

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Dr Jelena J Jelić

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ ANGIOGENEZE I EKSPRESIJE
ADHEZIVNIH MOLEKULA STROMALNIH ĆELIJA KOD
BOLESNIKA SA FOLIKULARNIM I DIFUZNIM B
KRUPNOĆELIJSKIM LIMFOMOM**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Dr Jelena J Jelicic

**THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF ANGIOGENESIS
AND EXPRESSION OF ADHESIVE MOLECULES ON
STROMAL CELLS IN DIFFUSE LARGE B CELL AND
FOLLICULAR LYMPHOMA PATIENTS**

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2015.

MENTOR:

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

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. dr Biljana Mihaljević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.
2. Prof. dr Predrag Đurđević, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.
3. dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetski inženjering, Univerzitet u Beogradu.

DATUM ODBRANE: _____

Zahvaljujem se mentoru Prof. dr Mileni Todorović Balint na stručnim savetima tokom izrade disertacije, podršci, razumevanju i prevazilaženju svih zajedničkih prepreka.

Posebnu zahvalnost dugujem mojoj direktorki Prof. dr Biljani Mihaljević na nesebičnom podsticanju naučno-istraživačkog rada na Klinici za Hematologiju, zalaganju za mlade lekare i pruženim veoma korisnim savetima prilikom izrade i korekcije ovog rada.

Zahvaljujem se članovima komisije Prof. dr Predragu Đurđeviću i dr Sonji Pavlović koji su omogućili izradu disertacije.

Zahvaljujem se Prof. dr Dragici Tomin i Doc. Jeleni Bili, svojim nastavnicima na predmetu interne medicine, koje su me usmerile prema hematologiji kao životnom pozivu.

Svim lekarima Klinike za Hematologiju KCS dugujem zahvalnost za nesebičnu saradnju i timski rad koji su mi pomogli prilikom izrade teze.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Maji Peruničić Jovanović na nesebičnoj pomoći u realizaciji disertacije. Takođe, zahvaljujem se laborantkinjama Branki Rakonjac i Borki Kostadinović koje su svojim stručnim umećem omogućile izradu ovog rada. Zahvaljujem se svim patolozima Službe za Patohistologiju KCS koji su ustupili materijal za izradu teze. Dr Novici Boričiću se zahvaljujem na izradi tkivnog mikroniza.

Zahvaljujem se dr Goranu Trajkoviću na korisnim savetima prilikom statističke obrade podataka.

Zahvaljujem svojoj porodici, roditeljima Milici i Josipu i bratu Damiru na nesebičnoj podršci u najtežim trenucima. Zahvaljujem se mom Milošu.

PROGNOSTIČKI ZNAČAJ ANGIOGENEZE I EKSPRESIJE ADHEZIVNIH MOLEKULA STROMALNIH ČELIJA KOD BOLESNIKA SA FOLIKULARNIM I DIFUZNIM B KRUPNOĆELIJSKIM LIMFOMOM

SAŽETAK

Uvod: Značaj tumorske mikrosredine limfoma je prepoznat upotrebom najsavremenijih tehnologija sa posledičnom analizom prognostičkog značaja ovih rezultata. Poznavanje tumorske mikrosredine difuznog B krupnoćelijskog limfoma (DBKL), folikularnog limfoma (FL), kao i genetske osnove primarnog DBKL centralnog nervnog sistema (DBKL CNS) kao posebnog podentiteta u okviru DBKL je još uvek nedovoljno.

Cilj ove studije je bio analiza prognostičkog značaja kliničkih parametara, gustine krvnih sudova merene ekspresijom CD34 na endotelnim ćelijama u tumorskom tkivu, ekspresije CD44s kao adhezivnog molekula na stromalnim i tumorskim ćelijama, i ekspresije transkripcionog faktora FOXP1 na tumorskim ćelijama DBKL, primarnog DBKL CNS-a i FL.

Metoda: Analizirana su 202 patohistološka uzorka fiksirana na formalinu i ukalupljena na parafinu (115 DLBCL/65 FL/22 primarni DLBCL CNS). Korišćenjem *MiSeq* i *TruSeqAmplicon Cancer Panel-a* (TSCAP) za 48 kancer-povezanih gena analizirano je 19 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a.

Rezultati: Povoljan terapijski odgovor (kompletna/parcijalna remisija) je postignut kod 81.3% bolesnika sa DBKL, 81.8% sa primarnim DBKL CNS i 92.3% sa FL. Pored kliničkih parametara koji su pokazali uticaj na ukupno preživljavanje i preživljavanje bez pojave bolesti, utvrđen je značaj visoke gustine krvnih sudova kod bolesnika sa DBKL, a visoke ekspresije CD44s adhezivnog molekula na tumorskim ćelijama kod FL. Multivarijanta analiza je kod DBKL pokazala prognostički značaj na preživljavanje gustine krvnih sudova zajedno sa NCCN-IPI-jem ($p=0.026$, $p<0.001$), dok su se kod FL izdvojili FLIPI, pol, ALC/AMC (absolutni broj limfocita/ absolutni broj monocita u perifernoj krvi), gradus FL i visoka FOXP1 ekspresija ($p=0.006$, $p=0.007$, $p=0.016$, $p=0.034$, $p=0.014$) kao prognostički značajni markeri. Bolesnici sa primarnim

DBKL CNS-a su imali bolje preživljavanje ukoliko je prethodno sprovedena kompletna tumorska resekcija ($p=0.03$). *Next generation sequencing* (NGS) analiza je pokazala prisustvo preko 80% pronađenih visokorizičnih mutacija (nonsense, missense i frameshift – NMF) u 8/48 analiziranih gena (CTNNB1, PIK3CA, PTEN, ATM, KRAS, PTPN11, TP53 i JAK3). TP53 je bio jedini gen mutiran kod svih bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a. Visokorizične mutacije u genima ATM, PTEN, SMO i ERBB4 su bile povezane sa lošijim ukupnim preživljavanjem, dok je prisustvo NMF mutacija u genima ATM, APC, SMO i ERBB4 uticalo na kraće vreme do pojave događaja. NMF mutacije u genu SMO koreliraju sa ranijom pojavom recidiva bolesti (Fišerov tačne verovatnoće $p=0.023$).

Zaključak: Dešavanja u mikrosredini tumora izražena kroz gustinu krvnih sudova i ALC/AMC su jednostavni parametri koji zajedno sa aktuelnim prognostičkim skorovima mogu definisati visokorizične bolesnike sa DBKL i FL. NGS analiza je pokazala da mutacije u genima TP53, ATM, PTEN, SMO i ERBB4 mogu biti odgovorni za patogenezu i agresivnost primarnog DBKL CNS-a, bez obzira na inicijalnu terapiju.

Ključne reči: limfom, limfocitno-monocitni odnos, adhezija, angiogeneza, analiza genskog sekvencioniranja, genetske mutacije.

THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF ANGIOGENESIS AND EXPRESSION OF ADHESIVE MOLECULES ON STROMAL CELLS IN DIFFUSE LARGE B CELL AND FOLLICULAR LYMPHOMA PATIENTS

ABSTRACT

Objectives: The significance of tumor immune microenvironment has been emphasized using the most advanced analysis, with consecutive attempts to reveal prognostic impact of this findings. Furthermore, the knowledge about tumor microenvironment of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL) as well as the genomic basis of primary central nervous system DLBCL (CNS DLBCL), as the special entity within DLBCL, is still insufficient.

The **aim** of this study was to compare and define the prognostic significance of clinical parameters, microvessel density (MVD) in tumour tissue labelled with anti CD34 antibody on endothelial cells of tumour blood vessels, expression of CD44s as adhesive molecule on stromal and tumour cells, as well as transcription factor FOXP1 on tumor cells of DLBCL, primary CNS DLBCL and FL.

Methods: A total of 202 formalin fixed, paraffin-embedded tumor samples (115 DLBCL/65 FL/22 primary CNS DLBCL) were evaluated. Using the MiSeq and TruSeqAmplicon Cancer Panel (TSCAP) for 48 cancer-related genes, 19 primary CNS DLBCL were investigated.

Results: Overall response (complete/partial remission) was achieved in 81.3% DLBCL patients, 81.8% primary CNS DLBCL and 92.3% FL. Beside clinical parameters that were significant for overall survival (OS) and event free survival (EFS), high MVD in DLBCL correlated with poorer outcome, while in FL high CD44s expression correlated with inferior EFS and OS. In DLBCL, multivariate regression analysis showed that MVD along with NCCN-IPI ($p=0.026$, $p<0.001$) were the most important parameters that influenced survival, and in FL were as following: FLIPI, gender, ALC/AMC (absolute lymphocyte count/absolute monocyte count), FL histological grade and high FOXP1 expression ($p=0.006$, $p=0.007$, $p=0.016$, $p=0.034$, $p=0.014$, respectively). In primary CNS DLBCL complete tumor extirpation correlated previous to chemotherapy with

favourable outcome ($p=0.03$). Next generation sequencing (NGS) analyses revealed that over 80% of mutations with high-impact (nonsense, missense and frameshift – NMF) were detected in 8 genes: CTNNB1, PIK3CA, PTEN, ATM, KRAS, PTPN11, TP53 and JAK3. TP53 was the only gene harboring mutations in all 19 patients with primary CNS DLBCL. High-impact mutations in ATM, PTEN, SMO and ERBB4 were negative prognostic parameters for OS, while NFM mutations in ATM, APC SMO and ERBB4 correlated with poorer EFS. Furthermore, NFM mutations in SMO gene correlate with earlier disease relapse.

Conclusion: Events in tumor microenvironment expressed through MVD and ALC/AMC are simple tools that are, with current prognostic scores, able to define long-term survival and identify the patients with DLBCL and FL at higher risk of inferior outcome. Furthermore, mutations in TP53, ATM, PTEN, SMO and ERBB4 genes could be involved in molecular pathophysiology and aggressiveness of DLBCL CNS regardless the initial treatment.

Key words: lymphoma, lymphocyte-to-monocyte count, adhesion, angiogenesis, next generation sequencing, gene mutations.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Non-Hodgkin limfomi.....	1
1.1.1 Epidemiologija NHLa.....	1
1.1.2 Etiopatogeneza NHLa.....	1
1.1.3 Klasifikacija.....	2
1.1.4 Klinička slika.....	2
1.1.5 Dijagnostički postupak.....	3
1.1.6 Klinički stadijum i prognostički skorovi.....	4
1.1.7 Diferencijalna dijagnoza.....	5
1.1.8 Lečenje B ćelijskih limfoma.....	5
1.2 Difuzni B krupnoćelijski limfom (DBKL).....	5
1.2.1 Difuzni B krupnoćelijski limfom, NOS.....	7
1.2.2 Profil genske ekspresije.....	9
1.2.3 Gensko sekvencioniranje.....	10
1.2.4 Imunohistohemijske podgrupe.....	12
1.2.5 Primarni DBKL centralnog nervnog sistema.....	14
1.2.6 Ostali limfomi krupnih B ćelija.....	16
1.2.7 Prognostički parametri.....	21
1.2.7.1. Kliničko-laboratorijski parametri.....	21
1.2.7.2. Absolutni broj limfocita, absolutni broj monocita, limfocitno monocitni odnos.....	23
1.2.7.3 Prognoza u odnosu na biološki potencijal bolesnika.....	24
1.2.7.4. Imunohistohemijski prognostički parametri.....	24
1.2.7.5. Molekularni prognostički parametri.....	25
1.2.7.6. Imunohistohemijski markeri koji se najčešće koriste u dijagnostici limfoma.....	25
1.2.7.7. Angiogeneza u limfomima.....	27
1.2.7.8. Uloga adhezivnih molekula u limfomima.....	28
1.2.8. Terapija.....	29

1.3. Folikularni limfom (FL).....	33
1.3.1. Klinička slika.....	33
1.3.2. Klinički stadijum i prognostički skorovi.....	33
1.3.3. Morfologija.....	34
1.3.4. Imunofenotip.....	35
1.3.5. Profil genske ekspresije (GEP).....	36
1.3.6. Angiogeneza i adhezija.....	36
1.3.7. Lečenje.....	37
2. CLJEVI.....	39
3. BOLESNICI I METODE.....	39
3.1. Terapijski principi.....	40
3.2. Imunohistohemijska analiza.....	41
3.3. Konstrukcija tkivnog mikroniza (TMA).....	43
3.4. Gensko sekvencioniranje (NGS).....	44
3.5. Statistička obrada.....	45
4. REZULTATI.....	46
4.1. Epidemiološke i kliničke karakteristike.....	46
4.2. Laboratorijski testovi.....	51
4.3. Imunohistohemijski markeri.....	52
4.4. Subklasifikacija DBKL na bazi ćelijskog porekla (GCB vs. non-GCB)....	60
4.5. Analiza korelacije kliničkih i imunohistohemijskih parametara.....	60
4.6. Odgovor na terapiju.....	61
4.7. DBKL prognostički parametri.....	62

4.8. Primarni DBKL CNS prognostički parametri.....	68
4.9. FL prognostički parametri.....	68
4.10. Analiza preživljavanja.....	70
4.11. Mutacioni profil bolesnika sa primarnim DBKL CNS dobijen upotrebom analize genskog sekvencioniranja.....	90
5. DISKUSIJA.....	97
6. ZAKLJUČCI.....	115
7. REFERENCE.....	117

1. UVOD

1.1 Non-Hodgkin limfomi (NHL)

Limfomi predstavljaju primarne neoplazme limfnog sistema koji se ubrajaju u peti po učestalosti malignitet u Zapadnoj Evropi ¹. Preko dve trećine bolesnika su stariji od 65 godina sa podjednakom učestalošću bolesnika oba pola ¹.

1.1.1. Epidemiologija NHL-a

Bolja dijagnostika limfoma i pojava HIV infekcije (engl. *Human immune deficiency virus*) je doprinela beleženju porasta incidence limfoma u svetu u poslednjim decenijama¹. Bolesnici sa HIV-om su u povišenom riziku od razvoja visokoagresivnih oblika NHL-a. Takođe, u povišenom riziku od razvoja limfoma su i bolesnici sa transplantiranim organima na imunosupresivnoj terapiji, zatim bolesnici koji su primali visoko-doznu hemioterapiju praćenu transplantacijom matične ćelije, kao i oni sa naslednim imunodeficijntnim sindromima ili autoimunim bolestima ¹. Infekcija je delom odgovorna za razvoj limfoproliferativnih bolesti bilo inhibicijom imunog mehanizma ili indukcijom hroničnog inflamatornog odgovora. *Epstein-Barr virus* (EBV) se dovodi u vezu sa nastankom Burkitt limfoma i nazalnog NK-ćelijskog i T ćelijskih limfoma, dok se *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) dovodi u vezu sa nastankom gastričnog MALT-a (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*), a hepatitis C virus (HCV) sa spleničnim limfomom marginalne zone. *Chlamydia psittaci* može biti odgovorna u izvesnom broju slučajeva za nastanak okularnih adneksalnih limfoma ².

1.1.2. Etiopatogeneza NHL-a

NHL predstavljaju heterogenu grupu maligniteta koju čine 85-90% limfomi koji nastaju od B limfocita, dok ostatak čine limfomi koji vode poreklo od T limfocita i NK (engl. *natural killer*) limfocita ¹. Najčešće limfomi zahvataju i nastaju u limfnim nodusima, mada mogu zahvatiti bilo koje tkivo organizma sa različitim stepenom agresivnosti uključujući indolentne limfome (folikularni limfom – FL) kao i agresivne

limfome (Difuzni B krupnoćelijski limfom - DBKL, Burkitt limfom) ¹. Heterogenost limfoma nastaje zbog mogućnosti maligne ćelijske transformacije u bilo kojoj fazi razvoja kao i diferencijacije limfnih ćelija tokom koje ove ćelije postaju autonomne, nekontrolisano rastu nezavisno od faktora koji normalno kontrolišu ćelijski rast ³.

1.1.3. Klasifikacija

U skladu sa patohistološkim karakteristikama tumora, pokušaji da se klasifikuju hematološki maligniteti su počeli još ranih 60 godina XX veka ⁴. Prve klasifikacije su se bazirale na morfologiji ćelija uključujući Lukes-Collinsovu i Rappaportovu klasifikaciju koja je potom modifikovana u Kiel klasifikaciju ^{4,5}. Na bazi prethodnih klasifikacija i novih saznanja, Internacionalna limfomska studijska grupa (engl. *International Lymphoma Study Group*) je 1994. predložila REAL klasifikaciju (engl. *Revised European-American Lymphoma Classification*) koja se bazirala na morfologiji, imunofenotipu, hromozomsko-genskim promenama i kliničkim karakteristikama tumora ^{4,6}. Ova klasifikacija je poslužila Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization* – WHO) da inkorporira nova saznanja u oblasti limfoma i predloži WHO klasifikaciju 2001. u okviru koje se razlikuje pet kategorija limfoproliferativnih bolesti uključujući neoplasme prekursorskih B i T ćelija, neoplazme zrelih B ćelija, neoplazme zrelih T/NK ćelija, Hodgkinov limfom i limfoproliferativne bolesti udružene sa imunodeficijencijom ^{3,6,8}. Ova klasifikacija je doživela svoju, još uvek aktuelnu, reviziju 2008. godine ⁹. Uprkos načinjenim poboljšanjima, a imajući u vidu i dalje postojanje graničnih podtipova, može se očekivati dalje unapređenje navedene klasifikacije. Pored kliničkih karakteristika, i imunofenotipske analize rađene bilo na parafinskim presecima i/ili protočnom citometrijom zajedno sa molekularno-citogenetskim tehnikama, imaju značajnu dijagnostičko-prognostičku ulogu ¹⁰.

1.1.4. Klinička slika

Simptomi bolesti najčešće zavise od mesta zahvaćenosti limfomom, njegovog histološkog tipa i prisustva ili odsustva B simptomatologije (gubitka u telesnoj težini >10% telesne mase za period kraći od 6 meseci, povišene telesne temperature >38°C,

noćnog znojenja i preznojavanja). Najčešće dolazi do razvoja generalizovane, bezbolne, periferne limfadenopatije koja je kod indolentnih limfoma veoma varijabilna, za razliku od agresivnih čiji je nastanak praćen brzim uvećanjem limfnih čvorova u kratkom vremenskom periodu što zahteva brzu dijagnostiku i neophodnost hitnog otpočinjanja lečenja¹. Limfom može zahvatiti bilo koje tkivo, ali je najčešća ekstranodalna lokalizacija gastrointestinalni trakt (GIT), u okviru koje je želudac najčešće mesto pojave limfoma uključujući MALT i DBKL na terenu MALT-a ili de novo DBKL¹. Vrlo često sa zahvatanjem GIT-a može biti zahvaćen i Waldeyer-ov prsten¹¹. Mantle-ćelijski limfom često zahvata kolon i može biti udružen sa limfomatoznom polipozom, koja je obeležena i kao potencijalno mesto nastanka MALT-a i FL-a¹². NHL predstavljaju i najčešće testikularne malignitete osoba starijih od 60 godina, a koje najčešće čine agresivni limfomi uključujući DBKL, sa mogućom zahvaćenošću i kontralateralnog testisa¹¹.

1.1.5. Dijagnostički postupak

Dijagnostički postupak limfoma obuhvata histološki pregled bioptirane limfne žlezde ili drugog zahvaćenog tkiva. Neophodno je izabrati pre sprovođenja biopsije reprezentativan uzorak. Ekstirpacija limfnog čvora omogućava dobijanje najvećeg broja patohistoloških preparata na kojima je moguće pratiti stepen narušenosti arhitekture limfne žlezde, za razliku od materijala koji je dobijen klinastom resekcijom ili FNAB-om (engl. *Fine Needle Aspiration Biopsy*) kojima se vrlo često dobija isfragmentisan material neadekvatan za dalju analizu. Pored morfološke analize koristi se imunohistohemijsko bojenje u cilju precizne dijagnostike¹³. U cilju još preciznijeg ispitivanja moguće je sprovesti citogenetska i molekularno-genetska ispitivanja¹³. Po postavljanju dijagnoze limfoma neophodno je sprovesti dodatne dijagnostičke procedure u cilju određivanja proširenosti bolesti uključujući i biopsiju kostne srži. Indolentni B ćelijski limfomi se odlikuju češćom infiltracijom kostne srži u poređenju sa agresivnim limfomima kao što je DBKL gde je infiltracija moguća kod 27% slučajeva.

1.1.6. Klinički stadijum i prognostički skorovi

U cilju procene raširenosti limfoma najčešće se koristi kompjuterizovana tomografija (engl. *computed tomography* – CT) vrata, grudnog koša, abdomena i male karlice koja je zamenila ranije korišćene tehnike (radiografiju grudnog koša – Rtg; limfangiografiju i eksplorativnu laparotomiju). U cilju procene zahvaćenosti centralnog nervog sistema (CNS) ili prisutva limfoma kosti, magnetna rezonanca (MR) je superiornija u odnosu na CT ^{14, 15}. U poslednje vreme sve više se koristi PET CT (engl. *Positron Emission Tomography CT*) koji na osnovu nakupljanja FDG-a (*2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose*) može proceniti aktivnost limfoma u određenim regionima. Različiti tipovi limfoma imaju različit afinitet za preuzimanjem FDG-a, uključujući DBKL, FL i mantle-ćelijiski limfom koji imaju stalni afinitet za razliku od ekстранodalnog limfoma marginalne zone, sitnoćeljskog limfoma i T ćelijskih NHL-a koji imaju veoma varijabilni afinitet za nakupljanje FDG-a ^{14,16}. PET CT pregled nije dao rezultate u proceni zahvaćenosti kostne srži i pred terapiju može premestiti bolesnika u viši klinički stadijum u odnosu na CT. Ipak, njegov najveći značaj leži u proceni terapijskog odgovora nakon završetka lečenja ¹⁶. Nakon sprovedenih kliničkih i laboratorijskih ispitivanja moguće je NHL klasifikovati prema Ann Arbor staging sistemu koji je u upotrebi više od 40 godina (Tabela 1) ¹⁷.

Tabela 1. Ann Arbor staging sistem klasifikacije limfoma.

Stadijum	
I	Zahvaćenost jedne regije limfnih čvorova ili ograničena zahvaćenosti jednog ekstralimfatičnog organa (IE)
II	Zahvaćenost dve ili više regija limfnih čvorova sa iste strane dijafragme ili ograničeno zahvaćen jedan ekstralimfatični organ sa jednim ili više zahvaćenih limfnih čvorova sa iste strane dijafragme
III	Zahvaćenost više grupa limfnih čvorova sa obe strane dijafragme (III) ili lokalna zahvaćenost ekstralimfatičnog organa ili tkiva (IIIE) ili slezine (IIIS) ili oba (IIISE)
IV	Difuzno ili diseminovana zahvaćenost jednog ili više ekstralimfatičnih organa ili tkiva sa zahvaćenim limfnim čvorovima ili bez njih ili izolovani ekstralimfatični organ sa udaljenim limfnim čvorovima

U cilju procene prognoze još od 1993. u upotrebi je Internacionalni Prognostički Indeks (engl. *International Prognostic Index* – IPI) koji uključuje starost (≤ 60 godina vs. > 60 godina), vrednost laktat dehidrogenaze – LDH (normalna vs. povišena), ECOG PS < 2 vs. ≥ 2 (engl. *Eastern Cooperative Oncology Group performance status*), Ann Arbor stadijum (I/II vs. III/IV), i broj zahvaćenih ekстранodalnih regiona (\leq jedan vs. dva i više). Na osnovu navedenih parametara IPI klasifikuje bolesnike na četiri rizične grupe (niskog, srednje niskog, srednje visokog i visokog rizika)¹⁸. Sa uvođenjem novih terapijskih modaliteta, predložene su revizije prognostičkih sistema koji se baziraju na IPI-ju, ali sa boljom selekcijom visokorizičnih kategorija bolesnika¹⁹⁻²². O njima će biti više reču u nastavku.

1.1.7. Diferencijalna dijagnoza

S obzirom da u trenutku postavljanja dijagnoze bolesnici mogu biti febrilni, neophodno je isključiti infektivni uzrok. Po postavljanju dijagnoze limfoma neophodno je sprovesti imunohistohemijsko ispitivanje u cilju određivanja podtipa limfoma od čega dalje zavisi terapijski pristup^{23,24}.

1.1.8. Lečenje B-ćelijskih limfoma

Terapijski pristup B-ćelijskih limfoma pre svega zavisi od više faktora uključujući starost, ECOG PS, histološki tip limfoma i proširenost bolesti. Limfomi se u zavisnosti od navedenih karaktersitka mogu lečiti primenom (imuno)hemioterapije, radioterapije i ređe hirurškim pristupom¹. O lečenju DBKL i FL će biti više reči u nastavku.

1.2. Difuzni B krupnoćelijski limfom – DBKL

Difuzni B krupnoćelijski limfom predstavlja najčešći podtip NHL-a činići trećinu svih slučajeva i 90% agresivnih B-ćelijskih NHL-a⁸. Obično se prezentuju brzorastućom tumorskom masom čiju je dijagnozu moguće postaviti na osnovu patohistološkog pregleda tumorskog tkiva koji se odlikuje prisustvom velikih B limfocita, difuznog rasta, krupnim jedrima dvostruko većim od normalnog limfocita. S obzirom na prisutni

diverzitet u okviru DBKL, veći broj entiteta koji se razlikuju po svojim kliničkim, morfološkim, molekularnim i imunohistohemijskim karakteristikama je prepoznat od strane WHO (Tabela 2) ^{8,25}.

Tabela 2. Difuzni B krupnoćelijski limfomi: varijante, podgrupe i podtipovi prema klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije.

Difuzni B krupnoćelijski limfom, (DBKL) NOS		
<u>Morfološke varijante</u>	<u>Molekularne podgrupe</u>	<u>Imunohistohemijske podgrupe</u>
Centroblastni	GCB tip	CD5 + DBKL
Imunoblastni	ABC tip	GCB
Anaplastični		Non-GCB
Difuzni B krupnoćelijski limfom, podtipovi		
DBKL T-ćelijama/histiocitima bogat		
Primarni DBKL centralnog nervnog sistema		
Primarni kutani DBKL, (engl. <i>leg type</i>)		
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		
* GCB tip (tip B ćelija germinativnog centra); ABC tip (tip aktiviranih B ćelija); Non-GCB (tip koji nije porekla germinativnog centra) ⁸		

1.2.1. Difuzni B krupnoćelijski limfom, NOS (*not otherwise specified* – NOS)

Etiologija, epidemiologija, klinička slika: DBKL, NOS, čini do 30% adultnih NHL-a i zapadnom svetu se najčešće javlja u sedmoj deceniji života, iako nisu tako retki slučajevi kod značajno mlađih bolesnika. DBKL, NOS se nešto češće javlja kod bolesnika muškog pola^{26,27}. Odlikuje se brzorastućom tumorskom masom koja može nastati de novo, kao primarni DBKL ili transformacijom hronične limfocitne leukemije, FL, limfoma marginalne zone ili limfoplazmocitnog limfoma, što se odlikuje veoma lošim preživljavanjem ovakvih bolesnika²⁷. EBV je često prisutan u tumorskom tkivu kod imunosuprimiranih bolesnika, dok oko 10% imunokompetentnih bolesnika ima dokazanu EBV infekciju²⁸.

U vreme postavljanja dijagnoze oko 40% bolesnika ima ekstranodalnu zahvaćenost sa najčešćom pojavom limfoma u GIT-u, uz mogućnost pojave i u drugim organima i organskim sistemima uključujući respiratorni sistem, kosti, testise, slezinu, Waldeyer-ov prsten, pljuvačne žlezde, jetru, štitastu žlezdu, bubrege i nadbubrežnu žlezdu²⁷. Kod do 27% bolesnika se opisuje zahvaćenost kostne srži^{29,30}.

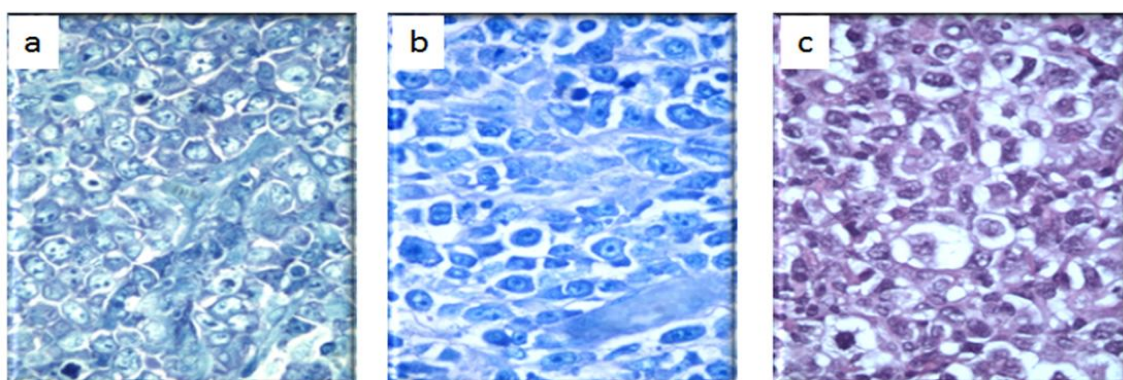
Morfologija: Proliferacija velikih limfoidnih ćelija u okviru DBKL, NOS može zahvatiti parcijalni deo limfnog čvora ili uzrokovati potpunu narušenost arhitekture limfnog čvora. Parcijalna infiltracija može biti interfolikularna ili sinusoidalna uz često zahvatanje perinodalnog tkiva i pojavu sklerotičnih delova. DBKL se odlikuje krupnim limfoidnim ćelijama koje eksprimiraju B ćelijske antigene. Uobičajene morfološke varijante DBKL, NOS obuhvataju: centroblastni, imunoblastni i anaplastični tip, koji u današnje vreme nemaju veći klinički značaj³¹.

Centroblastni tip je najčešća morfološka varijanta DBKL, NOS sastavljena dominantno od ćelija tipa centroblasta, koji predstavljaju limfoidne ćelije srednje veličine, oskudne citoplazme, sa ovalnim ili okruglim jedrima, i sa više nukleolusa uz jedrovu membranu (Slika 1a). Tumor je najčešće polimorfan, sastavljen od ćelija tipa centroblasta i imunoblasta, dok u pojedinim slučajevima može biti isključivo sastavljen od centroblasta³².

