p<0.001$); visok klinički stadijum, voluminozna tumorska masa (bulky disease) (OS_{5god} log rank $p=0.055$); B simptomi (OS_{5god} log rank $p=0.002$), nepovoljni prognostički parametri ukupnog petogodišnjeg preživljavanja, nezavisno od primenjene terapije.

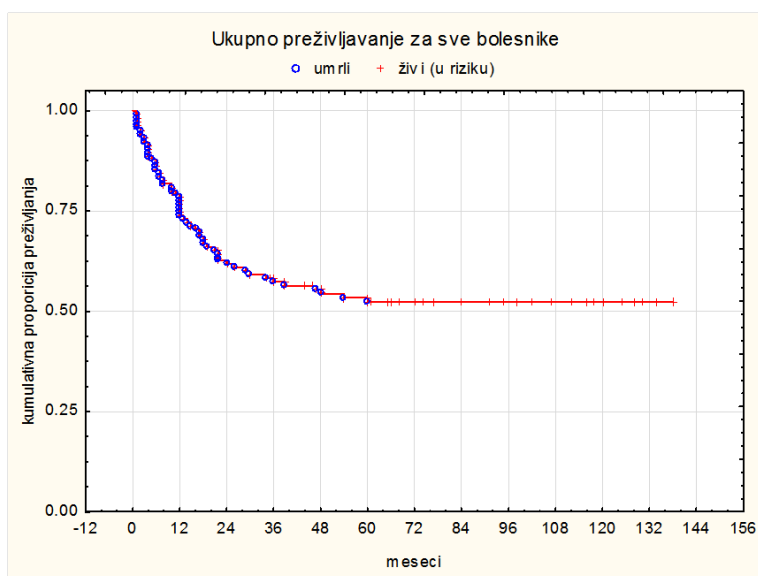
Multivarijantnom regresionom analizom po Cox-u pokazano je da je IPI nezavisan faktor ukupnog preživljavanja (Tabela 6).

Tabela 6. Multivarijantna analiza faktora preživljavanja svih analiziranih pacijenata

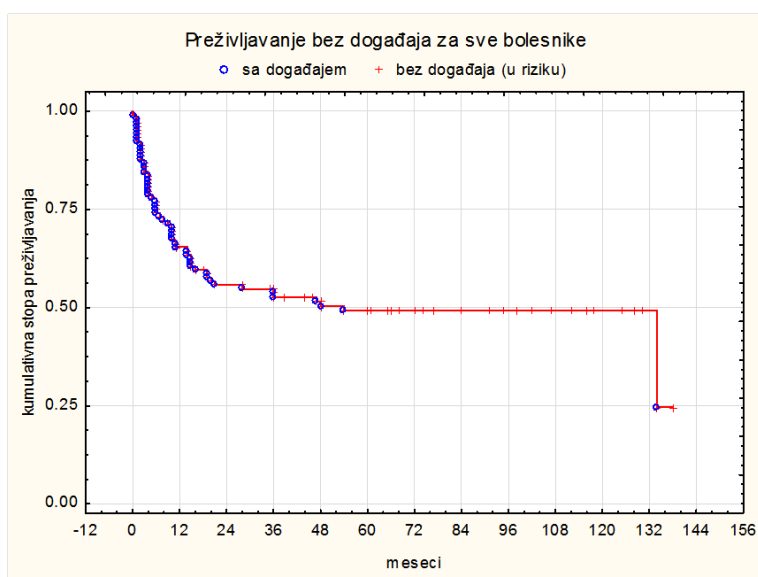
N=115	p	Risk ratio label (95% confidence interval)
Faktor		
IPI visok vs. nizak	0.000001	4.6 (2.5-8.6)
RCHOP vs. CHOP	0.061773	0.6 (0.3-1.0)
tip (GCB vs. non GCB)	0.932684	1.0 (0.5-1.9)

Četrdeset osam pacijenata su dobili CHOP ili CHOP- like terapiju, 63 pacijenta R-CHOP terapiju, dok su dva pacijenta primili samo terapiju kortikosteroidima. Dva pacijenta sa DBKL CNS-a su lečeni visokim dozama metotreksata.

Nakon primenjene terapije, kompletna remisija je postignuta kod 84 bolesnika (73,04%). Relaps bolesti se javio kod 49 pacijenata, da bi drugu kompletnu remisiju doživelo 5 pacijenata. Klinički stadijum, IPI i LDH su prognostički faktori u postizanju kompletne remisije bez obzira na primenjenu terapiju. Posle 5 godina praćenja 61 (53,04%) pacijenata je živo dok su 54 (46,95%) pacijenta umrla (Grafikon 7). Preživljavanje do neželjenog događaja je iznosilo 49% (Grafikon 8).



Grafikon 7. Ukupno petogodišnje preživljavanje cele grupe pacijenata sa DBKL



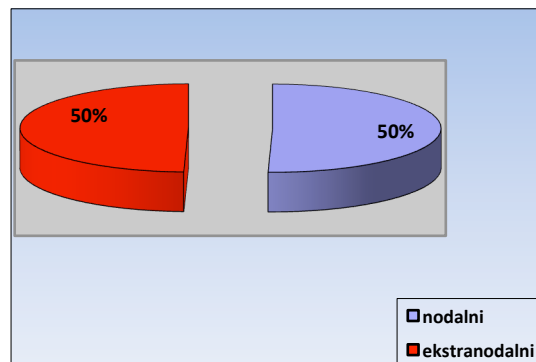
Grafikon 8. Preživljavanje do neželjenog događaja (EFS) za celu grupu pacijenata sa DBKL

Grupa pacijenata koja je bila na standardnoj hemioterapiji sa Rituximab-om imala je značajno bolje petogodišnje preživljavanje u odnosu na grupu koja je primila samo standardnu hemoterapiju bez Rituximab-a (log rank, $p=0,01$). Takođe, pacijenti iz grupe koja je primila standardnu hemoterapiju uz Rituximab je pokazala značajno bolje postizanje kompletne remisije (log rank, $p=0,003$).

Period do neželjenog događaja za pacijente koji su primili standardnu terapiju i Rituximab za period od 5 godina bilo je 60% odnosno 38% za pacijente koji su bili na terapiji bez Rituximab-a (log rank, $p=0,006$).

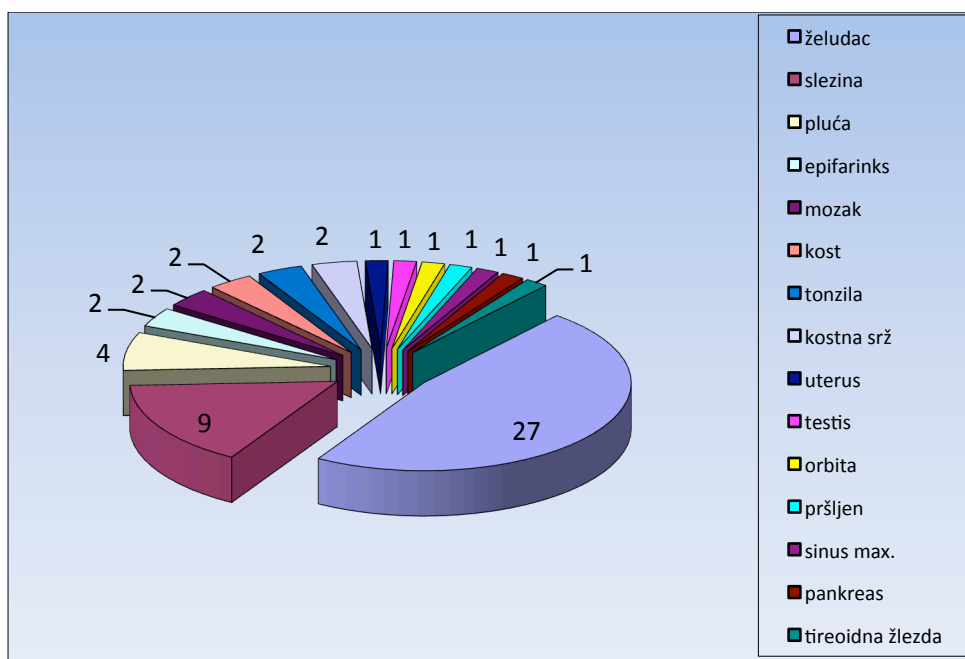
4.2.Lokalizacija DBKL

U studiji je bilo 58 (50,43%) nodalnih i 57 (49,56%) ektranodalnih DBKL (Grafikon 9).



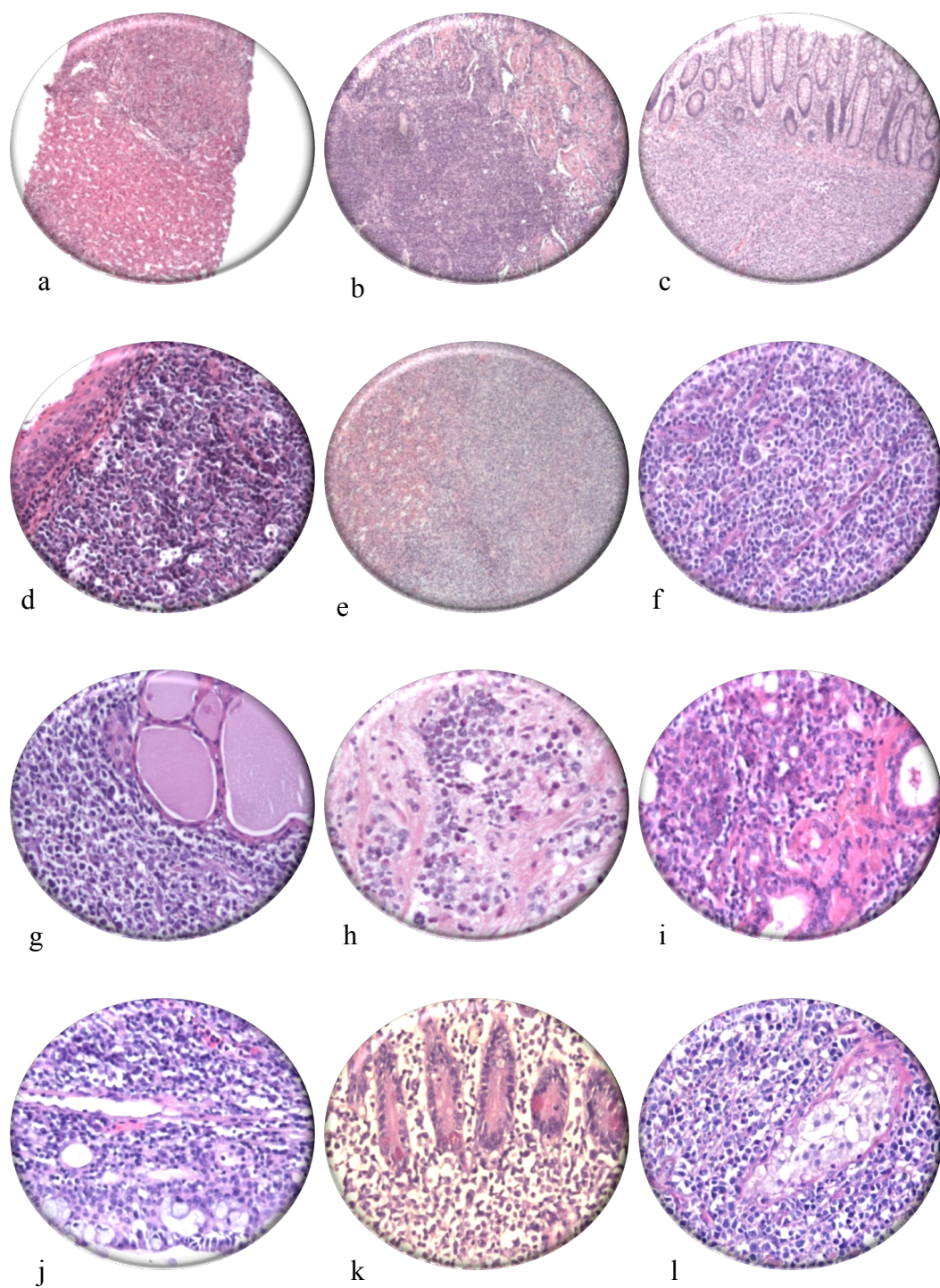
Grafikon 9. Lokalizacija DBKL

Najčešće zastupljena ekстранodalna lokalizacija bio je želudac (Slika 12), u 27 (23,5%) slučajeva, slezina 9 (7,82%), pluća 4 (3,47%), epifarinks, kost, tonzila, mozak i kostna srž po 2 (1,73%), a pankreas, štitasta žlezda, uterus, testis, orbita, pršljen i maksilarni sinus po jedan (0,86%)(Grafikon 10).



Grafikon 10. Ekстранodalne lokalizacije DBKL

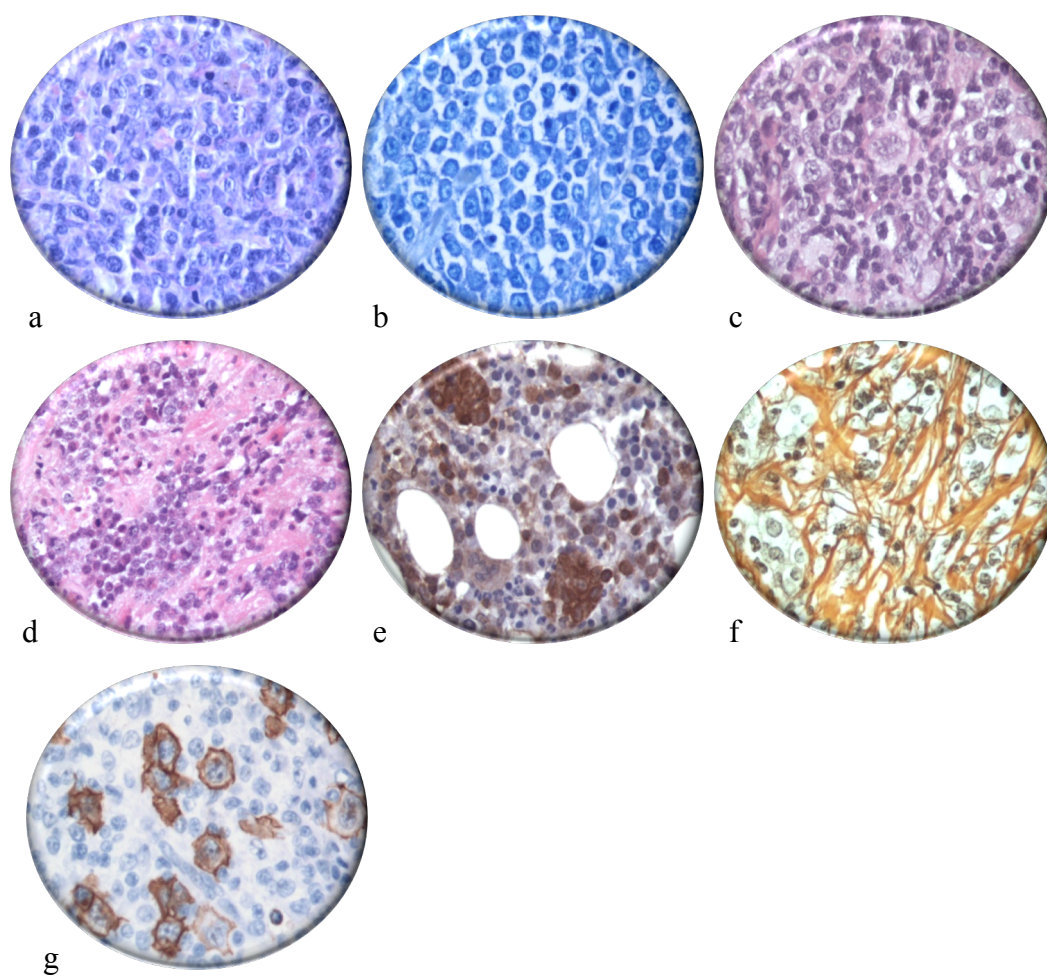
Nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju između pacijenata sa nodalnom lokalizacijom DBKL u odnosu na pacijente sa ekстранodalnom lokalizacijom (OS, log rank $p=0,899$, EFS log rank $p=0,539$).



Slika 9. Ekstranodalne lokalizacije DBKL. a) jetra, b) pluća, c) želudac, d) koža, e) slezina, f) limfni čvor, g) štitasta žlezda, h) mozak, i) pljuvačna žlezda, j) vežnjača, k) tanko crevo, l) testis [a, b, c, e: HEx50; d, f, g, h, i, j, k, l: HE200]

4.3. Morfološka i imunohistohemijska analiza

U analiziranoj grupi pacijenata bilo je 106 (92,17%) DBKL NOS, (103 centroblastni, 1 imunoblastni, 2 anaplastična), 4 (3, 47%) T ćelijama /histiocitima bogat B limfom, 2 (1,73%) primarna medijastinalna, 2 (1,73%) primarna DBKL CNS i 1 (0,86%) intravaskularni (Tabela 7, slika 10). Uticaj morfološkog podtipa DBKL na preživljavanje nije mogla biti ispitana zbog malog broja pacijenata iz grupe imunoblastnih i anaplastičnih.