Imunoblastni tip predstavlja retku morfološku varijantu koju odlikuje prisustvo preko 90% imunoblasta u tumorskom tkivu sa centralno postavljenim jedrom i oskudnom, bazofilnom citoplazmom (Slika 1b). Imunoblasti sa plazmocitoidnom diferencijacijom

predstavljaju diferencijalno dijagnostički problem u odnosu na plazmablastni limfom ili multipli mijelom.

Anaplastični tip je retka varijanta koja se odlikuje džinovskim ovalnim ćelijama koje se pretežno nalaze unutar sinusa i pokazuju kohezivni način rasta. Mogu podsećati na Hodgkinove i Reed-Sternberg ćelije, ali se biološki od njih razlikuju. Imunohistohemijska analiza omogućava razlikovanje ovog limfoma i od anaplastičnog krupnoćelijskog limfoma T/nultog fenotipa koji pokazuje ekspresiju ALK-1 proteina (Slika 1c).



Slika 1. Uobičajene morfološke varijante DBKL, NOS: centroblastni (uveličanje Giemsa x 400) a), imunoblastni (Giemsa x 400) b), anaplastični (Hematoksilin i eozin – H&E x 400) c).

Imunofenotip: DBKL je neoplazma koja se odlikuje prisustvom ćelija koje ekspresiraju pan B ćelijske markere (CD19, CD20, CD22 i CD79 α , s tim da jedan ili više markera može biti odsutan) čije bojenje je neophodno, uz dodatni panel antitela, za postavljanje dijagnoze^{8,24,33}. Membranska ili citoplazmatska ekspresija imunoglobulina, najčešće IgM može se verifikovati u do 75% slučajeva, dok se CD5 ekspresira u 10%, CD10 u 30-60%, BCL6 u 60-80%, BCL2 u dve trećine slučajeva, IRF4/MUM1 u 35-65%^{8,23,24,33,34}. Ekspresija CD38 i CD138 se viđa u različitom procentu, dok je ekspresija CD30 i EMA obično udružena sa anaplastičnom morfološkom³⁵. Proliferativni indeks Ki-67 se kreće kod DBKL u rasponu od 40-90%⁸. Prisustvo EBV u tumorskim ćelijama se može dokazati imunohistohemijskim bojenjem na latentni membranski protein (LMP) ili EBER in situ hibridizacijom³⁶.

1.2.2. Profil genske ekspresije – GEP (engl. *Gene Expression Profiling*)

Na osnovu profila genske ekspresije, pre više od jedne decenije, identifikovane su dve grupe u okviru DBKL: tip porekla germinativnog centra (GCB) koji najverovatnije nastaje od normalnih B ćelija germinativnog centra, i non-GCB tip ili tip aktiviranih B ćelija (ABC) koji verovatno nastaje zbog blokade tokom plazmaćelijske diferencijacije B ćelija post-germinativnog centra ^{37,38}.

Ove dve grupe se razlikuju u pogledu preživljavanja i prisustva genskih aberacija koje pokazuju involviranost različitih onkogenih puteva u patogenezi tumora ^{37,38}. GCB podtip se odlikuje prisustvom hromozomskih aberacija koje uključuju BCL2 kroz translokaciju (14;18)(q32;q21) i disregulaciju MYC onkogeno kroz t(8;14)(q24;q32), zatim nishodnu regulaciju tumor supresornog gena PTEN, amplifikaciju REL, kao i mutacije TP53, i EZH2 metiltransferaze. ABC podtip je prevashodno udružen sa strukturnim alteracijama koje oštećuju završnu fazu B ćelijske diferencijacije (PRDM1 inaktivacija) i posledičnim brojnim lezijama dovode do aktiviranja NF-κB (engl. *nuclear factor kappa-B*) transkripcionog kompleksa (najčešće mutacija TNFAIP3, CARD11, CD79B i MYD88). ABC podtip ima slabiju prognozu u odnosu na GCB podtip ³⁹⁻⁴². Hromozomske aberacije koje uključuju translokacije CIITA i amplifikacije/rearanžmane gena koji kodiraju CD274/PDL1 i CD273/PDL2 ligande su nedavno verifikovane u primarnom mediastinalnom B ćelijskom limfomu (engl. *primary mediastinal B cell lymphoma – PMBCL*) ^{41,43}. Pojedine navedene promene se mogu naći u samo određenom broju slučajeva, dok najveći broj lezija koje dovode do maligne transformacije ostaje nepoznat ⁴¹. Na osnovu GEP analize utvrđeno je da bolesnici sa visokim nivoom ekspresije gena normalnih B ćelija germinativnog centra (GCB podtip) imaju bolje 5-godišnje ukupno preživljavanje (60% vs. 35%) u odnosu na bolesnike sa niskim nivoom ekspresije istih gena (non-GCB podtip) ³⁸.

Kod bolesnika lečenih samo hemioterapijom, izdvojena su četiri genska profila sa različitim uticajem na preživljavanje, što je poslužilo Lenz-u i sar. da analizom genskog profila 181 bolesnika lečenih CHOP protokolom (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednizon) i 233 lečenih R-CHOP protokolom (rituksimab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednizon) predlože podelu bolesnika na dva fenotipa, sa stromalnim fenotipom 1 i 2 ⁴⁴. Stromalni potpis 1 (engl. *stromal signature 1*) se odlikuje genskim

potpisom koji reflektuje depoziciju vanćelijskog matriksa i infiltraciju ćelijama monocitne linije (histiociti) što za posledicu ima prognostički povoljan ishod. Geni koji definišu stromalni potpis 1 kodiraju komponente ekstracelularnog matriksa, uključujući fibronektin, osteonektin, kolagen, laminin i antiangiogeni faktor trombospondin. Uopšteno, stromalni potpis 1 reflektuje obilnu monocitnu reakciju potke koja je udružena sa depozicijom ekstracelularnog matriksa. Nasuprot prethodnom, stromalni potpis 2 (engl. *stromal signature 2*) reflektuje visoku gustinu krvnih sudova tumora, s obzirom da se odlikuje genima regulatorima angiogeneze, genima koji kodiraju von Willebrandov faktor. Ovaj podtip je udružen sa lošijim ishodom ⁴⁴. Upotreba imunohemioterapije u lečenju bolesnika sa DBKL, čini se da smanjuje razlike u preživljavanju ovih bolesnika, ali su molekularne podgrupe i dalje od značaja u pogledu preživljavanja ^{45,46}. Svakako različiti rezultati i prognostički značaj pojedinih gena je prevashodno posledica upotrebe različitih tehnika analize, kao i algoritama za konstrukciju prediktivnih modela.

1.2.3 Gensko sekvencioniranje (engl. next generation sequencing – NGS)

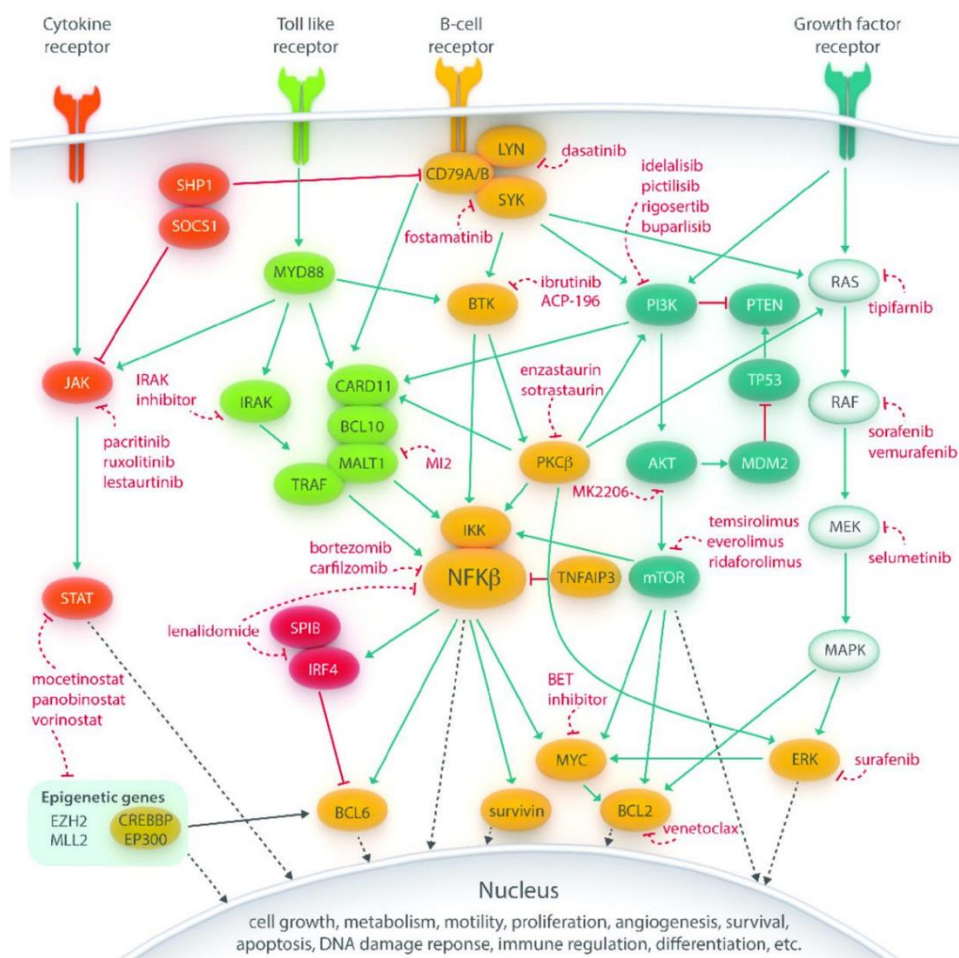
Imajući u vidu heterogenost DBKL koji se na bazi GEP analize klasifikuje u dva podtipa koji se razlikuju u odnosu na ekspresiju pojedinih gena i njihovih mutacija, upotrebom najsavremenijih tehnika (engl. *whole genome sequencing – WGS, whole exome sequencing – WES, next generation sequencing – NGS*) otkriveni su brojni geni koji su pogođeni somatskim mutacijama u manjem broju gena kao i strukturnim rearajmanima, a koji mogu nastati kao posledica prekida u sklopu mehanizma B ćelijske rekombinacije ⁴⁷.

NGS tehnologija, koja omogućava obilan paralelni protok DNK sekvencioniranja, je u toku poslednjih nekoliko godina omogućila novi pogled na genetske odlike DBKL i ostalih zrelih B ćelijskih maligniteta ⁴⁸. Do sada je WES u preko 200 DBKL redefinisao genetsku podlogu upotrebom varijanti pojedinačnih nukleotida (engl. *single nucleotide variants – SNV*). NGS analiza je potvrdila nalaze WES-a, ali je ukazala na značaj gena uključenih u prenos signala u sklopu BCR (engl. *B cell receptor signaling*) prenosnog mehanizma, TLR (engl. *Toll-like receptor signaling*), NOTCH NF-κB i MAPK (engl. *mitogen activated protein kinase signaling*).

U ABC podtipu DBKL najčešće somatske mutacije su pronađene u genima MYD88 (aktivira NF- κ B i JAK/STAT3 signalni put nakon stimulacije TLR), i CD79B/CD79A⁴⁸. NGS analiza je pokazala preklapanje pojedinih somatskih mutacija između FL i DBKL uključujući somatske mutacije EZH2 histon metiltransferaze. Ovaj gen je mutiran kod 23% GCB DBKL i povezan je sa limfomagenezom uz BCL2, mada bez za sada jasnog prognostičkog značaja. GCB podtip se odlikuje mutacijama u genima kao što je MEF2M (transkripcioni faktor koji regrutuje histon modifišuće enzime), MLC1, GNA13 (tumor supresorni gen), SGK1, FOXO. Mutacije koje su zajedničke za GCB i ABC podtip DBKL uključuju CARD11, CREBBP, MLL2, i FOXO1 koji je udružen sa nepovoljnim ishodom bolesnika lečenih sa imuohemioterapijom nezavisno od R-IPi-ja⁴⁸.

Primarni DBKL centralnog nervnog sistema (engl. *primary diffuse large B cell lymphoma of central nervous system lymphoma* – DBKL CNS) predstavlja limfom koji većinom pripada ABC podtipu DBKL. WES je pokazala nove mutacije u genima MYD88 i TBLXR1 uključenih u NF- κ B signalni put i Wnt-posredovanu transkripciju. Takođe mutacije kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a su pronađene i u genima CARD11, PRKCD, ATM, TOX (regulator T ćelijskog razvoja) od kojih neke nisu prethodno opisane u nodalnim DBKL⁴⁸.

Pored formiranja sveobuhvatnih arhiva somatskih mutacija i otkrivanja novih gena koji doprinose ćelijskoj transformaciji, NGS omogućava usmeravanje kliničkih potreba u smeru lečenja B ćelijskih maligniteta i razvijanja ciljne terapije koja deluje preko signalnih puteva uključenih u limfomagenzu (Slika 2)⁴⁹. Očekuje se u budućnosti, usavršavanjem metoga genskog sekvencioniranja, definisanje kako novih mutacija tako i njihovog kliničko-terapijskog značaja.



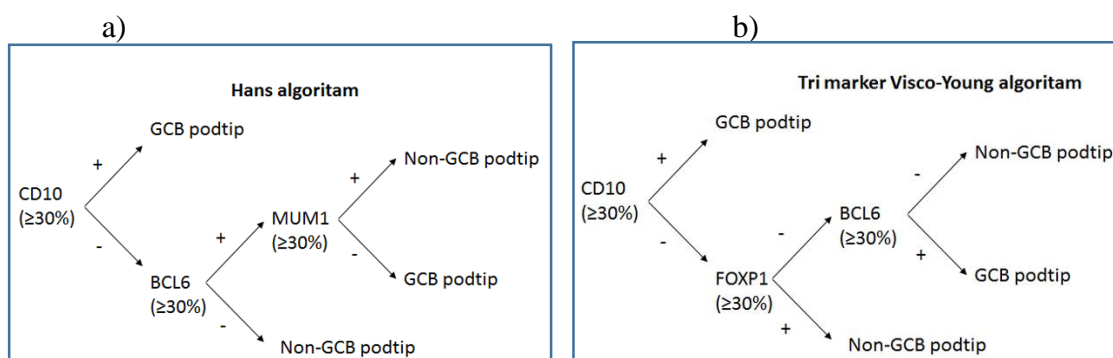
*Adapirano iz „Precision medicine in diffuse large B cell lymphoma: hitting the target“ autora Vermaat i sar. 50

Slika 2. Glavni signalni putevi uključeni u limfomagenezu B ćelijskih limfoma. Ovi putevi mogu biti blokirani upotrebom novih lekova na nekoliko nivoa (od ćelijskog receptora preko intracelularnih proteina do transkripcionih faktora).

1.2.4. Imunohistohemijske podgrupe

Od trenutka kada su prepoznati biološki podtipovi DBKL na bazi GEP-a, veći broj studija je sproveden u cilju pronalaska dostupnih imunohistohemijskih surogat markera za određivanje ćelijskog porekla, imajući u vidu da je GEP još uvek skupa i nedostupna metoda u većini laboratorija ⁵¹⁻⁵³. Stepem slaganja ovih algoritama sa GEP-om i njihov klinički značaj je rezultirao protivrečnim podacima ^{54,55}. Najčešće korišćen algoritam u cilju razlikovanja GCB vs. non-GCB tipa predstavlja Hansov algoritam koji je razvijen u pre-rituksimab eri i zasniva se na imunohistohemijskoj ekspresiji sledećih markera:

CD10, BCL6 i MUM1/IRF4 ⁵⁶. Prema ovom algoritmu GCB DBKL su imunohistohemijski CD10+ (>30% ćelija) ili CD10-, BCL6+ i IRF4/MUM1-, dok se svi ostali slučajevi svrstavaju u non-GCB tip ⁵⁶ (Slika 3a). Prognostički značaj GCB DBKL vs. non-GCB DBKL prema Hansovom algoritmu u eri novih terapijskih modaliteta je i dalje predmet diskusije ^{10,37}. Slaganje Hansovog algoritma sa GEP analizom nije zadovoljavajući (GCB 86.3%, non-GCB 88.3%) zbog čega su Visco i sar. predložili novi algoritam sa tri markera (*Visco-Young*) koji slučajeve koji su CD10+ (≥30%) i CD10-, FOXP1- (≥60%), BCL6+ (≥30%) klasifikuje u GCB tip, dok ostali slučajevi pripadaju non-GCB tipu (Slika 3b). Ovaj algoritam je pokazao, pored svoje jednostavnosti, i visok stepen slaganja sa GEP-om (GCB 93.1%, non-GCB 92.0%) ⁵¹.



Slika 3. Imunohistohemijski algoritam određivanja porekla B ćelije: germinativnog centra (GCB) ili ne-germinativnog centra (non-GCB) podtipa difuznog B krupnoćelijskog limfoma prema Hansovom algoritmu (a) i Visco-Youngovom algoritmu (b).

U cilju što bolje reprodukcije nalaza GEP analize više studija je analiziralo gustinu krvnih sudova u tumorskom tkivu kao i ćelijsku potku primenom imunohistohemije što je rezultovalo potvrđivanjem uticaja genskog potipsa 1 i 2 na preživljavnje bolesnika sa DBKL u pojedinim studijama ⁵⁷.

Unazad više decenija opisano je i postojanje CD5+ DBKL ⁸. Da li je CD5+ DBKL nov entitet ili je varijanta DBKL sa lošom prognozom, još uvek je nejasno. Naime, morfološke karakteristike ovog tumora se u velikom procentu slučajeva preklapaju sa nekim karakteristikama intravaskularnog DBKL. Ovu grupu limfoma odlikuje značajna

morfološka heterogenost, imunohistochemijske karakteristike (CD5+, BCL6-, CD10-, IRF4/MUM1+, BCL2+) i potencijalno agresivniji tok ^{58,59}.

1.2.5. Primarni DBKL centralnog nervnog sistema (engl. *primary diffuse large B cell lymphoma of central nervous system – DBKL CNS*)

Primarni DBKL CNS-a predstavlja primarni limfom intracerebralnog ili intraokularnog regiona (koji se definiše kao primarni intraokularni limfom), a koji isključuje limfome dure, limfome vezane za imunodeficijenciju imunosuprimiranih bolesnika (najčešće HIV pozitivnih), kao i slučajeve sa sitemskim, sekundarnim širenjem u CNS ⁸. Predstavlja manje od 1% svih NHL-a i oko 2-3% tumora mozga, ali sa rastućom incidencom u proteklim decenijama do 5 slučajeva na 100 000 ⁶⁰⁻⁶². Uzrok nastanka ovog tipa limfoma je nepoznat, ali s obzirom da se javlja na imunološki zaštićenim mestima, utvđena je snižena ili odsutna ekspresija HLA molekula klase I i II što dozvoljava tumorskim ćelijama da izbegnu imunološku odbranu organizma ⁶³. EBV infekcija je najčešće odsutna kod imunokompetentnih bolesnika sa DBKL-om ⁸. Kliničke manifestacije najčešće zavise od mesta lokalizacije i uključuju brojne neurološke simptome kao što su glavobolja, konfuzija, hemipareza, poremećaj vida, i dr ⁶⁴. Fokalni neurološki deficiti mogu biti prisutni kod 50-80% bolesnika, dok se psihijatrijski simptomi mogu javiti kod 30% slučajeva ⁸. Kod oko 60% bolesnika se verifikuje jedna tumorska lezija od čega njih 48% ima zahvaćenost jedne od moždanih hemisfera ⁶⁵. Širenje tumora može uzrokovati zahvatanje subependimalnih struktura, ventrikularnog sistema i širenja u meninge, koje ne moraju biti praćene neurološkom simptomatologijom ⁶⁵. MR pregled često upućuje na prisustvo homogenih lezija koje mogu biti praćene i centralnom nekrozom. Diseminacija u ekstraneuralna mesta je retka, mada može biti zahvaćena kostna srž ⁸. Biopsijski uzorci su često ograničavajući faktor u postavljanju dijagnoze primarnog DBKL CNS, zbog čega je metoda stereotaksične biopsije, koja se koristi sa velikim uspehom, postala zlatni standard ⁶⁴. U cilju procene prognoze bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a, razvijen je poseban skor za primarni DBKL CNS od strane Internacionalne studijske grupe za ekstranodalne limfome (engl. *International Extranodal Lymphoma Study Group – IELSG*), koji po jednim bodom označava sledeće parametre: starost ≥ 60 godina, ECOG PS ≥ 2 , povišenu vrednost serumske LDH ($>$ gornje

normalne granice), povišenu koncentraciju proteina u cerebrospinalnoj tečnosti (engl. *cerebrospinal fluid – CSF*) i zahvaćenost dubokih moždanih struktura (periventrikularno područje, bazalne ganglije, moždano stablo i mali mozak) ²¹. IELSG skor razlikuje tri gupe rizika uključujući bolesnike sa niskim (skor 0-1), srednjim (skor 2-3) i visokim rizikom (4-5) (Tabela 4).

Tabela 4. Prognostički indeks za primarne limfome centralnog nervnog sistema prema IELSG skoru.

IELSG	
Starost	
≤60 godina	0
>60 godina	1
ECOG PS<2	0
ECOG PS≥2	1
Normalna LDH	0
Povišena LDH	1
Normalna CSF protein koncentracija	0
Povišena CSF protein koncentracija	1
Zahvaćenost dubokih struktura	
ne	0
da	1
Skor prema IELSG-u	
nizak rizik	0-1
srednji rizik	2-3
visok rizik	4-5

Morfologija ukazuje na prisustvo krupnih B limfoidnih ćelija u tumorskom preparatu koje u vidu mufa okružuju krvne sudove uz prisustvo većeg broja drugih ćelija kao što su aktivirani limfociti, makrofagi, aktivirane mikroglialne ćelije i astrociti. Tumorsko tkivo se može odlikovati i prisustvom polja nekroze ⁶⁴. Imunofenotip ćelija primarnog DBKL CNS-a se odlikuje prisustvom pan B ćelijskih markera (CD19, CD20, CD22, CD79a i PAX-5), bez ekspresije plazma ćelijskih markera (CD38, CD138). IgM i IgD, ali ne i IgG, su eksprimirani na površini tumorskih ćelija što indikuje odsustvo imunoglobulinskog prekida ⁶⁴. Ekspresija CD10 je prisutna u 10% slučajeva, BCL6 u 60-80%, a MUM1 u 90% što je u skladu sa post germinalnim poreklom ^{8,64}. BCL2 ekspresija je česta, bez udruženosti sa t(14;18)(q32;q21) translokacijom. Primarni DBKL CNS-a

imaju česte somatske hipermutacije uključujući VH4/34 gen što ukazuje na antigen-zavisnu proliferaciju, kao i gene BCL6, PIM1, MYC, Rho/TTFn i PAX 5⁶⁶. Do 40% bolesnika ima BCL6 vezane translokacije, dok su t(14;18)(q32;q21) i t(8;14)(q24;q32) retke, a prisustvo delecija 6q i viška na mestu 12q, 22q, i 18q21 sa amplifikacijom BCL2 i MALT1 česte⁶⁷. Homozigotne ili heterozigotne delecije koje zahvataju 9q21 su nađene da utiču na CDKN2A/p16, dok male delecije regiona 6p21.3 dovode do gubitka ekspresije HLA I i II^{63, 67}. Upravo interakcije između ekstracelularnog matriksa i adhezivnih molekula, možda preko antigene stimulacije, dovode do aktiviranja cirkulišućih B ćelija lokalizovanih u CNS-u. Od uvođenja primene visokih doza metotreksata (MTX) prognoza bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a je značajno poboljšana, sa medijanom preživljavanja do 60 meseci, ali je preživljavanje ovih bolesnika i dalje lošije u odnosu na ostale limfome⁶². U cilju unapređenja preživaljavanja bolesnika sa primarnim DBKL CNS-om, sve više istraživanja se sprovodi na polju molekularne genetike i mikrosredine tumora. Patogeneza ovog tumora nije dobro razjašnjena upravo zbog svoje retkosti, ograničenih biopsijskih uzoraka i slabog poznavanja genske baze bolesti. Napreci načinjeni na polju NGS analize bi mogli razjasniti genetska zbivanja u solidnim tumorima i hematološkim malignitetima⁶⁸⁻⁷². Veći broj gena je prepoznat u evoluciji solidnih maligniteta, a imajući u vidu ponašanje primarnog DBKL CNS-a, mogu se očekivati postojanje mutacija u zajedničkim genima. Ovo područje još uvek nije dovoljno istraženo i predmet je aktuelnih studija.

1.2.6. Ostali limfomi krupnih B ćelija

DBKL bogat T ćelijama/histiocitima (engl. *T cell/histiocyte-rich large B cell lymphoma – TCHRBCL*) je prema novoj WHO klasifikaciji prepoznat kao poseban entitet⁸. Odlikuje se obilnim inflamatornim reaktivnim infiltratom sastavljenim od T ćelija i histiocita uz malu proporciju (<10%) krupnih tumorskih B ćelija u biopsijskom uzorku⁸. Čini 10% svih DBKL uz nešto veću učestalost kod muškaraca sa prosečnom starošću od 46 godina. Najčešće zahvata limfne noduse, uz nešto ređu zahvađenost kostne srži, jetre i slezine. Preko 50% bolesnika se dijagnostikuje u uznapredovalom stadijumu⁷³. Morfološka odlika je predominacija velikih B ćelija uz obilje sitnih T limfocita sa manjim ili većim brojem histiocita što predstavlja potencijalni diferencijalno dijagnostički

problem u odnosu na periferni T ćelijski limfom i Hodgkinov limfom ^{8,74}. Imunofenotipski TCHRBCL se odlikuje pozitivnošću B-ćelijskih markera na velikim atipičnim ćelijama uz BCL6 pozitivnost, varijabilno BCL2 i EMA, dok su CD15, CD30 i CD138 negativni. Mikrosredina tumora se odlikuje prisustvom različitog broja CD68+ histiocita kao i CD3 i CD5 pozitivnih T ćelija. Odsustvo IgD pozitivnih mantle ćelija i mreže folikularnih dendritičnih ćelija je od značajne diferencijalno dijagnostičke pomoći u odnosu na limfocitima bogat Hodgkinov limfom ⁷³. Tumorske ćelije TCHRBCL se odlikuju istim rearanžmanima za gene za imunoglobuline kao i ćelije germinalnog centra.

Primarni kutani DBKL (engl. *leg type*) je poseban entitet DBKL koji se prezentuje ako plavičast čvorić, ređe kao plak ili ulceracija, najčešće na donjim ekstremitetima ⁸. Javlja se obično u osmoj deceniji života, češće u ženskoj populaciji ³⁶. Ovaj tip limfoma spada u visoko agresivne limfome sa lošom prognozom i 5-godišnjim preživljavanjem kod 50% bolesnika ⁷⁵. Histološki, tumorske ćelije su tipa centroblasta, ređe se prezentuje kao imunoblastna varijanta tumora sa imunofenotipskim odlikama tumorskih ćelija koje su BCL2+, IRF4/MUM1+, FOXP1 uz prisustvo genetskih abnormalnosti koje su karakteristične za DBKL, NOS i prema GEP analizi ABC-like ⁸.

EBV pozitivan DBKL starijih osoba (EBV+ DBKL) predstavlja klonalnu B ćelijsku proliferaciju udruženu sa EBV infekcijom kod osoba starijih od 50 godina bez znakova imunodeficijencije ⁸. Odlikuje se proliferacijom atipičnih krupnih B ćelija uključujući i Reed-Sternberg-like ćelije sa reaktivnom komponentom, što predstavlja dijagnostički problem. Medijana starosti se kreće od 70-79 godina sa porastom incidence starenjem. Klinički se odlikuje limfadenopatijom, sa relativno čestom ektranodalnom zahvaćenošću uključujući kožu, GIT ili pluća ⁷⁶. Imunofenotip EBV+ DBKL se odlikuje CD20, CD79α pozitivnošću uz čestu BCL6, CD10 i CD15 negativnost, LMP1 pozitivnost (do 94%) i EBNA-2 (28%), kao i varijabilnu ekspresiju CD30 ⁸. Klinički tok je veoma agresivan, sa preživljavanjem od oko 2 godine, nezavisno od IPI indeksa ²⁸.

Primarni medijastinalni B krupnoćelijski limfom (engl. *primary mediastinal B cell lymphoma – PMBCL*) je prema WHO klasifikaciji izdvojen kao poseban entitet, zbog svojih jedinstvenih molekularnih i kliničkih karakteristika, iako citomorfološki liči na ostale DBKL ^{77,78}. Predstavlja 6-10% DBKL i najčešće se prezentuje kao velika tumorska masa u medijastinumu, sa lokalnim širenjem u pluća, zid grudnog koša, pleuru, perikard ⁸. Veoma retko je udružen sa ektranodalnom zahvaćenošću uključujući i kostnu

srž. Najčešće se javlja u populaciji mlađih žena do 35 godina mada se može javiti kod dece i starijih ⁷⁹. Tumor se može odlikovati izrazito brzim rastom medijastinalne mase koja može dovesti do razvoja sindroma gornje šuplje vene, kompresije i/ili infiltracije okolnih struktura medijastinuma što često zahteva hitno otpočinjanje terapije. U trenutku postavljanja dijagnoze oko 20% bolesnika ima uznapredovali III i IV klinički stadijum. Petogodišnje preživljavanje bolesnika sa PMBCL je povoljnije u odnosu na ostale DBKL bolesnike (64% vs. 46%) ⁸⁰. Morfološki PMBCL se odlikuje prisustvom ćelija srednje veličine, difuznog tipa rasta, sa svetlom citoplazmom, i različitim stepenom fibroze intersticijuma. Imunofenotip tumorskih ćelija se odlikuje pozitivnošću na CD20, CD79α i u različitoj meri na CD30, a negativnošću na IgM, HLA (engl. *human leucocyte antigen*) klase I i II i CD5. CD23 je često pozitivan dok ekspresija BCL6 i CD10 postoji u određenom broju slučajeva ^{80,81}. GEP analiza je pokazala veliku sličnost PMBCL i Hodgkinovog limfoma s obzirom da je preko trećine gena sa visokom ekspresijom u PMBCL u odnosu na druge DBKL, ekspimirano u Hodgkinovom limfomu ⁸⁰. Kao jedan od takvih gena posebno se izdvaja PDL2 koji kodira regulator T ćelijske aktivnost, i koji najbolje razdvaja PMBCL od drugih DBKL ima visoku ekspresiju u DBKL ⁸⁰.

Intravaskularni DBKL (IVDBKL) predstavlja retku formu ekstranodalnog DBKL koji se odlikuje intravaskularnim načinom rasta ⁸. Najčešće se javlja u koži i mozgu ali može zahvatiti i druge organe. Klinički se može prezentovati simptomima vaskulitisa, tromboze različitih organa (mozak, pluća, bubreg, nadbubrežna žlezda) ^{82,83}. Koštana srž je zahvaćena u većini slučajeva i pacijenti se dijagnostikuju u uznapredovalom stadijumu bolesti sa češćom pojavom u šestoj i sedmoj deceniji života. IVDBKL se odlikuje veoma agresivnim tokom sa preživljavanjem kraćim od jedne godine. Primena rituksimaba u lečenju ovih bolesnika je pokazala poboljšanje preživljavanja ^{82,84}. Tumorske ćelije ekspimiraju B ćelijske antigene, rastu intravaskularno što može biti posledica defekta „homing” receptora na tumorskim ćelijama. Retki CD3 pozitivni slučajevi su veoma rezistentni na terapiju ⁸⁴.

DBKL udružen sa hroničnom inflamacijom (engl. *Pyothorax-associated lymphoma – PAL*) je limfoidna neoplazma na terenu dugotrajne hronične inflamacije koja nastaje nakon 10-20 godina od razvoja infekcije i odlikuje se agresivnim tokom sa 5-godišnjim preživljavanjem od 20-30% ⁸⁵. Inicijalno je opisana u Japanu kod bolesnika sa piotoraksom, češće nakon pete decenije života kod muškaraca ⁸⁶. Odlikuje

se centroblastno-imunoblastnom morfoloijom uz često prisustvo polja masivne nekroze i angiocentričnog tipa rasta. Imunofenotip tumorskih ćelija odlikuje prisustvo B ćelijskih antigena sa aberantnom ekspresijom T-ćelijskih markera kao što je CD2. GEP analiza je pokazala da se PAL odlikuje različitim profilom u odnosu na nodalni DBKL. PAL je najčešće udružen sa EBV infekcijom sa ekspresijom EBV latentnih gena kao što su EBNA-2, LMP-1 zajedno sa EBNA-1⁸⁵.

Limfomatoidna granulomatoza (LYG) je predstavlja proliferaciju zrelih B ćelija koja nastaje ekstranodalno, najčešće u plućima, zatim u mozgu, bubrezima, jetri i koži uz veoma retko zahvatanje limfnih čvorova⁸¹. Odlikuje se multifokalnim angiocentričnim i angiodestruktivnim lezijama koje uzrokuje prisustvo EBV pozitivnih B ćelija uz brojne reaktivne T ćelije⁸. Javlja se u svim uzrasnim strukturama sa predominacijom kod muškaraca srednjih godina. Imunofenotip ćelija odlikuje pozitivnost na CD20, CD30, EBER i EBV LMP. Kliničko ponašanje tumora zavisi od histološkog gradusa koji je u korelaciji sa zastupljenošću B ćelija i odnosa broja CD4+ T ćelija. Spontana regresija je retka, te je neophodno kod većine bolesnika lečenje imunohemioterapijom.

ALK+ DBKL (engl. *Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma*) predstavlja retku varijantu DBKL koji čini ispod 1% svih DBKL^{35,87}. Može se javiti u svim uzrasnim grupama, ali je nešto češći kod muškaraca mlađeg i srednjeg životnog doba. Dijagnostikuje se najčešće u uznapredovalom stadijumu sa neretko medijastinalnom prezentacijom ili ekstranodalnim zahvatanjem (meka tkiva, želudac, nazofarinks, jezik, kosti). Tok bolesti je izrazito agresivan⁸⁸. Tumor se odlikuje tumorskim ćelijama koje imaju imunoblastnu ili plazmablastnu morfoloiju, a retko anaplastičnu⁸⁸. ALK+ DBKL se sastoji od ćelija koje su negativne za B i T ćelijske markere uz često slabu LCA (engl. *leukocyte common antigen*) pozitivnost. Prisutna je pozitivnost plazma ćelijskih antigena: CD138, CD38, EMA i MUM. Odsustvo CD20 ekspresije uzrokuje neosetljivost ovog tumora na rituksimab. Za razliku od ALK+ anaplastičnog limfoma krupnih ćelija kod koga je t(2;5)(p23;35) najčešća genska abnormalnost, ALK+ DBKL se odlikuje čestim prisustvom t(2;17)(p23;q23)⁸.

Plazmablastni limfom (PBL) predstavlja limfoproliferaciju koja se sastoji od krupnih ćelija koje liče na imunoblaste i najčešće je udruženo sa imunodeficijentnim stanjima, posebno sa HIV infekcijom^{8,87}. Medijana starosti bolesnika je 50 godina, mada se u rekim slučajevima može javiti kod dece. Odlikuje se izrazito agresivnim tokom,

dijagnostikom u uznapređovalom kliničkom stadijumu, sa preživljavanjem manjim od jedne godine. PBL se odlikuje imunoblastnom ili plazmablastnom morfoloģijom što predstavlja diferencijalno dijagnostički problem, te se samo na osnovu morfoloģije ne može razlikovati od imunoblastnog limfoma ili plazma ćelijske neoplazme. Plazmablastni limfom usne duplje koji nastaje kod HIV+ pacijenata se izdvaja kao poseban entitet⁹. Klinički se prezentuje u vidu tumorske mase koja se najčešće pojavljuje u usnoj duplji, mada se može javiti na drugim lokalizacijama uz retku pojavu u limfnim nodusima⁸⁹. Imunofenotip malignih ćelija je negativan za pan-B ćelijske markere sa pozitivnošću na CD138 ćelija (CD20-, CD79α+/-, CD138+, CD38+, MUM1+) uz visok proliferativni indeks. Pokazano je da se na osnovu plazmablastnog fenotipa (PRDM1/BLIMP1+, XBP1+ i CD20/PAX5-/+) može sa velikom sigurnošću PBL razlikovati od drugih tipova DBKL⁹⁰. Ovaj fenotip iako češći u EBV pozitivnih slučajeva, može se naći i kod nekih EBV negativnih slučajeva. EBV je značajan u nishodnoj regulaciji B ćelija kroz različite mehanizme uključujući i PAX5 promotorsku hipermetilaciju⁹⁰.

Krupnoćelijski B limfom udružen sa humanim herpes virus 8 (HHV8+) i multicentričnom Castleman-ovom bolešću predstavlja nodalni limfom koji može zahvatiti GIT, jetru, pluća ili se može javiti u leukemijskoj fazi. Odlikuje ga veoma agresivan klinički tok sa preživljavanjem od nekoliko meseci⁸⁷. Morfološki se odlikuje monoklonalnom proliferacijom B ćelija inficiranih HHV8 koje podsećaju na plazmablaste i ekspiriraju IgM⁹¹. Često je udružen sa HIV infekcijom, dok se EBV infekcija ne javlja. Tumorske ćelije ekspiriraju slabo CD20, i MUM1, i negativne su na PAX-5, CD138, CD27, EBV EBER. Po svojim karakteristikama je sličan plazmablastnom limfomu⁹¹.

Primarni efuzioni limfom (PEL) predstavlja limfom sa veoma agresivnim tokom i pojavom ekstranodalne neoplastične serozne efuzije bez detektabilne tumorske mase^{9,35}. Prezentuje se masivnom seroznom efuzijom u jednu ili više telesnih šupljina (pleuralna, perikardijalna i peritonealna šupljina). Ishod bolesti je veoma nepovoljan, sa preživljavanjem kraćim od šest meseci⁹². Odlikuje se imunoblastnom ili anaplastičnom morfoloģijom. Tumorske ćelije najčešće ne ekspiriraju B ćelijske antigene, ali može biti prisutna ekspresija HLA-DR, CD30, CD38, CD138 i EMA. Obično je udružen sa HHV8 i EBV⁹¹.

B ćelijski limfomi, neklasifikovani, sa karakteristikama između DBKL i Hodgkinovog limfoma predstavljaju grupu agresivnih limfoma koji se ne uklapaju u kriterijume za klasični DBKL ili Hodgkinov limfom. U ovu grupu spada i kategorija limfoma sa karakteristikama između PMBCL i klasičnog limfoma⁸. Ovaj tip limfoma se češće javlja kod mlađih muškaraca sa agresivnijim tokom u poređenju sa PMBCL i klasičnim Hodgkinovim limfomom. Klinički se najčešće prezentuje medijastinalnom tumorskom masom koja se može širiti na okolne strukture. Morfološki limfom se karakteriše slivenim poljima i trakama pleomorfnih tumorskih ćelija sa fibrozno izmenjenom stromom koje podsećaju na klasični Hodgkinov limfom, DBKL ili PMBCL. Prisustvo polja različitih infiltrata sastavljenog od eozinofila, plazmocita, histiocita i T limfoidnih ćelija može biti u različitoj meri izraženo uz područja nekroze. Imunofenotipski se verifikuje preklapanje između Hodgkinovog limfoma i DBKL, te tumorske ćelije mogu eksprimirati B-ćelijske markere, CD45 sa varijabilnom ekspresijom markera Hodgkinovog limfoma (CD30, CD15) i odsustvo ekspresije imunoglobulina, CD10 i ALK⁹³.

B-ćelijski limfom, sa karakteristikama između DBKL i Burkitt-ovog limfoma se javlja najčešće kod starijih osoba, često sa ektranodalnom prezentacijom bolesti, ali za razliku od Hodgkinovog limfoma nema tendenciju javljanja u ileocekalnoj regiji⁸. Odlikuje se izrazito agresivnim tokom bolesti sa lošim ishodom bez obzira na vrstu primenjenog terapijskog protokola⁹². Morfološki ćelije su sitnije u odnosu na klasičan DBKL, ali veće u poređenju sa Burkitt limfomom. Imunofenotipski se odlikuju eksprimiranjem B ćelijskog panela sa visokim mitotskim indeksom³⁵. Ovaj entitet uključuje slučajeve sa translokacijom MYC i BCL2 tzv. „double hit“ limfome⁹⁴

1.2.7. Prognostički parametri

1.2.7.1. Kliničko-laboratorijski parametri

Ann Arbor staging sistem predstavlja standardni način procene raširenosti bolesti gde je odmakli stadijum povezan sa lošijim ishodom¹⁷. S obzirom da je više pojedinačnih kliničko-laboratorijskih parametara pokazalo značaj u pogledu preživljavanja formiran je IPI u pre-rituksimab eri, koji se unazad više od dve decenije koristi u cilju procene prognoze kod NHL-a (Tabela 5)¹⁸. Skorira se tako što se dodaje po jedan poen za svaki

negativni prognostički parametar kao što su: starost \geq 60 godina, ECOG PS \geq 2, uznapredovali stadijum bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji (III/IV), zahvaćenosti ekstralimfatičnih orgna (>1), i povišen nivo serumske LDH ($>$ od gornje normalne granice), razvrstavajući bolesnike u četiri prognostičke kategorije sa 5-godišnjim preživljavanjem grupe niskog rizika od 73% i 26% grupe bolesnika visokog rizika. S obzirom da je uvođenje novih terapijskih modaliteta, najpre rituksimaba, dovelo do poboljšanja prognoze bolesnika sa NHL-om, IPI je izgubio mogućnost stratifikovanja bolesnika u četiri kategorije i zadržao svoju značajnost u razlikovanju onih sa niskim i visokim rizikom ⁹⁵. Potreba za stvaranjem novih prognostičkih indeksa je rezultovala razvojem revidiranog IPI-ja (*Revised – IPI*) koji razlikuje tri prognostičke kategorije na bazi istih parametara koji su uključeni u IPI, ali sa različitim bodovanjem. Kod R-IPI-a bolesnici sa skorom 0 pripadaju grupi niskog rizika, sa skorom 1 i 2 grupi srednjeg rizika, i sa skorom ≥ 3 grupi visokog rizika (Tabela 5)¹⁹. Četvorogodšnje preživljavanje bolesnika sa niskim rizikom je 94%, a sa visokim rizikom je 55%.

Tabela 5. Internacionalni Prognostički Indeks (IPI), revidirani–IPI za agresivne limfome.

IPI i R-IPI	
starost<60 godina	0
starost\geq60 godina	1
ECOG PS<2	0
ECOG PS\geq2	1
Ann Arbor I/II	0
Ann Arbor III/IV	1
Normalna LDH	0
Povišena LDH	1
Zahvaćenost ekstralimfatičnih orgna	
≤ 1	0
>1	1
Skor prema IPI-ju	
nizak rizik	0-1
srednje nizak rizik	2
srednje visok rizik	3
visokrizik	4-5
Skor prema R-IPI-ju	
nizak rizik	0
srednji rizik	1-2
visok rizik	≥ 3

U cilju još preciznije procene prognoze razvijen je NCCN-IPI (engl. *National Comprehensive Cancer Network IPI*) (Tabela 6) ²⁰. Uprkos pojavi navedenih kliničkih modela i dalje postoji potreba za razvojem prognostičkog sistema koji bi razlikovao pacijente koji mogu biti lečeni standardnom terapijom od onih koji zahtevaju intenzifikaciju terapije.

Tabela 6. Prognostički skor za agresivne limfome prema NCCN-IPI-ju.

NCCN-IPI	
Starost	
>40 do ≤60 godina	1
>60 do ≤75 godina	2
>75 godina	3
LDH	
>1 do ≤3	1
>3	2
ECOG PS<2	0
ECOG PS≥2	1
Ann Arbor I/II	0
Ann Arbor III/IV	1
Zahvaćenost ekstralimfatičnih orgna	
≤1	0
>1	1
Skor prema IPI-ju	
nizak rizik	0-1
srednje nizak rizik	2-3
srednje visok rizik	4-5
visok rizik	≥6

1.2.7.2. Absolutni broj limfocita (engl. *Absolute lymphocyte count–ALC*), absolutni broj monocita (engl. *Absolute monocyte count– MC*), limfocitno-monocitni odnos–ALC/AMC

Na osnovu GEP analize, pokazan je značaj tumorske mikrosredine i limfocita koji se mogu koristiti u cilju procene kliničkog ishoda ⁴⁴. Ovi nalazi su rezultovali ispitivanjem uticaja limfocita i monocita u perifernoj krvi kao markera imuniteta domaćina i limfocitnog infiltrata. Više studija je uprkos diskrepantnim nalazima pokazalo prognostički uticaj na OS i EFS (engl. event free survival) vrednosti AMC, ALC i ALC/AMC kod bolesnika sa DBKL lečenih hemio i imunochemoterapijom ^{96,97}. Po analogiji sa DBKL, slična istraživanja su sprovedena kod bolesnika sa FL gde je takođe

pokazano da ALC, AMC i ALC/AMC u pojedinim studijama imaju nezavistan prognostički značaj na preživljavnje ovih bolesnika ^{98,99,100,101}. Različiti rezultati u prikazanim studijama su pre svega posledica heterogenosti analiziranih studijskih populacija kao i različitih terapijskih modaliteta kojima su bolesnici lečeni.

1.2.7.3. Prognoza u odnosu na biološki potencijal bolesnika

Starost i performans status: Primena terapije kod starijih zahteva razmatranje dodatnih faktora kao što je slabljenje funkcije organskih sistema starenjem (slabljenje glomerularne funkcije, smanjanje mišićne mase, opadanje funkcije jetre i smanjenje hematološke koštane rezerve), prisustva komorbiditeta i lošeg performans statusa¹⁰². Odmakla životna dob i loš ECOG PS su povezani sa lošijim ishodom bolesnika sa DBKL i mogu uticati kako direktno tako i kroz primenu manje agresivne terapije. Takođe, stariji bolesnici su često uskraćeni za ulazak u kliničke studije zbog više incidence smrtnosti nevezane za limfom. Procenat postizanja kompletnih remisija (engl. *complete remission* – CR) je niža kod starijih bolesnika i može biti posledica suboptimalnog lečenja ¹⁰³.

Komorbiditeti: Komorbiditeti predstavljaju pridružene bolesti koje postoje u trenutku postavljanja dijagnoze limfoma. Mogu se analizirati kroz upotrebu različitih sistema od kojih je CCI (engl. *Charlson Comorbidity score*) veoma jednostavna skala razvijena za procenu komorbiditetnog statusa bolesnika sa karcinomom ¹⁰⁴. Mlađi bolesnici se leče primenom intenzivnijih terapijskih modaliteta u poređenju sa starijim bolesnicima koji često imaju brojna pridružena komorbiditetna stanja i posledično lošije preživljavnje ¹⁰⁵.

Pol bolesnika: Uticaj pola na ishod bolesti je još uvek nejasan, ali su pojedine studije pokazale bolje preživljavanje osoba ženskog pola lečenih rituksimabom, što se može objasniti nešto sporijim metabolizmom leka kod žena u odnosu na muškarce ¹⁰⁶.

1.2.7.4. Imunohistohemijski prognostički parametri

Morfološke kategorije unutar DBKL nisu jasno povezane sa prognozom i predikcijom ⁸. Prognostički značaj pojedinačnih imunohistohemijskih markera u eri rituksimaba je kontradiktoran. CD5 pozitivan DBKL se povezuje sa visokom ekspresijom

BCL2, čestim recidivima u CNS i lošim ishodom^{58,59}. Kombinacija markera koji ulaze u sastav imunohistohemijskih algoritama koji razlikuju GCB od non-GCB tipa je pokazala različite rezultate u pogledu preživljavanja^{23,51,56}. Primena rituksimaba je modifikovala prethodno verifikovan loš prognostički značaj BCL2 i pozitivni uticaj BCL6 na klinički ishod¹⁰⁷. EBV infekcija u DBKL se pokazala kao loš prognostički znak²⁸. Postoje kontradiktorni podaci vezani za prognostički značaj visokog proliferativnog indeksa označenog kroz ekspresiju Ki-67¹⁰⁸.

1.2.7.5. Molekularni prognostički parametri

Značajan napredak u razumevanju limfomageneze i ekspresije pojedinih gena u DBKL je učinjen uvođenjem GEP-a na osnovu koje je konstatovano postojanje dva molekularna podtipa (GCB vs. ABC) sa različitim prognostičkih ishodom⁴⁴. Prisustvo translokacija BCL6 se povezuje sa boljim ishodom, dok se t(8;14)(q24;q32) povezuje sa Burkitt limfomom, a t(14;18) lošijim ishodom^{109,110}. Takođe visokorizične abnormalnosti uključuju i kariotip, MYC translokaciju, TP53 deleciju ili p53 mutaciju, ali je značaj navedenih parametara u eri rituksimaba potrebno dodatno ispitati.

1.2.7.6. Imunohistohemijski markeri koji se najčešće koriste u dijagnostici limfoma

CD20 (engl. *Cluster of Differentiation 20*) je transmembranski protein koji se eksprimira na membrani B limfocita i učestvuje u njihovoj aktivaciji i proliferaciji. Enkodiran je sa MS4A1 na hromozomu 11q12. Njegova ekspresija se gubi tokom diferencijacije ćelija prema plazma ćelijama¹¹¹. Predstavlja metu za delovanje monoklonskog antitela – rituksimaba.

CD10 (CALLA – engl. *common acute lymphoblastic leukemia antigen*) je metaloproteinaza na membrani ćelije, koja je enkodirana sa MME na hromozomu 3q25. Pojavljuje se na pro-B ćelijama tokom diferencijacije limfocita i gubi se tokom sazrevanja B ćelije, da bi se ponovo pojavio tokom antigen zavisnog sazrevanja u germinativnom centru čime predstavlja marker ćelije porekla germinalnog centra¹⁰. CD10 se eksprimira na normalnim i malignim ćelijama hematopoeznog porekla (uključujući sve Burkitt

limfome, do 40% DBKL i većinu FL, dok je negativan u limfomima marginalne zone i mantl ćelijskom limfomu) ¹⁰.

CD79a (engl. *Cluster of Differentiation 79a*) je specifičan površinski marker B limfocita (od nezrelih pre-B do zrelih B ćelija i plazmocitnih ćelija) ^{8, 24,33}.

CD5 (engl. *Cluster of Differentiation 5*) molekul predstavlja glikoprotein koji se nalazi na T limfocitima i na ćelijama nekih B limfoma i uključen je u prenos signala (hronična limfocitna leukemija, mantl ćelijski limfom, i u 10% DBKL) ^{24,33}. CD5+ DBKL se odlikuju agresivnijim tokom u odnosu na klasični DBKL ⁵⁸.

BCL6 (engl. *B-cell lymphoma 6*) je proto-onkogen koji je kodiran genom na hromozomu 3q27. Pripada familiji inhibitora transkripcije koji svoje efekte ostvaruje preko većeg broja gena koji kontrolišu ćelijski ciklus i diferencijaciju. Ekspirira se u normalnim B ćelijama germinativnog centra i folikularnim T helper ćelijama ^{24,33}. BCL6 je najčešća hromozomska translokacija detektovana kod DBKL i odlikuje se dobrom prognozom ¹¹². Neophodan je u formiranju germinativnog centra i ima ulogu u olakšavanju somatske hipermutacije, kojim se generiše raznovrsnost antitela i povećava afinitet antigena supresijom apoptoze uzrokovane posredstvom p53, kao odgovor na oštećenje dezoksiribonukleinske kiseline (DNK).

BCL2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) je antiapoptotički gen, na unutrašnjoj strani mitohondrijalne membrane, koji je kodiran genom koji se nalazi na hromozomu 18q21 i član je familije gena u koju još spadaju proapoptotički geni BID, BAD i BAX. Ima značajnu ulogu u normalnom razvoju i diferencijaciji B ćelija ¹¹³. Promene u genu BCL2 uključuju t(14;18)(q32;q21). Prisustvo BCL2 ekspresije se verifikuje u nezrelim B ćelijama i memorijskim B ćelijama, uz privremen gubitak u ćelijama germinativnog centra ¹¹⁴. Ekspresija BCL2 proteina se može naći u oko 40%-60% DBKL i samo je deo vezan za t(14;18)(q32;q21) ⁸. Ekspresija BCL2 je udružena sa lošijom prognozom ¹¹⁵.

MUM1/IRF4 (engl. *Multiple Myeloma 1/Interferon Regulatory Factor 4 protein*) je onkogen koji se aktivira kao posledica translokacije t(6;14)(p25,q32). Deo je familije Interferon regulatornih faktora (IRF4) ^{8,10}. Predstavlja transkripcioni faktor koji je kodiran sa IRF na hromozomu 6p25 i ima ulogu u regulisanju sazrevanja i diferencijaciji imunih ćelija, kao i odgovoru na različite patogene činioce, citokine i apoptozu. MUM1 se ekspirira u jedru B ćelija i plazma ćelijama kao i ponekad u T ćelijama ¹¹⁶. Ekspresija

MUM1 se verifikuje kod oko 75% DBKL, dok u normalnim B ćelijama ekspresija BCL6 i MUM1 isključuju jedna drugu ¹¹⁶.

CD138 (*Syndecan 1*) je transmembranski proteoglikan koji se eksprimira u plazmocitima i B prekursorima iz kostne srži. Prisustvo CD138 pozitivnosti se u DBKL reko viđa ⁸.

EBV LMP (engl. *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1*) je membranski protein ekspimiran od strane EBV u latentnoj infekciji i viđa se kod imunokompromitovanih bolesnika, sa HIV infekcijom ili starijih osoba zbog slabljenja imunološkog sistema.

FOXP1 (engl. *Forkhead Box P1*) je transkripcioni factor koji ima ulogu u ranom B ćelijskom razvoju ¹¹⁷. FOXP1 izoforme su ekspimirane u adultnom mozgu i verovatno uključene u razvoj CNS-a. Visoka ekspresija FOXP1 je udružena sa lošijim ishodom kod DBKL i nekih “low grade” limfoma ¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Ki 67 (MIB-1) je nuklearni protein koji enkodiran sa MKI67 na hromozomu 10q25q u ćelijama u deobi, a odsutan je za vreme G0 faze. Zbog različitog procenta koja je definisana kao Ki-67 pozitivnost, prognostički značaj ovog markera nije jasan ¹⁰⁸. Treba imati u vidu da pojedini tumori sa niskim proliferativnim indeksom mogu biti rezistentni na terapiju, zbog prisustva većeg broja ćelija u G0/G1 fazi ciklusa ^{10,23}.

1.2.7.7. Angiogeneza u limfomima

Angiogeneza predstavlja rast novih krvih sudova kao odgovor na proangiogene stimulse. Neoangiogeneza je proces formiranja krvnih sudova u tumorskom tkivu pod uticajem tumorske mikrosredine ¹²⁰. Rast i progresija limfoma je potencirana sa najmanje dva različita angiogena mehanizma: autokrine stimulacije tumorskih ćelija preko ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor – VEGF*) i VEGF receptora (VEGFR) limfomskih ćelija, kao i parakrinim uticajem proangiogene tumorske mikrosredine na lokalnu neovaskularnu transformaciju i regrupisanje cirkulišućih progenitora iz kostne srži ¹²¹. Pojačanu VEGF ekspresiju imaju agresivni tipovi limfoma uključujući i DBKL, dok je u FL ekspresija varijabilna i najčešće niska. Pojačana ekspresija VEGF-a u FL je najčešće udružena sa poljima transformacije u DBKL, a unutar DBKL sa lošijim ishodom. Lokalno infiltrišuće ćelije tumorske sredine (monociti, T ćelije, mezenhimalni periciti) su udruženi sa patogenezom limfoma i

potencijalno prognozom. Gustina krvnih sudova (engl. *microvessel density – MVD*) meri neovaskularizaciju koja nastaje kao rezultat na prisustvo tumorskih ćelija, proangiogenih stromalnih ćelija infiltrišućih benignih T/B limfocita unutar tumorskog tkiva. Zbog različitih uzoraka koji su analizirani, podtipova limfoma, kao i markera za obeležavanje krvnih sudova, postoje velike varijacije u sprovedenim studijama. Najveća MVD je verifikovana u agresivnim limfomima tj. Burkittovom i DBKL, dok je najmanja u FL ¹²¹. GEP analiza je potvrdila postojanje genetskog potpisa 2 udruženog sa genima odgovornim za angiogenezu i time indikovala neophodnost u proceni prognostičko-terapijskog značaja tumorske neovaskularizacije ⁴⁴.

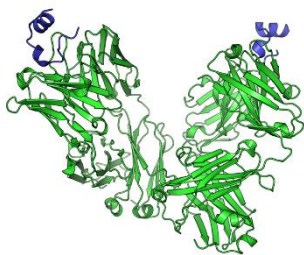
1.2.7.8. Uloga adhezivnih molekula u limfomima

Na tumorsku angiogenezu utiče veliki broj različitih molekula uključujući i antigen CD44 koji predstavlja deo familije glikoprotein adhezivnih molekula i koji ostvaruje ulogu u tumorskoj invazivnosti i njegovom metastaziranju ¹²². CD44 gen se sastoji od 20 egzona, od čega je 10 poznato kao konstantni egzoni i postoje u svim izoformama, dok ostalih 10 predstavljaju varijantne egzona. Najmanja izoforma tj. standardna forma CD44 (CD44s) se odlikuje nedostatkom varijantnih egzona i široko je rasprostranjena, za razliku od CD44 varijanti (CD44v) koji su češće ekspimirani u različitim malignitetima ¹²³. CD44 je dospao u fokus ispitivanja kada je uočeno da posreduje u vezivanju limfocita ili limfomskih ćelija za endotelne ćelije najviše kroz aktivaciju limfocita, omogućavajući širenje tumorskih ćelija. Svoje posredovanje ostvaruje kao receptor za hijalouronan (HA), polisaharid koji se u velikoj meri nalazi naročito u vezivnom tkivu, limfi i matriksu limfnih čvorova. HA omogućava ćelija-ćelija adheziju, ćelijsku migraciju kao i rast i diferencijaciju. Uočeno je da pojedine tumorske ćelije mogu pojačano stvarati HA ili indukovati ćelije mikrosredine i to prevashodno fibroblaste da stvaraju HA. Iako su HA i CD44s ekspimirani u skoro svim tkivima, ostvaruju ulogu u samo nekoliko važnih fizioloških procesa uključujući i „homing“ limfocita ¹²³. Perzistentna ekspresija CD44s do 20% na rektivnim limfocitima može biti prisutna ¹²⁴. Uočeno je da bolesnici sa DBKL lečeni hemioterapijom sa povišenom ekspresijom CD44s i CD44v6 imaju lošije preživljavnje, mada su objavljeni i kontradiktorni podaci, što može biti rezultat upotrebe različitih antitela i

imunohistochemijskih metoda skoriranja ¹²⁵. Prognostički značaj CD44s ekspresije u eri rituksimaba nije dovoljno ispitan, ali se uočava potencijalni gubitak prognostičkog značaja visoke ekspresije CD44s na ishod.