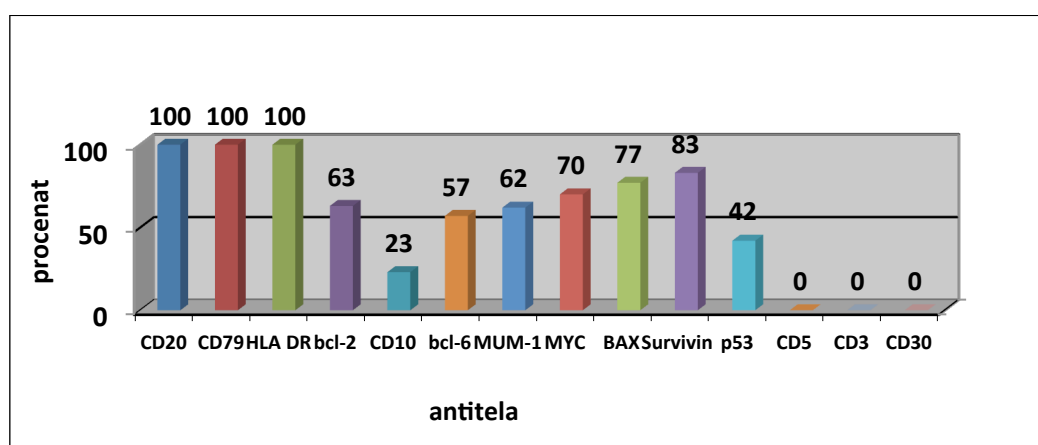


Slika 10. Tipovi DBKL u ispitivanoj grupi pacijenata. a) Centroblastni [Hex400] b) Imunoblastni [Giemsa400] c) Anaplastični [HEx400] d) DBKL CNS [HEx400] e) Intravaskularni [IHH CD20x400] f) B sklerozirajući limfom [Gordon Sweetx400] g) T ćelijama/histiocitima bogat B limfom [IHH CD20x400]

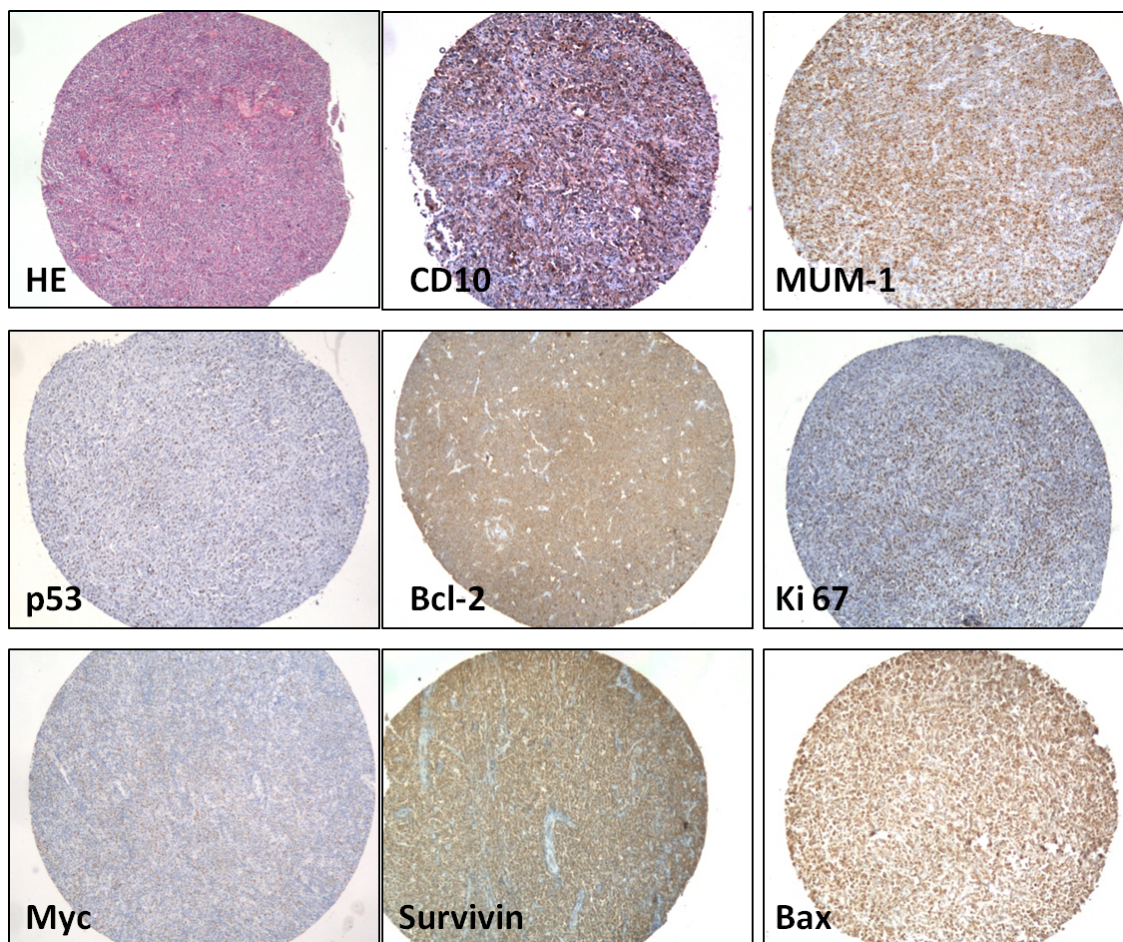
Tabela 7. Distribucija DBKL prema tipu

Tip DBKL	n	%
DBKL (ukupno)	115	100
DBKL NOS	106	92
centroblastni	103	89,5
imunoblastni	1	0,9
anaplastični	2	1,7
T ćelijama/ histiocitima bogat	4	3,5
Primarni medijastinalni	2	1,7
Primarni CNS	2	1,7
Intravaskularni	1	0,9

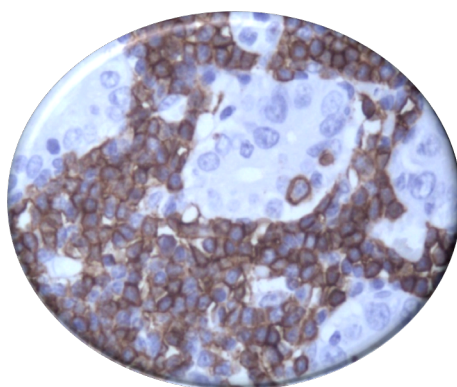
Svi ispitivani slučajevi su pokazali CD20, CD79 α , kao i HLA-DR pozitivnost. Svi ispitivani uzorci su bili CD3 negativni. Nije bilo CD5+, CD30+, ni CD138+ slučajeva. Bcl-6 je bio eksprimiran kod 66 (57%), CD10 kod 27 (23%), a MUM-1 kod 71 (62%) pacijenata (Grafikon 11)(Slika 11).



Grafikon 11. Imunohistohemijska ekspresija pojedinačnih markera u ispitivanoj grupi pacijenata



Slika 11. TMA, ekspresija pojedinačnih markera, IHHx50



Slika 12. DBKL NOS želuca, centroblastni, CD20, IHHx400

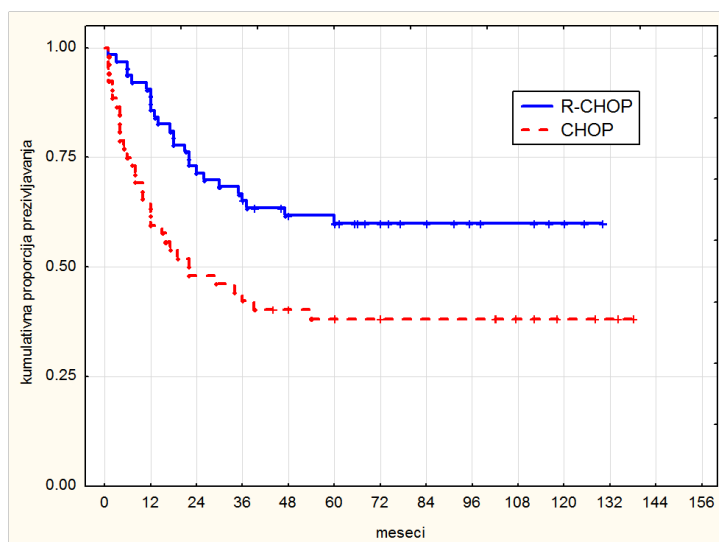
Zbog morfološke homogenosti grupe, izdvojili smo 103 pacijenta sa DBKL centroblastnog tipa. Laboratorijske i kliničke karakteristike ove grupe pacijenata prikazane su na tabeli 8.

Tabela 8. Laboratorijske i kliničke karakteristike 103 DBKL centroblastne morfologije.

		N	(%)
Centroblastni DBKL NOS		103	100
Karakteristike			
Starosna dob	Mediana	56 (17-87)	
	<60	59	57
	≥60	44	43
Pol	Muški	55	53
	Ženski	48	47
Ann Arbor stadijum	I-II	30	29
	III-IV	73	71
B-simptomi	da	80	78
Visok serumski LDH	da	67	66
Voluminozna tumorska masa	da	26	25
Ekstranodalno širenje	da	83	81
Infiltracija kostne srži	da	33	32
IPI	Nizak, 0-2	53	51
	Visok, 3-5	50	49
Prezentacija	Nodalno	45	44
	Drugi limfatični organi	11	11
	Ekstranodalno	47	46
Podtip	GCB	28	27
	Non-GCB	75	73
Terapija	CHOP	46	45
	R CHOP	57	55

4.4. Terapijski pristup

Četrdeset šest pacijenata je primilo CHOP ili CHOP-like terapiju, dok je 57 pacijenata primilo R CHOP terapiju. Petogodišnje ukupno preživljavanje u grupi pacijenata koji su lečeni hemoterapijom i Rituximab-om je bilo značajno bolje u odnosu na pacijente koji su lečeni standardnom hemoterapijom bez Rituximab-a (61% vs 38%, log rank p=0,007)(Grafikon 12). Petogodišnje EFS bilo je 60% u RCHOP i 36% CHOP grupi (log rank p=0,007).



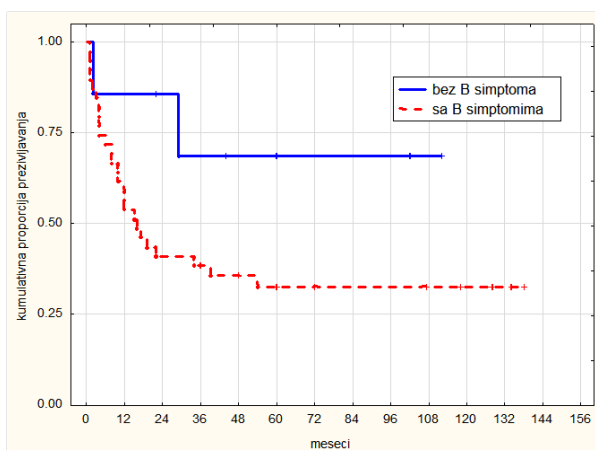
Grafikon 12. Ukupno preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na primenjenu terapiju

Tabela 9. Uticaj ispitivanih faktora na odgovor na terapiju i preživljavanje ispitivanih bolesnika u odnosu na terapijski pristup

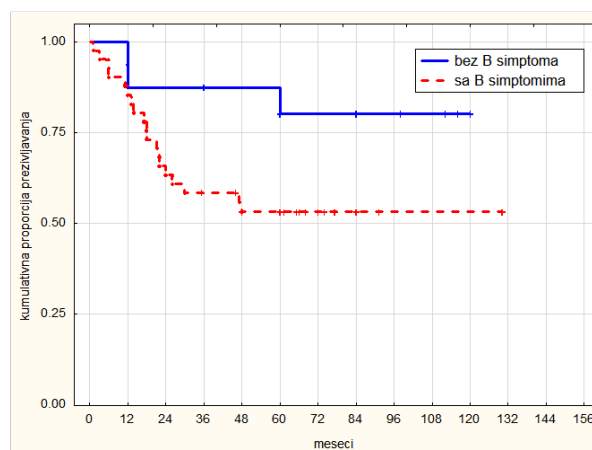
	Centroblastni DBKL (n=103)			
	CHOP		R CHOP	
	CR	OS	CR	OS
	p	p	p	p
B simptomi	0,1	0,05	0,7	0,05
“Bulky”	0,1	0,02	0,4	0,6
LDH	0,002	0,000	0,3	0,2
CS	0,07	0,1	0,7	0,01
IPI	0,001	0,001	0,1	0,002
GCB/non GCB	0,07	0,9	0,05	0,2
Bcl-2	0,5	0,1	0,2	0,9
Bcl-6	0,2	0,08	0,7	0,1
CD10	0,3	0,2	0,1	0,4
MUM-1	0,01	0,7	0,7	0,1
Ki 67	0,7	0,7	0,8	0,5
myc	0,3	0,6	0,7	0,5

Posle terapije, kompletna remisija je postignuta kod 75 pacijenata (73%). Kompletna remisija je postignuta značajno češće kod pacijenata sa niskim IPI skorom, normalnim nivoom LDH i MUM-1 pozitivnim DBKL, u CHOP grupi (log rank $p=0,001$, $p=0,002$, $p=0,01$, po redosledu) (Tabela 9).

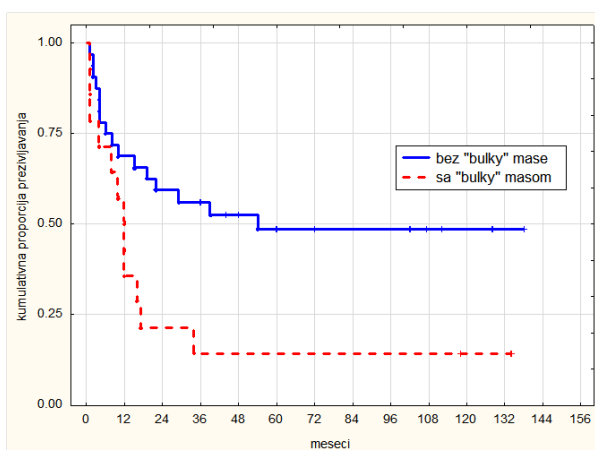
Nepovoljni faktori preživljavanja su: visok IPI, "bulky disease", visok serumski LDH u CHOP grupi (log rank $p=0,001$, $p=0,02$, $p=0,000$, po redosledu) i visok IPI, visok klinički stadijum (III-IV) i B simptomi u R CHOP grupi ($p=0,002$, $p=0,01$, $p=0,05$ po redosledu) (Tabela 9, Grafikoni 13-20).



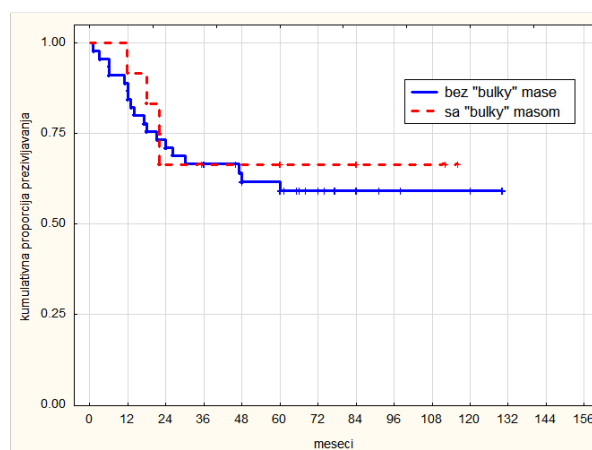
Grafikon 13. Ukupno preživljavanje u CHOP grupi u odnosu na postojanje B simptoma, Log rank test $p=0.07$



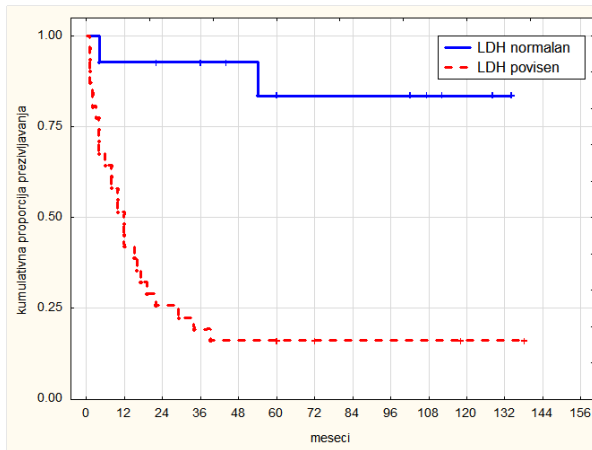
Grafikon 14. Ukupno preživljavanje u R CHOP grupi u odnosu na postojanje B simptoma, Log rank test $p=0.05$



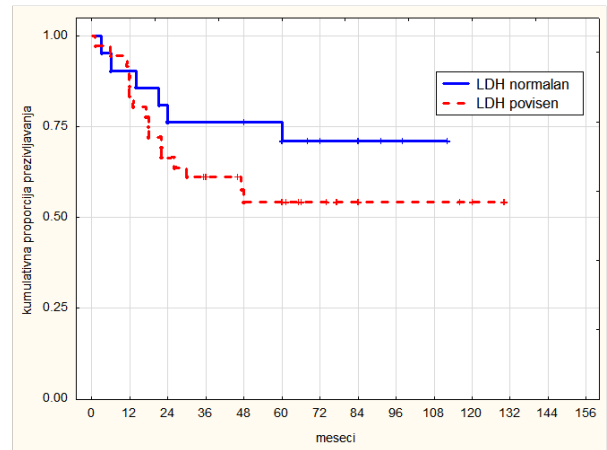
Grafikon 15. Ukupno preživljavanje u CHOP grupi u odnosu na „bulky“ tumorsku masu, Log rank test $p=0.026$



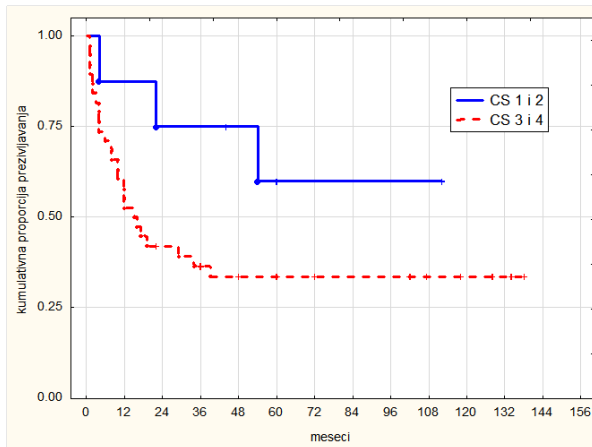
Grafikon 16. Ukupno preživljavanje u R CHOP grupi u odnosu na „bulky“ tumorsku masu, Log rank test $p=0.642$



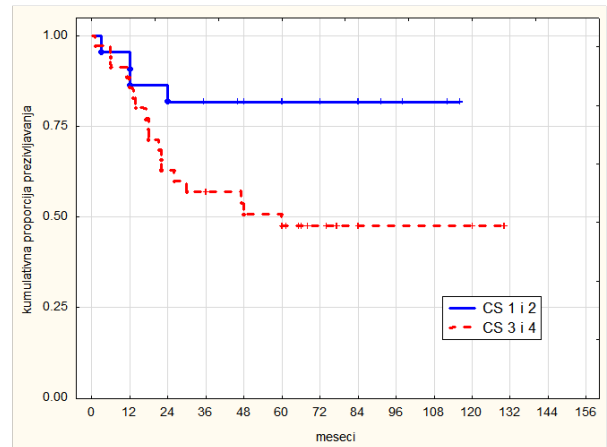
Grafikon 17. Ukupno preživljavanje u CHOP grupi u odnosu na nivo LDH, Log rank test $p=0.0001$



Grafikon 18. Ukupno preživljavanje u R CHOP grupi u odnosu na nivo LDH, Log rank test $p=0.222$

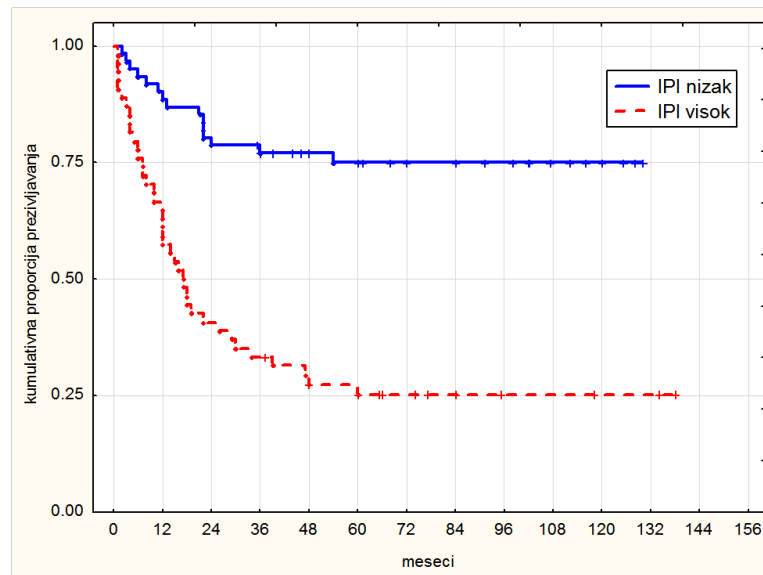


Grafikon 19. Ukupno preživljavanje u CHOP grupi u odnosu na klinički stadijum, Log rank test $p=0.073$



Grafikon 20. Ukupno preživljavanje u R CHOP grupi u odnosu na klinički stadijum, Log rank test $p=0.019$

Univarijantna analiza je pokazala da visok IPI značajno utiče na ukupno preživljavanje (75% vs. 25%, Log rank, $p=0,000$) u obe terapijske grupe (Grafikon 21).