1.2.8. Terapija

DBKL predstavlja agresivni limfom sa medijanom preživljavanja kraćim od jedne godine kod nelečenih bolesnika ¹²⁶. Standard lečenja bolesnika sa DBKL je decenijama



predstavljao CHOP protokol. U cilju poboljšanja ishoda bolesnika sa DBKL korišćene su različite hemioterapijske kombinacije, ali bez značajnijeg preživljavanja bez progresije bolesti kao i OS ¹²⁷. Tek uvođenjem monoklonskog anti CD20 antitela –

rituksimaba u kombinaciji sa hemioterapijom postignut je značajan napredak u preživljavanju bolesnika sa novodijagnostikovanim DBKL. Studija Francuske limfomske grupe – GELA (engl. *The Groupe d'Etude des Lymphomes d'Adulte*) je prva pokazala korist od nove terapije kod bolesnika starijih od 60 godina, a čiji su rezultati potom potvrđeni i u drugim studijama ¹²⁸. U ekstenziji navedene studije pokazan je značajan benefit u pogledu 10-godišnjeg vremena bez progresije bolesti (engl. *progression free survival* – PFS) kod obolelih lečenih imunochemioterapijom u odnosu na bolesnike lečene hemioterapijom (36.5% vs. 20%), kao i 10-godišnjeg OS (43.5% vs. 27.6%) ¹²⁹. U cilju optimizacije režima primene terapije, sprovedeno je više studija uključujući i RICOVER-60, koje su potvrdile superiornost imunochemioterapije u odnosu na hemioterapiju kod starijih osoba ^{130,131}. Takođe, korist od primene rituksimaba je pokazana i u populaciji mlađih osoba od 60 godina ^{131,132}. Uprkos dosadašnjim naprecima načinjenim u lečenju ovih bolesnika, i dalje oko 20-30% bolesnika ima refraktarnu bolest sa veoma lošim ishodom ¹³³. Studija MINT je pokazala da kod mlađih bolesnika na preživljavanje (EFS, PFS, OS) utiče primena rituksimaba kao i aaIPI (engl. *age adjusted IPI*) što je imalo za posledicu sprovedenja više studija (FLYER, UNFOLDER, LNH03-2B GELA) u cilju selektovanja grupe sa visokim rizikom i intenziviranja terapije kao preispitivanju upotrebljivosti IPI-ja u eri rituksimaba i dodatnih kliničkih prognostičkih faktora ^{132,134}.

U cilju poboljšanja terapijskog ishoda bolesnika sa NHL-om, na animalnim modelima je ispitan veći broj agenasa sa antiangiogenetskim efektima i inhibicijom

angiogeneze koji su omogućili prepoznavanje novih terapijskih opcija ¹³⁵. Jedan od potencijalnih agenasa uključuje endostatin koji je endogeni inhibitor angiogeneze koji efekat ostvaruje tako što inhibira proliferaciju endotelnih ćelija, njihovu migraciju, indukuje apoptozu i uzrokuje G1 arest endotelnih ćelija. Takođe uzrokuje i blokiranje VEGF-a za VEGFR-2 i stabilizuje ćelija-ćelija i ćelija-matriks adheziju stopirajući prekid ovih veza neophodnih tokom angiogeneze ¹³⁶. U multiplom mijelomu primena imunomodulatornih lekova je dala veliki uspeh u terapiji ovih bolesnika bazirajući se na antiangiogenetskoj aktivnosti talidomida, koji aktivnost ostvaruje preko inhibicije brojnih citokina uključujući faktor nekroze tumora (TNF- α) i VEGF. Njegov potentniji analog sa slabijim antiangiogenetskim efektom, a izraženijom inhibicijom TNF- α , bortezomib kao predstavnik grupe inhibitora proteazoma svoju aktivnost ostvaruje preko inhibicije puta NF- κ B (odgovornog za sintezu angiogenetskih faktora), takođe predstavljaju predmet aktuelnih ispitivanja u NHL-u uključujući DBKL i FL ¹³⁵. Bevacizumab, rekombinovano humanizovano monoklonsko antitelo protiv VEGF-A, koje inhibira tumorski rast, je pokazalo produžetak PFS-a sam ili u kombinaciji sa hemioterapijom kod bolesnika sa DBKL ^{137,138}. Antiangiogenetska terapija predstavlja značajno potencijalno oruđe u lečenju limfoma čiju ulogu je potrebno evaluirati u eri novih terapijskih modaliteta imajući u vidu terapijsku efikasnost standardne terapije. Naime, oko 60% bolesnika biva izlečeno primenom standardne R-CHOP terapije, međutim bolesnici u recidivu, naročito oni sa relapsom bolesti unutar jedne godine, iako lečeni primenom terapije na bazi platinumskih protokola i/ili autologne transplantacije matične ćelije hematopoeze (auto TMČH), imaju veoma loš ishod ^{50,139}. Takođe auto TMČH je pogodna samo za bolesnike koji su mlađi i u dobrom opštem stanju, za razliku od starijih bolesnika gde kurativne terapije nema, s obzirom da starije životno doba i komorbiditeti onemogućavaju intenzifikaciju terapije.

Upravo napreci na terenu genetskih istraživanja su omogućila prepoznavanje, pored razlika na bazi ćelijskog porekla, puteve tumorske aktivacije koji mogu biti osnova za ciljnu terapiju (Slika 2) ⁵⁰. Naime, BCR i TLR putevi značajni za non-GCB DBKL dovode do NF- κ B aktivacije i potencijalne su mete na svakom nivou od površinskih receptora do transkripcionih faktora. BCR put može biti blokiran ushodno dasatinibom (LYN inhibitor), fosatinibom (SYK inhibitor), enzastaurinom (PKC β inhibitor) i ibrutinibom (BTK inhibitor) koji je za sada dao obećavajuće rezultate sa 41% bolesnika

koji su postigli povoljan terapijski odgovor u ABC podtipu i samo 5% u GCB podtipu (Tabela 7) ⁵⁰.

Tabela 7. Pregled gena, signalnih puteva i odgovarajućih terapijskih agenasa u DBKL.

<i>Zahvaćen gen</i>	<i>Signalni put</i>	<i>Molekularni podtip</i>	<i>Terapijski agens</i>
<i>SYK</i>	BCR/NF-κB	ABC	SYK inhibitori, npr. fosamatinib
<i>BTK</i>	BCR/NF-κB	ABC	BTK inhibitori, npr. ibrutinib, ACO-196, ONO-4059, CC-292
<i>PKCβ</i>	BCR/NF-κB	ABC	PKC inhibitori, npr. enzastaurin, sotrastaurin
<i>IKK</i>	BCR/NF-κB	ABC	IKK inhibitori, npr. PS-1145, MLX015
<i>NF-κB</i>	BCR/NF-κB	ABC	Inhibitori proteazoma, npr. bortezomib, karfilzomib
<i>SPIB</i>	Mikrosredina/NF	ABC	Imuni modulatori, npr. lenalidomid
<i>IRF4</i>	Mikrosredina/NF	ABC	Imuni modulatori, npr. lenalidomid
<i>MYD88</i>	Toll-like receptor	ABC	IRAK inhibitori
<i>IRAK</i>	Toll-like receptor	ABC	IRAK inhibitori
<i>MALT1</i>	Toll-like receptor/CBM	ABC	MALT inhibitori, npr. MI 2
<i>JAK 2/3</i>	JAK/STAT	ABC	JAK inhibitori, npr. pacritinib, ruxolitinib, lestaurtinib
<i>STAT 3/6</i>	JAK/STAT	ABC	STAT inhibitori
<i>PI3K</i>	PI3K/AKT/mTOR	GCB	PIK3K inhibitori, npr. idealisib, buparsilib, rigoserib
<i>AKT</i>	PI3K/AKT/mTOR	DBKL	AKT inhibitori, npr. MK2206, perifosin
<i>mTOR</i>	PI3K/AKT/mTOR	DBKL	mTOR inhibitori, npr. temsirolimus, everolimus, ridaforolimus, silvestrol
<i>ERK</i>	PI3K/AKT/mTOR	DBKL	ERK inhibitori, npr. surafenib
<i>MYC</i>	Apopototski signalni put	GCB, ABC	BET bromodomenski inhibitori
<i>BCL6</i>	Apopototski signalni put	GCB/ABC	BCL6 inhibitori, npr 79-6
<i>BCL2</i>	Apopototski signalni put	GCB, ABC	BCL2 inhibitori, npr GDC-199 (venetoclax)
<i>CREBBP</i>	Histon modifikatori	GCB, ABC	HDAC inhibitori, npr. vorinostat, panobinostat, etinostat, mocetinostat
<i>EP300</i>	Histon modifikatori	GCB, ABC	HDAC inhibitori, npr. vorinostat, panobinostat, etinostat, mocetinostat
<i>ML2</i>	Histon modifikatori	GCB, ABC	HDAC inhibitori, npr. vorinostat, panobinostat, etinostat, mocetinostat
<i>EZH2</i>	Histon modifikatori	GCB, ABC	EZH2 inhibitori, npr. neselektivni EZH2 inhibitori (DZNep), GSK 126, E7438

*Adaptirano iz „Precision medicine in diffuse large B cell lymphoma: hitting the target“ autora Vermaat i sar. 50

Inhibitori koji ciljaju IRAK kinaze, nishodno od MYD88 su i dalje predmet istraživanja. Bortezomib, kao predstavnik inhibitora proteazoma, s obzirom na indirektno dejstvo na NF-κB put kao i lenalidomid, koji deluje preko IRF4, su pokazali benefit kod

bolesnika sa non-GCB podtipom. Obećavajuće mete kod GCB podtipa uključuju PIK3k/AKT/mTOR put koji se aktivira preko PTEN inaktivacije, BCL6 i EZH2 metiltransferaze. Pojačana ekspresija MYC (kroz translokaciju u GCB podtipu DBKL ili preko drugih mehanizama u ABC podtipu DBKL) može biti ciljana epigenetskom manipulacijom sa BET bromodomenskim inhibitorom. Histon modifikujući agensi (vorinostat) su dali preliminarne obećavajuće rezultate za limfome sa CREBBP/EP300 mutacijama. I takođe, ne tako malo značajna, pojačana ekspresija anti-apoptotskog proteina BCL2 može biti ciljna meta za BH3 mimetike kao što je GDC 199 (Tabela 7). Navedeni primeri samo potvrđuju značaj signalnih puteva i neophodnost sprovođenja prospektivnih studija u cilju individualizacije terapije.

Limfomi CNS-a predstavljaju poseban terapijski izazov, s obzirom na značajno lošije preživljavnje u odnosu na ostale B ćelijske limfome kod kojih je uvođenjem rituksimaba prognoza značajno poboljšana⁶². Decenijama unazad se lečenje primarnog DBKL CNS-a baziralo na primeni radioterapije koja dovodi do privremenog zaustavljanja rasta tumora i lošim preživljavanjem. S obzirom na verifikovan porast incidence primarnog DBKL CNS-a, tokom osamdestih godina XX veka, započelo se sa detaljnijim ispitivanjem ovog entiteta. Ubrzo po kombinovanju radioterapije mozga i CHOP protokola postalo je jasno da terapijska efikasnost hemioterapije nije ista kao kod ostalih limfoma¹⁴⁰. Tek uvođenjem visokih doza MTX u lečenju ovih bolesnika postignut je evidentan napredak u postizanju terapijskog odgovora (60-70% i više) kao i dugotrajnog preživljavanja kod 10-30% bolesnika¹⁴⁰. Još uvek nije postignut konsenzus niti formiran zlatni standard u lečenju ovih bolesnika. Jedno od pitanja koje se postavlja jeste da li ima mesta za zračnu terapiju u lečenju limfoma mozga, s obzirom na potencijalnu toksičnost, iako se radioterapija u kombinaciji sa visokim dozama MTX i dalje savetuje kao efikasan treatment za bolesnike sa primarnim DBKL CNS jer redukuje pojavu relapsa i omogućava kontrolu bolesti^{62,140}. Dosadašnje studije su predlagale izbegavanje ekstenzivne neurohirurške resekcije zbog pojave čestih neurotoksičnih efekata, ali je studija Wellera i sar. iznela mogućnost ponovnog razmatranja uvođenja hirurške resekcije u lečenju limfoma CNS-a¹⁴¹. Potencijalni terapijski pristup u pogledu vaskularizacije tumora je nerazjašnjen imajući u vidu da je mikrovaskularizacija primarnog DBKL CNS-a veoma heterogena, što potvrđuje važnost neoangiogeneze u patogenezi¹³⁵. Imajući u vidu napretke napravljene na polju NGS analize, može se

očekivati u skorije vreme razvoj target terapije i za ovu grupu bolesnika na bazi već postojećih saznanja.

1.3. Folikularni limfom (FL)

Folikularni limfom (FL) predstavlja najučestaliji indolentni limfom koji čini 70% indolentnih limfoma i 22% svih NHL-a⁸. Najčešće se javlja u petoj i šestoj deceniji života. Preživljavanje ovih bolesnika se kreće od nekoliko meseci do preko 20 godina¹⁴². Prema REAL (WHO) klasifikaciji, FL je definisan kao limfom folikularnog centra. Kao i kod ostalih maligniteta uzrok nije poznat, ali se povezuje sa stečenim genetskim poremećajima koja mogu biti posledica greške u kontroli rearanžmana imunoglobulinskih gena, dejstva toksičnih materija (citostatici, benzen), jonizujućeg zračenja, prisustva hroničnih virusnih i bakterijskih infekcija.

1.3.1. Klinička slika

Klinička slika se odlikuje pojavom bezbolne limfadenopatije sa ili bez prisustva B simptomatologije. Bolest se najčešće dijagnostikuje u uznapredovalom kliničkom stadijumu. Ekstranodalna lokalizacija bolesti je retka, mada se kod FL često viđa zahvaćenost kostne srži. Odlika ovog tipa indolentnog limfoma jeste varijabilan tok bolesti uz osetljivost na različite citostatike, ali i sklonost ka recidivima koji su sa sniženom senzitivnošću na hemioterapiju sa svakim novim recidivom. Medijana preživljavanja ovih bolesnika je od 8-10 godina¹⁴³. Transformacija bolesti u agresivniju formu najčešće DBKL, a ređe u limfome sive zone, može nastati nezavisno od primenjene terapije. Učestalost transformacije FL u agresivniji oblik se kreće od 10-60% sa kumulativnom godišnjom stopom od 3%¹⁴³. Ishod bolesti je veoma loš sa medijanom preživljavanja od 11 meseci¹⁴³

1.3.2. Klinički stadijum i prognostički skorovi

Kod FL se za procenu proširenosti bolesti, kao i kod ostalih NHL-a koristi Ann Arbor staging sistem. S obzirom da unutar podgrupa FL postoji nepredvidivost u

kliničkom toku i ishodu, kao i nepouzdanost IPI-ja, u prognozi ovih bolesnika se od 2004. koristi FLIPI (engl. *Follicular Lymphoma Interantional Prognostic Index*) (Tabela 8). FLIPI grupiše bolesnike u tri rizične kategorije na osnovu dodavanja jednog boda u slučaju starosti ≥ 60 godina, Ann Arbor kliničkog stadijuma III i IV, vrednosti Hb < 120 g/l, povišene LDH i prisustva više od 4 zahvaćena limfna regiona. Varijabilan klinički tok bolesti je prevashodno posledica karakteristika tumorske mikrosredine, zbog čega je u poslednjih par godina u fokusu ispitivanja prognostički značaj ALC, AMC i ALC/AMC na ishod, analogno sa rezultatima GEP-a u DBKL ^{98-100,144}

Tabela 8. Intenacionalni prognostički indeks za folikularni limfom – FLIPI.

FLIPI		
Starost	<60 godina	0
	≥ 60 godina	1
Ann Arbor klinički stadijum	I ili II	0
	III ili IV	1
Hemoglobin	> 120 g/l	0
	< 120 g/l	1
Serumska LDH	Normalna	0
	Povišena	1
Broj zahvaćenih limfnih regiona	≤ 4	0
	> 4	1
Zbir	Nizak rizik	0-1
	Srednji rizik	2
	Visok rizik	3-5

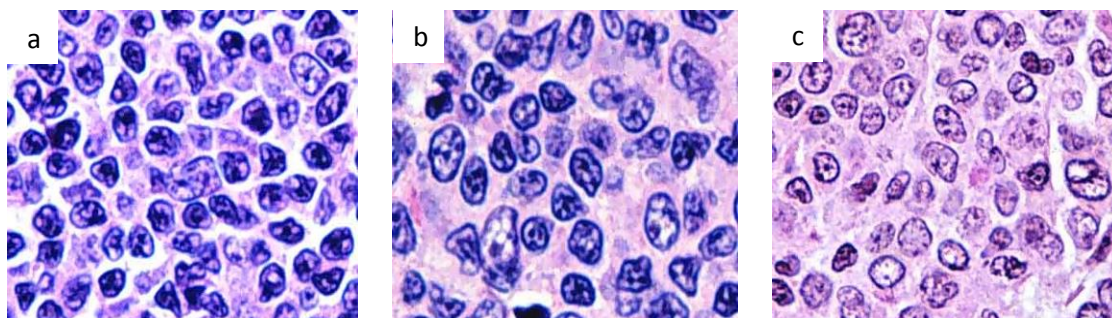
Nakon uvođenja imunohemioterapije kao standardne terapije u lečenju FL, formiran je novi prognostički skor FLIPI2, mada je FLIPI zadržao svoju prognostičku vrednost kako u pogledu PFS-a tako i OS-a ^{145, 146}.

1.3.3. Morfologija

Tumorsko tkivo FL se odlikuje prisustvom dve vrste malignih ćelija (centrociti, centroblasti) u germinativnom centru koje podsećaju na ćelije normalnih limfnih folikula uz određeni broj T limfocita, folikularno-dendritičnih ćelija i makofaga. Centrociti su male ćelije sa nepravilnim jedrom i slabo bazofilno razvijenom citoplazmom, za razliku

od centroblasta koji su krupne ćelije, oskudne bazofilne citoplazme. Ove ćelije dele isti imunofenotip. Određivanje broja ćelija je od značaja za određivanje podtipa FL ¹⁴². Prema broju centroblasta prema WHO klasifikaciji razlikuju se tri podtipa FL (Slika 4) ¹⁴⁷.

1. **Gradus I** se odlikuje dominacijom centrocita sa manje od 20-25% krupnih ćelija ili manje od 5 centroblasta/x 40 HPF (engl. *high power field* – *HPF*) i medijanom preživljavanja od 8 godina (Slika 4a). Predstavlja najčešći podtip FL
2. **Gradus II** odlikuje prisustvo od 25-50% krupnih ćelija ili od 5-15 centroblasta /x 40 HPF (Slika 4b).
3. **Gradus III** se odlikuje dominacijom centroblasta koji čine preko 50% ćelija, odnosno preko 15 ćelija/x 40 HPF (Slika 4c). Gradus IIIa se odlikuje prisustvom centrocita, a gradus IIIb odlikuje potpuno odsustvo centrocita. Gradus III se odlikuje sličnostima sa DBKL u pogledu agresivnosti i sklonosti ka čestim recidivima.



Slika 4. Folikularni limfom gradus 1 (a), gradus 2 (b) i gradus 3 (c).

1.3.4. Imunofenotip

Ćelije FL vode poreklo od B ćelija i ekspiriraju pan B ćelijske markere (CD19, CD20, CD22, CD79 α). CD10 pokazuje varijabilnu ekspresiju sa nižom ekspresijom u višem gradusu (83% u gradusu III vs. 20 % u gradusu I) za razliku od BCL6 koji se češće ekspirira u višem gradusu ^{147,148}. Ekspresija BCL2 je prisutna u većini ćelija, dok je CD43 pozitivnost prisutna samo u gradusu 3, a CD5 negativnost odlika svih FL ¹⁴⁹. MUM1 je označen kao potencijalni marker negativnog uticaja na ishod ¹⁵⁰. U FL su verifikovane izražene somatske mutacije na genima za lake i teške lance imunoglobulina.

Tipična hromozomska mutacija u FL je t(14;18)(q32;q21) i verifikuje se u 85% slučajeva, dok je ređe prisutna t(2; 18)(p12;q12) koja uključuje mutacije na poziciji BCL-

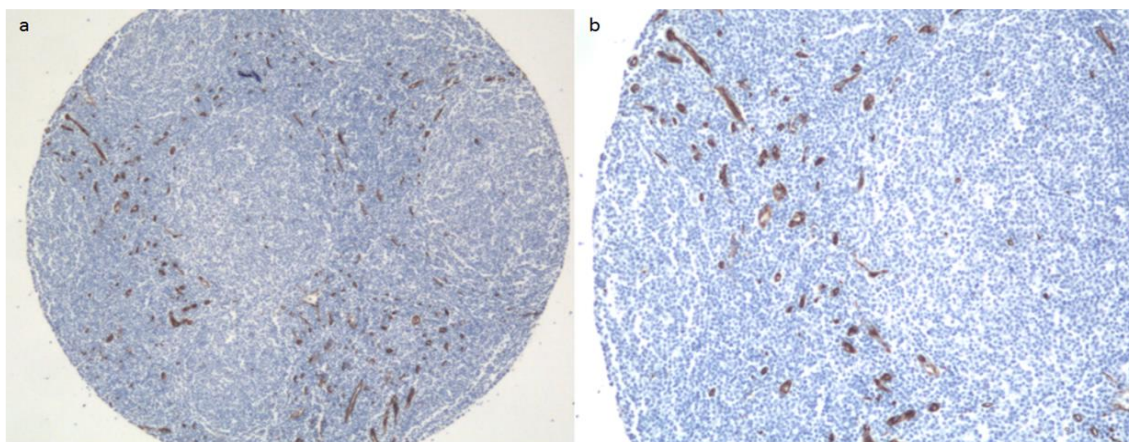
gena i gena za imunoglobuline. U FL su opisane i druge abnormalnosti kao što je delecija hromozoma 6 (6q27) u oko 20% slučajeva. Navedene abnormalnosti su povezane sa većom verovatnoćom transformacije bolesti u agresivniju formu (DBKL) i lošiji ishod ¹⁵¹.

1.3.5. Profil genske ekspresije – GEP (engl. *Gene Expression Profiling*)

GEP analiza je u FL potvrdila prisustvo dva zapisa na bazi biološke funkcije pojedinih gena i to potpis imunog odgovora 1 – IR-1 (engl. *immune-response 1 signature*) i IR-2 (engl. *immune-response 2 signature*) koji su povezani sa ne-neoplastičnim tumor infiltrišućim ćelijama i makrofazima. IR-1 iako uključuje gene koji kodiraju T ćelijske markere (npr. CD7, CD8B1, ITK, LEF1, and STAT4) nije prosti surogat marker za T ćelije u tumorskom tkivu, jer uključuje i gene koji su visoko ekspimirani u makrofazima (npr. ACTN1 i TNFSF13B). IR-1 je povezan sa boljim ishodom. IR2 uključuje gene koji su ekspimirani u makrofazima i/ili dendritičnim ćelijama (npr. TLR5, FCGR1A, SEPT10, LGMN, i C3AR1). Ovi nalazi potvrđuju ulogu IR-1 i IR-2 koji reflektuju biološke karakteristike nemalignih ćelija u tumorskom tkivu ¹⁵².

1.3.6. Angiogeneza i adhezija

U reaktivnom limfnom čvoru kao i u limfnom čvoru infiltrisanim folikularnim limfomom, MVD je izraženija u interfolikularnoj zoni nego u folikulima (Slika 5a, b) ¹³⁵.



Slika 5. FL sa naglašenom vaskularizacijom interfolikularne zone obeležene anti CD34 antitelom za bojenje endotelnih ćelija kapilara, uveličanje x 50 (a), uveličanje x 100 (b)

Odlika mikrovaskularizacije tumora je prisustvo transluminalnih mostića i alternativnog načina rasta krvnih sudova. Pojedine studije su ukazale na povezanost visoke MVD i progresivne bolesti kao i transformacije u DBKL, mada postoje i kontradiktorni podaci u literaturi ¹⁵³. Značaj angiogeneze u FL je teško utvrditi s obzirom na primenjen različit terapijski pristup i različite markere za obeležavanje krvnih sudova u objavljenim studijama. Za angiogenezu je delom odgovoran CD44 antigen tumorskih ćelija koji pokazuje višu ekspresiju sa pojavom difuzne tumorske građe ¹⁵⁴

1.3.7. Lečenje

Kao i u DBKL, od trenutka uvođenja rituksimaba u kombinaciji sa hemioterapijom, preživljavanje bolesnika sa FL je značajno unapređeno ¹⁵⁵. Efikasnost različitih terapijskih protokola je poređeno uključujući R-CVP (rituksimab, ciklofosfamid, vinkristin, prednizon), R-CHOP, R-bendamustin itd. PRIMA studija, kao i Italijanska FL-05 studija su pokazale podjednaku efikasnost R-FM protokola (rituksimab, fludarabin, mitoksantron) i R-CHOP protokola, ali uz značajno višu stopu toksičnosti fludarabinskog protokola ¹⁵⁶. Efikasnost R-CHOP protokola je bolja u pogledu PFS-a u poređenju sa R-CVP. Nemačka studijska grupa je u studiji StiL NHL1 poredila R-CHOP vs. R-bendamustin kod bolesnika sa indolentnim limfomom, uključujući i 279 bolesnika sa FL, ističući manju hematološku i neurološku toksičnost R-bendamustina ¹⁵⁶. U cilju smanjenja učestalosti relapsa bolesti i produžetka PFS-a, pokazan je benefit od primene terapije održavanja rituksimabom, kako kod de novo bolesnika sa FL, tako i kod onih sa refraktarnom ili relapsirajućom bolešću ¹⁵⁷. Ipak, Meta-analiza je objedinjujući rezultate 9 istraživanja pokazala da je terapija održavanja rituksimabom povezana sa nižim rizikom od smrti (HR 0.76, 95 % CI 0.62-0.92). Iako su ovi rezultati izraženiji kod bolesnika lečenih terapijom održavanja u recidivu, sličan trend postoji i kod bolesnika koji su lečeni terapijom održavanja u prvoj liniji (HR 0.86, 95% CI 0.60-1.25) ¹⁵⁷. Dalja ispitivanja su pokazala da se upotrebom konjugata koja kombinuju antitumorsku aktivnost rituksimaba i radioizotopa (⁹⁰Y-ibritumomab tiuteksan i ¹³¹I-tositumomab) postiže visok procenat povoljnog terapijskog odgovora i produženog OS-a, ali uz čestu hematološku toksičnosti (citopenije)¹⁵⁸. Takođe, na terenu uspeha koji je postignut sa prvim anti CD20 antitelom, u toku su ispitivanja efikasnosti primene novih antitela koja

ciljaju isti antigen, kao što su ofatumomab, veltuzumab ili obinutuzumab (poznat i pod nazivom GA101) ¹⁵⁶.

Savremene preporuke za lečenje FL predlažu manje agresivan pristup za bolesnike u I i II kliničkom stadijumu u vidu primene lokalne radioterapije ili u slučaju visokorizičnih, simptomatskih bolesnika primenu imunohemioterapije sa/bez radioterapije. Asimptomatski bolesnici u uznapređovalom kliničkom stadijumu, bez velike tumorske mase ili visokog FLIPI-ja se mogu pratiti (engl. *watch and wait*), dok se u suprotnom predlaže se primena imunohemioterapije. Bolesnici u recidivu FL imaju bolje preživljavanje u slučaju primene imunohemioterapije sa održavanjem rituksimabom. Uloga autologne i alogene transplantacije matičnih ćelija u FL je pokazala mogući benefit, ali i veću učestalost neželjenih događaja.

HIPOTEZA:

Više studija je pokušalo da reprodukuje nalaze GEP analize kroz ispitivanje prognostičkog značaja kliničkih i patohistoloških parametara na ishod bolesti. Takođe, pokazano je da povećana MVD u tumorskom tkivu (neovaskularizacija), kao i različit stepen prisustva nemalighnih reaktivnih ćelija strome utiču na ishod bolesti u limfoproliferativnim oboljenjima (DBKL i FL). Uloga angiogeneze u eri rituksimaba nije jasno definisana, uprkos GEP analizi koja je označila angiogenezu kao genski potpis 2. Shodno navedenom, naša pretpostavka polazi od uticaju kliničko-patohistoloških markera, pre svega MVD i ekspresije adhezivnih molekula na tumorskim i ćelijama strome, na tok i ishodom bolesti.

U okviru DBKL, po svojim karakteristikama, naročito agresivnosti, izdvajaju se limfomi mozga kao poseban entitet u odnosu na ostale limfome deleći kliničke karakteristike sa solidnim tumorima mozga što je bila polazna pretpostavka u NGS analizi primarnog DBKL CNS-a.

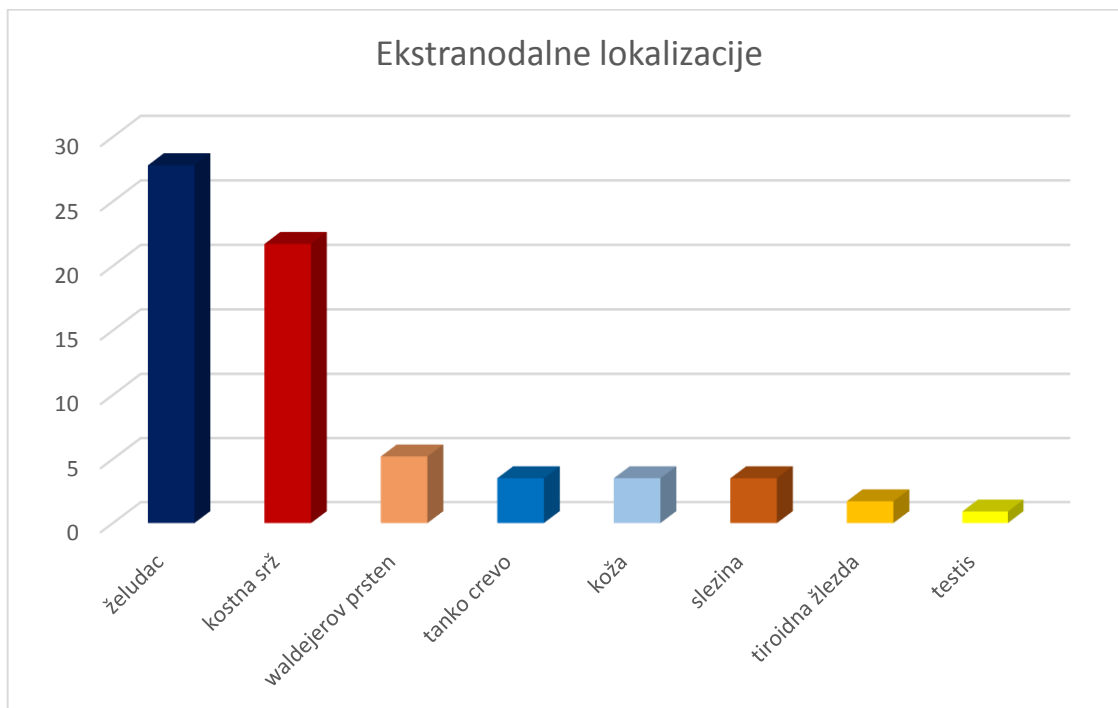
2. CILJEVI:

- Usporedna analiza epidemioloških, kliničkih, patohistoloških i laboratorijskih parametara kod bolesnika sa DBKL i FL.
- Ispitavanje uticaja gustine krvnih sudova i prisustva adhezivnih molekula stromalnih i tumorskih ćelija na tok i ishod bolesti.
- Testiranje značaja aktuelnih prognostičkih indeksa i korelacija sa karakteristikama mikrosredine tumora i tumorskih ćelija.
- Analiza posebnog entiteta primarnog DBKL centralnog nervnog sistema putem genskog sekvencioniranja radi definisanja ekspresije mutiranih tumorskih gena.

3. BOLESNICI I METODE:

U ovoj retrospektivnoj analizi obrađena su 202 bolesnika kojima je bio dostupan dijagnostički tumorski material fiksiran na formalinu i ukalupljen na parafinu (engl. *formalin fixed, paraffin wax embedded – FFPE*). Grupu je činilo 95 muškaraca (47.0%) i 107 žena (53.0%) koji su dijagnostikovani i lečeni u desetogodišnjem periodu od 2003. do 2013. na Klinici za Hematologiju Kliničkog Centra Srbije. U analizu su uključena 22 bolesnika (10.9%) sa primarnim DBKL CNS-a, zatim 49 (24.3%) bolesnika sa nodalnim DBKL, 66 (33.7%) sa ektranodalnim DBKL (izuzev primarnog DBKL CNS-a) i 65 (33.2%) bolesnika sa FL. Dijagnoza limfoma je postavljena histopatološkom i imunohistohemijskom analizom uzoraka tumorskog tkiva dobijenog biopsijom ili ekstirpacijom tkiva limfnog čvora ili drugih ektranodalnih lokalizacija u skladu sa kriterijumima klasifikacionog sistema WHO ⁸. Bolesnici sa tumorima udruženim sa imunodeficijencijom, PEL i PMBCL nisu analizirani. Svi bolesnici su prošli kroz standardne „staging“ procedure u cilju određivanja kliničkog stadijuma bolesti. Velika tumorska masa („bulky” bolest) je računata u slučaju prisustva tumora promera ≥ 7 cm.

Ako se izuzme primarni DBKL CNS-a (22 bolesnika), među 115 bolesnika sa DBKL najčešća ektranodalna lokalizacija je bila želudac 32 (27.8%), zatim kostna srž 25 (21.7%), Waldejerov prsten 6 (5.2%), tanko crevo 4 (3.5%), koža 4 (3.5%), slezina 4 (3.5%), tiroidna žlezda 2 (1.7%) i testis 1 (0.9%) (Grafikon 1).



Grafikon 1. Distribucija učestalosti ekstranodalnih lokalizacija bolesnika sa DBKL.

Među FL bolesnicima najčešća ekstranodalna lokalizacija je bila kostna srž (73.8%), potom slezina (4.6%) i pljuvačne žlezde (3%).

3.1. Terapijski principi

Bolesnici su lečeni primenom rituksimaba (monoklonskog anti CD20 antitela) u kombinaciji sa hemioterapijom CHOP/CHOP like protokolima. Od 202 bolesnika, 180 sa DBKL i FL je lečeno primenom imunohemioterapije, dok su bolesnici sa primarnim DBKL CNS lečeni primenom visokih doza MTX sa/bez zračne terapije mozga. Kompletna ekstirpacija tumora pred hemioterapiju je sprovedena kod 10 bolesnika sa primarnim DBKL CNS (45.5%), dok je kod 7 (31.8%) učinjena parcijalna resekcija, a kod 5/22 (22.7%) samo biopsija tumora.

Za potrebe studije analizirani su navedeni parametri:

1. Klinički parametri (pol, starost, performans status prema ECOG kriterijumima, prisustvo B simptoma, "bulky" bolesti, komorbiditeti prema CCI)

2. Parametri krvne slike (broj leukocita sa leukocitarnom formulom) određivani metodom po Coulter Counteru sa bojenjem po May-Grunwald-Giemsu (MGG) i brojanjem najmanje 100 ćelija u cilju određivanja leukocitarne formule.
3. Laboratorijski parametri (hemoglobin, broj leukocita, ALC, AMC, ALC/AMC, LDH).
4. Prognostički indeksi uključujući IPI, R-IPI i NCCN-IPI za DBKL, IELSG skor za primarni DBKL CNS-a i FLIPI za FL.
5. Morfološka i imunohistohemijska analiza tumorskog tkiva korišćenjem standardnih dijagnostičkih monoklonskih antitela: CD20, CD79alfa, CD38, CD3, CD5, CD30, HLA-DR).
6. U cilju određivanja porekla B ćelija (GCB vs. non-GCB) korišćena su monoklonska antitela za Hansov algoritam (CD10, BCL6, MUM1) i Visco-Young-ov algoritam (CD10, FOXP1, BCL6)^{51,56}.
7. MVD u tumorskom tkivu je procenjivana upotrebom anti CD34 antitela, a prisustvo adhezivnih molekula na tumorskim i stromalnim ćelijama upotrebom anti CD44 antitela.
8. Terapijski odgovor je procenjivan prema Cheson-ovim kriterijumima¹⁵⁹.

3.2. Imunohistohemijska analiza

Imunohistohemijska analiza je obuhvatila inicijalnu obradu tkiva fiksiranjem u 10% puferisanom formalinu uz kalupljenje u parafinu i sečenje na mikrotomu u cilju dobijanja preseka debljine 4-5 μ m. Dalja obrada je uključila standardne tehnike bojenja H&E, Giemsom i Gordon Sweetom uz dehidraciju i deparafinizaciju uzoraka. U dijagnostičkoj analizi su korišćena sledeća monoklonskih antitela ručno obrađena: CD20, CD79 α , CD3, CD5, CD10, BCL2, BCL6, MUM-1, CD138, CD30, HLA-DR, i Ki 67 (Tabela 9). Nakon inkubacije antitelima, primenom streptavidin-biotinskog kompleksa je učinjena imunoreakcija uz vizuelizaciju pomoću sistema za vizualizaciju (DAKO Envision+System sa diaminobenzidin (DAB) hromogenom). U skladu sa propozicijama proizvođača za svako antitelo je korišćena pozitivna kontrola.

Tabela 9. Specifikacija antitela korišćenih u analizi.

Antitelo/antigen	Dilucija	Proizvođač
CD3	1:20	DAKO
CD5	1:50	DAKO
CD10	RTU*	Novocastra
CD20	1:20	DAKO
CD30	1:25	DAKO
CD79a	1:20	DAKO
CD138	1:25	DAKO
BCL6	1:10	DAKO
BCL2	1:25	DAKO
HLA-DR	1:10	DAKO
Ki-67	1:50	DAKO
MUM1/IRF4	1:25	DAKO
CD44s	1:50	DAKO
CD34	1:25	DAKO
FOXP1	1:100	Spring Bioscience

*RTU – engl. ready to use



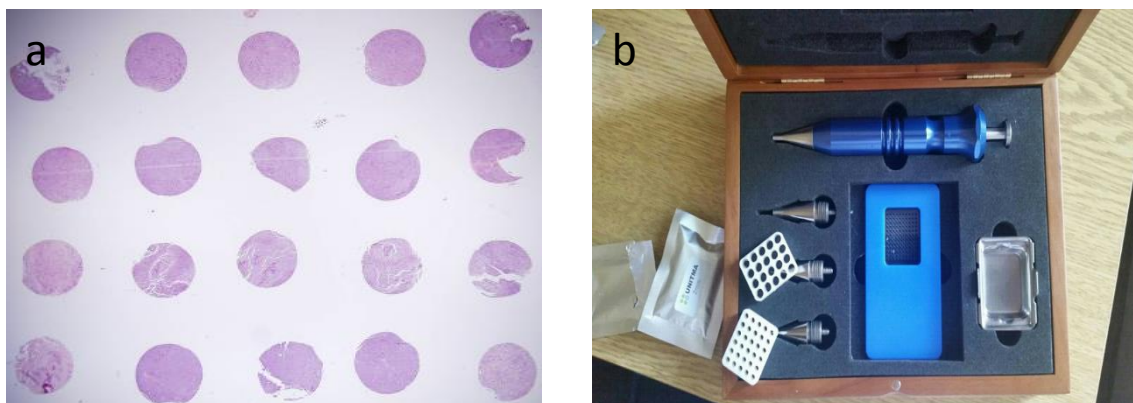
Procentualne vrednosti za markere korišćene za određivanje porekla tumorskih ćelija uključujući CD10 (30%), BCL6 (30%), MUM1/IRF4 (30%), FOXP1 (60%) su određivane na osnovu originalnih istraživanja^{51,56}. Limfomi u kojima je ekspresija BCL2 na tumorskim ćelijama verifikovna u više od 50% ćelija su smatrani pozitivnim. Proliferativni indeks određivan je kao procenat tumorskih ćelija koje su pokazivale pozitivnost na Ki-67 (MIB1) antitelo u vidu nuklearnog bojenja brojanjem na 10 različitih polja velikog mikroskopskog uveličanja (*HPF*, x 400). Anti CD34 antitelo je korišćeno za bojenje endotelnih ćelija krvnih sudova u tumorskom tkivu. MVD u DBKL je nakon prethodne obrade kvantifikovana u tri najvaskularizovanija mesta (engl. *hot spots*) koja su verifikovana na svetlosnom mikroskopu na x50 uveličanju, a potom je u svakom „hot spot” području brojano na većem uveličanju na definisanom području od 0,36mm² na x400 uveličanju broj krvnih sudova (mikroskop Leica 2500). Srednja vrednost broja krvnih sudova sa tri mesta je korišćena u daljoj analizi. S obzirom da je veći broj krvnih sudova verifikovan u interfolikularnom području u odnosu na intrafolikularno kod bolesnika sa FL, u daljoj analizi je računat broj u interfolikularnoj zoni tumora. Procena

pozitivnosti imunohistohemijske reakcije vršena je brojanjem pozitivnih tumorskih ćelija, na 10 polja velikog mikroskopskog uveličanja (HPF), izraženo u procentima.

Anti CD44s antitelo je korišćeno u proceni ekspresije adhezivnog molekula CD44s na stromalnim i tumorskim ćelijama. Na tumorskim ćelijama je membranska ekspresija do 10% smatrana kao negativna, 11-70% kao pozitivna, a visokopozitivna kada je bila preko 70% ¹²⁴. U pogledu FOXP1 ekspresije u skladu sa Visco-Youngovim algoritmom je nuklearna ekspresija u preko 60% ćelija određena kao pozitivna ⁵¹. Karakteristike korišćenih antitela su date u prethodno navedenoj Tabeli 9.

3.3. Konstrukcija tkivnog mikroniza (tissue microarray – TMA)

Konstrukcija tkivnog mikroniza – TMA je obuhvatila odabir najreprezentativnijih područja tumora za dalju obradu. U svakom pojedinačnom uzorku su tri cilindra dijametra 1-mm odabirana sa 0.6mm punkcionom iglom, umetana u novi parafinski blok zajedno sa kontrolama (TMA kalup), sa posledičnim postavljanjem serija do 20 cilindara. Potom su sa svakog TMA kalupa sečeni preseci debljine 3-5 μ m, i obrađivani na prethodno opisani način primenom imunohistohemijskih procedura (Slika 6a, b) ¹⁶⁰. Uzorci koji nisu bili reprezentativni za TMA analizu su obrađivani standardnom procedurom celih preseka.



Slika 6. Tkivni mikroniz (TMA) na x40 uveličanju, bojenjem H&E (a), aparatura za izradu TMA (b).

3.4. Gensko sekvencioniranje (*engl. next generation sequency – NGS*)

TruSeqAmplicon-arhivski panel za preparaciju i sekvenciranje gena

TruSeqAmplicon – Cancer Panel, TSACP (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) je panel tumorskih gena koji prepoznaje mutacione promene u 48 gena koji su povezani sa karcinomima (ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MLP, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53 i VHL). TSACP se sastoji od 212 amplikona obeleženih parovima oligonukleotida koji su dizajnirani da hibridizuju ciljane regione.

Obrađeni su uzorci od 19 bolesnika sa primarnim DBKL CNS iz FFPE tumorskog tkiva. Arhivska preparacija je sprovedena korišćenjem 250ng DNK prema propozicijama proizvođača. DNK je hibridizovana sa oligonukleotidima koji ciljaju regione od interesa, praćene ukljanjanjem nevezujućih oligonukleotida i koracima ekstenzije i ligacije. PCR (*engl. polymerase chain reaction*) amplifikacija je sprovedena korišćenjem specifičnih prajmera koje dodaju “index” sekvence za umnožavanje (i5 i i7) kao i standardne adaptore za grupisanje (P5 i P7). PCR produkti su prečišćeni upotrebom *AMPure XP* kapi. Podjednaki volumeni dobijenih arhiva su pripremljeni za postupno grupisanje i sekvencioniranje na MiSeq sistemu (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Upareni krajevi su sekvencionirani upotrebom *MiSeqReagent Kita V3* (600-obrti). Kvalitet sekvencioniranja je prikazan procentualno na bazama koje imaju Q30 skor od 97.2% (1 greška/1 000 baza).

U daljem postupku je sprovedena bioinformatička analiza kojom su FASTQ fajlovi, napravljeni tokom arhivskog sekvencioniranja, obrađeni u četiri koraka uključujući prvo bazičnu kontrolu i skraćivanje, drugo poravnavanje i pred-procesiranje, treće dodatnu kontrolu kvaliteta i na kraju filtraciju. Prvi korak se sastoji od bazične kontrole sa FastQC i skraćivanja baza lošijeg kvaliteta (kvalitet<20) na krajevima, uz pomoć FastqMcf. Poravnanje prema referentnom genomu GRCh37 uz upotrebu BWA-MEM (softverkog paketa za mapiranje nisko-divergentnih sekvenci nasuprot velikog referentnog genoma) formirajući BAM fajlove. Dodatna kontrola kvaliteta je sprovedena

prema uputsvu proizvođača korišćenjem prodajnih skripti (SBG). Skripte uračunavaju čitajuće sekvence u svakom amplikonu i identifikuju amplikon sa niskom-čitajućom sekvencom u svim uzorcima. Poslednji korak je sproveden upotrebom *GATK Unified Genotyper* i *Variant Filtration* instrumenata. Unified Genotyper stvara VCF fajlove koji sadrže pojedinačne varijante nukleotida (SNVs) i indel varijante u relaciji sa GRCh37 referentnim genomom. Kao završni korak Variant Filtration instrument je korišćen za filtriranje varijanti lošeg kvaliteta iz VCF fajla ¹⁶¹⁻¹⁶³.

Potom je korišćena obrada pomoću R programa i paketa *Variant Annotation*, *BSgenome.Hsapiens.UCSC.hg19*, *TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene*, *biomaRt* i *SNP locs.Hsapiens.dbSNP.20120608* ^{164,165}. Rezultat analize je bio izveštaj koji sumira sve amplikone uključujući dubinu sekvence i prisutne mutacije na DNK i proteinskom nivou kao i dbSNP identifikator. *Integrated Genomics Viewer* je korišćen za vizuelnu evaluaciju podataka ¹⁶⁶.

3.5. Statistička obrada

Metode deskriptivne statistike su korišćene u cilju opisivanja karakteristika analizirane grupe (mere centralne tendencije i mere varijabiliteta). Fišerov i χ^2 su korišćeni za analiziranje kategorijskih varijabli. ROC (engl. *Receiver Operating Characteristic*) kriva je korišćena za određivanje cut-off vrednosti za MVD za DBKL, dok je medijana broja krvnih sudova u interfolikularnoj zoni korišćena kao cut-off vrednost za FL. Presečne tačke za ALC, AMC i ALC/AMC su odabrane u skladu sa ranije objavljenim radovima uključujući za DBKL vrednosti od $1.1 \times 10^9/l$, $0.62 \times 10^9/l$ i 2.6, kao i za FL $1.1 \times 10^9/l$, $0.32 \times 10^9/l$ i 4.7 ^{98,167}. Spirmanov koeficijent ranga i Kendallov τ koeficijent su korišćeni za procenu korelacije između MVD i ekspresije CD44s sa kliničkim parametrima (klinički stadijum, prognostički skorovi, bulky bolest, zahvaćenost kostne srži, performans status, terapijski odgovor, relaps bolesti) i imunohistohemijskim parametrima (CD10, BCL2, BCL6, MUM1, FOXP1, ćelijsko poreklo prema Hansovom i Visco-Young ovom algoritmu, histološki gradus FL i transformacija FL u DBKL). Mann-Vitni test i Kruskal Volis test su korišćeni za poredenje MVD i ekspresije CD44s između različitih tipova limfoma. Logistička regresiona analiza je korišćena u cilju procene varijable koja najviše doprinosi postizanju povoljnog terapijskog odgovora kod DBKL. Analiza preživljavanja je sprovedena

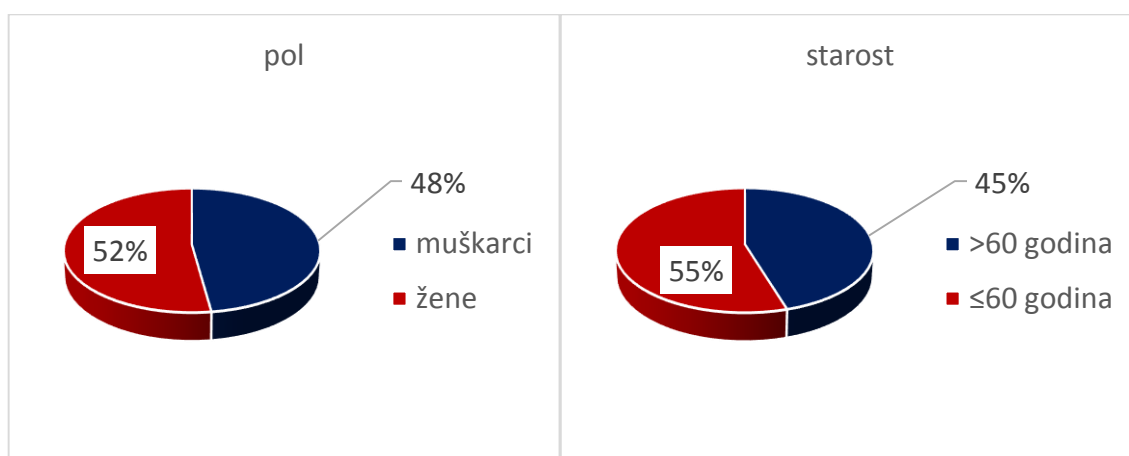
korišćenjem Kaplan-Mejerove analize uz Log Rank test za poređenje preživljavanja između ispitivanih grupa. Multivarijantna Cox regresiona analiza je korišćena za određivanje najprediktivnijeg parametra koji utiče na preživljavanje. P vrednost ≤ 0.05 je razmatrana kao značajna.

Sve sprovedene kliničko-patološke analize su urađene u SPSS programu, verzija 21.0. Za bioinformatičku analizu uzoraka bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a korišćen je R program uz primenu verzija 1.3.19; 1.4.12; 2.8.0 i odgovarajućih paketa.

4. REZULTATI:

4.1. Epidemiološke i kliničke karakteristike

Od 115 ispitivanih bolesnika sa DBKL, 55 (47.8%) su činili muškarci, a 60 (52.2%) žene sa medijanom starosti od 59 godina (opseg od 21 do 80 godina). Ispitivanu grupu je činilo 52 bolesnika (45.2%) starijih od 60 godina (Grafikon 2).



Grafikon 2. Distribucija bolesnika sa DBKL prema polu i starosnoj dobi.

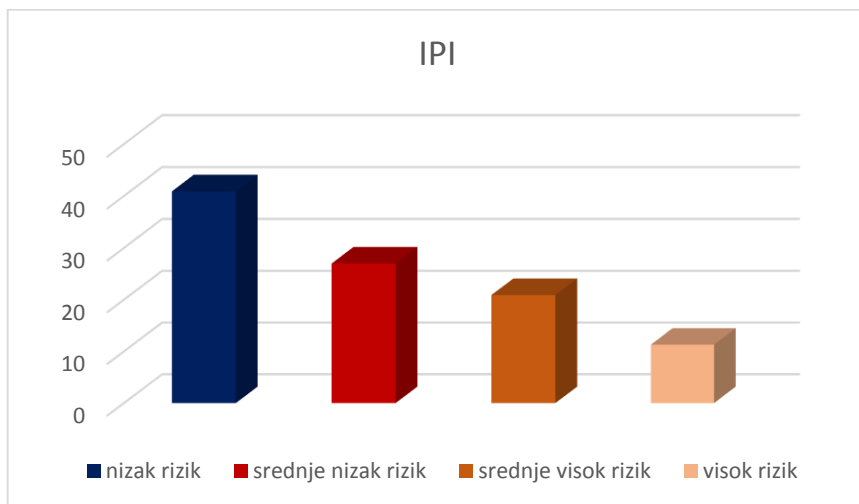
Prisustvo B simptoma je registrovano kod 82 bolesnika (71.3%) a bulky bolesti kod 22 (19.1%). Većina bolesnika 81 (70.5%) je bila u dobrom performans statusu, dok je ECOG PS ≥ 2 imalo 34 bolesnika (29.5%). Visok komorbiditetni indeks (CCI ≥ 2) je imalo 9 bolesnika (7.8%). Distribucija bolesnika prema Ann Arbor kliničkom stadijumu

je bila sledeća: u I stadijumu je bilo dijagnostikovano 12 bolesnika (10.4%), u II 44 (38.3%), u III 19 (16.5%) i u IV 40 (34.8%). Infiltracija kostne srži je verifikovana kod 25 bolesnika (21.7%) (Tabela 10).

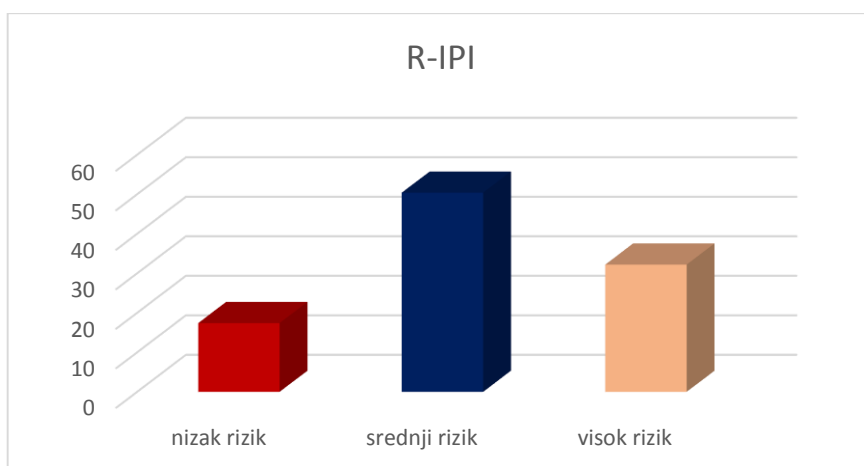
Tabela 10. Kliničke karakteristike bolesnika sa DBKL.

Kliničke karakteristike	DBKL N (%)
Godine starosti (medijana)	59 (opseg 21 do 81)
Prisustvo B simptoma	82 (71.3)
Prisustvo bulky bolesti	22 (19.1)
ECOG PS\geq2	34 (29.5)
CCI\geq2	9 (7.8)
Ann Arbor stadijum	
I	12 (10.4)
II	44 (38.3)
III	19 (16.5)
IV	40 (34.8)
Infiltracija kostne srži	25 (21.7)
Relaps bolesti	25 (22.7)
Vitalni status	
živ	72 (62.6)
mrtav	43 (37.4)

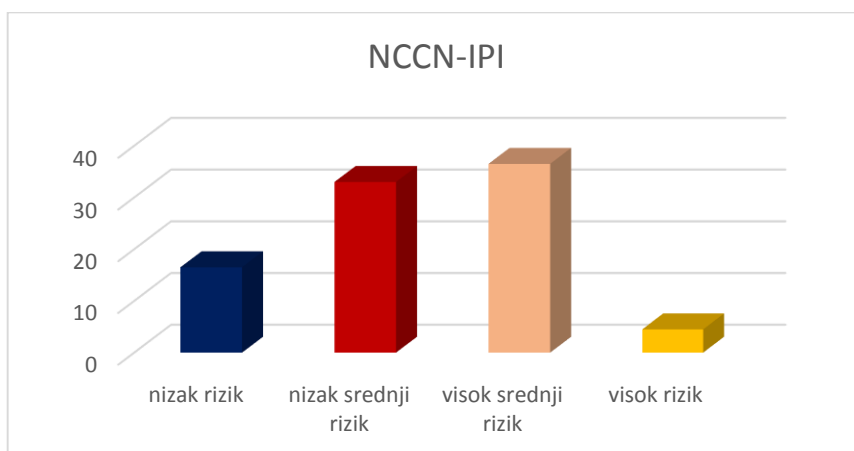
U odnosu na IPI distribucija je bila sledeća: nizak skor je imalo 47 bolesnika (40.9%), nizak srednji 31 (27.0%), visok srednji 24 (20.9%) i visok 13 (11.3%) (Grafikon 3). Nizak R-IPI je imalo 20 bolesnika (17.4%), srednji 58 (50.4%) i visok 37 (32.2%) (Grafikon 4). U odnosu na NCCN-IPI distribucija je bila: nizak rizik je imalo 19 bolesnika (16.5%), nizak srednji 38 (33%), visok srednji 42 (36.5%) i visok 13 (11.3%) (Grafikon 5). Recidiv bolesti je verifikovan kod 25/115 bolesnika (22.7%), a u trenutku završetka studije 72 bolesnika sa DBKL je bilo živo (62.6%) (Tabela 10).



Grafikon 3. Distribucija bolesnika sa DBKL u odnosu na IPI



Grafikon 4. Distribucija bolesnika sa DBKL u odnosu na R-IPI.

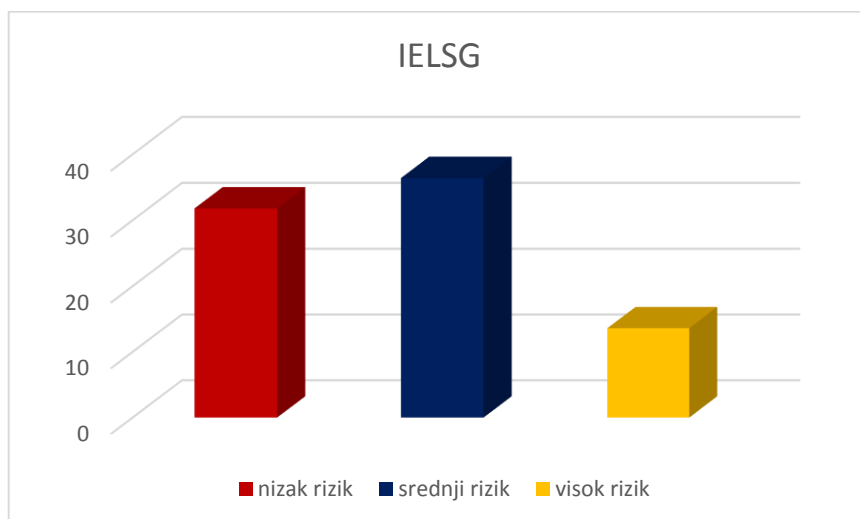


Grafikon 5. Distribucija bolesnika sa DBKL u odnosu na NCCN-IPI.

Od 22 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a, 7 su bili muškarci (31.8%), a 15 žene (68.2%). Medijana starosti ispitivane grupe sa DBKL CNS je bila 53.5 godina (opseg od 29 do 69 godina). Ispitivanu grupu je činilo 6 bolesnika (27.3%) starijih od 60 godina. Prisustvo B simptoma je registrovano kod 3 bolesnika (13.6%). Najveći broj bolesnika na prezentaciji je imao slabost ekstremiteta 13 (59%), mučninu i/ili povraćanje 10 (45.4%), glavobolju 8 (36.4%), otežan govor 8 (36.4%), kognitivnu izmenjenost 5 (22.7%), diplopije 2 (9.1%). Većina bolesnika 17 (77.3%) je bila u lošem performans statusu, a samo jedan bolesnik (4.5%) je imao visok komorbiditetni indeks ($CC \geq 2$) (Tabela 11). Zahvaćenost dubokih moždanih struktura (periventrikularna zona, bazalne ganglije, moždano stablo, cerebelum) je bila prisutna kod 8 bolesnika (36.4%). Prisustvo samo jedne tumorske lezije (engl. *single lesion*) je verifikovano kod 12 bolesnika (54.5%). U odnosu na IELSG skor distribucija je bila sledeća: nizak skor je imalo 7 bolesnika (31.8%), srednji 8 (36.4%), i visok 3 (13.6%) (Grafikon 6). Recidiv bolesti je verifikovan kod 9 bolesnika (40.9%). U trenutku završetka studije 14 bolesnika (63.6%) je bilo živo (62.6%).

Tabela 11. Kliničke karakteristike bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a.