Grafikon 21. Ukupno preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na IPI

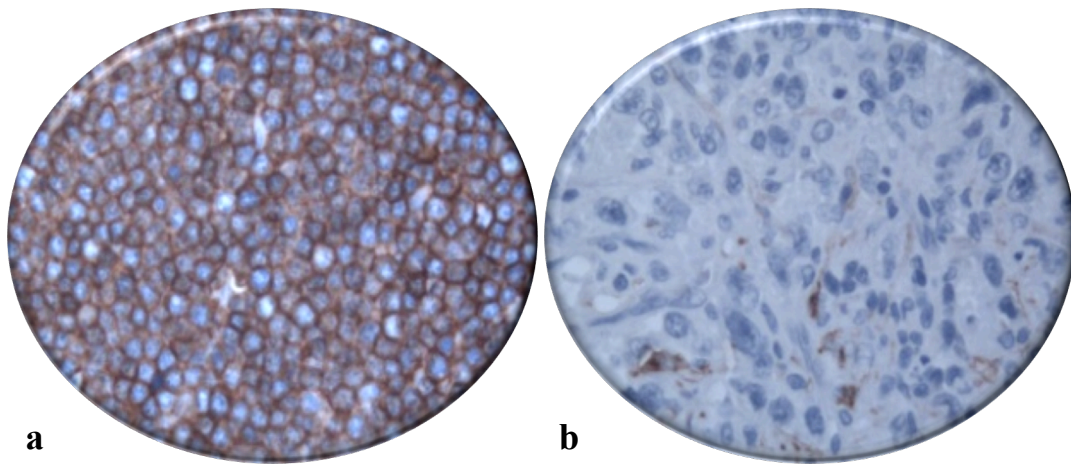
U multivarijantnoj analizi, visok IPI je identifikovan kao nezavisan prognostički faktor preživljavanja kod pacijenata sa centroblastnim tipom DBKL (Tabela 10).

Tabela 10. Multivarijantna analiza faktora preživljavanja za pacijente sa centroblastnim tipom DBKL

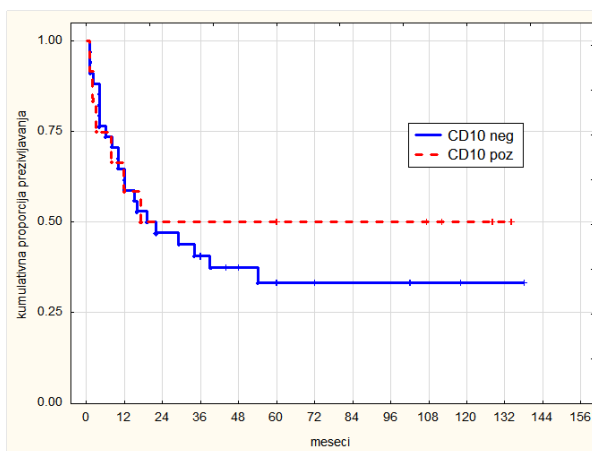
N=103	p	Risk ratio label (95% confidence interval)
Faktor		
IPI visok vs. nizak	0.000025	4.05 (2.1-7.8)
RCHOP vs. CHOP	0.065270	0.6 (0.3-1.0)
tip (GCB vs. non GCB)	0.918284	1.0 (0.5-1.9)

4.5. Prognostički značaj imunohistohemijskih markera

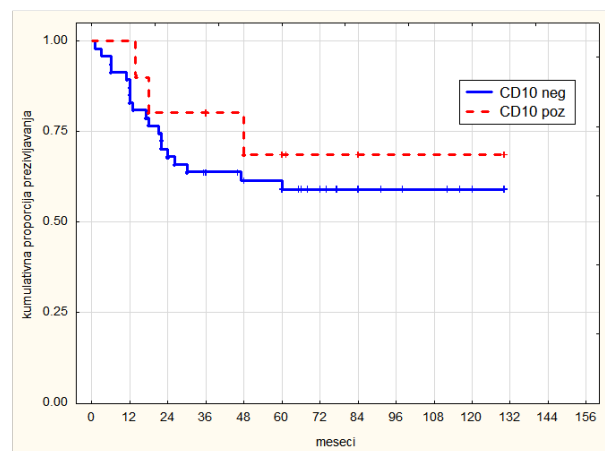
Ekspresija CD10 (Slika 13) kod svih ispitivanih slučajeva je bila udružena sa boljim preživljavanjem, mada razlika nije bila statistički značajna (log rank, $p=0.391$). Takođe, ekspresija CD10 nije značajno uticala na ukupno preživljavanje ni u CHOP grupi (log rank, $p=0.518$) (Grafikon 22), kao ni u grupi pacijenata lečenih terapijom R CHOP ($p=0.482$) (Grafikon 23). Ekspresija CD10, kao ni bcl-6, bcl-2, MUM-1, BAX, MYC, Survivin, Ki-67 nije pokazala značajan uticaj ni na postizanje kompletne remisije bolesti (log rank $p=0.99$, $p=0.28$, $p=0.5$, $p=0.28$, $p=0.16$, $p=0.9$, $p=0.33$, $p=0.09$ po redosledu).



Slika br. 13. Ekspresija CD10 (x400): a) pozitivan b) negativan

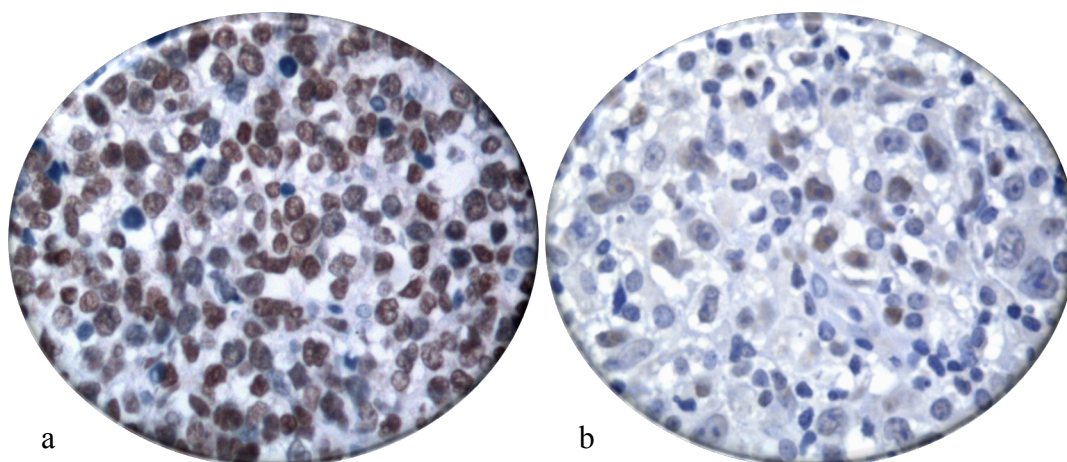


Grafikon 22. Ukupno preživljavanje u odnosu na ekspresiju CD10 u CHOP grupi, Log rank test $p=0.518$



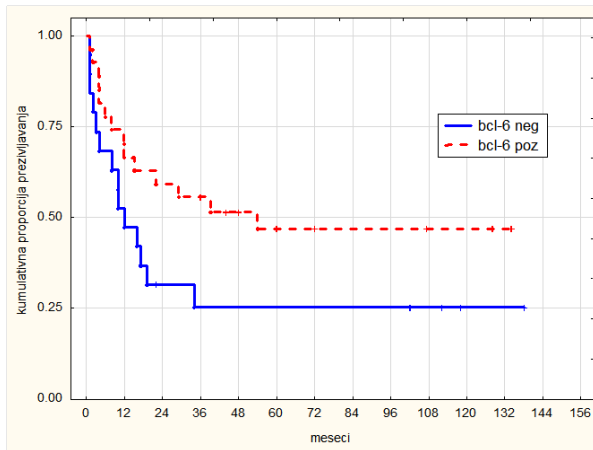
Grafikon 23. Ukupno preživljavanje u odnosu na ekspresiju CD10 u R CHOP grupi, Log rank test $p=0.482$

Ekspresija Bcl-6 (Slika 14) analizirana na celoj grupi pacijenata, nije pokazala uticaj na preživljavanje (log rank, $p=0,9$). Međutim, utvrđena je pozitivna korelacija između Bcl-6+ tumora i “bulky” tumorske mase (log rank, $p=0,08$).

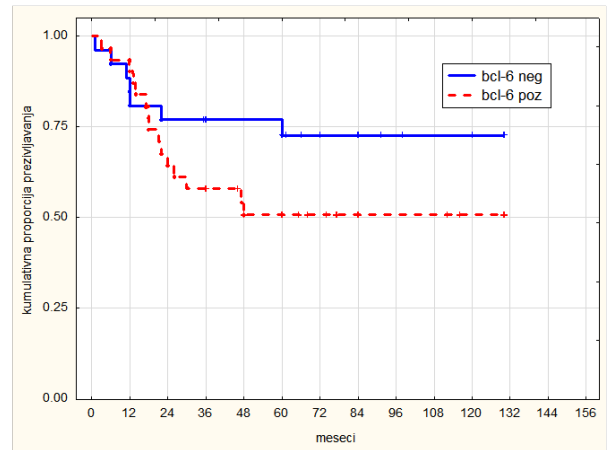


Slika 14. Ekspresija Bcl-6 a) visoka (IHHx400) b) niska (IHHx400)

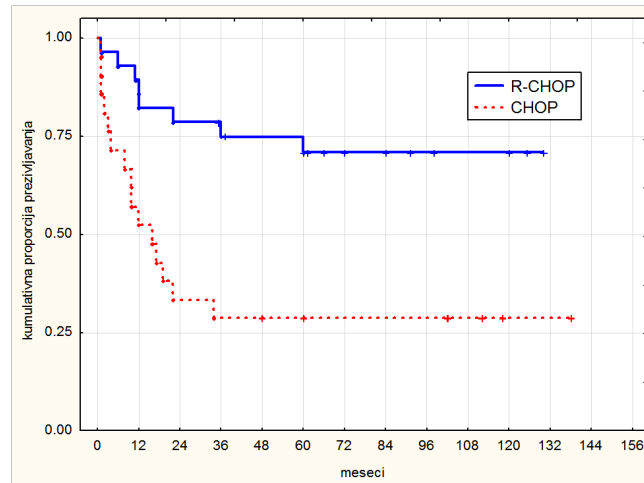
Takođe je ispitan značaj ekspresije Bcl-6 kod pacijenata s DBKL koji su tretirani hemioterapijom i onih koji su lečeni imunochemioterapijom. U CHOP grupi, Bcl-6 pozitivni slučajevi su imali bolje ukupno preživljavanje nego Bcl-6 negativni (47% vs. 25%, log rank, $p=0,086$) (Grafikon 24). U grupi pacijenata koji su lečeni R CHOP terapijom, Bcl-6 negativni slučajevi su imali bolje preživljavanje nego Bcl-6 pozitivni (73% vs 51%, log rank, $p=0,139$) (Grafikon 25). Dodavanje rituximab-a standardnoj hemioterapiji nije značajno poboljšalo ukupno preživljavanje pacijenata sa Bcl-6 pozitivnim DBKL, (51% vs 47%, log rank, $p=0,568$), ali pacijenti sa Bcl-6 negativnim DBKL su imali značajno bolje ukupno preživljavanje u R CHOP u odnosu na CHOP grupu (73% vs 25%, log rank, $p=0,001$) (Grafikon 26).



Grafikon 24. Ukupno preživljavanje u odnosu na ekspresiju Bcl-6 u CHOP grupi, Log rank test $p=0.086$

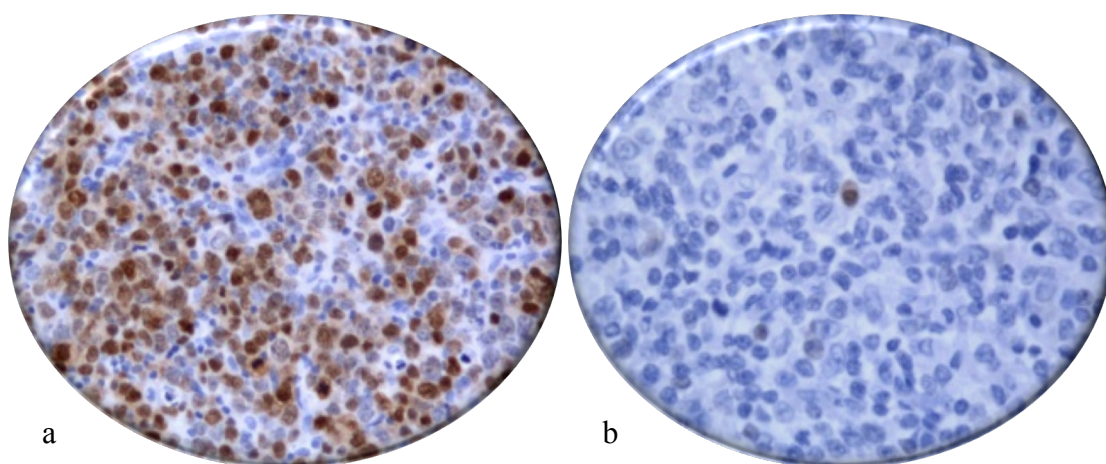


Grafikon 25. Ukupno preživljavanje u odnosu na ekspresiju Bcl-6 u R CHOP grupi, Log rank test $p=0.139$

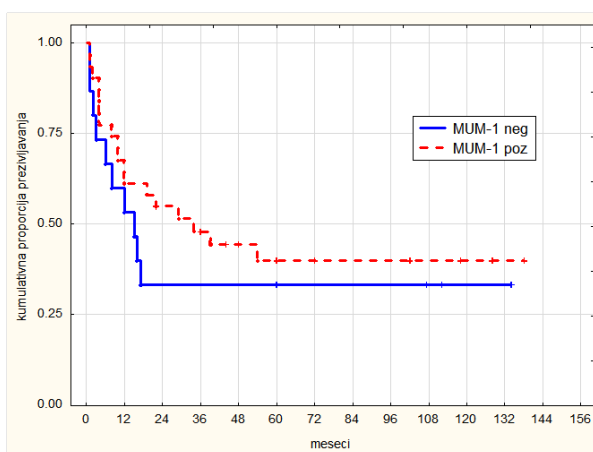


Grafikon 26. Ukupno preživljavanje bolesnika sa Bcl-6 negativnim DBKL u odnosu na primenjenu terapiju, Log rank test $p=0,001$

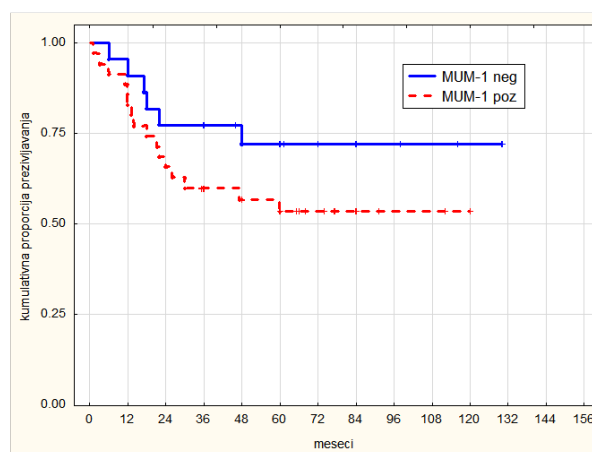
Ekspresija MUM-1 (Slika 15), je bila povezana sa lošijim ishodom bolesti u celoj grupi pacijenata, mada bez statističke značajnosti (log rank, $p=0,316$). Takođe, nije bilo razlike u ukupnom preživljavanju u odnosu na ekspresiju MUM-1 ni u CHOP grupi (Grafikon 27), ni u grupi pacijenata lečenih R CHOP terapijom, (log rank, $p=0.420$, $p=0.166$, po redosledu) (Grafikon 28).



Slika 15. Ekspresija MUM 1 a) visoka (IHHx400) b) tumorske ćelije su negativne (IHHx400)



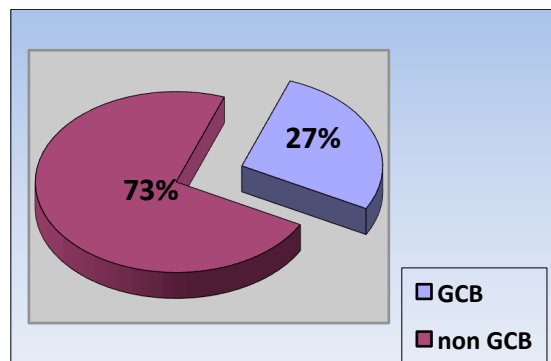
Grafikon 27. Ukupno preživljavanje u odnosu na ekspresiju MUM-1 u CHOP grupi, Log rank test $p=0.420$



Grafikon 28. Ukupno preživljavanje u odnosu na ekspresiju MUM-1 u R CHOP grupi, Log rank test $p=0.166$

4.6. Subklasifikacija na bazi COO (GCB, non GCB podtip)

U skladu sa originalnim studijama za određivanje porekla ćelije (COO subtyping), na osnovu urađene imunohistohemijske analize u skladu sa algoritmom Hans i saradnika GCB fenotip je ustanovljen kod 28 (27%) i non GCB kod 75 (73%) pacijenata (Grafikon 29). CD10 je bio eksprimiran u 21% slučajeva, Bcl-6 u 56% i MUM-1 u 64% slučajeva.

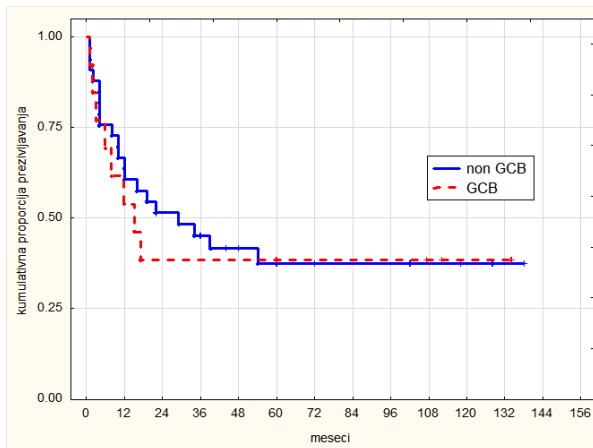


Grafikon 29. Distribucija DBKL po (COO) podtipu

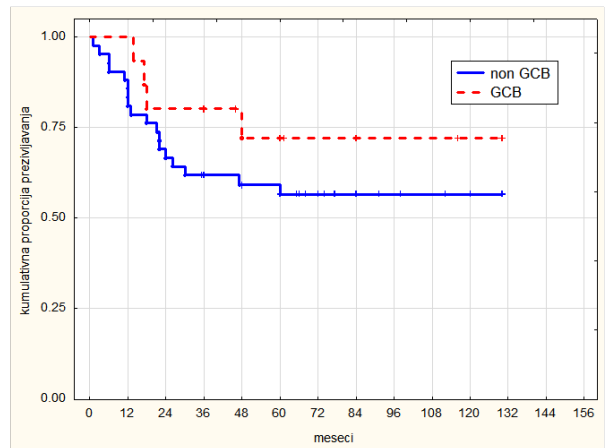
Da bi smo analizirali prediktivnu vrednost subklasifikacije na bazi porekla ćelije (COO), ispitivali smo ishod bolesti kod pacijenata GCB, odnosno non-GCB podtipa. Kliničke karakteristike pacijenata GCB, odnosno non GCB podtipa se nisu značajno razlikovale.

Kompletna remisija je postignuta češće kod pacijenata GCB tipa lečenih CHOP terapijom (log rank, $p=0,07$) i značajno češće u R CHOP terapijskoj grupi (log rank, $p=0,05$) (Tabela 9). Ekspresija nijednog imunohistohemijskog markera nije imala uticaj na postizanje kompletne remisije, osim ekspresije MUM-1 i to u grupi pacijenata lečenih CHOP terapijom (log rank, $p=0,01$) (Tabela 9).