Kliničke karakteristike	Primarni DBKL CNS N (%)
Godine starosti (medijana)	53.5 (29-69).
Pol (muški/ženski)	7/15 (31.8/68.2)
Prisustvo B simptoma	3 (13.6)
ECOG PS\geq2	17 (77.3)
CCI\geq2	1 (4.5)
Duboke moždane strukture	
ne	14 (63.6)
da	8 (36.4)
Single tumorska lezija	12 (54.5)
Relaps bolesti	9 (40.9%)
Vitalni status	
živ	14 (63.6)
mrtav	8 (36.4)



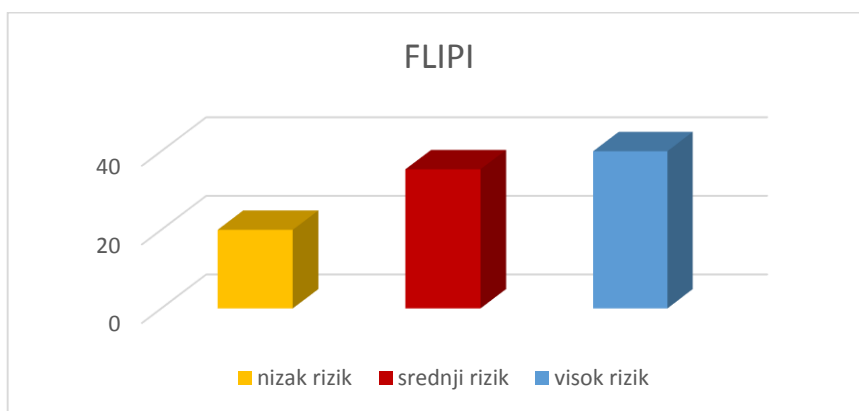
Grafikon 6. Distribucija bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a u odnosu na IELSG skor.

Od 65 bolesnika sa FL 33 su bili muškarci (50.8%), a 32 žene (49.2%). Medijana starosti je bila 54 godine (opseg od 32 do 82 godina). Ispitivanu grupu je činilo 6 bolesnika (27.3%) starijih od 60 godina. Prisustvo B simptoma je registrovano kod 47 bolesnika (72.3%). Prisustvo "bulky" bolesti je verifikovano kod 21 bolesnika (32.3%). Većina ispitanika 49 (75.4%) je bila u dobrom opštem stanju na prezentaciji, a četiri bolesnika (6.2%) su imala visok komorbiditetni indeks ($CC \geq 2$).

Distribucija bolesnika prema Ann Arbor kliničkom stadijumu je bila sledeća: u I stadijumu je bio dijagnostikovao 1 bolesnik (1.5%), u II 4 (6.2%), u III 12 (18.5%), u IV 44 (67.7%), dok je leukemijsku fazu bolesti tj. V klinički stadijum imalo 4 bolesnika (6.2%). Infiltracija kostne srži je verifikovana kod 48 bolesnika (73.8%) (Tabela 12). U odnosu na FLIPI distribucija je bila sledeća: nizak skor je imalo 13 bolesnika (20.0%), srednji 23 (35.4%) i visok 26 (40.0%). Recidiv bolesti je verifikovan kod 27 bolesnika (41.5%), a transformacija u DBKL kod 8 (13.3%) bolesnika. U trenutku završetka studije 48 bolesnika (73.8%) je bilo živo (Grafikon 7).

Tabela 12. Kliničke karakteristike bolesnika sa FL.

Kliničke karakteristike	FL N (%)
Godine starosti (medijana)	54 (opseg 32-82)
Pol (muškarci/žene)	33 (50.8/49.2)
Prisustvo B simptoma	47 (72.3)
Prisustvo bulky bolesti	21 (32.3)
ECOG PS \geq 2	16 (24.6)
CCI \geq 2	4 (6.2)
Ann Arbor stadijum	
I	1 (1.5)
II	4 (6.2)
III	12 (18.5)
IV	44 (67.7)
V	4 (6.2)
Infiltracija kostne srži	48 (73.8)
Transformacija FL u DBKL	8 (12.3)
Relaps bolesti	27 (41.5)
Vitalni status	
živ	48 (73.8)
mrtav	17 (26.2)



Grafikon 7. Distribucija bolesnika sa FL u odnosu na FLIPI.

4.2. Laboratorijski testovi

Učestalost ALC, AMC i ALC/AMC u odnosu na analizirane podtipove limfoma je dat u Tabeli 13 za bolesnike sa DBKL i primarnim DBKL CNS-a, a u Tabeli 14 za bolesnike sa FL. Od 115 bolesnika sa DBKL, 78 bolesnika (67.8%) je imalo ALC $>$ 1.1x10⁹/l, 56 (48.7%) AMC $<$ 0.62x10⁹/l i 63 (54.8%) ALC/AMC $>$ 2.6. Ukupno 31

bolesnik (27.0%) je imao $ALC \leq 1.1 \times 10^9/l$, 52 (45.2%) $AMC \geq 0.62 \times 10^9/l$ i 45 (39.1%) $ALC/AMC \leq 2.6$.

U grupi 22 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a, 14 (63.6%) je imalo $ALC > 1.1 \times 10^9/l$, 8 (36.4%) $AMC < 0.62 \times 10^9/l$ i 10 (45.5%) $ALC/AMC > 2.6$ dok su četiri bolesnika (18.2%) imala $ALC \leq 1.1 \times 10^9/l$, 10 (45.5%) $AMC \geq 0.62 \times 10^9/l$, i 8 (36.4%) $ALC/AMC \leq 2.6$.

Deset od 65 bolesnika (15.4%) sa FL je imalo $ALC < 1.1 \times 10^9/l$, 51 (78.5%) $AMC \geq 0.32 \times 10^9/l$, i 33 (50.8%) $ALC/AMC < 4.7$ dok je 51 bolesnik (78.5%) imao $ALC \geq 1.1 \times 10^9/l$, 10 (15.4%) $AMC < 0.32 \times 10^9/l$ i 28 (43.1%) $ALC/AMC \geq 4.7$.

Tabela 13. Distribucija učestalosti ALC, AMC i ALC/AMC kod bolesnika sa DBKL i primarnim DBKL CNS.

	DBKL N (%)	Primarni DBKL CNS N (%)
$ALC > 1.1 \times 10^9/l$	78 (67.8)	14 (63.6)
$ALC \leq 1.1 \times 10^9/l$	52 (45.2)	4 (18.2)
$AMC < 0.62 \times 10^9/l$	56 (48.7)	8 (36.4)
$AMC \geq 0.62 \times 10^9/l$	52 (45.2)	10 (45.5)
$ALC/AMC > 2.6$	63 (45)	10 (45.5)
$ALC/AMC \leq 2.6$	45 (39.1)	8 (36.4)

Tabela 14. Distribucija učestalosti ALC, AMC i ALC/AMC kod bolesnika sa FL.

	FL N (%)
$ALC \geq 1.1 \times 10^9/l$	10 (15.4)
$ALC < 1.1 \times 10^9/l$	51 (78.5)
$AMC < 0.32 \times 10^9/l$	10 (15.4)
$AMC \geq 0.32 \times 10^9/l$	51 (78.5)
$ALC/AMC \geq 4.7$	28 (43.1)
$ALC/AMC < 4.7$	33 (50.8)

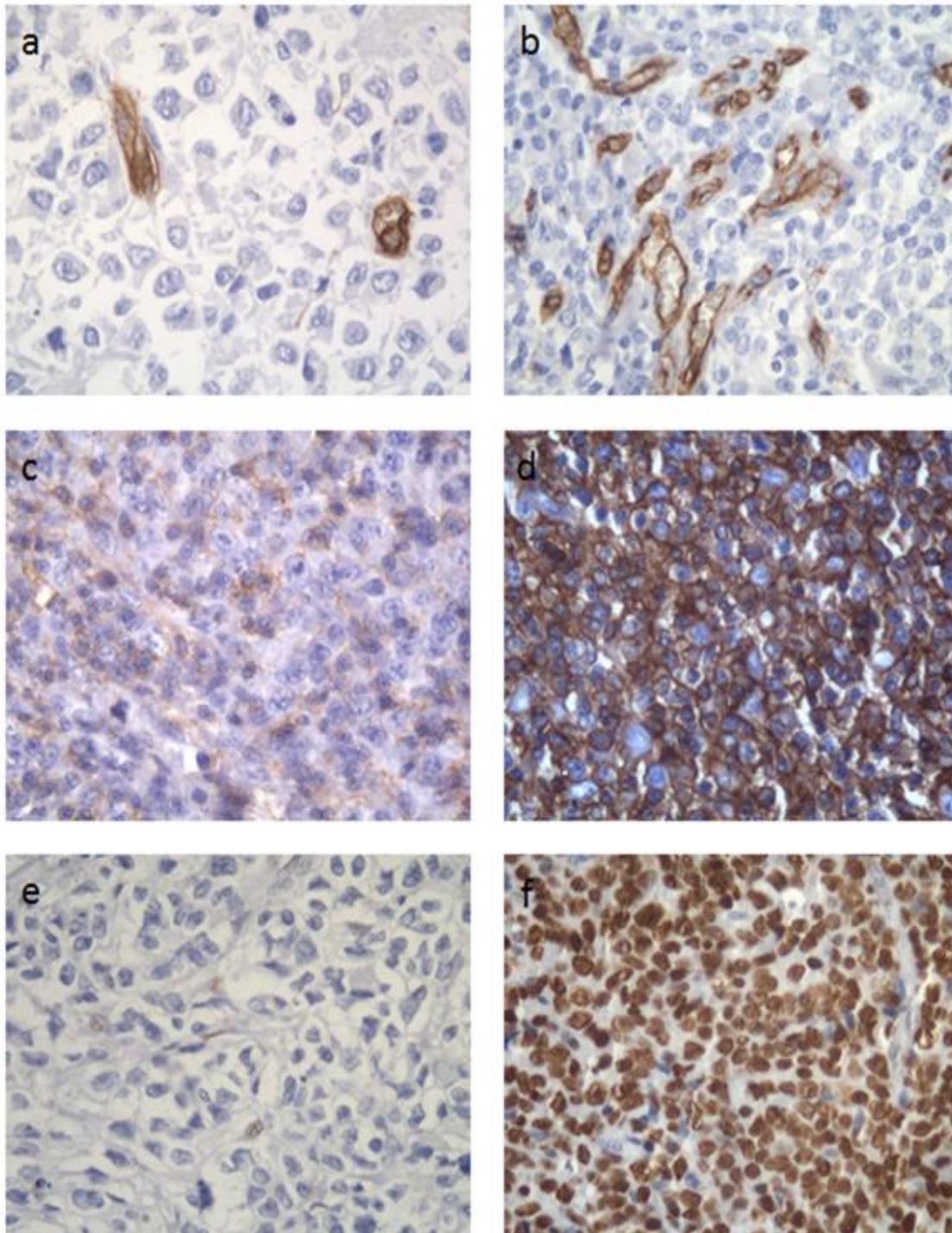
4.3. Imunohistohemijski markeri

Ekspresija pojedinih imunohistohemijskih markera u odnosu na tip limfoma je sumirana u tabeli 15. U grupi DBKL pozitivna ekspresija CD10 je verifikovana kod 30 bolesnika (27.5%), dok 79 (72.5%) nije imalo ekspresiju CD10. Pozitivna ekspresija BCL2 je verifikovana kod 62 bolesnika (63.3%), a BCL6 kod 46 (47.4%). MUM1 visoka

pozitivnost je bila prisutna kod 56 bolesnika (48.7%), FOXP1 \geq 60% kod 63 (55.3%) i FOXP1 \geq 80% kod 31 bolesnika (27.0%). Proliferativna aktivnost ćelija merena ekspresijom Ki-67 se kretala u opsegu od 30% do 90% sa prosečnom vrednošću od 66.33% \pm 17.31% i medijanom od 70%. Prosečan broj krvnih sudova u tumorskom tkivu na definisanom području od 0,36mm² na x 400 uvećanju je bio 39.15 \pm 21.6 sa medijanom od 33. Očekivano, s obzirom na morfološku građu DBKL, ekspresija CD44s je verifikovana u niskom procentu (do 10%) u stromalnim ćelijama, dok je ekspresija na tumorskim ćelijama bila varijabilna (opseg od 0 do 100%) sa prosečnom vrednošću od 66.47 \pm 30.8 i medijanom od 70%. Negativna CD44s ekspresija na tumorskim ćelijama je verifikovana kod 8 bolesnika (7.9%), srednja kod 48 (42.5%) i visoka kod 56 (49.5%). Na slici je prikazano imunohistohemijsko bojenje upotrebom anti CD34 antitela, CD44s i FOXP1 na tumorskom tkivu bolesnika sa DBKL uz poređenje niske MVD vs. visoke MVD, niske ekspresije CD44s vs. visoke ekspresije CD44s na tumorskim ćelijama i niske ekspresije FOXP1 vs. visoke ekspresije FOXP1 na tumorskim ćelijama (Slika 7).

Tabela 15. Ekspresija imunohistohemijskih markera u odnosu na tip limfoma.

Ekspresija imunohistohemijskih markera (N)	DBKL N (%)	Primarni DBKL CNS N (%)	FL N (%)
CD10\geq30%	30 (27.5)	4 (19.0)	47 (72.3)
CD10<30%	79 (72.5)	17 (80.1)	18 (27.7)
Ukupno	109	21	65
BCL2\geq50%	62 (63.3)	10 (58.8)	60 (92.3)
BCL2<50%	36 (36.7)	7 (41.2)	5 (7.7)
Ukupno	98	17	65
BCL6\geq30%	46 (47.4)	7 (35.0)	20 (37.7)
BCL6<30%	51 (52.6)	13 (65.0)	33 (62.3)
Ukupno	97	20	53
MUM\geq80%	58 (59.8)	12 (70.6)	5 (9.2)
MUM<80%	39 (40.2)	5 (29.4)	49 (90.8)
Ukupno	97	17	54
FOXP1\geq60%	63 (55.2)	9 (45.0)	43 (68.2)
FOXP1<60%	51 (44.8)	11 (55.0)	20 (31.8)
Ukupno	114	20	63
CD44s\leq10%	8 (7.9)	5 (25)	11 (16.9)
CD44s 11-70%	48 (42.5)	3 (13.6)	29 (45.3)
CD44s>70%	56 (49.5)	12 (60)	25 (39.1)
Ukupno	113	20	64

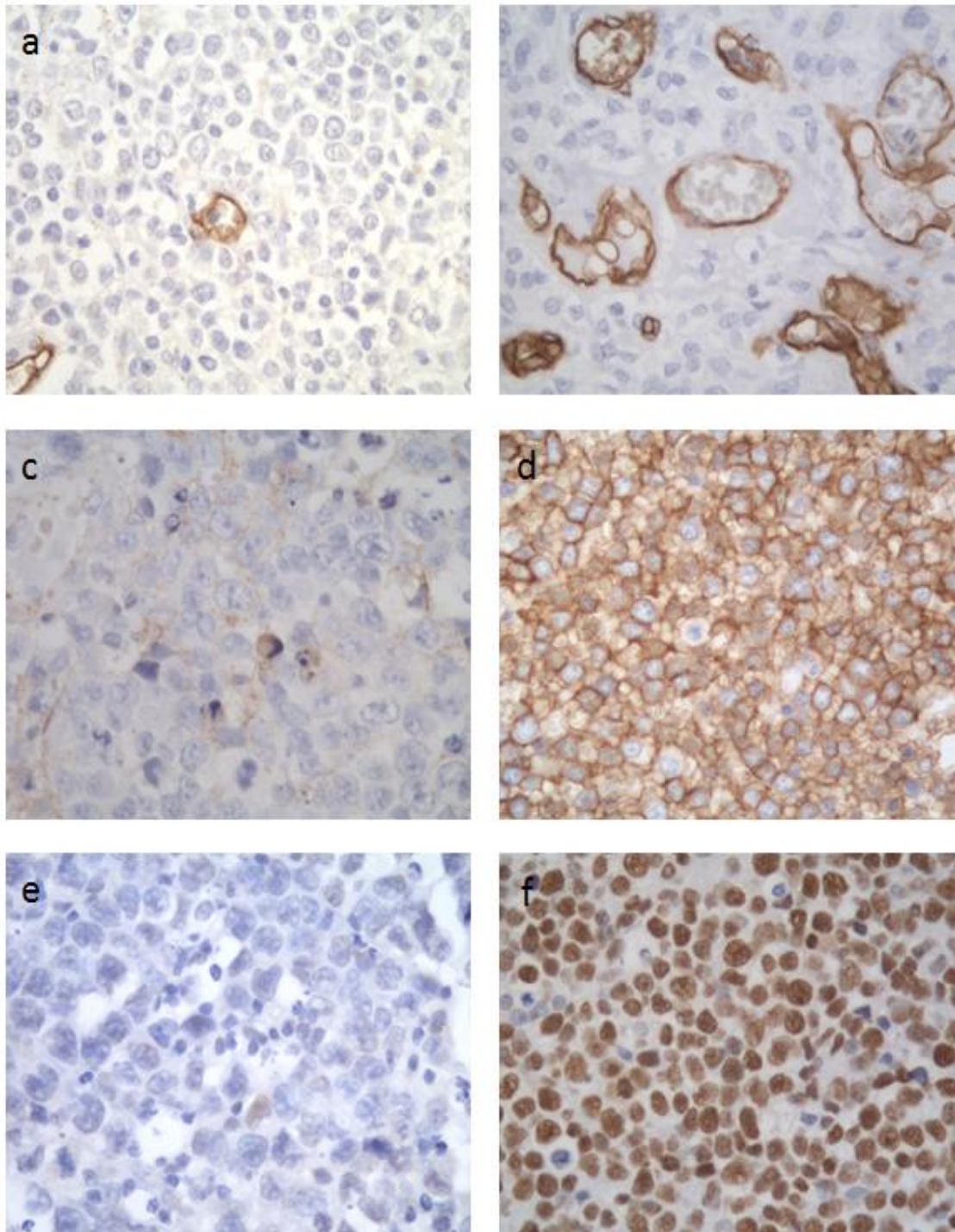


Slika 7. DBKL sa niskom MVD obeleženom pomoću anti CD34 antitela, uveličanje x 400 (a), visokom MVD, uveličanje x 400 (b) niskom ekspresijom CD44s na tumorskim ćelijama, uveličanje x 400 (c) visokom ekspresijom CD44s, uveličanje x 400 (d) niskom FOXP1 ekspresijom na tumorskim ćelijama, uveličanje x 400 (e) i visokom FOXP1 ekspresijom, uveličanje x 400 (f).

U grupi bolesnika sa primarnim DBKL CNS pozitivna ekspresija CD10 je verifikovana kod 4 bolesnika (19%), dok 17 bolesnika (80.1%) nije imalo ekspresiju CD10. Pozitivna ekspresija BCL2 je verifikovana kod 10 bolesnika (58.8%), a BCL6 kod 7 (35.0%). MUM1 visoka pozitivnost je verifikovana kod 12 bolesnika (70.6%), FOXP1 \geq 60% kod 11 (55.0%), a FOXP1 \geq 80% 7 bolesnika (31.8%). Proliferativna aktivnost ćelija merena ekspresijom Ki-67 se kretala u opsegu od 40 do 95% sa prosečnom vrednošću od 73.16 \pm 16.0 i medijanom od 80%.

Prosečan broj krvnih sudova u tumorskom tkivu određivan pomoću anti CD34 antitela je bio 37.35 \pm 31.0/HPF sa medijanom od 26.5. Ekspresija CD44s na tumorskim ćelijama bila varijablna (opseg od 0 do 100%) sa prosečnom vrednošću od 62.20 \pm 43.7 i medijanom od 85.0%. Negativna CD44s ekspresija na tumorskim ćelijama je verifikovana kod 5 bolesnika (20.0%), srednja kod 3 (13.6%) i visoka kod 12 (60.0%). Ekspresija u stromalnim ćelijama je bila do 10%.

Na slici je prikazano imunohistohemijsko bojenje upotrebom anti CD34 antitela, CD44s i FOXP1 na tkivu bolesnika sa primarnim DBKL CNS uz poređenje niske MVD vs. visoke MVD, niske ekspresije CD44s vs. visoke ekspresije CD44s na tumorskim ćelijama i niske ekspresije FOXP1 vs. visoke ekspresije FOXP1 na tumorskim ćelijama (Slika 8).

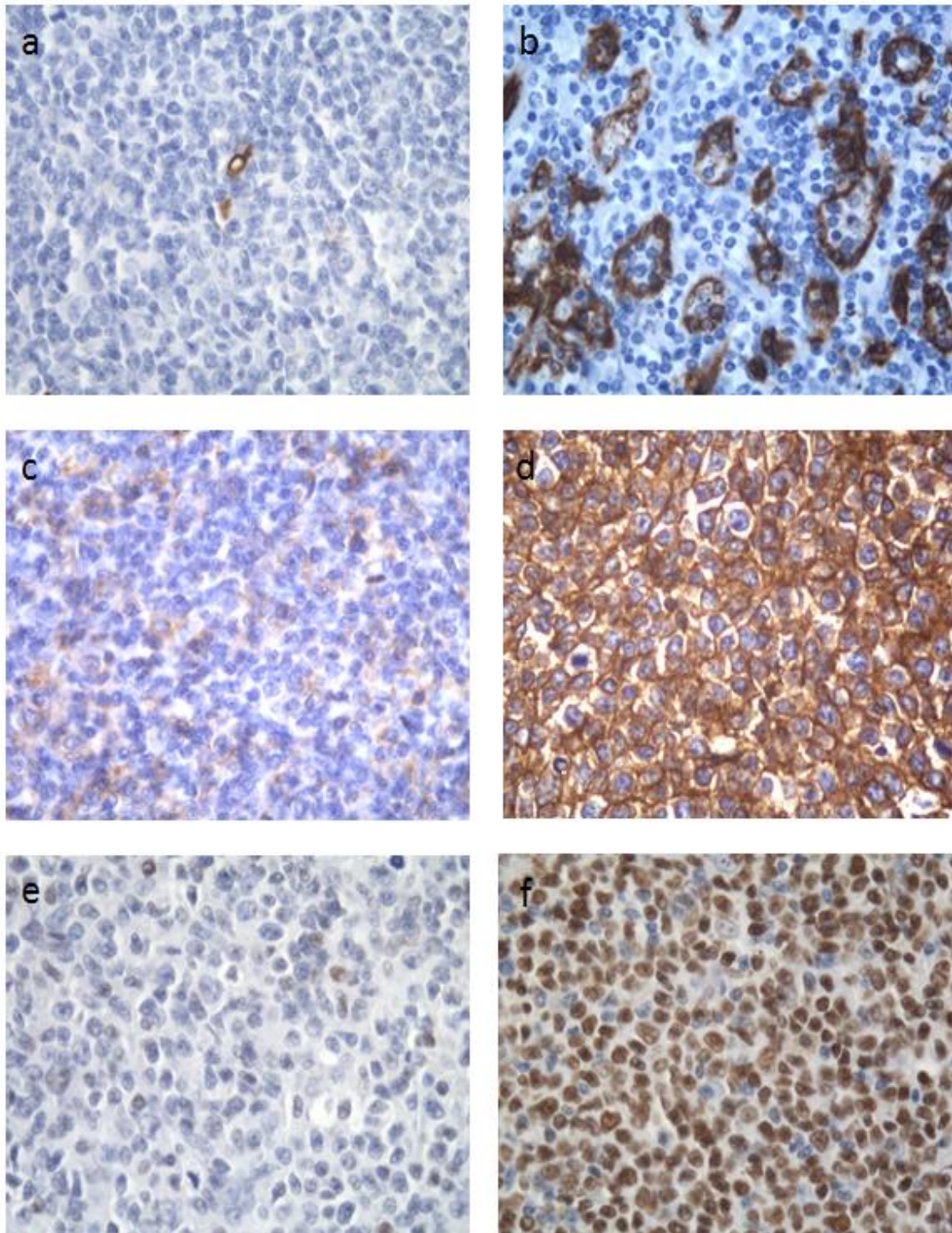


Slika 8. Primarni DBKL CNS sa niskom MVD obeleženom pomoću anti CD34 antitela, uveličanje x 400) (a), visokom MVD, uveličanje x 400 (b) niskom ekspresijom CD44s na tumorskim ćelijama, uveličanje x 400 (c) visokom ekspresijom CD44s, uveličanje x 400 (d) niskom FOXP1 ekspresijom na tumorskim ćelijama, uveličanje x 400) (e) i visokom FOXP1 ekspresijom, uveličanje x 400 (f).

U pogledu morfologije, gradus 1 i 2 limfoma je imalo 45 bolesnika (69.2%), dok je 20 (30.8%) imalo FL gradusa 3. Od 65 bolesnika, 18 (27.7%) je imalo pozitivnu ekspresiju CD10, dok 47 bolesnika (72.3%) nije imalo ekspresiju CD10. Pozitivna ekspresija BCL2 je verifikovana u većini slučajeva (92.3%). U odnosu na BCL6 i MUM1 ekspresiju, 20 bolesnika je imalo pozitivnu ekspresiju (37.7%) BCL6 i 5 (9.2%) visoku MUM1 ekspresiju na tumorskim ćelijama. FOXP1 \geq 60% ekspresija je verifikovana kod 43 (68.2%). Proliferativna aktivnost ćelija merena ekspresijom Ki-67 se kretala u opsegu od 10 do 50% sa prosečnom vrednošću od 24.41 \pm 10.38 i medijanom od 20%.

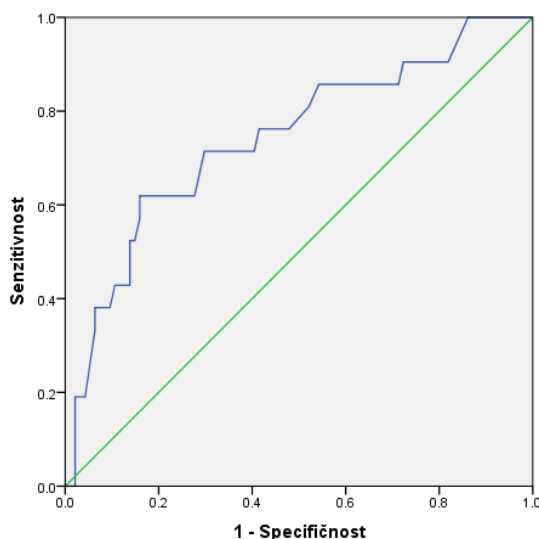
Prosečan broj krvnih sudova u interfolikularnoj zoni tumora određivan pomoću anti CD34 antitela na definisanom području od 0,36mm² je bio 49.09 \pm 21.43 sa medijanom od 45. Ekspresija CD44s na tumorskim ćelijama se kretala od 0-100% sa prosečnom vrednošću od 49.53 \pm 35.0 i medijanom od 30%. Negativna CD44s ekspresija na tumorskim ćelijama je verifikovana kod 11 bolesnika (16.9%), srednja kod 29 (45.3%) i visoka kod 25 (39.1%). Ekspresija adhezivnog molekula CD44 na stromalnim ćelijama je bila izrazito visoka (\geq 90%).

Na slici je prikazano imunohistohemijsko bojenje upotrebom anti CD34 antitela, CD44s i FOXP1 na tkivu bolesnika sa FL uz poređenje niske MVD vs. visoke MVD, niske ekspresije CD44s vs. visoke ekspresije CD44s na tumorskim ćelijama i niske ekspresije FOXP1 vs. visoke ekspresije FOXP1 na tumorskim ćelijama (Slika 9).



Slika 9. FL sa niskom MVD obeleženom pomoću anti CD34 antitela, uveličanje x 400) (a), visokom MVD, uveličanje x 400 (b) niskom ekspresijom CD44s na tumorskim ćelijama, uveličanje x 400 (c) visokom ekspresijom CD44s, uveličanje x 400 (d) niskom FOXP1 ekspresijom na tumorskim ćelijama, uveličanje x 400) (e) i visokom FOXP1 ekspresijom, uveličanje x 400 (f).

U odnosu na MVD uočena je značajna razlika između analiziranih tipova limfoma ($p=0.001$) sa najvišom učenom u interfolikularnom području FL, potom u ekstranodalnom, nodalnom DBKL i najmanjom u primarnim DBKL CNS-a sa medijanom broja krvnih sudova na $0.36\text{mm}^2/\text{HPF}$ od 45, 37, 32 i 26.5. Poređenjem MVD između nodalnog, ekstranodalnog DBKL i primarnog DBKL CNS-a nije uočena statistički značajna razlika ($p=0.27$). Najznačajnija presečna tačka za MVD određena ROC analizom za bolesnike sa DBKL je bila 43 krvna suda/HPF (senzitivnost 71.4%, specifičnost 70.2%) sa vrednošću ispod krive (engl. *Area under the curve* – *AUC*) od 0.742 (95% CI 0.618-0.866, $p=0.01$) (Grafikon 8).



Grafikon 8. ROC analiza za određivanje presečne tačke za gustinu krvnih sudova u tumorskom tkivu kod bolesnika sa DBKL.

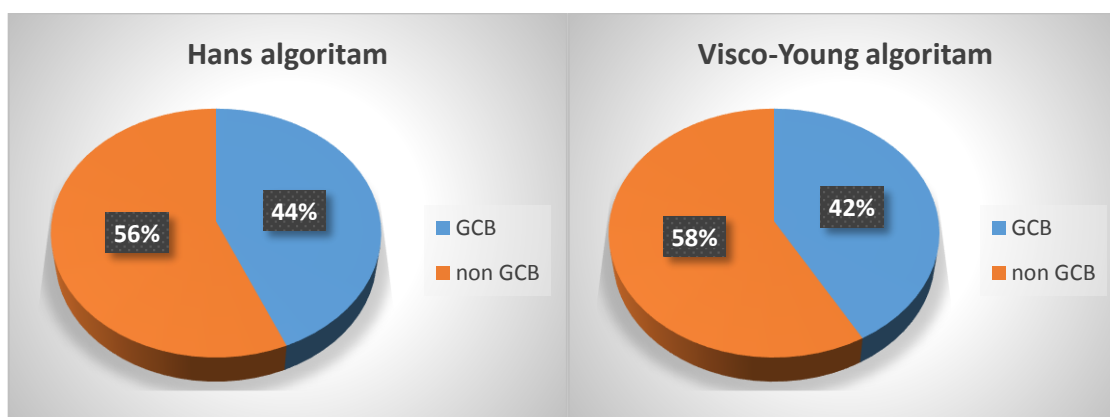
Visok stepen vaskularizacije (>43 krvna suda/HPF) je imalo 44 DBKL bolesnika (38.3%) i 6 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a (27.0%). Medijana broja krvnih sudova interfolikularne zone (Med=45 krvna suda/HPF) je uzeta kao presečna tačka za FL i u odnosu na nju povišen broj krvnih sudova je verifikovan kod 39 bolesnika (60.0%).