Subklasifikacija na bazi porekla ćelije (COO) nije imala značajan uticaj na preživljavanje ni u grupi pacijenata lečenih samo standardnom terapijom bez rituximab-a (GCB vs non GCB, log rank, $p=0,787$) (Grafikon 30), kao ni u R CHOP terapijskoj grupi (OS 72% vs 57%, GCB vs non GCB, log rank, $p=0,256$) (Grafikon 31), mada su pacijenti DBKL GCB podtipa imali bolje ukupno preživljavanje nego pacijenti non GCB podtipa u R CHOP grupi.



Grafikon 30. Ukupno preživljavanje u CHOP grupi u odnosu na COO podtip, Log rank test $p=0.787$

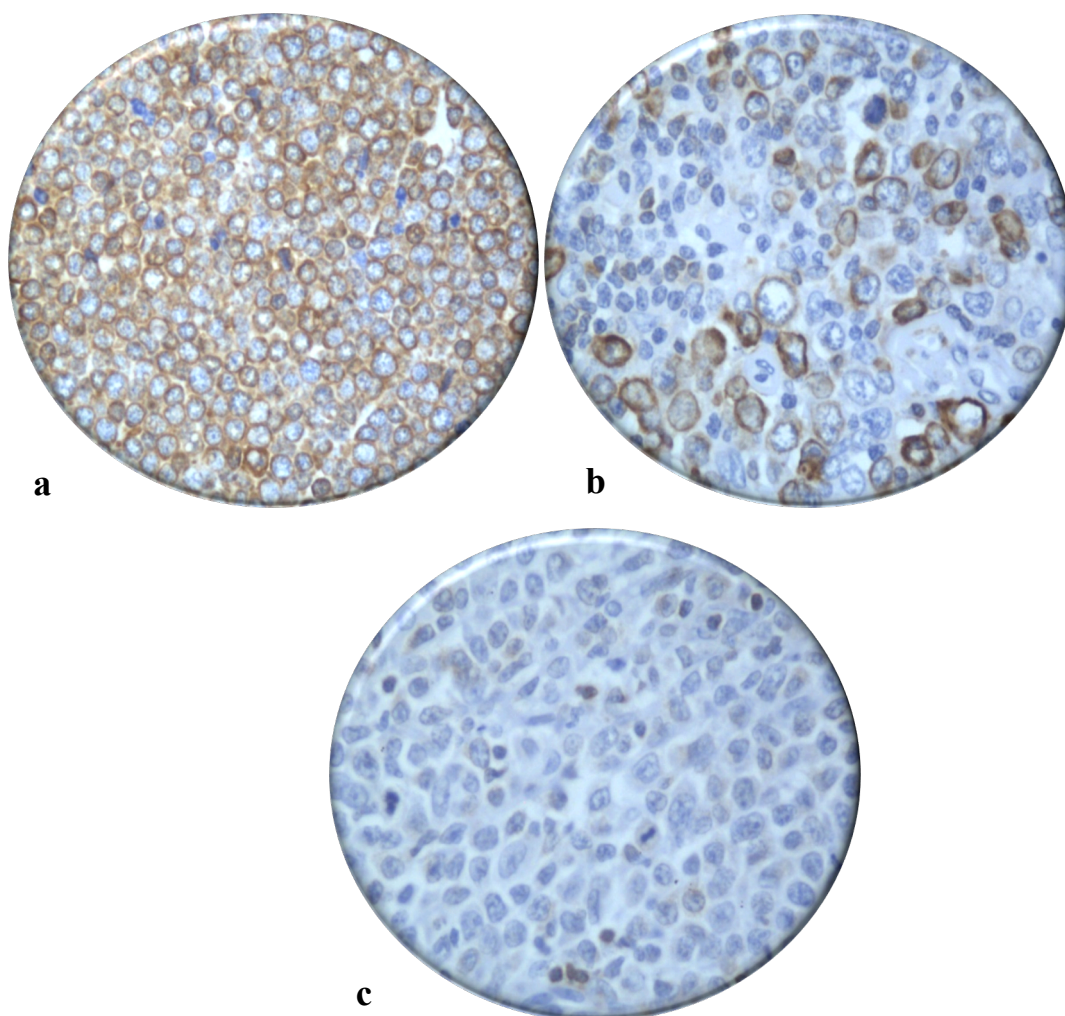


Grafikon 31. Ukupno preživljavanje u R CHOP grupi u odnosu na COO podtip, Log rank test $p=0.256$

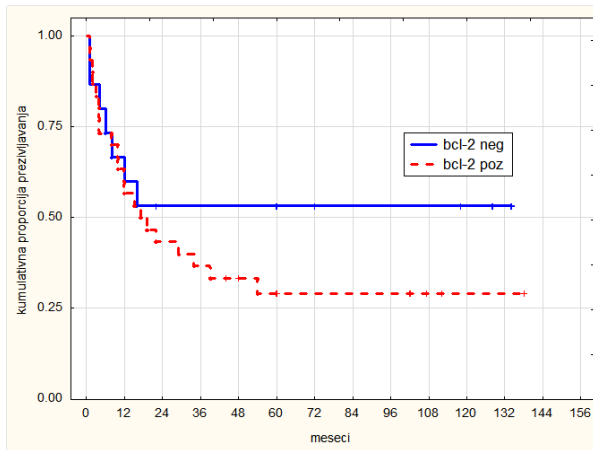
Pacijenti GCB podtipa koji su primili R CHOP, imali su značajno bolje preživljavanje od onih koji su primili standardnu terapiju bez rituximab-a (5 godišnje OS 72% vs 38%, log rank, $p=0.031$). Pacijenti non GCB podtipa koji su primili R CHOP takođe su imali značajno bolje preživljavanje od onih koji su tretirani samo hemioterapijom (5 godišnje OS 57% vs 37%, log rank, $p=0.05$).

4.7. Analiza ekspresije Bcl-2

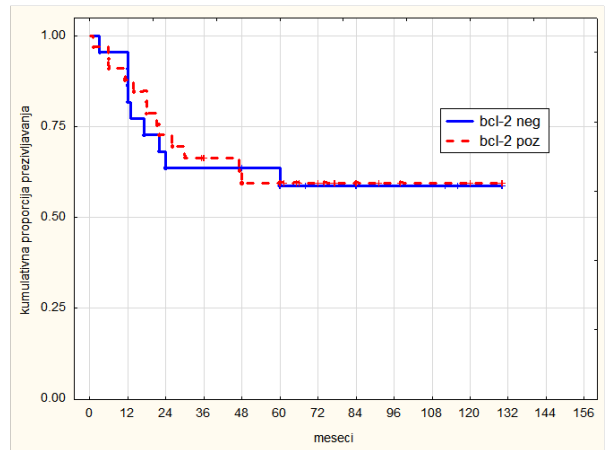
Ekspresija Bcl-2 proteina je detektovana kod 63% pacijenata (slika 16). Ispitali smo značaj ekspresije Bcl-2 u odnosu na ishod bolesti. Ekspresija Bcl-2 proteina nije imala uticaj na ukupno preživljavanje ni u grupi pacijenata lečenoj CHOP (log rank, $p=0,268$)(Grafikon 32), ni u grupi pacijenata lečenih imunohemioterapijom (log rank, $p=0,901$)(Grafikon 33). Dodavanje rituximab-a standardnoj hemioterapiji je značajno poboljšalo ukupno preživljavanje pacijenata koji su imali Bcl-2 pozitivan DBKL (60 vs 29%, log rank $p=0,008$)(Grafikon 34), ali ne i onih koji su imali Bcl-2 negativan DBKL (59% vs 53%, $p=0,456$). Utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između slučajeva DBKL koji su bili Bcl-2+ i onih koji su bili Bcl-6+ (Spearman Rank $p=0,01$).



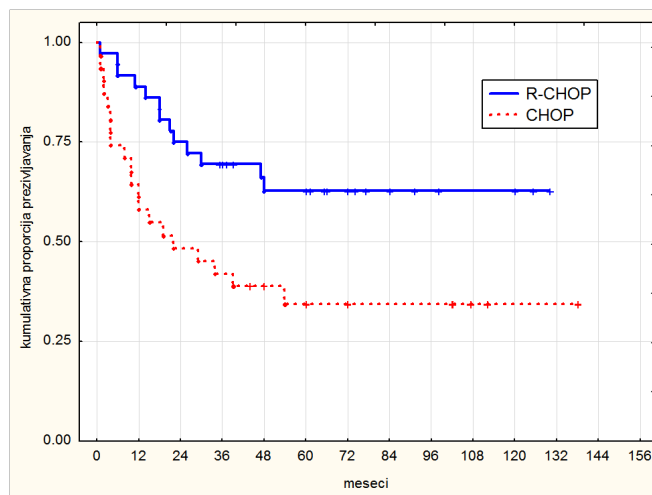
Slika 16. Ekspresija Bcl-2 proteina. a) visoka (x400) b) umerena (x400) c) niska (x400)



Grafikon 32. Ukupno preživljanje u odnosu na ekspresiju Bcl-2 u CHOP grupi, Log rank test $p=0.268$

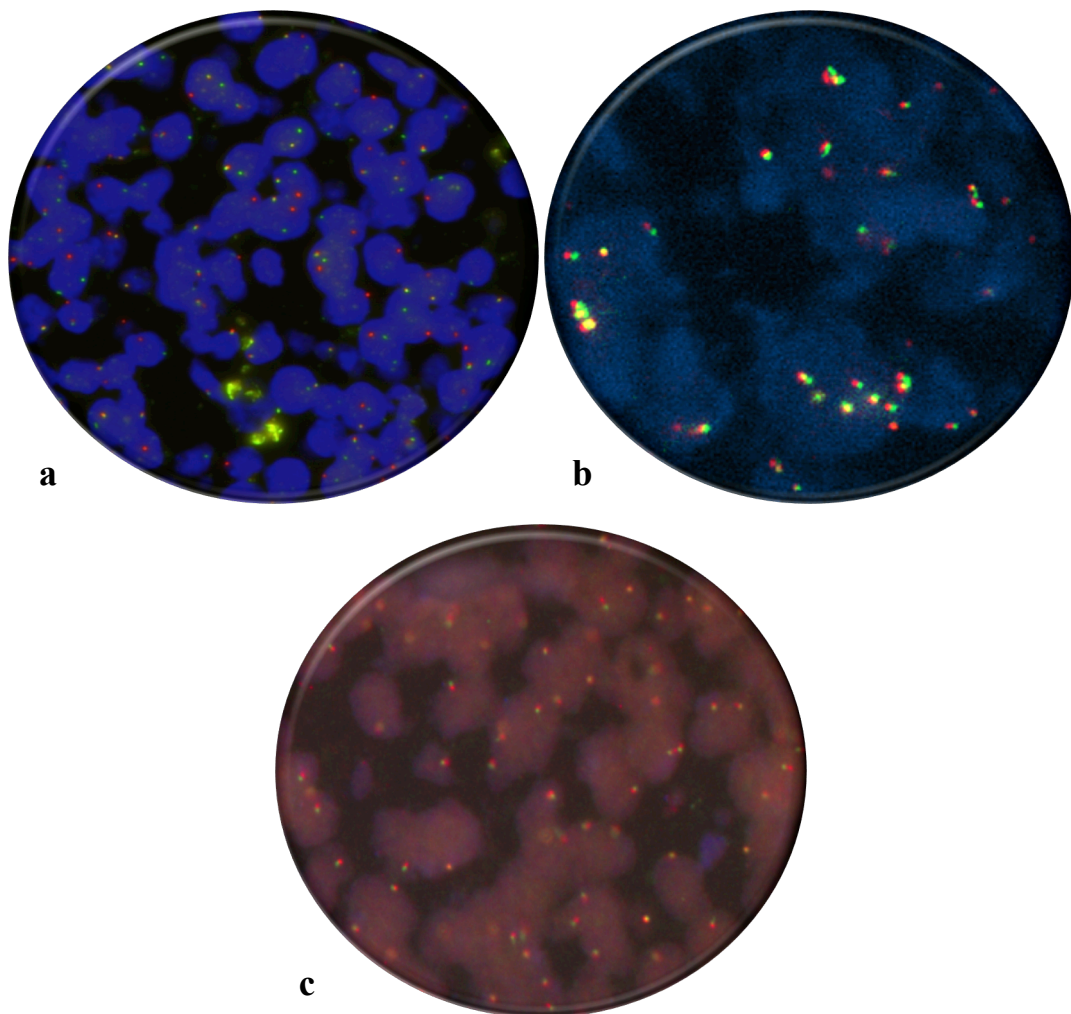


Grafikon 33. Ukupno preživljanje u odnosu na ekspresiju Bcl-2 u R CHOP grupi, Log rank test $p=0.901$



Grafikon 34. Ukupno preživljanje bolesnika sa Bcl-2 pozitivnim DBKL u odnosu na primenjenu terapiju, Log rank test $p=0,008$

Alteracije *BCL 2* gena su identifikovane kod 13 od 67 (19,40%) pacijenata, i to 3 (4,47%) rearanžmana i 10 (14,9%) amplifikacija (Slika 17).

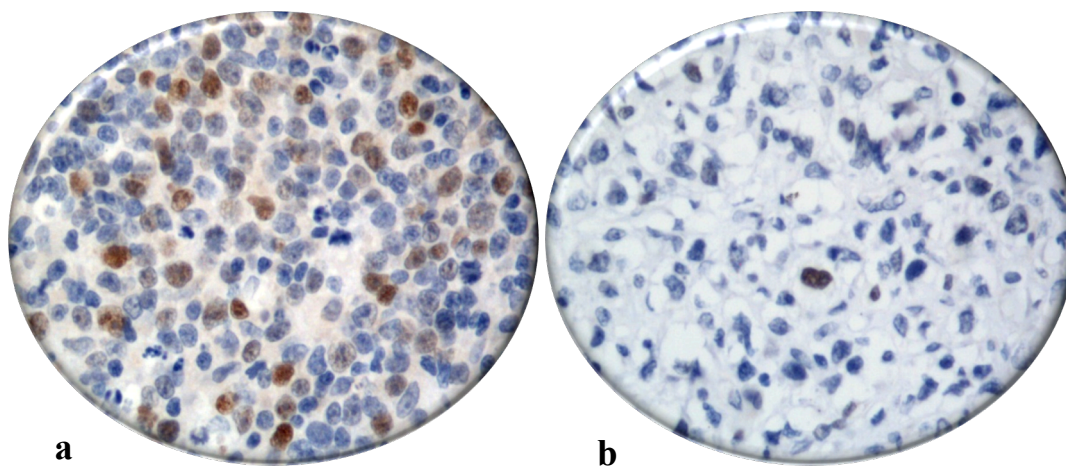


Slika 17. Ekspresija BCL 2 gena. a) *BCL2* rearanžman, b) *BCL2* amplifikacija, c) *BCL2* negativan

Devet od 13 slučajeva (69,23%) sa alteracijom *BCL2* gena je pokazalo Bcl-2 pozitivnost imunohistohemijski. Ekspresija Bcl-2 proteina (45 of 65; 69,23%) i *BCL2* amplifikacija (10 of 10; 100%) je bila češće udružena sa non GCB podtipom. Nije uočena korelacija između dve metode ispitivanja ekspresije *BCL2*.

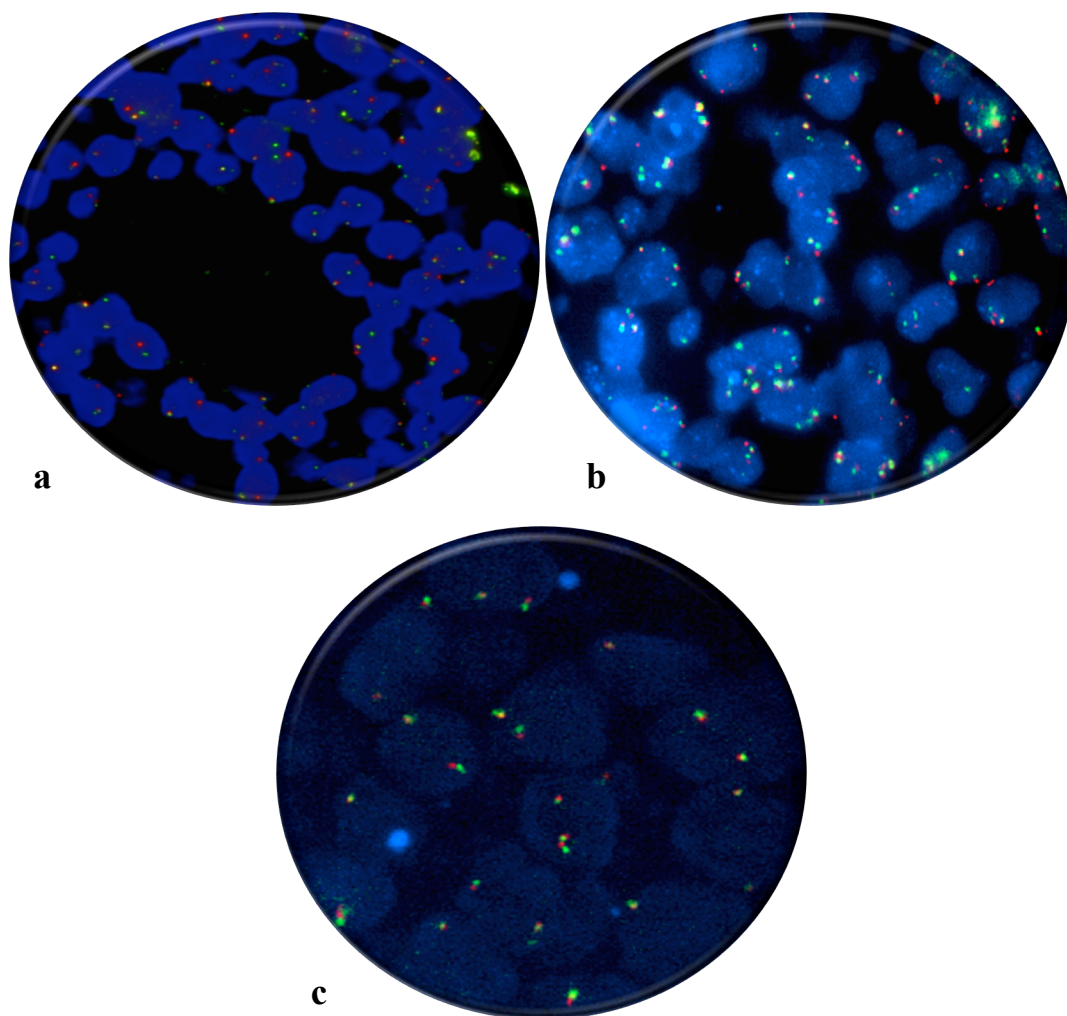
4.8. Analiza ekspresije MYC

Kod 67 analiziranih pacijenata, imunohistohemijskom analizom utvrđena je ekspresija Myc proteina u 47 (70%) slučajeva u različitom procentu (10-60%, mean 21,35, medijana 20) (Slika 18). U 27 (40%) slučajeva, uočena je ekspresija Myc proteina u $\geq 30\%$ ćelija, dok je u 20 (30%) slučajeva, Myc pozitivno nuklearno bojenje uočeno u 10-30% tumorskih ćelija. U 20 (30%) uzoraka bojenje je bilo negativno. U Myc+ grupi, 40% slučajeva je bilo non GCB podtipa, dok je 28% slučajeva bilo GCB podtipa.



Slika 18. IHH ekspresija MYC proteina. a) visoka (x400) b) niska (x400)

U seriji ispitivanih bolesnika metodom FISH, 13 od 67 (19,40%) slučajeva DBKL je imalo alteraciju *MYC* gena, i to 5 translokacija (7,46%) i 8 amplifikacija (11,94%) (Slika 19).



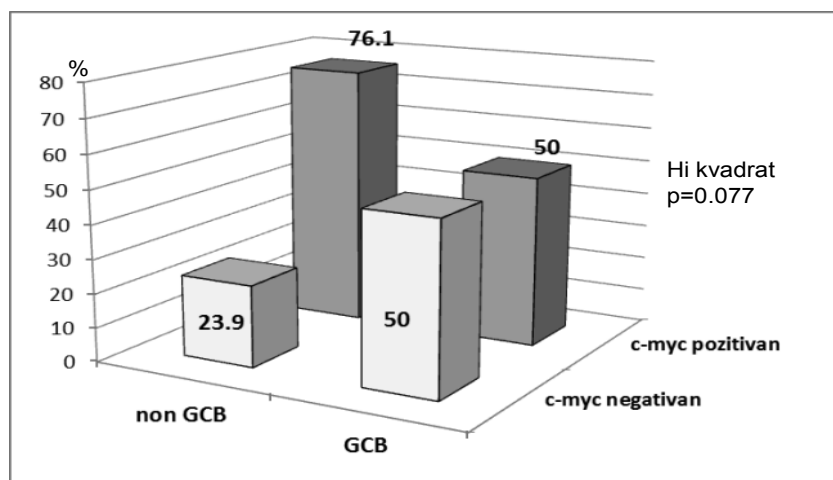
Slika 19. Ekspresija MYC gena. a) *MYC* rearanžman b) *MYC* amplifikacija c) *MYC* negativan

MYC alteracija je bila solitarna u 10 od 67 (14,92%) uzoraka. U četiri slučaja (6%), *MYC* translokacija je bila solitarna genska alteracija dok je jedan slučaj sa *MYC* translokacijom imao udruženu amplifikaciju *BCL2* gena. Dva slučaja su imali udruženu *MYC/BCL2* amplifikaciju. Četiri slučaja (4 od 5, 80%) DBKL sa rearanžmanom *MYC* gena je pokazalo nuklearno *MYC* bojenje u $\geq 30\%$ tumorskih ćelija, i samo u 2 od 8 (25%) slučajeva sa amplifikacijom *MYC* gena.

Devetnaest slučajeva (19 od 54, 35%) bez alteracije *MYC* gena rearanžmana je takođe pokazalo povećanu ekspresiju *MYC* proteina imunohistohemijski (Slika 18). Nije uočena korelacija između dve metode ispitivanja ekspresije *MYC* proteina.

Nije bilo razlike u učestalosti između GCB versus non GCB podtipa u *MYC*⁺ i *MYC*⁻ slučajevima. Pacijenti sa alteracijom *MYC* gena su češće imali visok IPI nego ostali pacijenti (74% vs 66,6%, log rank $p=0,529$).

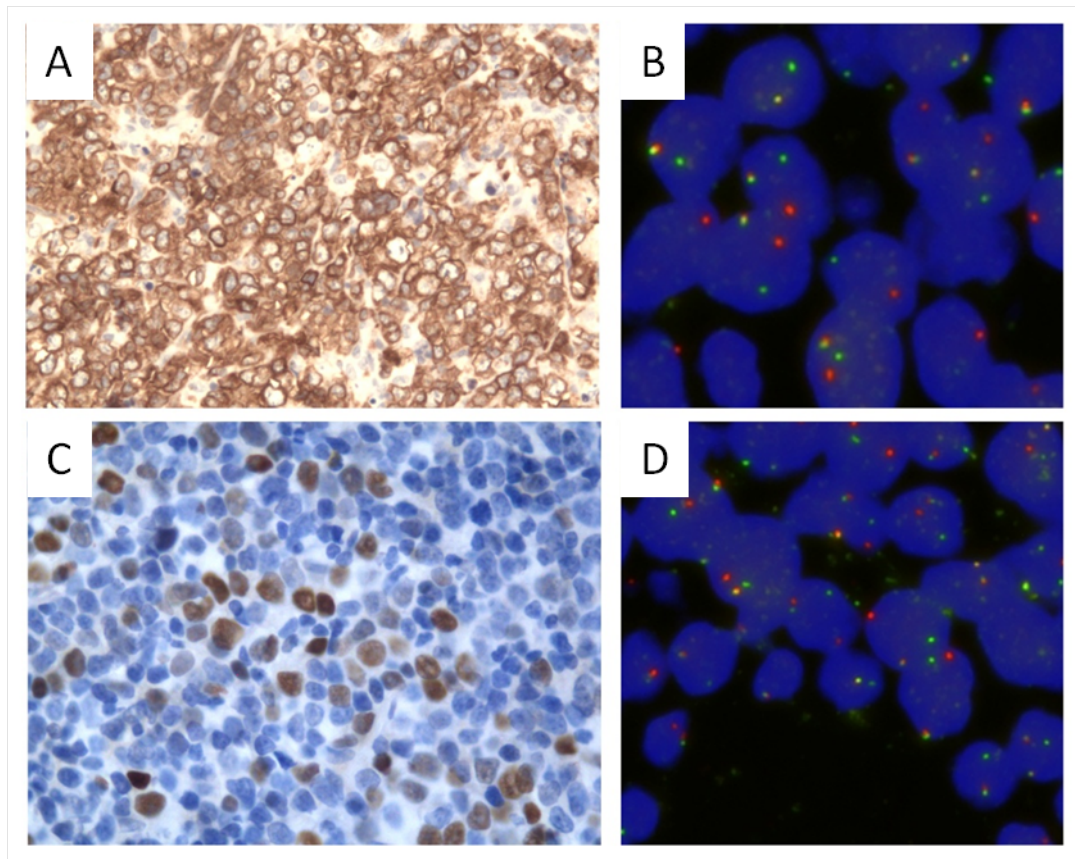
Odnos između ćelije porekla u DBKL i c-myc pozitivnosti na IHH



Grafikon 35. Odnos između COO podtipa DBKL i ekspresije MYC proteina

Dvadeset tri od 67 uzoraka (34%) ispitivanih metodom FISH na *MYC* i *BCL2* je imalo bar jednu gensku alteraciju.

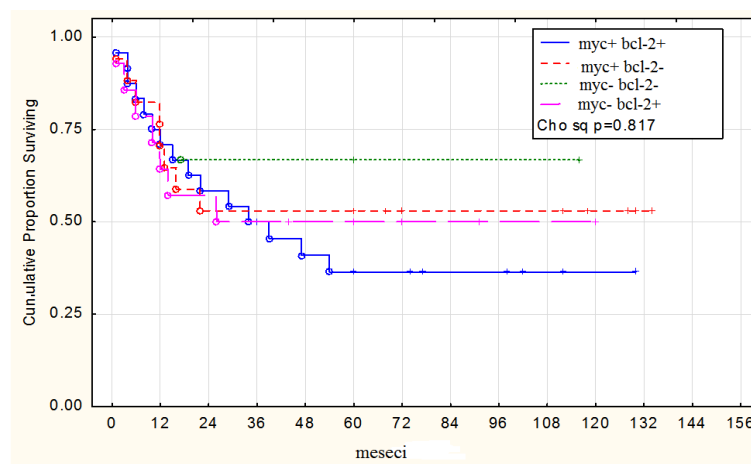
Tri pacijenta sa dvostrukom *MYC/BCL2* genskom alteracijom su bili muškog pola, prosečne starosti 57 godina (39-70). Dva pacijenta su bili u četvrtom stadijumu bolesti, sa visokim IPI skorom i lošim ishodom, 4 i 6 meseci nakon dijagnoze. Dva pacijenta su na prezentaciji imali ekstranodalnu, a jedan nodalnu lokalizaciju tumora. Infiltracija kostne srži je bila prisutna kod dva pacijenta na prezentaciji. Sva tri su morfološki su bili centroblastni, non-GCB podtipa, sa visokom *MYC* i *Bcl-2* proteinskom ekspresijom. Jedan pacijent sa dvostrukom *MYC/BCL2* genskom alteracijom je bio u I kliničkom stadijumu i niskim IPI. Posle terapije R CHOP postignuta je kompletna remisija koja je trajala 44 meseca nakon dijagnoze.



Slika 20. Bcl-2 i MYC IHH ekspresija i FISH

A) Bcl-2 ekspresija IHH (x200), B) BCL2 rearanžman FISH (x1000), C) Myc ekspresija IHH (x400), D) MYC rearanžman FISH (x1000).

Istovremena ekspresija MYC i Bcl-2 proteina bila je prisutna kod 25 (37%) Grupa pacijenata koji su imali ekspresiju Bcl-2 i MYC proteina je imala lošije preživljavanje od grupe pacijenata koji nisu imali ekspresiju ni Bcl-2 ni MYC, mada razlika nije bila statistički značajna (Spearman Rank $p=0,473$).

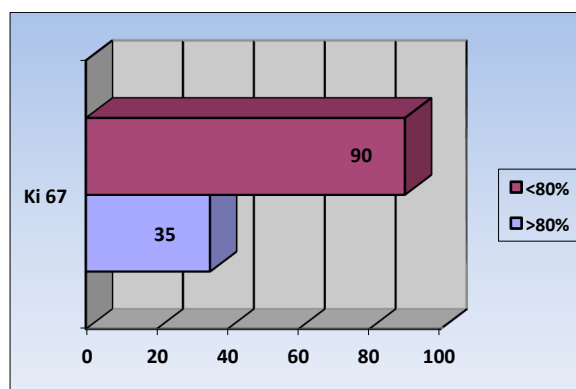


Grafikon 36. Ukupno preživljavanje u odnosu na IHH ekspresiju MYC i bcl-2

Grupa pacijenata sa imunohistohemijom "double hit" skorom su imali veći proliferativni indeks (Ki 67+) (χ^2 , Mann Whitney U test and Spearman Rank $p=0,03$). Takođe, pacijenti koji su imali povećanu ekspresiju MYC proteina, češće su bili MUM-1 pozitivni.

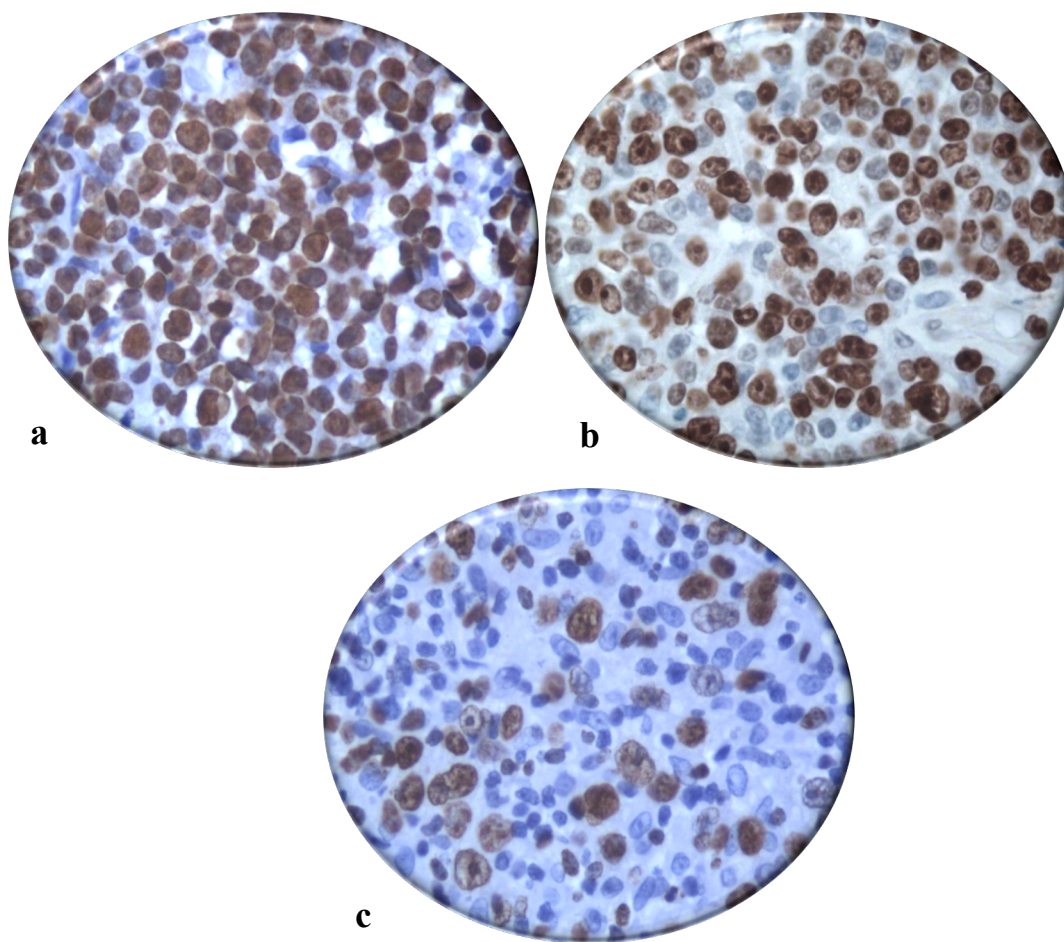
4.9. Analiza ekspresije Ki 67

Ekspresija proliferativnog markera, Ki 67 (Slika 21), uočena je kao nuklearno bojenje u tumorskim ćelijama u različitom procentu kod analiziranih pacijenata. Procenat pozitivnih ćelija je varirao od 30-100% (medijana 60, mean 61,58). Trideset pet (30,43%) pacijenata imalo je ekspresiju Ki 67+ u $\geq 80\%$ tumorskih ćelija u tumorskom tkivu (Grafikon 37). Srednja vrednost u GC grupi je bila 65% a u non GC grupi 60%.



Grafikon 37. Distribucija bolesnika u odnosu na nivo ekspresije Ki67

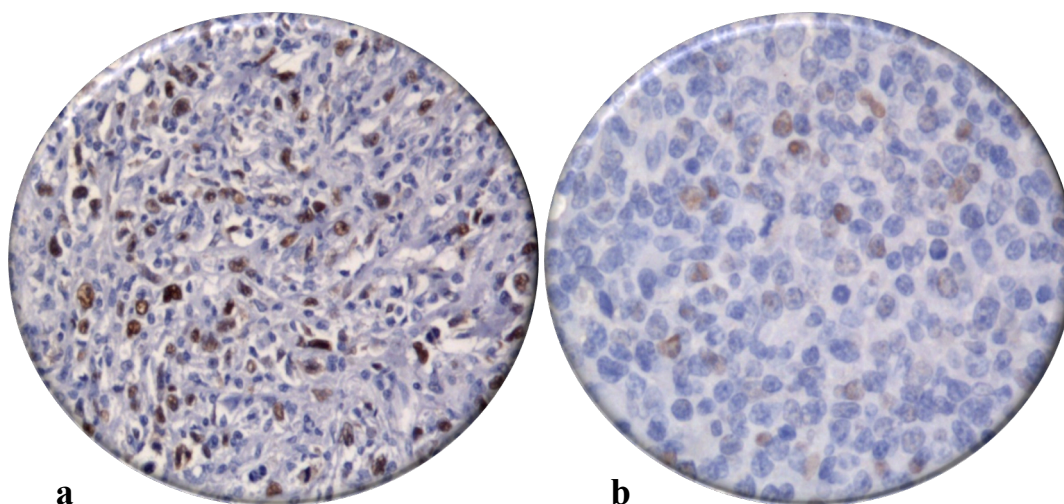
Pacijenti sa visokim IPI skorom su imali veći procenat Ki 67+ ćelija (Spearman Rank, $p=0,08$). Utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između Ki67>60% tumorskih ćelija i visokog IPI skora (χ^2 , Mann Whitney U test i Spearman Rank $p=0,02$).



Slika 21. Ekspresija Ki 67, (IHHx400): a) visoka, b) umerena, c) niska

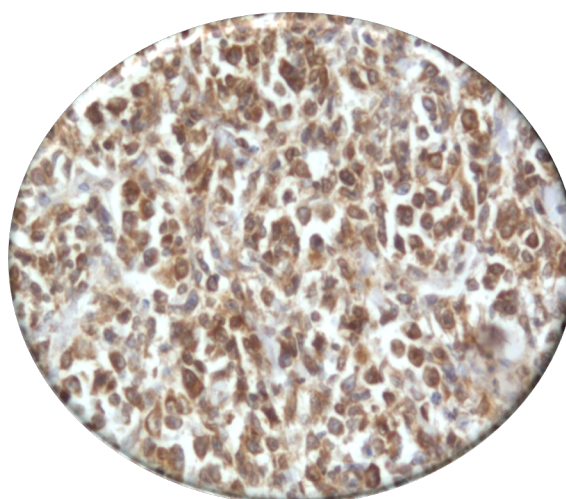
4.10. Analiza ekspresija p53, Bax i survivina

Od 83 analizirana uzorka, 38 (46%) je pokazalo pozitivnost na p53 u različitom procentu (1-80%). Kod samo 3 pacijenta uočena je ekspresija p53 u više od 50% tumorskih ćelija (Slika 22). Trideset četiri pacijenta (41%) su imali pozitivnost p53 u više od 10% tumorskih ćelija i češće su imali nodalnu (55,88%) lokalizaciju i značajno češće su bili non-GCB tipa (88%). Koekspresija MYC i p53 imunohistohemijski, bila je prisutna kod 34% pacijenata (22 od 65). Takođe, pacijenti koji su imali povećanu ekspresiju p53 proteina, češće su bili MUM-1 pozitivni (Spearman Rank $p=0,01$). Većina je bila non-GCB tipa, u 3 i 4 kliničkom stadijumu (86,36%). Polovina pacijenata je bila sa visokim a pola sa niskim IPI indeksom.



Slika 22. Ekspresija p53. a) visoka (x400) b) niska (x400)

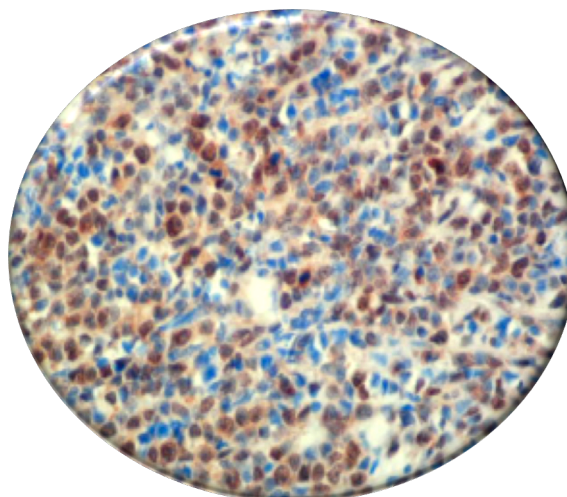
U 85 uzoraka je analizirana ekspresija BAX, kod 66 (77, 64%) je bio pozitivan (slika 23). Koekspresija BAX i Bcl-2 proteina je bila prisutna u 43 uzorka (65%). Kod 36 (83%) pacijenata sa koekspresijom oba markera uočeno je da su u 3. ili 4. kliničkom stadijumu, a 26 (60%) je imalo visok IPI. Velika većina pacijenata sa koekspresijom oba markera, (38 od 43, 88%) bilo je non GCB tipa. Takođe, postojala je značajna korelacija u ekspresiji p53 i bax (Spearman Rank $p=0,03$) (Tabela 11).



Slika 23. Ekspresija BAX, IHHx400

Ekspresija survivina (Slika 24), je uočena kod 83,56%, (61 od 73) ispitanih uzoraka DBKL, sa različitim procentom ekspresije (10-100%). Ekspresija survivina u više od 30% tumorskih ćelija uočena je kod 39 (53,42%) pacijenata. Pacijenti sa

povećanom ekspresijom survivina su češće bili CD10+ (χ^2 , Mann Whitney U test i Spearman Rank $p=0,02$). Survivin se češće ekspimirao u GCB grupi (10 od 21, 47,6%) nego u non-GCB grupi (18 od 52, 34,6%). Pacijenti koji su imali B simptome imali su povećanu ekspresiju survivina (Spearman Rank $p=0,003$) (Tabela 11).