U odnosu na CD44s ekspresiju u tumorskim ćelijama limfoma uočena je razlika između analiziranih grupa sa najnižom medijanom CD44s ekspresije u FL, srednjom u

nodalnim i ekstranodalnim DBKL i najviša u primarnom DBKL CNS-a (30%, 65%, 80% i 85%) ($p=0.021$).

4.4. Subklasifikacija DBKL na bazi ćelijskog porekla (GCB vs. non-GCB)

Prema Hans algoritmu 48 bolesnika (43.6%) je imalo GCB podtip dok je 62 (56.4%) imalo non-GCB podtip. U pogledu ćelijskog porekla prema Visco-Young-ovom algoritmu, 46 bolesnika (41.8%) je imalo GCB podtip dok je 64 (58.2%) imalo non-GCB podtip (Grafikon 9). Mera slaganja kappa je pokazala visoku podudarnost analiziranih algoritama (proporcija slaganja 0.876) sa senzitivnošću od 91.7% i specifičnošću od 82.2% (0.745, 95% CI, 0.62- 0.87, $p<0.0001$).



Grafikon 9. Distribucija bolesnika sa DBKL u odnosu na poreklo ćelije prema Hansovom i Visco-Youngovom algoritmu.

4.5. Analiza korelacije kliničkih i imunohistohemijskih parametara

Bolesnici sa DBKL dijagnostikovani u uznapredovaloj fazi bolesti su imali lošiji ECOG PS (Kendall $\tau=0.305$, $p=0.0001$), i visok rizik prema IPI-ju (Kendall $\tau=0.532$, $p=0.0001$), R-IPI-ju (Kendall $\tau=0.547$, $p=0.0001$) i NCCN-IPI-ju (Kendall $\tau=0.430$, $p=0.0001$). Pacijenti sa lošijim performans statusom (ECOG PS \geq 2) su imali značajno češće prisustvo B simptoma (Kendall $\tau=0.360$, $p=0.0001$) i nizak ALC/AMC (Kendall $\tau=0.322$, $p<0.0001$). Kod bolesnika sa DBKL uočena je granična korelacija visoke

ekspresije CD44s u tumorskim ćelijama sa visokom ekspresijom MUM1 (Kendall $\tau=0.288$, $p=0.007$). Povišena gustina vaskularizacije je korelirala sa non-GCB podtipom (Kendall $\tau=0.272$, $p=0.004$) prema Visco-Young algoritmu dok prema Hansovom algoritmu nije bilo statističke značajnosti (Kendall $\tau=0.201$, $p=0.036$). Terapijski odgovor je bio u korelaciji sa pojavom recidiva (Kendall $\tau=0.281$, $p=0.003$).

Kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a nije uočena značajna statistička korelacija između analiziranih kliničkih i imunohistohemijskih parametara.

Među analiziranim imunohistohemijskim parametrima kod bolesnika sa FL uočena je korelacija visoke ekspresije CD44s u tumorskim ćelijama sa $AMC \geq 0.32 \times 10^9/l$ (Kendall $\tau=0.313$, $p=0.015$) visokom ekspresijom $MUM1 \geq 80\%$ (Kendall $\tau=0.300$, $p=0.028$) i višim proliferativnim indeksom Ki-67 (Spearman $\rho=0.317$, $p=0.014$). Vrednost $ALC/AMC < 4.7$ je bila u graničnoj korelaciji sa prisustvom bulky tumorske mase (Kendall $\tau=0.264$, $p=0.041$). Viši stepen proliferacije je bio u korelaciji sa $ALC/AMC < 4.7$ (Spearman $\rho=0.326$, $p=0.014$).

Uočena je visoka korelacija visokog gradusa sa niskom ekspresijom CD10 (Kendall $\tau=-0.63$, $p < 0.0001$). Bez ekspresije CD10 je bilo 14/18 bolesnika (77.8%) gradusa 3 i 6/47 bolesnika (12.8%) gradusa 1 i 2 ($\chi^2=2.86$, $p < 0.0001$) (Tabela 16).

Tabela 16. Distribucija bolesnika u odnosu na ekspresiju CD10 i gradusa FL.

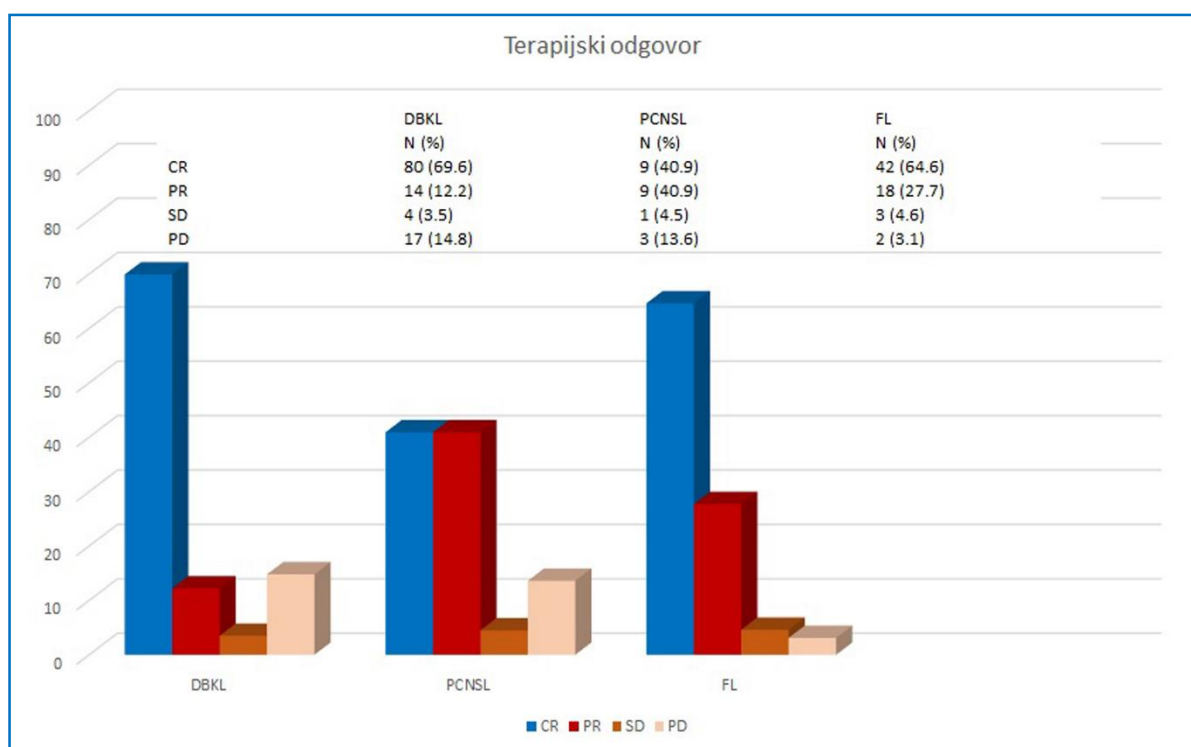
Ekspresija CD10	Gradus FL		Ukupno N (%)
	Gradus 1 i 2 N (%)	Gradus 3 N (%)	
CD10<30%	4 (22.2)	14 (77.8)	18 (27.7)
CD10≥30%	41 (87.2)	6 (12.8)	47 (72.3)
Ukupno	45 (69.2)	20 (30.8)	65 (100)

Uočena je korelacija visoke ekspresije MUM1 i transformacije FL u DBKL (Kendall $\tau=0.45$, $p=0.001$). Inicijalni terapijski odgovor je bio u korelaciji sa pojavom recidiva (Kendall $\tau=0.293$, $p=0.019$).

4.6. Odgovor na terapiju

Povoljan terapijski odgovor (CR, engl. *partial remission – PR*) je postignut kod

94 bolesnika sa DBKL (81.8%), dok je 21 bolesnik imao primarno rezistentnu bolest (18.2%). CR je postignuta kod 80 bolesnika (69.6%), PR kod 14 (12.2%), stabilna bolest (engl. *stable disease* – SD) kod 4 (3.5%) i progresivna bolest (engl. *progressive disease* - PD) kod 17 (14.8%). Kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS povoljan odgovor je imalo 18 bolesnika (81.8%). Devet bolesnika sa primarnim DBKL CNS je postiglo CR (40.9%), 9 (40.9%) PR, jedan je imao SD (4.5%) i tri su imala progresivnu bolest (13.6%) (Grafikon 10). Najveći broj bolesnika sa FL je postigao inicijalni povoljan terapijski odgovor (92.3%) uključujući 42 sa CR (64.6%), 18 sa PR (27.7%), a 3 bolesnika sa SD (4.6%) i 2 sa PD (3.1%). Relaps osnovne bolesti je verifikovan kod 25 bolesnika sa DBKL (28.9%), 9 sa primarnim DBKL CNS (40.9%) i 27 sa FL (41.5%).



Grafikon 10. Grafički prikaz terapijskog odgovora u odnosu na tip limfoma (DBKL, primarni DBKL CNS i FL).

4.7. DBKL prognostički parametri

Kod bolesnika sa DBKL distribucija bolesnika u odnosu na postizanje povoljnog terapijskog odgovora prema Ann Arbor sistemu je bila sledeća: 10/12 bolesnika (83.3%)

je postiglo povoljan terapijski odgovor u I stadijumu, 38/44 (78.9%) u II, 15/19 (78.9%) u III i 31/40 (77.5%) u IV ($p=0.74$) (Tabela 17).

Tabela 17. Grafički prikaz terapijskog odgovora kod bolesnika sa DBKL u odnosu na Ann Arbor klinički stadijum.

Ann Arbor sistem		Terapijski odgovor		Ukupno
		PD, SD	PR, CR	
Ann Arbor	I	2 16.7%	10 83.3%	12 100.0%
	II	6 13.6%	38 86.4%	44 100.0%
	III	4 21.1%	15 78.9%	19 100.0%
	IV	9 22.5%	31 77.5%	40 100.0%
Ukupno		21 18.3%	94 81.7%	115 100.0%

U odnosu na IPI, kod bolesnika sa DBKL povoljan terapijski odgovor je postignut kod 44/47 bolesnika (93.6%) sa niskim rizikom, 22/31 sa srednje niskim (71%), 21/24 sa srednje visokim (87.5%) i 7/13 (53.8%) sa visokim rizikom ($p=0.003$). U odnosu na R-IPI, povoljan terapijski odgovor je postignut kod 20/20 bolesnika (100%) sa niskim rizikom, 46/58 sa srednjim (79.3%) i 28/37 (75.7%) sa visokim rizikom ($p=0.061$). U odnosu na NCCN-IPI, kod bolesnika sa DBKL povoljan terapijski odgovor je postignut kod 19/19 bolesnika (100%) sa niskim rizikom, 32/38 sa srednje niskim (84.2%), 32/42 sa srednje visokim (76.2%) i 8/13 (61.5%) sa visokim rizikom ($p=0.035$). Na postizanje povoljnog terapijskog odgovora kod bolesnika sa DBKL je uticao i ECOG PS ($p=0.003$).

Grafički prikaz terapijskog odgovora u odnosu na prognostičke indekse je prikazan tabelarno (Tabela 18).

Tabela 18. Prikaz postizanja terapijskog odgovora u odnosu na IPI, R-IPI, NCCN-IPI.

IPI		Terapijski odgovor		Ukupno
		PD, SD	PR, CR	
IPI	Nizak rizik	3 6.4%	44 93.6%	47 100.0%
	Nizak srednji rizik	9 29.0%	22 71.0%	31 100.0%
	Visok srednji rizik	3 12.5%	21 87.5%	24 100.0%
	Visok rizik	6 46.2%	7 53.8%	13 100.0%
Ukupno		21 18.3%	94 81.7%	115 100.0%

R-IPI		Terapijski odgovor		Ukupno
		PD, SD	PR, CR	
R-IPI	Nizak rizik	0 0.0%	20 100.0%	20 100.0%
	Srednji rizik	12 20.7%	46 79.3%	58 100.0%
	Visok rizik	9 24.3%	28 75.7%	37 100.0%
Ukupno		21 18.3%	94 81.7%	115 100.0%

NCCN-IPI		Terapijski odgovor		Ukupno
		PD, SD	PR, CR	
NCCN-IPI	Nizak rizik	0 0.0%	19 100.0%	19 100.0%
	Nizak srednji rizik	6 15.8%	32 84.2%	38 100.0%
	Visok srednji rizik	10 23.8%	32 76.2%	42 100.0%
	Visok rizik	5 38.5%	8 61.5%	13 100.0%
Ukupno		21 18.8%	91 81.3%	112 100.0%

Kod bolesnika sa DBKL povoljan terapijski odgovor je postignut kod 65 bolesnika (83.3%) sa $ALC > 1.1 \times 10^9/l$ i 24 (77.4%) sa $ALC \leq 1.1 \times 10^9/l$ ($\chi^2=0.198$, $p=0.58$), i 55 (87.3%) sa $ALC/AMC > 2.6$ i 34 (75.6%) sa $ALC/AMC \leq 2.6$ ($\chi^2=1.75$, $p=0.18$). Hi-kvadrat test je pokazao statističku značajnost u postizanju povoljnog terapijskog odgovora u odnosu na AMC. CR i PR je postiglo 52 bolesnika (92.9%) sa $AMC < 0.62 \times 10^9/l$ i 37 (71.2%) sa $AMC \geq 0.62 \times 10^9/l$ ($\chi^2=7.34$, $p=0.007$) (Tabela 19).

Tabela 19. Terapijski odgovor u odnosu na AMC kod bolesnika sa DBKL.

AMC		Terapijski odgovor		Ukupno
		PD, SD	PR, CR	
AMC	$AMC < 0.62 \times 10^9/l$	4 7.1%	52 92.9%	56 100.0%
	$AMC \geq 0.62 \times 10^9/l$	15 28.8%	37 71.2%	52 100.0%
Ukupno		19 17.6%	89 82.4%	108 100.0%

Bolesnici sa GCB su imali veći procenat postizanja povoljnog terapijskog odgovora u odnosu na bolesnike sa non-GCB podtipom (91.3% vs. 75%) prema Visco-Young algoritmu ($p=0.05$) (Tabela 20). Prema Hansovom algoritmu nije bilo razlike u postizanju povoljnog terapijskog odgovora između GCB i non-GCB podtipa ($p>0.05$).

Tabela 20. Terapijski odgovor u odnosu na ćelijsko poreklo prema Visco-Young algoritmu.

Visco-Young algoritam		Terapijski odgovor		Ukupno
		PD, SD	PR, CR	
Visco-Young algoritam	GCB	4 8.7%	42 91.3%	46 100.0%
	non-GCB	16 25.0%	48 75.0%	64 100.0%
Ukupno		20 18.2%	90 81.8%	110 100.0%

U grupi bolesnika koji su imali pozitivnu ekspresiju CD10, povoljan terapijski odgovor (PR i CR) je postignut kod 29 bolesnika (97.7%) i 60 (75.9%) bolesnika bez ekspresije CD10 ($\chi^2=4.92$, $p=0.027$) (Tabela 21).

Tabela 21. Terapijski odgovor u odnosu na ekspresiju CD10 u DBKL.

Ekspresija CD10	Terapijski odgovor		Ukupno
	PD, SD	PR, CR	
CD10<30%	19 24.1%	60 75.9%	79 100.0%
CD10≥30%	1 3.3%	29 96.7%	30 100.0%
Ukupno	20 18.2%	20 18.3%	89 81.7%

Ekspresija FOXP1 je uticala na postizanje terapijskog odgovora ($\chi^2=5.6$, $p=0.018$). Kod 61/69 bolesnika (88.4%) sa ekspresijom FOXP1<80% je postignuta CR i PR, i kod 22/33 bolesnika (66.7%) sa visokom ekspresijom FOXP1≥80% (Tabela 22).

Tabela 22. Terapijski odgovor u odnosu na ekspresiju FOXP1 u DBKL.

FOXP1	Terapijski Odgovor		Ukupno
	PD, SD	PR, CR	
FOXP1<80%	8 11.6%	61 88.4%	69 100.0%
FOXP1≥80%	11 33.3%	22 66.7%	33 100.0%
Ukupno	19 18.6%	83 81.4%	102 100.0%

Stepen vaskularizacije tumorskog tkiva je bio visoko statistički povezan sa terapijskim odgovorom ($\chi^2=10.3$, $p=0.001$). Povoljan terapijski odgovor je postignut kod 91.5% (65/71) bolesnika sa niskom tumorskom vaskularizacijom (≤ 43 krvna suda/HPF) i 65.9% (29/44) bolesnika sa visokom tumorskom vaskularizacijom (Tabela 23).

Tabela 23. Terapijski odgovor u odnosu na gustinu vaskularizacije tumora kod bolesnika sa DBKL.

Tumorska vaskularizacija	Terapijski odgovor		Ukupno
	PD, SD	PR, CR	
niska	6 8.5%	65 91.5%	71 100.0%
visoka	15 34.1%	29 65.9%	44 100.0%
Ukupno	21 18.3%	94 81.7%	115 100.0%

Ostali analizirani klinički i imunohistohemijski parametri nisu pokazali značajnost u postizanju povoljnog terapijskog odgovora.

Primenom logističke regresione analize formiran je statistički značajan model ($\chi^2=28.48$, $p<0.0001$) od parametara (NCCN-IPI, AMC, ćelijsko poreklo prema Visco-Young algoritmu i stepen vaskularizovanosti tumora) koji su bili u korelaciji sa postizanjem terapijskog odgovora. Model je uspešno klasifikovao 85.1% slučajeva. Najznačajniji prediktori postizanja povoljnog terapijskog odgovora su niska gustina tumorske vaskularizacije i $AMC < 0.32 \times 10^9/l$ (Tabela 24).

Tabela 24. Predviđanje verovatnoće postizanja povoljnog terapijskog odgovora u odnosu na parametre koji su u univarijantnoj analizi označeni kao značajni.

	B	Standardna greška	Wald	Stepen slobode	p	95% CI	
						Donja granica	Gornja granica
NCCN-IPI	-0.360	0.221	2.671	1	0.102	0.453	1.074
AMC	1.854	0.697	7.075	1	0.008	1.629	25.043
GCB vs. non-GCB (Visco-Young)	1.389	0.776	3.201	1	0.074	0.876	18.366
Gustina vaskularizacije tumora	1.939	0.709	7.477	1	0.006	1.732	27.924

4.8. Primarni DBKL CNS – prognostički parametri

U odnosu na IELSG skor, kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a povoljan terapijski odgovor je postignut kod 6/7 bolesnika (85.7%) sa niskim rizikom, 7/8 sa srednjim rizikom (87.5%) i 1/3 (33.3%) sa visokim rizikom ($p=0.13$) (Tabela 25).

Tabela 25. Terapijski odgovor kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a u odnosu na IELSG skor.

IELSG skor	Terapijski odgovor		Ukupno	
	PD, SD	PR, CR		
IELSG	Nizak rizik	1 14.3%	6 85.7%	7 100.0%
	Srednji rizik	1 12.5%	7 87.5%	8 100.0%
	Visok rizik	2 66.7%	1 33.3%	3 100.0%
Ukupno	4 22.2%	14 77.8%	18 100.0%	

Kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a u odnosu na $ALC > 1.1 \times 10^9/l$, $AMC < 0.62 \times 10^9/l$ i $ALC/AMC > 2.6$, povoljan terapijski odgovor je postignut kod 10 bolesnika (71.4%), 5 (62.5%) i 6 (60%), dok je u odnosu na $ALC \leq 1.1 \times 10^9/l$, $AMC \geq 0.62 \times 10^9/l$ i $ALC/AMC \leq 2.6$, distribucija bila sledeća: 4 (100%), 9 (90%) i 8 (100%). Fišerov test tačne verovatnoće kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a nije pokazao značajnost u postizanju povoljnog terapijskog odgovora u odnosu na ALC, AMC i ALC/AMC ($p=0.52$, $p=0.27$, $p=0.09$). Kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a takođe nije pronađen uticaj analiziranih kliničkih ni imunohistohemijskih parametara (CD10, BCL2, BCL6, MUM1, FOXP1, Ki-67, GCB/non-GCB, MVD, CD44s) na postizanje povoljnog terapijskog odgovora.

4.9. FL- prognostički parametri

Kod bolesnika sa FL distribucija bolesnika u odnosu na postizanje povoljnog terapijskog odgovora prema Ann Arbor sistemu je bila sledeća: 1/1 bolesnika (100%) je

postiglo povoljan terapijski odgovor u I stadijumu, 4/4 (100%) u II, 11/12 (91.7%) u III, 40/44 (90.9%) u IV i 4/4 (100%) u V ($p=0.93$) (Tabela 26).

Tabela 26. Grafički prikaz postizanja terapijskog odgovora kod bolesnika sa FL u odnosu na Ann Arbor klinički stadijum.

Ann Arbor sistem		Terapijski odgovor		Ukupno
		PD, SD	PR, CR	
Ann Arbor	I	0 0.0%	1 100.0%	1 100.0%
	II	0 0.0%	4 100.0%	4 100.0%
	III	1 8.3%	11 91.7%	12 100.0%
	IV	4 9.1%	40 90.9%	44 100.0%
	V	0 0.0%	4 100.0%	4 100.0%
Ukupno		5 7.7%	60 92.3%	65 100.0%

U odnosu na FLIPI, kod bolesnika sa FL povoljan terapijski odgovor je postignut kod 13/13 bolesnika (100%) sa niskim rizikom, 21/23 sa srednjim rizikom (91.3%) i 23/26 (57%) sa visokim rizikom ($p=0.45$) (Tabela 27).

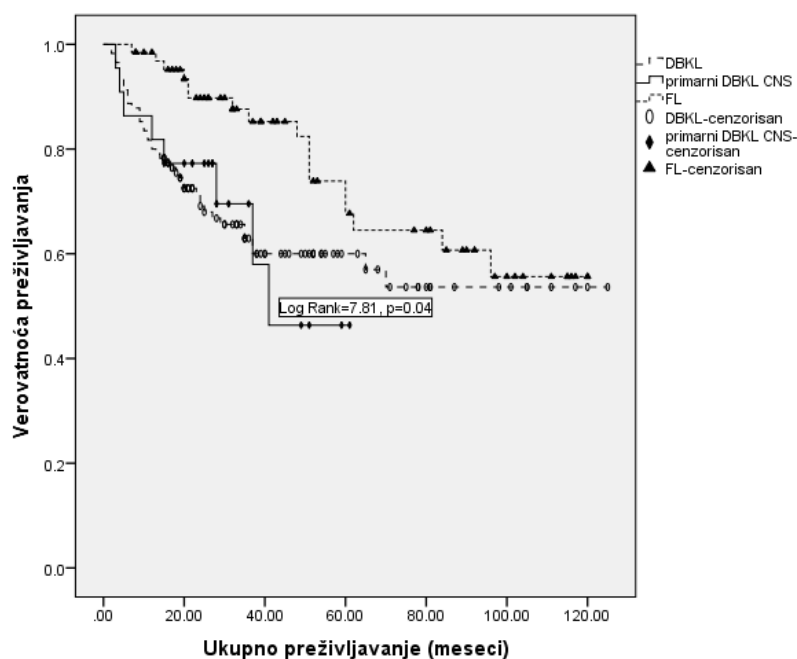
Tabela 27. Terapijski odgovor kod bolesnika sa FL-om u odnosu na FLIPI.

FLIPI		Terapijski odgovor		Ukupno
		PD, SD	PR, CR	
FLIPI	Nizak rizik	0 0.0%	13 100.0%	13 100.0%
	Srednji rizik	2 8.7%	21 91.3%	23 100.0%
	Visok rizik	3 11.5%	23 88.5%	26 100.0%
Ukupno		5 8.1%	57 91.9%	62 100.0%

Kod bolesnika sa FL u odnosu na $ALC > 1.1 \times 10^9/l$, $AMC < 0.32 \times 10^9/l$ i $ALC/AMC \geq 4.7$, povoljan terapijski odgovor je postignut kod 47 bolesnika (92.2%), 9 (90.0%) i 27 (96.4%) dok je u odnosu na $ALC \leq 1.1 \times 10^9/l$, $AMC \geq 0.32 \times 10^9/l$, i $ALC/AMC < 4.7$, distribucija bila sledeća: 9 (90%), 47 (92.2%) i 56 (91.8%). Fišerov test tačne verovatnoće nije pokazao značajnost u postizanju povoljnog terapijskog odgovora u odnosu na ALC, AMC i ALC/AMC ($p > 0.05$). Na postizanje povoljnog terapijskog odgovora takođe nisu uticali ostali analizirani parametri uključujući kliničke (pol, prisustvo B simptoma, ECOG PS, bulky bolest) kao ni gradus limfoma i gustina tumorske vaskularizacije. Nije uočena korelacija ni sa imunohistohemijskim markerima uključujući CD44s ($p > 0.05$), CD10 ($p = 0.68$), BCL6 ($p = 0.288$), MUM1 ($p = 0.95$), FOXP1 ($p = 0.28$) i Ki-67+ ($p > 0.05$).

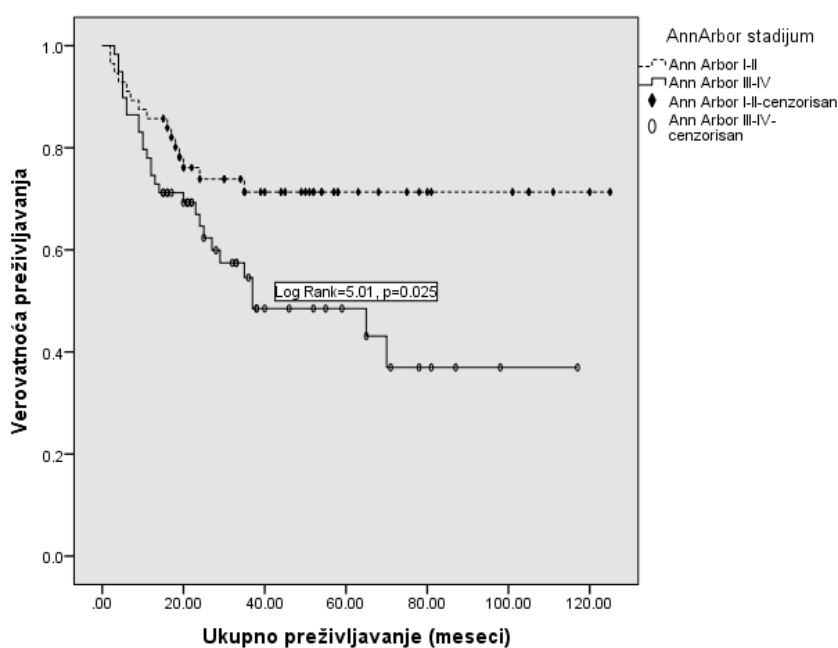
4.10. Analiza preživljavanja:

U odnosu tip limfoma uočena je razlika u preživljavanju (Log Rank=7.81, $p = 0.04$), sa 4-godišnjim preživljavanjem od 73% kod FL, 59% DBKL i 48% primarnim DBKL CNS-a (Grafikon 11). Nije uočena razlika u preživljavanju između nodalnih i ektranodalnih DBKL (Log Rank=1.96, $p = 0.162$).



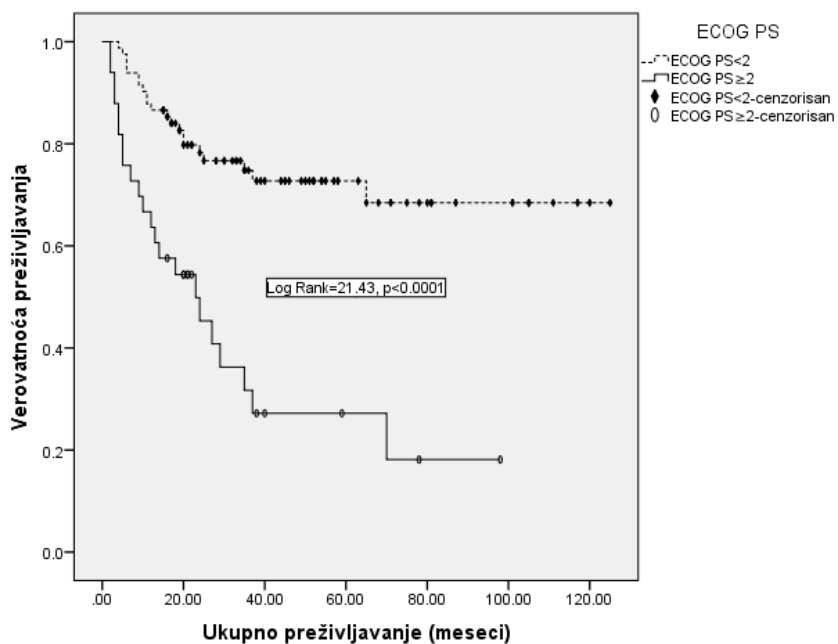
Grafikon 11. Preživljavanje bolesnika u odnosu na tip limfoma (FL, DBKL, primarni DBKL CNS).

Nije bilo razlike u preživljavanju u odnosu na godine starosti ($p=0.81$), pol ($p=0.16$), prisustvo bulky bolesti ($p=0.40$) kod obolelih od DBKL. S obzirom da je mali broj bolesnika imao visok komorbiditetni indeks, nije uočena razlika u njihovom preživljavanju ($p=0.76$). Bolesnici u uznapredovalom stadijumu prema Ann Arbor klasifikaciji (III-IV) su imali lošije ukupno preživljavanje u odnosu na bolesnike sa I i II Ann Arbor stadijumom (OS, Log Rank=5.01, $p=0.025$; EFS, Log Rank=9.10, $p=0.028$) (Grafikon 12).