Slika 24. Ekspresija survivin-a (IHHx400)

	Ki67	Bcl-2	Bcl-6	CD10	MUM-1	Myc	Bax	P53	Survivin	GCB/non GCB	IPI	Klinički stadijum	B simptomi	Bulky
Ki67						0,04					0,02 60%			
Bcl-2			0,01				65%			Non GCB, 69%				
Bcl-6		0,01												0,08
CD10									0,02					
MUM-1						0,04		0,01						
Myc	0,04				0,04					Non GCB 40%vs 28				
Bax		65%						0,03		88% non GCB	60 % visok	83% 3.i.4.		
P53					0,01		0,03			88% non GCB		86% 3.i.4.		
survivin				0,02						GCB 47% vs 35%				0,003

Tabela 11. Korelacija između ispitivanih parametara

5. DISKUSIJA

Difuzni B krupnoćelijski limfom je najčešća limfoidna neoplazma, koja se karakteriše veoma heterogenim kliničkim tokom, pa se odgovor na terapiju i ishod bolesti ne može predvideti na osnovu standardnih histopatoloških i imunohistohemijskih analiza (145-150). Uprkos značajnom napretku u terapiji, ishod bolesti je fatalan za skoro polovinu pacijenata sa DBKL (148, 161, 162).

Mnoge studije su ispitivale prognostičke faktore koji bi predvideli preživljavanje i optimizovale terapijsku strategiju kod pacijenata sa DBKL (8, 9, 60-65, 148, 151). Internacionalni prognostički indeks je prognostički model koji se koristi u predviđanju terapijskog odgovora i ishoda bolesti kod pacijenata sa DBKL još od 1993. godine (145-148). Prihvaćen je u celom svetu, zbog toga što se oslanja na informacije koje su lako dostupne i primenljive, a njegova prediktivna vrednost je dokazana u mnogim studijama. Većina autora tvrdi da samo IPI skor ima važnu ulogu u prognozi preživljavanja pacijenata sa DBKL (146, 152). Na osnovu IPI indeksa pacijenti u našoj studiji su podeljeni u niskorizičnu grupu (0 do 2 faktora) i visokorizičnu grupu (3,4 faktora).

U skladu sa rezultatima drugih autora, u našoj studiji, univarijantna analiza je pokazala da su visok IPI (>2) značajno utiče na ukupno preživljavanje pacijenata lečenih samo hemioterapijom tako i onih koji su lečeni imunohemioterapijom. U multivarijantnoj analizi, visok IPI je identifikovan kao nezavisan prognostički faktor preživljavanja kod pacijenata sa DBKL. Takođe, utvrdili smo da su IPI, CS i LDH, faktori koji utiču na postizanje kompletne remisije u grupi pacijenata lečenih CHOP ali ne i RCHOP terapijom.

U poslednje vreme, preispituje se upotrebljivost IPI kod pacijenata lečenih terapijom na bazi rituximab-a, pa su neki autori zaključili da bi trebalo restratifikovati IPI (146, 170). U našoj studiji, IPI se pokazao kao nezavisan faktor predviđanja ishoda bolesti, bez obzira na to da li je u terapiju uključen rituximab.

Odkako je rituximab dodat CHOP protokolu, postignut je značajan napredak u preživljavanju, tako da je R CHOP postao standardni terapijski protokol u lečenju pacijenata sa DBKL (3, 152). GELLA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) grupa je prvi put objavila randomizovanu studiju, koja je pokazala da dodavanje anti-CD20 monoklonskog antitela CHOP hemioterapiji, kod starijih pacijenata (>60 godina) sa DBKL, značajno poboljšava ishod bolesti (3). Razlika u petogodišnjem ukupnom preživljavanju je bila 58% vs 45%, $p=0,007$. Naša studija je pokazala slične rezultate. U

našoj grupi bolesnika, petogodišnje ukupno preživljavanje pacijenata koji su lečeni hemioterapijom i rituximab-om, bilo značajno bolje u odnosu na pacijente koji su lečeni standardnom terapijom bez rituximab-a (61% vs 38%, log rank $p=0,007$).

Jedno od mogućih pitanja je da li morfološke karakteristike još uvek imaju značaj u subklasifikaciji DBKL. Ranije studije sugerišu da tumori sastavljeni predominantno od centroblasta imaju bolju prognozu od onih koji su sastavljeni od imunoblasta, verovatno zbog toga što postoji parcijalna korelacija utvrđena GEP studijama, gde imunoblastni tip češće odgovara ABC profilu, dok su centroblastni DBKL češće porekla GC (90, 129). U svakom slučaju reproduktivnost je bila manja kada se primeni na širok spektar tumora, verovatno zbog različitih kriterijuma kvalifikovanja limfoma kao „imunoblastni“ tip (1, 2, 5, 6, 90). Upotreba citoloških kriterijuma je ponovo postala aktuelna u radu Ott-a i saradnika, koji su utvrdili da je imunoblastna morfologija značajan prediktivni faktor lošeg ishoda bolesti. U studiji koja je obuhvatila 949 pacijenata, samo je 7,4% slučajeva imalo imunoblastnu morfologiju, što je značajno manje nego što bi se očekivalo u grupi ABC baziranoj na GEP analizi. Iako su neki autori utvrdili kriterijume za identifikaciju prognostički relevantnih grupa, zbog malog procenta ovakvih slučajeva, upotrebljivost ovog pristupa u svakodnevnoj praksi je ograničena (6). U našoj studiji najveći broj DBKL, 92%, je bio centroblastni tip, tako da značaj imunoblastne i anaplastične morfologije nije mogla biti testirana zbog malog broja bolesnika iz te dve grupe.

Uprkos velikom napretku u terapiji, oko 30-40% pacijenata ima refraktarnu bolest ili doživi rani relaps bolesti, što upućuje na postojanje dodatnih onkogenih faktora (8, 14). Sa razvitkom novih tehnologija, heterogenost u kliničkom ishodu se sve više vezuje za biologiju tumora, pa se istraživanja fokusiraju na ispitivanje molekularnih i genetskih markera (23, 87, 160). Od glavnog značaja su analize ekspresije gena na osnovu kojih se kreira molekularni potpis, karakterističan za pojedine tipove DBKL (9, 94).

U eri pre uvođenja rituximaba u terapiju, razne studije su dokazale bolji ishod kod GCB podtipa DBKL, baziranih na GEP analizama, kod pacijenata koji su primili hemioterapiju (92, 102). Iako su prvobitne studije pokazale da se zadržava prognostički značaj diferencijacije na bazi GEP kod pacijenata koji su primili rituximab uz hemioterapiju, retrospektivnom analizom velikih randomizovanih kontrolisanih studija pacijenata lečenih Rituximab-om i hemioterapijom, pokazano je da nema značajne razlike u ishodu između grupa definisanih imunohistohemijski (94, 95). Ovakav

zaključak dovodi do hipoteze da pacijenti iz grupe non GCB DBKL mogu imati mnogo veću korist od rituximab-a nego pacijenti GCB podtipa, i da COO može imati ulogu u predviđanju benefita od rituximab-a. Ovu tezu podržava biološko obrazloženje činjenice da rituximab inhibiše NF-KB put (117).

S obzirom na to da GEP nije deo rutinske dijagnostičke procedure, preloženo je nekoliko IHH algoritama koji mogu poslužiti kao surogat za GEP analize, ali sa različitim nivoom uspešnosti (29, 102, 156). Studija Garcia i saradnika je pokazala da nijedan od 5 analiziranih IHH algoritama baziranih na GCB i non GCB podtipu, nije u mogućnosti da predvidi ukupno preživljavanje i preživljavanje do progresije bolesti (155). Kao što je naglašeno u mnogim studijama koje su ispitivale reproducibilnost između različitih laboratorija, ovaj nedostatak saglasnosti se delom može objasniti različitim izvođenjem i skoriranjem imunohistohemijskih rezultata (65, 78, 90). U našoj studiji, GCB versus non GCB imunofenotip u skladu sa algoritmom Hans i saradnika nije imao prognostički uticaj na ukupno preživljavanje ni u CHOP ni u RCHOP terapijskoj grupi, što je u saglasnosti sa nalazima većine autora (155). Međutim, naša studija je pokazala da je kompletna remisija postignuta značajno češće kod pacijenata GCB podtipa DBKL u R CHOP grupi. Ovakvi rezultati mogu biti objašnjeni efektom Rituximab-a.

U našoj studiji na osnovu urađene imunohistohemijske analize i Hans algoritma, GCB podtip je imalo 27%, non GCB podtip 73%. Učestalost non GCB podtipa je znatno veća nego u drugim objavljenim studijama; 42% u studiji van Imhoff-a i saradnika, 58% u studiji Hans i saradnika, itd, dok je u studijama korejskih autora, Yoon, Lee, Choi i Sung, procenat non GCB u saglasnosti sa našim rezultatima (69,4%, 63%, 69,8%, po redosledu). Razlog za ovakvu diskrepancu je nejasan, ali je jedno od objašnjenja možda u vezi sa povećanim procentom ektranodalnih limfoma u našoj studiji, koji su dominantno non-GCB tipa. Takođe, razlike u učestalosti pojedinih tipova limfoma su uočene u zapadnim i istočnim zemljama (1, 80).

Na osnovu do sada objavljenih podataka, može se zaključiti da nije postignut konsenzus oko najboljeg imunohistohemijskog modela koji bi obuhvatio heterogenost DBKL (8, 9, 30, 89, 90, 170). Koristan biomarker predviđanja preživljavanja pacijenata sa DBKL mora pokazati kliničku vrednost uporedivu sa IPI indeksom (4, 6, 9). Stoga je neophodno ponovo ispitati ranije utvrđene prognostičke markere u kontekstu novih terapijskih procedura.

Učestalost Bcl-6 pozitivnih slučajeva u našoj studiji (56%), je u skladu sa rezultatima većine studija. Učestalost u studiji Winter i saradnika je nešto veća (77%) u poređenju sa ranije objavljenim rezultatima Hans i saradnika (56%) i u većoj je saglasnosti sa rezultatima koje su objavili Colomo i njegova grupa (72%) i Lossos i saradnici (63%). Ovakve razlike mogu biti posledica različite populacije pacijenata, kao i tehničkih faktora vezanih za bojenje i interpretaciju dobijenih rezultata.

Rezultati GEP studija su u saglasnosti sa imunohistohemijskim studijama koje su identifikovale Bcl-6 kao prognostički faktor (20-23). Nekoliko različitih grupa autora je pokazalo da je ekspresija Bcl-6 proteina sama po sebi, ili u kombinaciji sa drugim markerima germinativnog centra, prediktor boljeg ishoda bolesti pacijenata s DBKL lečenih hemioterapijom sa antraciklinom (8, 22, 42, 102). Winter i saradnici su u svojoj studiji pokazali, da je ekspresija Bcl-6 proteina snažan prediktor ishoda bolesti pacijenata sa DBKL lečenih CHOP hemoterapijom (20). Nasuprot tome, Bcl-6 status nije prognostički marker kod pacijenata sa DBKL lečenih R CHOP imunohemioterapijom. Winter i saradnici su multivarijantnom analizom prognostičkih faktora pokazali prognostički značaj IPI indeksa, kao dominantnu varijablu previđanja ishoda bolesti kod pacijenata lečenih R CHOP terapijom kod Bcl-6 pozitivnih slučajeva. Osim toga ista grupa autora je pokazala da Bcl-6 negativni slučajevi lečeni R CHOP-om imaju duže preživljavanje od onih koji su lečeni samo CHOP terapijom (20).

Naša studija je pokazala da u grupi pacijenata lečenih CHOP-om, Bcl-6 pozitivni slučajevi imaju duže preživljavanje od Bcl-6 negativnih slučajeva. Međutim, u grupi pacijenata koji su primili R CHOP, Bcl-6 negativni slučajevi su imali bolje preživljavanje od Bcl-6 pozitivnih. Dakle, pacijenti sa Bcl-6 negativnim DBKL su imali značajno bolje preživljavanje u R CHOP grupi nego u grupi pacijenata lečenih samo standardnom terapijom. Dodavanje Rituximab-a standardnoj terapiji značajno poboljšava ishod bolesti kod Bcl-6 negativnih, ali ne i kod Bcl-6 pozitivnih slučajeva, što je u saglasnosti sa većinom studija (20, 89, 153).

Mehanizam kojim dodavanje Rituximab-a u terapiju CHOP-om poboljšava ishod bolesti kod Bcl-6 negativnih slučajeva je nepoznat, ali može biti rezultat direktnog citotoksičnog efekta Rituksimaba (antitelo-zavisna citotoksičnost, citotoksičnost preko komplementa ili indukcijom apoptoze). Moguće je i da je to još uvek nerazjašnjen efekat kako samog Rituksimaba, tako i u kombinaciji sa CHOP terapijom, na mehanizme preživljavanja ćelija koji su jedinstveni kod Bcl-6 negativnih DBKL.

Ekspresija Bcl-2 proteina je samo delimično udružena sa abnormalnostima BCL2 gena, jer se Bcl-2 protein eksprimira u većem broju DBKL slučajeva nego onih koji imaju t(14;18)(q32;21) (41-45, 99-101). U odsustvu BCL2 translokacije, amplifikacija i/ili aktivacija Nf kappaB puta može prouzrokovati ekspresiju Bcl-2 proteina (99-101). Prognostički značaj BCL2 amplifikacije ili translokacije kod *de novo* DBKL u eri CHOP terapije bez Rituximab-a, je kontroverzna. U poslednje vreme, pojavile su se studije u kojima je analiziran prognostički značaj BCL2 aberacija kod pacijenata lečenih R CHOP terapijom. Dve studije su pokazale da rearanžman BCL2 gena nema uticaj na preživljavanje (34, 35).

Prognostički značaj Bcl-2 ekspresije je takođe kontroverzan i poređenje između različitih studija je otežano pre svega zbog izbora različitog cut-off-a pozitivnih ćelija, ali i različitih terapijskih tretmana (63-65). Iako su u različitim studijama korišćeni različiti procenti koji definišu Bcl-2 pozitivnost, procenat pozitivnih slučajeva (45-66%) u većini objavljenih studija je u saglasnosti sa procentom korišćenim u našoj studiji (50%) (63-65, 150).

U studiji GELLA grupe je pokazano da je ekspresija Bcl-2 proteina prognostički faktor kod pacijenata sa DBKL lečenih CHOP ali ne i u grupi pacijenata lečenih R CHOP terapijom (148). U studiji Visco i saradnika ekspresija Bcl-2 je bila udružena sa značajno lošijim ishodom posmatrano na celoj grupi pacijenata uniformno lečenih R CHOP, ali kada se pacijenti podele u grupe u skladu sa GEP, primećeno je da je veća ekspresija Bcl-2 udružena sa lošijim PFS u GCB podgrupi ali ne i u ABC podgrupi (37). Takođe, ista grupa autora je pokazala da je prognostički efekat ekspresije Bcl-2 proteina vezan za istovremeno prisustvo BCL2 translokacije. Ovaj rezultat je donekle u saglasnosti sa objavljenom studijom Iqbal i saradnika u kojoj je ekspresija Bcl-2 kod GCB DBKL udružena sa lošijim ishodom (39, 40). U studiji Winter i saradnika kao i Hans i saradnika Bcl-2 ekspresija nije bila prognostički parametar. U nekim studijama je pokazano da dodavanje rituximab-a eliminiše negativan uticaj ekspresije Bcl-2 (38, 40).

Naša studija je pokazala da ekspresija Bcl-2 proteina nije imala uticaj na ukupno preživljavanje ni u grupi pacijenata lečenih R CHOP-om, ni u grupi koja je lečena samo standardnom hemioterapijom bez rituximab-a. Dalje, potvrdili smo da rituximab značajno poboljšava ishod bolesti kod Bcl-2 pozitivnih, ali ne i kod Bcl-2 negativnih slučajeva, što je u saglasnosti sa skorije objavljenim studijama (20, 44, 72, 77).

Incidenca genetskih promena, kao i MYC i BCL2 proteinska ekspresija u našoj studiji bila je slična podacima drugih autora (70-74, 77-79).

Mnoge studije su pokazale da pacijenti sa DBKL koji imaju MYC rearanžman imaju lošu prognozu ako su lečeni CHOP ili CHOP-like protokolom (80-82). Prisustvo MYC reranžmana zadržava svoj negativan efekat čak i kod pacijenata lečenih rituximab-om i imunohemioterapijom sa antraciklinom i predstavlja nezavisan prediktor ishoda kod pacijenata sa DBKL (73, 74). Takođe, u nekim studijama je pokazano da je visoka ekspresija MYC proteina udružena sa lošijim ishodom bolesti kod pacijenata koji su lečeni R CHOP terapijom ali ne i kod onih koji su primili CHOP (76-79). U našoj studiji nije uočena korelacija između BCL2 i MYC rearanžmana ili MYC proteinske ekspresije u odnosu na postizanje kompletne remisije ili ukupno preživljavanje. Mali broj uniformno tretiranih pacijenata sa genskim alteracijama i imunohistohemijskom ekspresijom MYC proteina u našoj studiji, ograničio je statističku korelaciju sa ishodom.

U našoj grupi pacijenata prisustvo MYC rearanžmana je bilo u korelaciji sa MYC proteinskom ekspresijom, što je potvrđeno u prethodnim publikacijama (69-74). U svakom slučaju, povećana ekspresija MYC proteina je češće bila prisutna u non GCB grupi (40%) u poređenju sa GCB grupom pacijenata (28%). Činjenica da se MYC protein eksprimira u GCB kao i u non GCB podtipu DBKL, što je potvrđeno u našoj studiji, kao i u studijama drugih autora, upućuje na biološki patogeni mehanizam nezavisan od COO podtipa (80).

Mnogi autori tvrde da istovremeno prisustvo $t(14;18)$ i MYC rearanžmana je udruženo sa lošim ishodom bolesti kod pacijenata lečenih R CHOP terapijom (73,74). Naša istraživanja su pokazala da preživljavanje pacijenata sa DBKL sa dvostrukom ekspresijom MYC i BCL2 proteina u grupi lečenih R CHOP je značajno bolje nego kod onih koji su lečeni samo terapijom CHOP. Mehanizam kojim ekspresija Bcl-2, Bcl-6 i MYC proteina utiče na preživljavanje pacijenata lečenih terapijom R CHOP suprotno od onih koji su lečeni samo terapijom CHOP je nepoznat (79).

Grupa pacijenata sa dvostrukom ekspresijom MYC i BCL2 proteina u našoj studiji, je imala lošije preživljavanje od grupe pacijenata koji nisu imali ekspresiju ni BCL2 ni MYC, mada razlika nije bila statistički značajna. Iako su mnoge studije pokazale negativan prognostički efekat MYC translokacije i MYC ekspresije, većina ovih pacijenta je imala i ekspresiju BCL2 proteina, pa je nepoznato da li bi slučajevi sa MYC translokacijom ali bez BCL2 ekspresije delili istu sudbinu (74, 158). Mi smo

pokazali da je ekspresija BCL2 proteina važna determinanta u kliničkom ishodu kod MYC pozitivnih DBKL, jer su pacijenti MYC-/Bcl-2+ imali lošiji klinički ishod od MYC+/Bcl-2- grupe.

Loš ishod bolesti kod pacijenata sa MYC rearanžmanom je najverovatnije posledica sinergističkog dejstva različitih gena, odnosno MYC indukovano rasta i antiapoptotskog efekta BCL2. Ne postoje kliničke, morfološke ili imunofenotipske karakteristike koje bi identifikovale "double-hit" DBKL, pa je neophodno uraditi FISH analizu MYC i BCL2 gena, naročito kod slučajeva sa proliferativnim indeksom većim od 80% (83, 84, 86).

Mogućnost imunohistohemijske detekcije MYC proteina omogućila je analizu DBKL u velikim serijama arhiviranog biopsijskog materijala (83, 86). Ekspresija MYC proteina imunohistohemijski, samo delom može biti objašnjena prisustvom MYC rearanžmana (70, 79). U studijama koje su se bavile ekspresijom MYC protein su pokazale da postoji grupa DBKL koja ima povišenu ekspresiju MYC proteina u odsustvu MYC translokacije i potvrdile stav da ne samo translokacija, već i drugi, alternativni mehanizmi učestvuju u deregulaciji MYC gena (73, 74, 83, 86). Ekspresija MYC gena može biti izmenjena translokacijom, amplifikacijom, mutacijom ili mikro-RNA zavisnim mehanizmima (70-74). U našoj studiji je identifikovano 35% DBKL sa visokom ekspresijom MYC proteina (>30%) u odsustvu MYC alteracije, što je u saglasnosti sa podacima većine autora.

S obzirom na činjenicu da MYC igra važnu ulogu u širokom spektru bioloških aktivnosti u ćeliji, imunohistohemijska ekspresija MYC proteina može na neki način predstavljati skup svih ili većine mehanizama koji su u osnovi regulacije MYC gena. Na osnovu ovakvih rezultata mnogi autori predlažu rutinski screening na Myc rearanžman kod visoko rizičnih pacijenata sa DBKL, kao i kod onih sa visokim proliferacionim indeksom.

Prognostički značaj proliferativnog markera, Ki 67, je kontroverzan (8, 9). Neke studije su utvrdile da je preživljavanje značajno kraće kod pacijenata sa nuklearnom ekspresijom Ki 67 u 60% ili 80% i više tumorskih ćelija (50, 60, 65). U studiji Nordijske Limfomske Grupe, niska ekspresija Ki67 je definisana kao manje od 60% Ki67 pozitivnih tumorskih ćelija. Ova grupa autora nije utvrdila značajnu razliku u petogodišnjem preživljavanju u odnosu na ekspresiju Ki 67. Studije većine autora nisu utvrdile prognostički značaj Ki 67 (20, 29, 64, 65). Činjenica je da su korišćene različite definicije pozitivnosti (89, 90). Osim toga, povezanost ekspresije Ki 67 i ishoda bolesti

je kompleksna (101, 104, 105). Tumori sa niskim prognostičkim indeksom mogu biti rezistentni na terapiju, zbog toga što je većina ćelija u G0/G1 fazi ciklusa pa su samim tim rezistentne na citotoksičnu terapiju. Osim toga, ćelije u G0/G1 fazi imaju vremena da poprave DNK oštećenja indukovana hemioterapijom, i tako prežive. U našoj studiji smo pokazali statistički značajnu pozitivnu korelaciju između Ki67>60% tumorskih ćelija i visokog IPI skora.

Do danas, nema jasnih zaključaka o prognostičkom i kliničkom značaju molekularnih lezija tumor supresor gena p53 kao i imunohistohemijske ekspresije ovog gena kod pacijenata sa DBKL, iako je to bio predmet istraživanja brojnih studija (59-62). Mutacije p53 dovode do produkcije proteina koji ima abnormalnu strukturu i produženi polu-život, akumulira se u jedru što dovodi do imunohistohemijske ekspresije. Mnogi autori tvrde da tumori sa 50% pozitivnih tumorskih ćelija značajno koreliraju sa mutacijama p53 (53-56). Neke studije pokazuju uticaj P53 mutacije i ekspresije p53 na preživljavanje, dok neki autori nisu našli značajnu povezanost između p53 ekspresije i bilo koje od kliničkih varijabli i ishoda (59-62, 75, 76).

Naša studija je pokazala da ekspresija p53 korelira sa kliničkim manifestacijama bolesti, posebno visokim kliničkim stadijumom i nodalnim poreklom DBKL. Koekspresija MYC i p53 imunohistohemijski, bila je prisutna kod (33,84%) pacijenata u našoj grupi. Većina je bila non GCB tipa, u 3 i 4 kliničkom stadijumu. Moguće je da nepoznata interakcija između p53 i MYC bar delimično odgovorna za agresivnost bolesti, delovanjem preko apoptotskog puta i tumorske progresije.

U dosadašnjim istraživanjima je dokazano da je Bcl-2 familija proteina predstavlja kritičnu tačku na apoptotskom putu u ćeliji (35, 36). Funkcionalni balans između antiapoptotskih i proapoptotskih uticaja određuje stepen osetljivosti ćelije na apoptozu. Mnoge studije su pokazale da se u DBKL često eksprimiraju članovi Bcl-2 grupe proteina, navodeći na zaključak da apoptotski mehanizmi učestvuju u patogenezi DBKL (40, 41, 43). Bax je proapoptotski član bcl-2 familije proteina (36, 41, 47). U studiji Bai i saradnika ekspresija BAX gena je češće bila udružena GCB podtipom, dok je u našoj studiji većina pacijenata sa ekspresijom Bax, bila iz non GCB grupe. Gaskoyne i saradnici nisu dokazali prognostički značaj ekspresije Bax proteina u DBKL, ali su uočili da su pacijenti iz Bcl2-/Bax- grupe pacijenata imali nešto kraće ukupno preživljavanje od pacijenata iz bcl-2-/Bax+ grupe. U našoj grupi pacijenata, velika većina (88%) je imala koekspresiju bcl-2 i Bax, i korelirala je sa visokim IPI i

kliničkim stadijumom bolesti, ali takođe nismo uspeli da dokažemo prognostički značaj ekspresije Bax proteina.

Survivin je inhibitor apoptoze i učestvuje u regulaciji ćelijske deobe (48-51). Survivin se eksprimira u mnogim malignim tumorima, ali se ne detektuje u normalnim tkivima, tako da predstavlja idealnu metu za antitumorsku terapiju. Ekspresija survivina je uočena kod 83,56% ispitivanih pacijenata u našoj studiji što je u saglasnosti sa nalazom drugih autora (48-51). Dok su Adida i saradnici utvrdili da ekspresija survivina lošije utiče na ukupno preživljavanje pacijenata sa DBKL, u našoj studiji, kao i u studijama korejskih i kineskih autora nije utvrđen prognostički značaj ekspresije survivina (49, 51). Loša prognoza DBKL sa ekspresijom survivina se objašnjava ekspresijom survivin gena u mitozu i njegove uloge u inhibiciji apoptoze (48-51).

U svakom slučaju, poremećaj regulacije apoptotskih mehanizama može imati dramatičan uticaj na ishod bolesti.

Heterogenost DBKL odražava heterogenost B ćelijskih neoplazmi uopšte, pa je ova kompleksnost dovela do povećanja broja entiteta u WHO klasifikaciji (1, 4, 10). Nekoliko kriterijuma, uključujući kliničke manifestacije, morfologiju, imunofenotip i određene citogenetske karakteristike, određuju finalni podtip. Upotreba novih genomskih tehnika nastavlja da dodaje na kompleksnosti ove slike (6, 10, 171).

Tretman DBKL se nije mnogo promenio poslednjih godina, pa je R CHOP i dalje standard u kliničkoj praksi. Dodavanje rituximab-a standardnoj CHOP terapiji je poboljšalo preživljavanje kod većine pacijenata ali je ishod još uvek lošiji u grupi pacijenata sa ABC u odnosu na one sa GCB podtipom limfoma.

S obzirom da smo utvrdili da rituximab značajno ne poboljšava preživljavanje Bcl-2 negativnih a ni Bcl-6 pozitivnih slučajeva, neophodno je u tom pravcu usmeriti buduće imunohistohemijske i molekularne studije, kako bi jasnije shvatili mehanizme kojima tumorska ćelija izbegava uticaj terapijskih faktora, pa u tom smislu ispitati nove, terapijske modalitete.

Shodno tome, bolji markeri i poboljšani imunohistohemijski algoritmi, kao surogat za GEP analize, mogu poboljšati klasifikaciju ovih tumora i u kombinaciji sa kliničkim parametrima koristiti u svakodnevnoj kliničkoj praksi u prognozi difuznog B krupnoćelijskog limfoma.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu prethodno prikazanih rezultata doneti su sledeći zaključci:

Internacionalni prognostički indeks je nezavisan prognostički parametar ishoda bolesti.

Nepovoljni faktori preživljavanja su: visok IPI, voluminozna tumorska masa, visok serumski LDH i B simptomi u CHOP grupi i visok IPI, visok Ann Arbor klinički stadijum (III-IV) i B simptomi u R CHOP grupi.

Petogodišnje ukupno preživljavanje kao i period bez neželjenog događaja, u grupi pacijenata koji su lečeni hemioterapijom i Rituximab-om, bilo je značajno bolje u odnosu na pacijente koji su lečeni standardnom hemioterapijom bez Rituximab-a.

Imunohemioterapija je značajno poboljšala preživljavanje pacijenata koji su imali Bcl-2 pozitivan, kao i Bcl-6 negativan DBKL, ali nije imala uticaj na preživljavanje Bcl-2 negativnih, a ni Bcl-6 pozitivnih slučajeva. Stoga je neophodno u tom pravcu usmeriti buduće imunohistohemijske i molekularne studije, kako bi jasnije shvatili mehanizme kojima tumorska ćelija izbegava uticaj terapijskih faktora i u tom smislu ispitati nove, terapijske modalitete.

Imunohistohemijski algoritam subtipizacije, bazirane na poreklu ćelije (COO), u skladu sa Hans i saradnicima, nije bio prediktor preživljavanja pacijenata sa DBKL bez obzira na primenjenu terapiju. Učestalost non GCB podtipa u našoj grupi analiziranih bolesnika je znatno veća nego u drugim objavljenim studijama.

Ekspresija nijednog imunohistohemijskog markera nije imala značajan uticaj na preživljavanje kao ni na postizanje kompletne remisije, međutim, utvrđena je korelacija između pojedinih imunohistohemijskih biomarkera i kliničkih parametara. (Ekspresija MUM-1 je imala pozitivan uticaj na preživljavanje samo u grupi pacijenata lečenih CHOP terapijom. Značajna pozitivna korelacija je postojala između Ki67>60% tumorskih ćelija i visokog IPI skora, ekspresije survivina i Bcl-6 i voluminozne tumorske mase, kao i ekspresije BAX, p53 i visokog kliničkog stadijuma).

Ne postoje kliničke, morfološke ili imunofenotipske karakteristike koje bi identifikovale postojanje genetskih aberacija, pa je neophodno uraditi FISH analizu u cilju njihove identifikacije i korelirati ih sa imunohistohemijskom ekspresijom proteina.

7. LITERATURA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al (Eds): WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
2. Nancy Lee Harris, Harald Stein, Sarah E. Coupland, et al. New approaches to lymphoma diagnosis. ASH Education Book January 1, 2001 vol. 2001 no. 1 194-220.
3. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002 Jan 24; 346(4):235-42.
4. Mey U, Hitz F, Lohri A, et al. Diagnosis and treatment of diffuse large B-cell lymphoma. Swiss Med Wkly. 2012; 142:w13511.
5. Pileri SA, Dirnhofer S, Went Ph, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. Histopathology 2002; 41, 482-509.
6. Menon MP, Pittaluga S, Jaffe ES. The Histological and Biological Spectrum of Diffuse Large B-cell Lymphoma in the WHO Classification. Cancer J. 2012 Sep-Oct;18(5):411-20.
7. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000 Feb 3; 403(6769):503-11.
8. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2006; 24; 995-1007.
9. Lossos IS. Diffuse large B cell lymphoma: from gene expression profiling to prediction of outcome. Biol Blood Marrow Transplant. 2008 Jan; 14(1 Suppl 1):108-11.
10. Steven H Swerdlow. Lymphoma classification and the tools of our trade: an introduction to the 2012 USCAP Long Course. Modern Pathology 26, S1-S14 (January 2013)
11. Lennert Karl: History of the European Association for haematopathology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006.
12. Bagg A. B cells behaving badly: a better basis to behold belligerence in B-cell lymphomas. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011;2011:330-5.
13. Nadav-Dagan L, Katz BZ. Malignant B-cell intra-clonal diversification: following the yarn in the Labyrinth. Leuk Lymphoma, 2011 Nov;52(11):2050-6.

14. Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13520–5.
15. Jaffe ES, Pittaluga S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 2011:506-14.
16. Garcia FC, Swerdlow H.S. Best practices in Contemporary Diagnostic immunohistochemistry. Panel Approach to Hematolymphoid Proliferations. *Arch Pathol Lab Med*. Vol 133, May 2009, 756-765.
17. Higgins RA, Blankenship JE, Kinney MC. Application of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Non-Hodgkin and Hodgkin Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Mar;132(3):441-61.
18. Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M et al. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol*. 2008 Nov;19(11):1921-6.
19. Yamaguchi M, Nakamura N, Suzuki R et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. *Haematologica*. 2008 Aug;93(8):1195-202.
20. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood*. 2006 Jun 1;107(11):4207-13.
21. Cattoretti G, Shaknovich R, Smith MP, et al: Stages of Germinal Center Transit Are Defined by B Cell Transcription Factor Coexpression and Relative Abundance. *J Immunol*. 2006 Nov 15;177(10):6930-9.
22. Lossos IS, Jones CD, Warnke R, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):945-51.
23. van Imhoff GW, Boerma EJ, van der Holt B, et al. Prognostic Impact of Germinal Center-Associated Proteins and Chromosomal Breakpoints in poor-Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, 2006 Sep 1;24(25):4135-42.
24. Biasoli I, Morais JC, Scheliga A, et al. CD10 and Bcl-2 expression combined with the International Prognostic index can identify subgroups of patients with diffuse

- large-cell lymphoma with very good or very poor prognoses. *Histopathology*. 2005; 46(3):328-33.
25. Fabiani B, Delmer A, Lepage E, et al. CD10 expression in diffuse large B-cell lymphomas does not influence survival. *Virchows Arch*. 2004 Dec;445(6):545-51.
 26. Shaffer AL, Emre NC, Romesser PB, Staudt LM, et al. IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin Cancer Res*. 2009 May 1;15(9):2954-61.
 27. Teng Y, Takahashi Y, Yamada M, et al. IRF4 negatively regulates proliferation of germinal center B cell-derived Burkitts lymphoma cell lines and induces differentiation toward plasma cells. *Eur J Cell Biol*. 2007 Oct;86(10):581-9.
 28. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):2084-92.
 29. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003; 101:78-84.
 30. Sehn LH. Optimal use of prognostic factors in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:295-302.
 31. Oh YH, Park CK. Prognostic evaluation of nodal diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemical profiles with emphasis on CD138 expression as a poor prognostic factor. *J Korean Med Sci*. 2006 Jun;21(3):397-405.
 32. Bodoor K, Matalka I, Hayajneh R, Haddad Y, Gharaibeh W. Evaluation of BCL-6, CD10, CD138 and MUM-1 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients: CD138 is a marker of poor prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(7):3037-46.
 33. Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y and Tsujimoto Y. Multiple Subcellular Localization of bcl-2: Detection in Nuclear Outer Membrane, Endoplasmic Reticulum Membrane, and Mitochondrial membranes. *Cancer Research* 1994;54:2468-71.
 34. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, et al. BCL2 expression is a prognostic maker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24:961-968.
 35. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2004; 165:159–166.

36. Bai M, Skyras A, Agnantis NJ, et al. Cluster Analysis of Apoptosis-Associated bcl2 Family Proteins in Diffuse Large B-cell Lymphomas. Relations with the Apoptotic Index, the Proliferation Profile and the B-cell Differentiation Immunophenotypes. *Anticancer Res.* 2004 Sep-Oct;24(5A):3081-8.
37. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica.* 2013 Feb;98(2):255-63.
38. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2 associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood.* 2003; 11:4279-4284.
39. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:7785–7795.
40. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, 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; 24:961–968.
41. Bai M, Skyras A, Agnantis NJ, et al. B-cell Differentiation, Apoptosis and Proliferation in Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Anticancer Res.* 2005 Jan-Feb;25(1A):347-62.
42. Barrans SL, Carter I, Owen RG, et al: Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2002 Feb 15;99(4):1136-43.
43. Pagnano KB, Silva MD, Vassallo J, Aranha FJ and Saad ST: Apoptosis-regulating proteins and prognosis in diffuse large B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Acta Haematol* 107: 29-34, 2002.
44. Wilson KS, Sehn LH, Berry B, et al. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2007 Jun; 48(6):1102-9.
45. Oltvai Y, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993,74:609-19.

46. Sohn SK, Jung JT, Kim DH, et al. Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2003 Jun; 73(2):101-7.
47. Gascoyne RD, Krajewska M, Krajewski S, Connors JM, Reed JC. Prognostic Significance of Bax Protein Expression in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood.* 1997 Oct 15;90(8):3173-8.
48. Adida C, Haioun C, Gaulard P, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2000 Sep 1; 96(5):1921-5.
49. Liu L, Zhang M, Zou P. Expression of PLK1 and survivin in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2007 Nov; 48(11):2179-83.
50. Kuttler F, Valnet-Rabier MB, Angonin R, et al. Relationship between expressions of genes involved in cell cycle control and apoptosis in diffuse large B cell lymphoma: a preferential survivin-cyclin B link. *Leukemia.* 2002 Apr; 16(4):726-35.
51. Sung JY, Lim SJ, Kim YW, Lee J. Prognostic significance of pSTAT3 and Survivin expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Basic Appl Pathology.* 2010; 3: 7-13.
52. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature.* 2004 Dec 2; 432(7017):635-9.
53. Villedas R. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. *Blood.* 1993;82(10):3152- 6.
54. Guinn B, Padua RA. Do p53 mutations have role in the initiation and progression of leukaemia? *The Cancer Journal.* 1995;8(4):195-200.
55. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *Journal of Pathology.* 1999;187:112-26.
56. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Suffering the p53 network. *Nature.* 2000;16:307-10.
57. Oda E. Noxa, a BH3 only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000;288:1053-8.
58. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler JW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell.* 2001;7:673-82.
59. Rujirojindakul P, Aiempanakit K, Kayasut K, Lekhakula A, Sriplung H. No Prognostic Impact of p53 and P-Glycoprotein Expression in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *ISRN Oncol.* 2011;2011:670358.

60. El-Bolkainy TN, El-Bolkainy MN, Khaled HM, et al. Evaluation of MIB-1 and p53 overexpression as risk factors in large cell non-Hodgkin lymphoma in adults. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2007 Dec;19(4):231-8.
61. Kramer MH, Hermans J, Parker J, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol.* 1996 Jul;14(7):2131-8.
62. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood.* 2012 Nov 8;120(19):3986-96.
63. De Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as prerequisite for broad clinical applications- A study from Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol.* 2007; 25:805-812.
64. Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ, et al: Building an Outcome Predictor Model for Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):613-22.
65. Tzankov A, Zlobec I, Went P, et al. Prognostic immunophenotypic biomarker studies in diffuse large B cell lymphoma with special emphasis on rational determination of cut-off scores. *Leuk Lymphoma.* 2010; 51:199–212.
66. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood.* 2011; 117:2319–2331.
67. Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S, Tzankov A. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *J Clin Pathol.* 2009;62:754-756.
68. Soldini D, Montagna C, Schüffler P, et al. A new diagnostic algorithm for Burkitt and diffuse large B-cell lymphomas based on the expression of CSE1L and STAT3 and on MYC rearrangement predicts outcome. *Ann Oncol.* 2013 Jan;24(1):193-201.
69. Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, et al. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PloS one.* 2012; 7:e33813.
70. Green TM, Nielsen O, de Stricker K, et al. High levels of nuclear MYC protein predicts the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2012 Apr;36(4):612-9.

71. Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3360-5.
72. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: The critical factors associated with survival. *Blood*. 2009 Sep 10;114(11):2273-9.
73. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009 Oct 22;114(17):3533-7.
74. Valera A, Lopez-Guillermo A, Cardesa-Salzman T, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*. 2013 Oct;98(10):1554-62.
75. Visco C, Canal F, Parolini C, et al. The impact of P53 and P21 (waf1) expression on the survival of patients with the germinal center phenotype of diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2006 May;91(5):687-90.
76. Chang CC, Liu YC, Cleveland RP, Perkins SL. Expression of c-Myc and p53 correlates with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2000 Apr;113(4):512-8.
77. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer*. 2012 Sep 1;118(17):4173-83.
78. Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012 Oct 1;30(28):3460-7.
79. Horn H, Ziepert M, Becher C, et al. German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013 Mar 21;121(12):2253-63.
80. Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL),

- especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology*. 2008 Aug;53(2):205-17.
81. Nitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical significance of 8q24/c-MYC translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2009 Feb;100(2):233-7.
 82. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, et al. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia*. 2008 Dec;22(12):2226-9.
 83. Tapia G, Lopez R, Munoz-Marmol AM, et al. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology*. 2011 Oct;59(4):672-8.
 84. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, et al. B-cell Lymphomas with Concurrent *IGH-BCL2* and *MYC* Rearrangements Are Aggressive Neoplasms with Clinical and Pathologic Features Distinct from Burkitt Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma *Am J Surg Pathol*. 2010 Mar;34(3):327-40.
 85. Gupta M, Maurer MJ, Wellik LE, et al. Expression of Myc, but not pSTAT3, is an adverse prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma treated with epratuzumab/R-CHOP. *Blood*. 2012 Nov 22;120(22):4400-6.
 86. Pfreundschuh M. Growing importance of MYC/BCL2 immunohistochemistry in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2012 Oct 1;30(28):3433-5.
 87. Thieblemont C, Brière J. MYC, BCL2, BCL6 in DLBCL: impact for clinics in the future? *Blood*. 2013 Mar 21;121(12):2165-6.
 88. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844-7.
 89. Salles G, de Jong D, Xie W, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: A study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood*. 2011 Jun 30;117(26):7070-8.
 90. Höller S, Horn H, Lohr A, et al. A cytomorphological and immunohistochemical profile of aggressive B-cell lymphoma: high clinical impact of a cumulative immunohistochemical outcome predictor score. *J Hematop*. 2009 Sep 2;2(4):187-94.

91. Swerdlow SH, Quintanilla-Martinez L, Willemze R, Kinney MC. Cutaneous B-Cell Lymphoproliferative Disorders Report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology Workshop. *Am J Clin Pathol.* 2013 Apr;139(4):515-35.
92. Rosenwald A, Wright G, Chan CW, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002 Jun 20;346(25):1937-47.
93. Barton S, Hawkes EA, Wotherspoon A, Cunningham D. Are we ready to stratify treatment for diffuse large B-cell lymphoma using molecular hallmarks? *Oncologist.* 2012;17(12):1562-73.
94. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia.* 2012 Sep;26(9):2103-13.
95. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood.* 2007 Jun 1;109(11):4930-5.
96. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood.* 2002 Apr 1; 99(7):2285-90.
97. Tzankov A, Went P, Dirnhofer S. Prognostic significance of in situ phenotypic marker expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Biomark Insights.* 2007 Nov 11;2:403-17.
98. Habara T, Sato Y, Takata K, et al. Germinal center B-cell-like versus non-germinal center B-cell-like as important prognostic factor for localized nodal DLBCL. *J Clin Exp Hematop.* 2012;52(2):91-9.
99. Dunleavy K, Wilson WH. Differential Role of BCL2 in Molecular Subtypes of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec 15;17(24):7505-7.
100. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol.* 2005;87:163-208.
101. Gouveia GR, Siqueira SA, Pereira J. Pathophysiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(6):447-51.

102. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):275-82.
103. Hunt KE, Reichard KK. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Jan;132(1):118-24.
104. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019-32.
105. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:523-31.
106. Tun HW, Personett D, Baskerville KA, et al. Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma. *Blood*. 2008 Mar 15;111(6):3200-10.
107. Rubenstein JL, Fridlyand J, Shen A, et al. Gene expression and angiotropism in primary CNS lymphoma. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3716-23.
108. Hoefnagel JJ, Dijkman R, Basso K, et al. Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood*. 2005 May 1;105(9):3671-8.
109. Dijkman R, Tensen CP, Jordanova ES, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006 Jan 10;24(2):296-305.
110. Wilcox RA. Cutaneous B-cell lymphomas: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, an management. *Am J Hematol*. 2013 Jan;88(1):73-6.
111. Paulli M, Lucioni M, Maffi A, et al. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma (PCDLBCL), leg-type and other: an update on morphology and treatment. *G Ital Dermatol Venereol*. 2012 Dec;147(6):589-602.
112. Asano N, Yamamoto K, Tamaru J, et al. Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients. *Blood*. 2009 Mar 19;113(12):2629-36.
113. Oyama T, Yamamoto K, Asano N, et al. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 1;13(17):5124-32.

114. Park S, Lee J, Ko YH, et al. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):972-8.
115. Barth TF, Leithauser F, Joos S, Bentz M, Moller P. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? *Lancet Oncol*. 2002 Apr;3(4):229-34.
116. Green MR, Monti S, Rodig SJ, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. Oct 28; 116(17):3268–3277.
117. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, et al. NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood*. 2005 Aug 15; 106(4):1392–1399.
118. Rui L, Emre NC, Kruhlak MJ, et al. Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. *Cancer Cell*. 2010 Dec 14;18(6):590-605.
119. Oshlies I, Burkhardt B, Salaverria I, et al. Clinical, pathological and genetic features of primary mediastinal large B-cell lymphomas and mediastinal gray zone lymphomas in children. *Haematologica*. 2011 Feb;96(2):262-8.
120. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, 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 Sep 15; 198(6):851–862.
121. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003 Dec 1; 102(12):3871–3879.
122. Ponzoni M, Ferreri AJ, Campo E, et al. Definition, diagnosis, and management of intravascular large B-cell lymphoma: proposals and perspectives from an international consensus meeting. *J Clin Oncol*. 2007 Jul 20; 25(21):3168–3173.
123. Murase T, Yamaguchi M, Suzuki R, et al. Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): a clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):478-85.
124. Aozasa K, Takakuwa T, Nakatsuka S. Pyothorax-associated lymphoma: a lymphoma developing in chronic inflammation. *Adv Anat Pathol*. 2005 Nov;12(6):324-31.

125. Narimatsu H, Ota Y, Kami M, et al. Clinicopathological features of pyothorax-associated lymphoma; a retrospective survey involving 98 patients. *Ann Oncol.* 2007 Jan; 18(1):122–8.
126. Laurent C, Do C, Gascoyne RD, et al. Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma: a rare clinicopathologic entity with poor prognosis. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 1; 27(25):4211–6.
127. Morgan EA, Nascimento AF. Anaplastic lymphoma kinase-positive large B-cell lymphoma: an underrecognized aggressive lymphoma. *Adv Hematol.* 2012:529-572.
128. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood.* 1997 Feb 15;89(4):1413-20.
129. Colomo L, Loong F, Rives S, et al. Diffuse Large B-cell Lymphomas With Plasmablastic Differentiation Represent a Heterogeneous Group of Disease Entities. *Am J Surg Pathol.* 2004 Jun; 28(6):736–47.
130. Vega F, Chang CC, Medeiros LJ, et al. Plasmablastic lymphomas and plasmablastic plasma cell myelomas have nearly identical immunophenotypic profiles. *Mod Pathol.* 2005 Jun; 18(6):806–15.
131. Cobo F, Hernandez S, Hernandez L, et al. Expression of potentially oncogenic HHV-8 genes in an EBV-negative primary effusion lymphoma occurring in an HIV-seronegative patient. *J Pathol.* 1999; 189(2):288–93.
132. Teruya-Feldstein J, Zauber P, Setsuda JE, et al. Expression of human herpesvirus-8 oncogene and cytokine homologues in an HIV-seronegative patient with multicentric Castleman’s disease and primary effusion lymphoma. *Lab Invest.* 1998 Dec; 78(12):1637–42.
133. Said JW. Aggressive B-cell lymphomas: how many categories do we need? *Mod Pathol.* 2013 Jan;26 Suppl 1:S42-56.
134. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med.* 1995 May 4; 332(18):1186–91.
135. Hoeller S, Copie-Bergman C. Grey zone lymphomas: lymphomas with intermediate features. *Adv Hematol.* 2012;2012:460801.
136. Quintanilla-Martinez L, de Jong D, de Mascarel A, et al. Gray zones around diffuse large B cell lymphoma. Conclusions based on the workshop of the XIV

- meeting of the European Association for Hematopathology and the Society of Hematopathology in Bordeaux, France. *J Hematopathol.* 2009 Dec 22;2(4):211-36.
137. Bain BJ. Bone marrow trephine biopsy. *J Clin Pathol.* 2001 Oct;54(10):737-42.
 138. Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC. International Council for Standardization in Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol.* 2008 Oct;30(5):349-64.
 139. Arber DA, George TI. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Surg Pathol.* 2005 Dec;29(12):1549-57.
 140. Wilkins BS, Clark DM. Making the most of bone marrow trephine biopsy. *Histopathology.* 2009 Dec;55(6):631-40.
 141. Baiyee et al. Lack of Utility of CD20 Immunohistochemistry in Staging Bone Marrow Biopsies for Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009 March ; 17(2): 93–95.
 142. Alvares CL, Matutes E, Scully MA, et al. Isolated Bone Marrow Involvement in Diffuse Large B Cell Lymphoma: A Report of Three Cases with Review of Morphological, Immunophenotypic and Cytogenetic Findings. *Leuk Lymphoma.* 2004 Apr;45(4):769-75.
 143. Ilgenfritz RB, Kayasut K, Le Tourneau A, et al. Correlation between molecular and histopathological diagnoses of B cell lymphomas in bone marrow biopsy and aspirates. *J Clin Pathol.* 2009 Apr;62(4):357-60.
 144. Brown D, Gatter K, Natkunam Y, Warnkw R. *Bone Marrow Diagnosis: An illustrated guide, Second Edition, 2006. Blackwell Publishing Ltd.*
 145. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med.* 1993 Sep 30;329(14):987-94.
 146. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood.* 2007 Mar 1;109(5):1857-61.
 147. Rosenberg SA: Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat Rep.* 1977 Sep;61(6):1023-7.

148. Coiffier B, Gisselbrecht C, Vose JM, et al: Prognostic factors in aggressive malignant lymphomas: Description and validation of a prognostic index that could identify patients requiring a more intensive therapy—The Groupe d'Etudes des Lymphomes Agressifs. *J Clin Oncol*. 1991 Feb;9(2):211-9.
149. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol*. 1999 Apr;17(4):1244.
150. Oh S, Koo DH, Suh C, et al. Prognostic value of immunohistochemical biomarkers at different cut-off values in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP chemotherapy. *J Korean Med Sci*. 2011 Dec;26(12):1556-62.
151. Perry AM, Cardesa-Salzmann TM, Meyer PN, et al. A new biologic prognostic model based on immunohistochemistry predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2012 Sep 13;120(11):2290-6.
152. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, et al. Addition of Rituximab to Standard Chemotherapy Improves the Survival of Both the Germinal Center B-Cell–Like and Non–Germinal Center B-Cell–Like Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 1;26(28):4587-94.
153. Sehn LH. Paramount prognostic factors that guide therapeutic strategies in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:402-9.
154. Cultrera JL, Dalia SM. Diffuse large B-cell lymphoma: current strategies and future directions. *Cancer Control*. 2012 Jul;19 (3):204-13.
155. Gutierrez-Garcia G. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011 May 5; 117(18):4836-43.
156. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 1;15(17):5494-502.
157. Morton LM, Cerhan JR, Hartge P, et al. Immunostaining to identify molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma in a population-based epidemiologic study in the pre-rituximab era. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2011 Aug 30;2(3):245-52.

158. Malumbres R, Chen J, Tibshirani R, et al. Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5509-14.
159. Chin SF, Daigo Y, Huang HE, et al. A simple and reliable pretreatment protocol facilitates fluorescent in situ hybridisation on tissue microarrays of paraffin wax embedded tumour samples. *Mol Pathol*. 2003 Oct;56(5):275-9.
160. Dunleavy K, Grant C, Wilson WH. Using biologic predictive factors to direct therapy of diffuse large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol*. 2013 Feb; 4(1):43-57.
161. Thieblemont C, Gisselbrecht C. Second-line treatment paradigms for diffuse large B-cell lymphomas. *Curr Oncol Rep*. 2009 Sep;11(5):386-93.
162. Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Phase II Study of Dose-Adjusted EPOCH-Rituximab in Untreated Diffuse Large B-cell Lymphoma with Analysis of Germinal Center and Post-Germinal Center Biomarkers. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 1;26(16):2717-24.
163. Dunleavy K, Davis RE, Landgren O, et al. BCL-6 and rituximab in diffuse large B-cell lymphoma: where are we? *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):843-4; discussion 844-5.
164. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 1;24(19):3121-7.
165. Tilly H, Vitolo U, Walewski J, et al. ESMO Guidelines Working Group. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012 Oct;23 Suppl 7:vii78-82.
166. 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 Aug;93(8):1263-77.
167. Ci W, Polo JM, Cerchietti L, et al. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood*. 2009 May 28;113(22):5536-48.
168. Ninan MJ, Wadhwa PD, Gupta P. Prognostication of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Leuk Lymphoma*. 2011 Mar;52(3):360-73.
169. StatSoft, Inc. (2013). STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.

170. Ozbalak M, Ar MC, Tuzuner N, et al. Detailed analysis of diffuse large B cell lymphoma patients: a single-center, retrospective study. *ISRN Hematol*. 2013 Jul 30; 2013:908191.
171. Dave SS. Genomic stratification for the treatment of lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:331-4.

SKRAĆENICE

ABC-DLBCL	Activated B-cell - like Diffuse Large B-cell Lymphoma
AG	Antigen
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
Bax	Bcl-2 associated X-protein
BCL-2	B cell lymphoma 2 -gen
Bcl-2	B cell lymphoma 2 –protein
BL	Burkitt-ov limfom
CALLA	Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen
CHL	Classical Hodgkin lymphoma
CHOP	Cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone
CR	Complete Remission
CT	Computed Tomography
DBKL	Difuzni B Krupnoćelijski Limfom
DLBCL	Diffuse Large B-cell Lymphoma
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
EBV	Epstein Barr virus
EBER	Epstein Barr virus Encoded RNA
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EMA	Epithelial Membrane Antigen
ENGL	Engleski jezik
EFS	Event Free Survival
EORTC	European Organization for the Research and Treatment of Cancer
FISH	Fluorescentna In Situ hibridizacija
GC	Germinativni Centar
GELLA	Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte
GEP	Gene-expression profiling
GCB-DLBCL	Germinal centre B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma
GC-DLBCL	Germinal centre diffuse large B-cell lymphoma
HE	Hematoksin i eozin
HHV8	Humani Herpes Virus 8
HL	Hočkinov limfom
HLA	Human Leukocyte Antigen

HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Latent Antigen
HRP	Horse Redish Peroxidase
RS	Reed-Sternberg
IAP	Inhibitori apoptotskih proteina
IHC	Immunohistochemistry
IHH	imunohistohemija
IL	Interleukin
IPI	Internacionalni Prognostički Indeks
ISH	In Situ Hybridization
JAK	Janus Kinase
LCA	leukocyte common antigen
LDH	Laktat dehidrogenaza
L&H	Lymphocytic&Histiocytic
LMP-1	Latentni Membranski protein-1
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin method
MR	Magnetna Rezonanca
MUM 1/IRF4	Multiple Myeloma-1/interferon regulatory factor-4
NCI	National Cancer Institute
Non-GC-DLBCL	Non Germinal centre diffuse large B-cell lymphoma
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NHL	Ne-Hočkinov limfom
OCT2	Octamerbinding Transcription factor 2
OS	Overall Survival
PEL	Primarni Efuzioni Limfom
PFS	Progression Free Survival
PR	Partial Remission
RCHOP	Rituximab Cyclophosphamide Doxorubicine Vincristine Prednisone
REAL	A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms
RNK	Ribonukleinska kiselina
RT	Radioterapija
SD	Stable disease
STAT	Signaling Transducer and Activator of Transcription
SZO	Svetska zdravstvena Organizacija

TGF	Tumor Growth Factor
TMA	Tissue Microarray
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV	Ultra-violetno
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organisation

BIOGRAFIJA

Dr Maja Peruničić Jovanović rođena je 1966.g. u Novom Pazaru.

Medicinski fakultet upisala je školske 1984/85 godine, završila 1991.g. na Medicinskom fakultetu u Prištini.

Specijalistički ispit iz Patološke anatomije položila je decembra 1996.g. na Medicinskom fakultetu u Prištini, gde je odbranila i magistarsku tezu pod nazivom: "Histopatološke karakteristike prekanceroznih stanja i lezija larinksa u korelaciji sa karcinomom larinksa", (mentor Prof. dr Mirjana Oklopđžija) januara 1997.godine.

Od 1991. do 1999. god. bila je zaposlena najpre kao lekar, a od 1997. godine kao asistent na predmetu Patološka anatomija, na Institutu za patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Prištini.

Od septembra 1999. do maja 2001. godine bila je zaposlena kao specijalista patolog u Opštoj bolnici u Srbinju-Foči, Rep.Srpska, BiH, i kao saradnik u nastavi na MF Srpsko Sarajevo.

Od maja 2001. g. "privremeno angazovana na poslovima u zdravstvu" na Institutu za Hematologiju Kliničkog Centra Srbije, a od februara 2003. godine u stalnom radnom odnosu kao specijalista patolog u Jedinici za patologiju hematopoeznog sistema u Institutu za Hematologiju Kliničkog Centra Srbije. Trenutno zaposlena kao šef Kabineta za hematopatologiju, Službe za patohistologiju Kliničkog centra Srbije.

Rad uže specijalizacije iz oblasti Medicinske citologije, na temu „Imunocitohemijska dijagnostika zrelih B ćelijskih neoplazmi“, mentor prof dr. Marija Havelka, odbranila je na Medicinskom fakultetu u Beogradu, 2012. godine.

Pohađala je više edukativnih kurseva iz oblasti hematološke patologije u zemlji i inostranstvu, sa dobijenim sertifikatima.

Autor i koautor u više stručnih radova objavljenih u domaćim i stranim stručnim časopisima, koautor u dve stručne monografije.

Član je Udruženja patologa Srbije, Evropskog udruženja patologa i Evropskog udruženja hematopatologa.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Maja Peruničić Jovanović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Imunohistohemijski prognostički biomarkeri u difuznom B krupnoćelijskom limfomu

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 27.02.2015.

Maja Peruničić Jovanović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _____ Maja Peruničić Jovanović _____

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada

Imunohistohemijski prognostički biomarkeri u difuznom B krupnoćelijskom limfomu

Mentor _____ prof dr Biljana Mihaljević _____

Potpisani _____ Maja Peruničić Jovanović _____

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____ 27.02.2015. _____

Maja Peruničić Jovanović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Imunohistohemijski prognostički biomarkeri u difuznom B krupnoćelijskom limfomu

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____ 27.02.2015. _____

Maja Peruničić Jovanović

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.