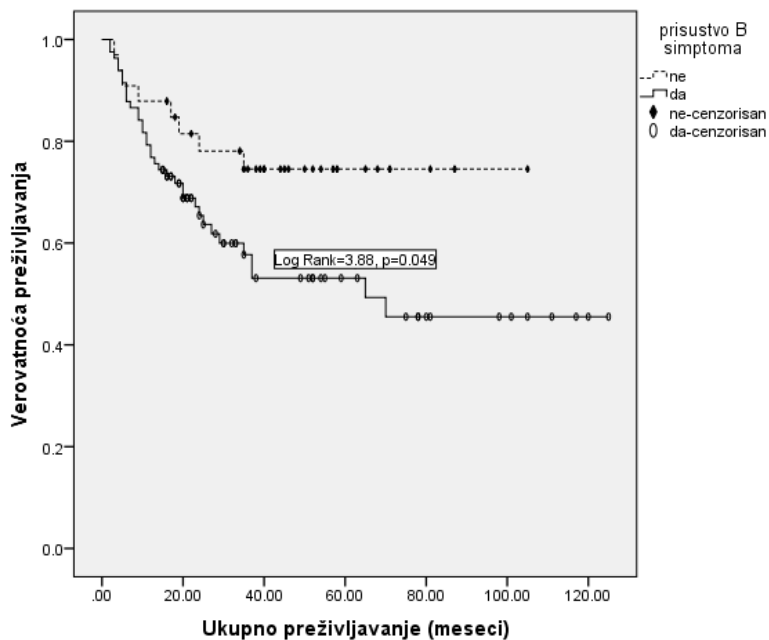


Grafikon 12. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na Ann Arbor stadijum.

Bolesnici koji sa lošijim ECOG PS \geq 2 imali su nepovoljniji ishod u odnosu na bolesnike u dobrom opštem stanju (OS, Log Rank=21.43, $p<0.0001$; EFS, Log Rank=23.83, $p<0.0001$) kao i bolesnici sa prisutnom B simptomatologijom u odnosu na bolesnike bez ovih simptoma (OS, Log Rank=3.88, $p=0.049$; EFS, Log Rank 3.73, $p=0.05$) (Grafikon 13 i 14).

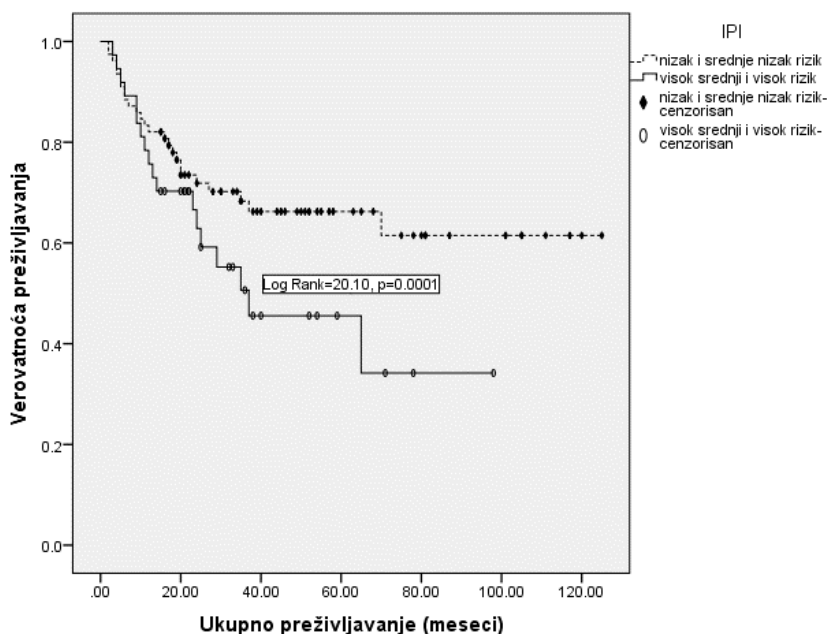


Grafikon 13. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na ECOG PS.



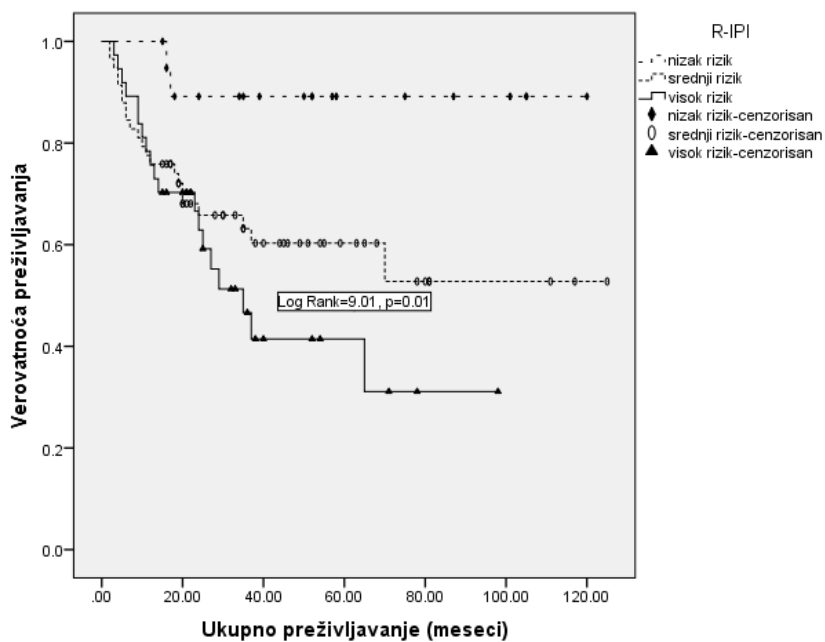
Grafikon 14. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na prisustvo B simptoma.

Kaplan-Mejerova analiza je potvrdila prediktivni značaj IPI-ja (OS, Log Rank=20.10, $p=0.0001$; EFS, Log Rank=20.75, $p=0.0001$), R-IPI-ja (OS, Log Rank=9.01, $p=0.01$; EFS, Log Rank=8.73, $p=0.013$) i NCCN-IPI-ja (OS, Log Rank=24.45, $p<0.0001$; EFS, Log Rank=22.45, $p<0.0001$) na OS i EFS. Medijana ukupnog preživljavanja bolesnika sa visokim i srednje visokim rizikom prema IPI-ju je bila 38 meseci nasuprot medijani koja nije dostignuta u grupi sa niskim i niskim srednjim (Grafikon 15).

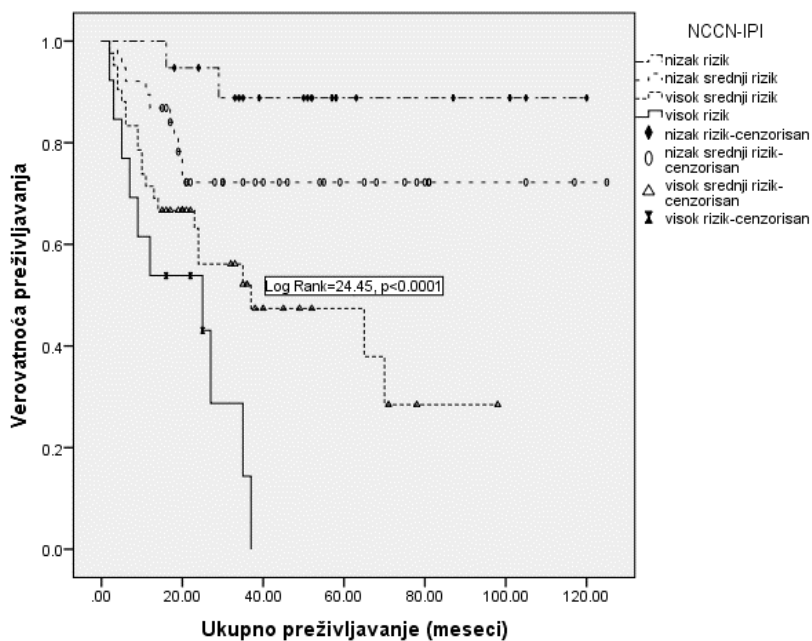


Grafikon 15. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na IPI.

Prema R-IPI-ju medijana u grupi sa visokim rizikom je bila 36 meseci, dok u grupi srednjeg i niskog rizika nije dostignuta. Prema NCCN-IPI-ju medijana OS u grupi bolesnika sa visokim rizikom je bila 25 meseci, 37 u grupi srednje visokog rizika dok u ostalim grupama nije dostignuta (Grafikon 16, 17).



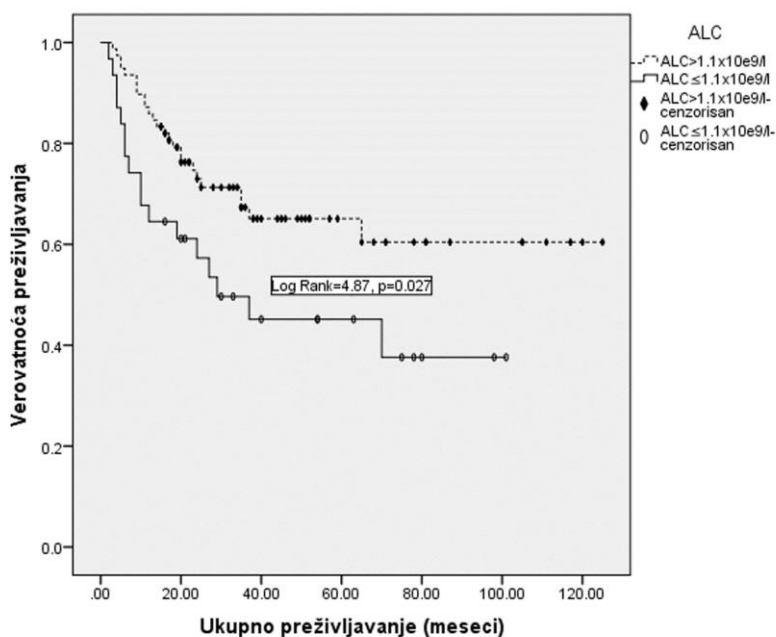
Grafikon 16. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na R-IPI.



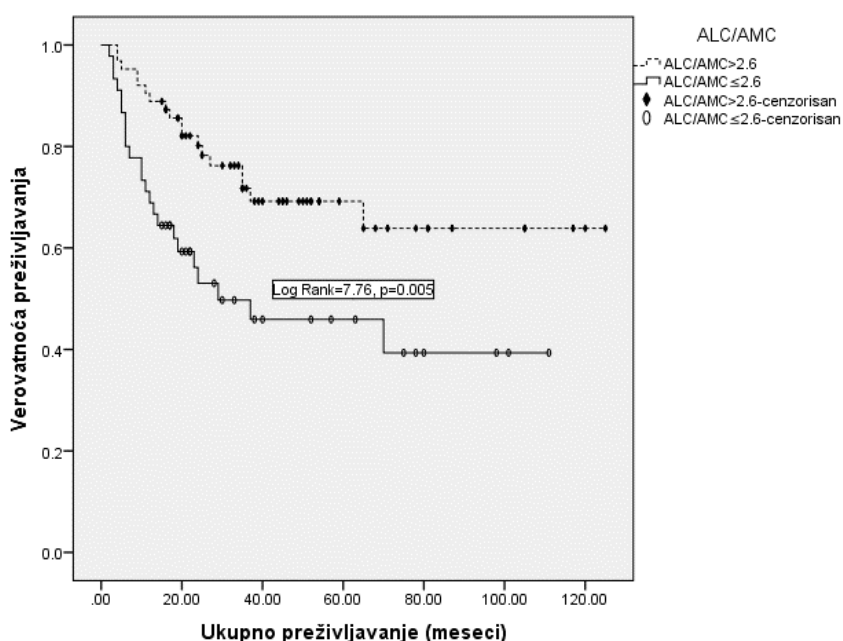
Grafikon 17. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na NCCN-IPI.

Bolesnici sa DBKL koji su na prezentaciji imali $ALC \geq 1.1 \times 10^9/l$ su bolje preživljavali u odnosu na bolesnike sa $ALC < 1.1 \times 10^9/l$ (OS, Log Rank=4.87, $p=0.027$;

EFS, Log Rank=5.80, $p=0.016$) kao i bolesnici sa $ALC/AMC > 2.6$ u odnosu na bolesnike sa $ALC/AMC \leq 2.6$ (OS, Log Rank 7.76, $p=0.005$, EFS, Log Rank=7.59, $p=0.006$). (Grafikon 18, 19). Medijana preživljavanja u nepovoljnijoj grupi u odnosu na ALC i ALC/AMC je iznosila 29 meseci, dok u povoljnijoj grupi nije dostignuta. Vrednost AMC na prezentaciji u analiziranoj grupi nije bila povezana sa ishodom ($p=0.15$).

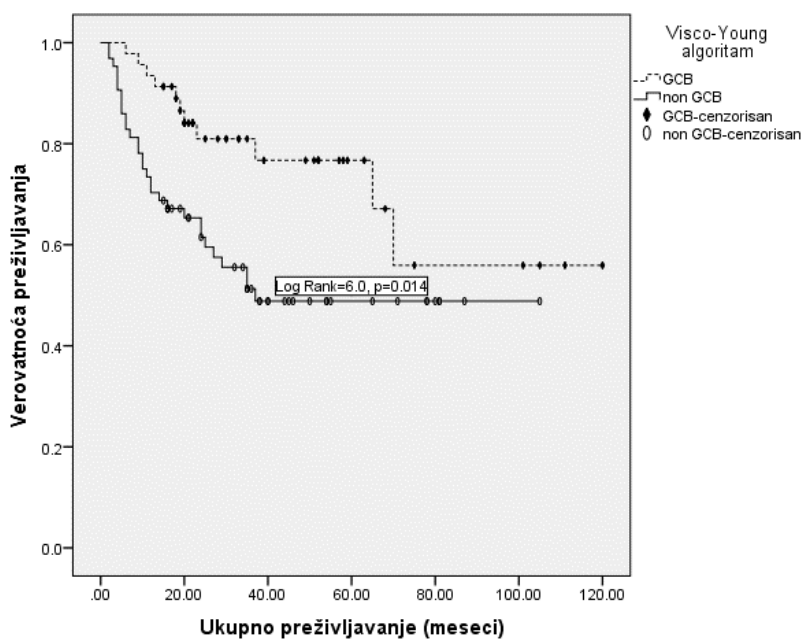


Grafikon 18. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na ALC.

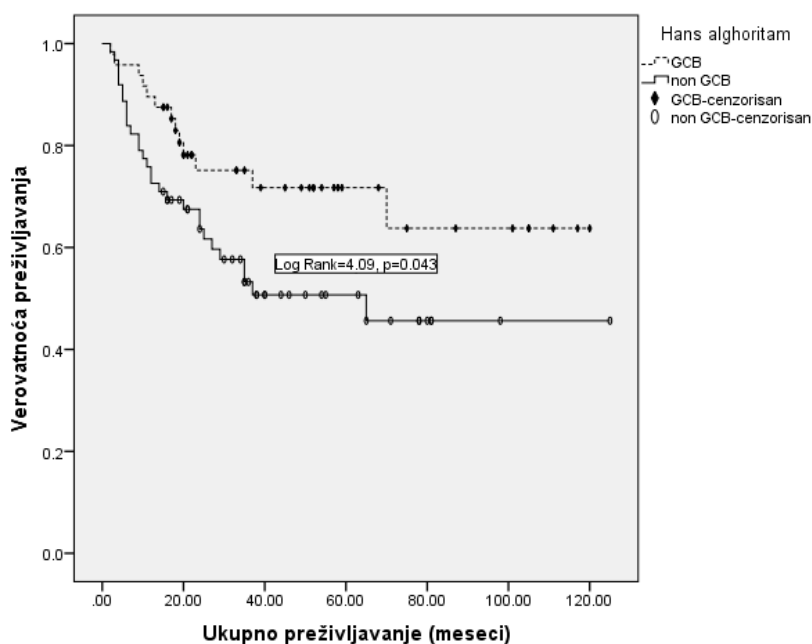


Grafikon 19. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na ALC/AMC.

I Visco Young (OS, Log Rank=6.0, p=0.014; EFS, Log Rank=6.60, p=0.01) i Hansov algoritam (OS, Log Rank=4.09, p=0.043; EFS, Log Rank=4.44, p=0.035) su pokazali bolje preživljavanje bolesnika sa GCB podtipom (Grafikon 20, 21). Jedno i trogodišnje preživljavanje za GCB i non-GCB podtip je prema Hansovom algoritmu 75% vs. 67% i 71% vs. 50%, a prema Visco-Youngovom 81% vs. 65% odnosno 76% vs. 48%.

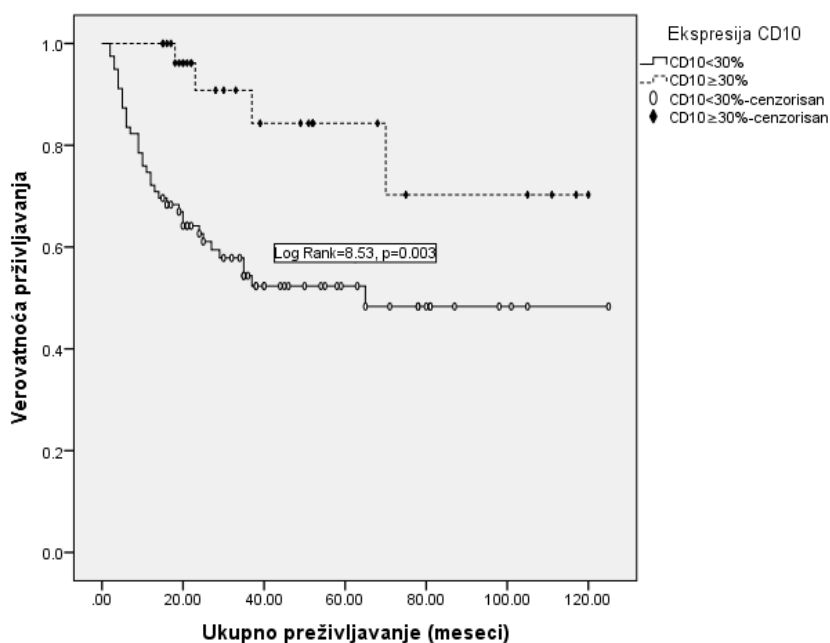


Grafikon 20. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na Visco Young algoritam.



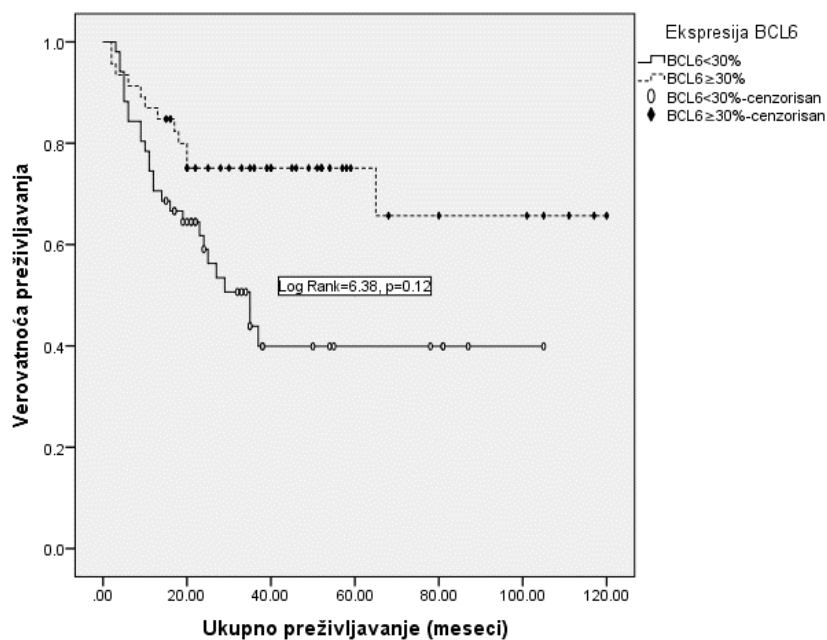
Grafikon 21. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na Hansov algoritam.

Pozitivna ekspresija CD10 na tumorskim ćelijama DBKL je bila povezana sa postizanjem boljeg OS (medijana nije dostignuta vs. 65 meseci, Log Rank=8.53, p=0.003) i EFS (medijana nije dostignuta vs. 65 meseci, Log Rank=9.19, p=0.002) (Grafikon 22). Bolesnici sa pozitivnom CD10 ekspresijom su imali 1-godišnje preživljavanje od 92%, i 3-godišnje preživljavanje od 85% dok su bolesnici bez CD10 ekspresije imali preživljavanje 64% odnosno 51%.



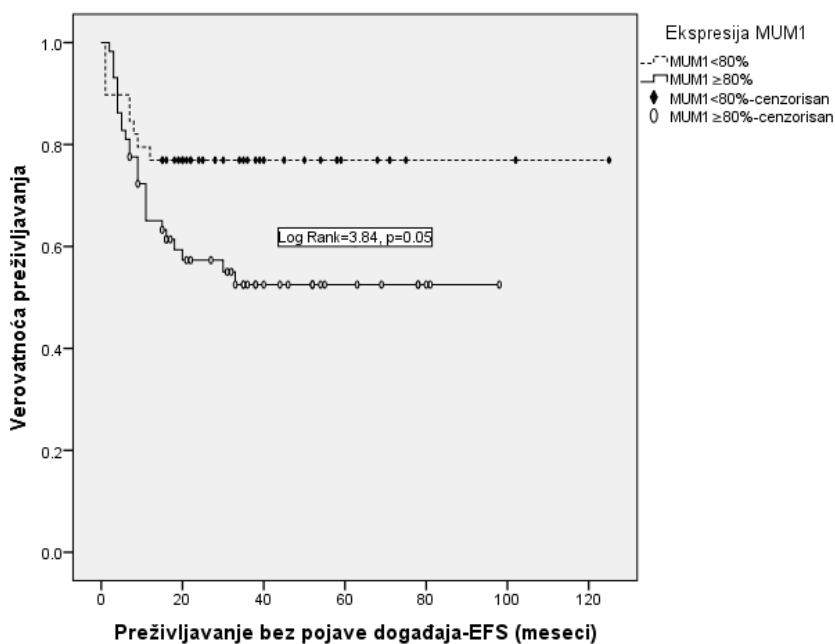
Grafikon 22. Analiza ukupnog preživljavanja (OS) u odnosu na ekspresiju CD10.

Ekspresija BCL2 u analiziranoj grupi bolesnika sa DBKL nije uticala na OS (p=0.94) ni na EFS (p=0.80). Nasuprot tome, prisustvo pozitivne ekspresije BCL6 je rezultovala boljim OS (medijana nije dostignuta vs. 35 meseci, Log Rank=6.38, p=0.012) i EFS (medijana nije dostignuta vs. 30 meseci, Log Rank=6.45, p=0.011) (Grafikon 23). Bolesnici sa pozitivnom BCL6 ekspresijom su imali 1-godišnje preživljavanje od 75%, i 3-godišnje preživljavanje od 75% dok su bolesnici bez BCL6 ekspresije imali 61% odnosno 39%.



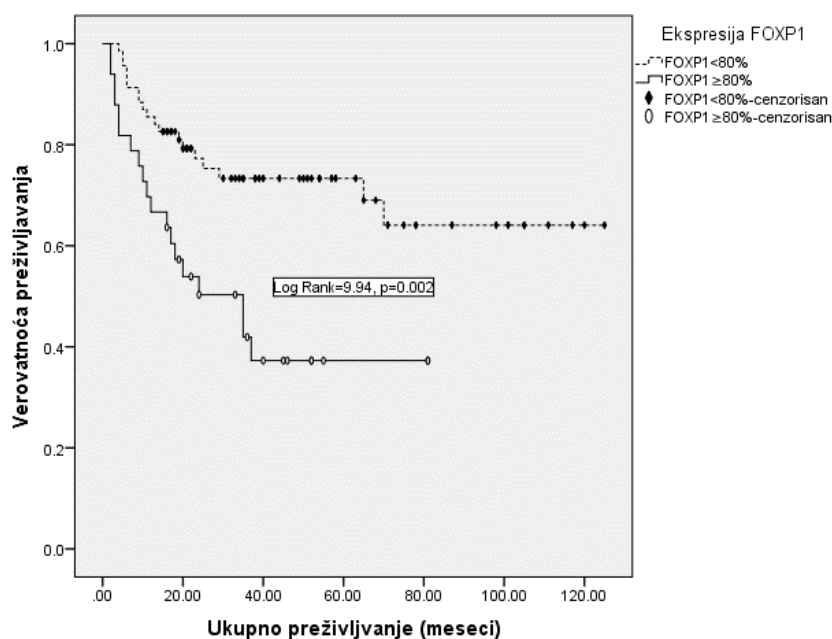
Grafikon 23. Analiza ukupnog preživljavanja (OS) u odnosu na ekspresiju BCL6.

Ekspresija MUM1 nije uticala na OS (Log Rank=3.39, $p=0.066$), dok je visoka ekspresija MUM1 $\geq 80\%$ bila povezana sa kraćim trajanjem EFS (Log Rank=3.84, $p=0.05$) (Grafikon 24). Bolesnici bez ekspresije MUM1 su postigli 1-godišnji i 3-godišnji EFS u 76%, dok su bolesnici sa ekspresijom MUM1 postigli 57% odnosno 52%.



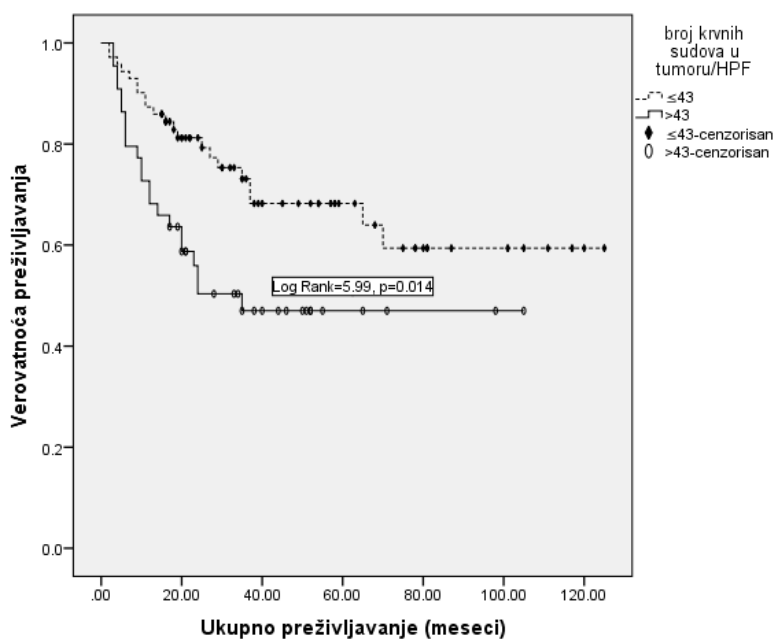
Grafikon 24. Preživljavanje bez pojave događaja u odnosu na visoku ekspresiju MUM1.

Kada se analizira preživljavanje u odnosu na FOXP1 prema cut off vrednosti koju predlaže Visco Young algoritam (60%), nije uočena značajna razlika u odnosu na OS ($p=0.57$) i EFS ($p=0.69$). Međutim, visoka ekspresija FOXP1 ($\geq 80\%$) je povezana sa lošijim OS (medijana 35 meseci vs, medijana nije dostignuta, Log Rank=9.94, $p=0.002$) i EFS (medijana 18 meseci vs, medijana nije dostignuta, Log Rank=9.70, $p=0.002$) (Grafikon 25). Bolesnici sa visokom ekspresijom FOXP1 su imali 1-godišnje odnosno 3-godišnje preživljavanje od 53% vs. 37% u odnosu na 77% vs. 73% kod bolesnika sa nižom FOXP1 ekspresijom.



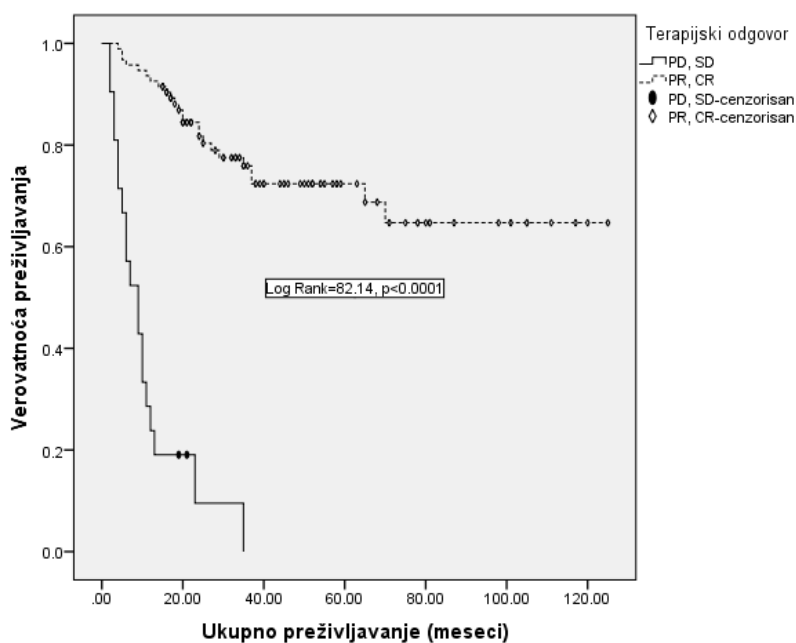
Grafikon 25. Analiza ukupnog preživljavanja u odnosu na pozitivnu ekspresiju FOXP1.

Prisustvo pojačane tumorske vaskularizacije kod bolesnika sa DBKL je povezano sa lošijim ishodom (OS, Log Rank=5.99, $p=0.014$; EFS, Log Rank=6.06, $p=0.014$), sa 1-godišnjim preživljavanjem i 3 godišnjim preživljavanjem od 55% vs. 46% u odnosu na bolesnike sa niskom gustinom tumorske vaskularizacije (81% vs. 68%) (Grafikon 26). Pojačana ekspresija CD44s na tumorskim ćelijama nije uticala na OS ni na EFS kod ovih bolesnika ($p=0.99$, $p=0.93$).



Grafikon 26. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na MVD.

Očekivano bolesnici koji nisu postigli povoljan terapijski odgovor na inicijalnu terapiju su imali značajno lošije preživljavanje u odnosu na bolesnike koji su postigli CR ili PR (medijana 9 meseci vs. medijana nije dostignuta, Log Rank=82.14, $p<0.0001$) (Grafikon 27).



Grafikon 27. Preživljavanje bolesnika sa DBKL u odnosu na terapijski odgovor.

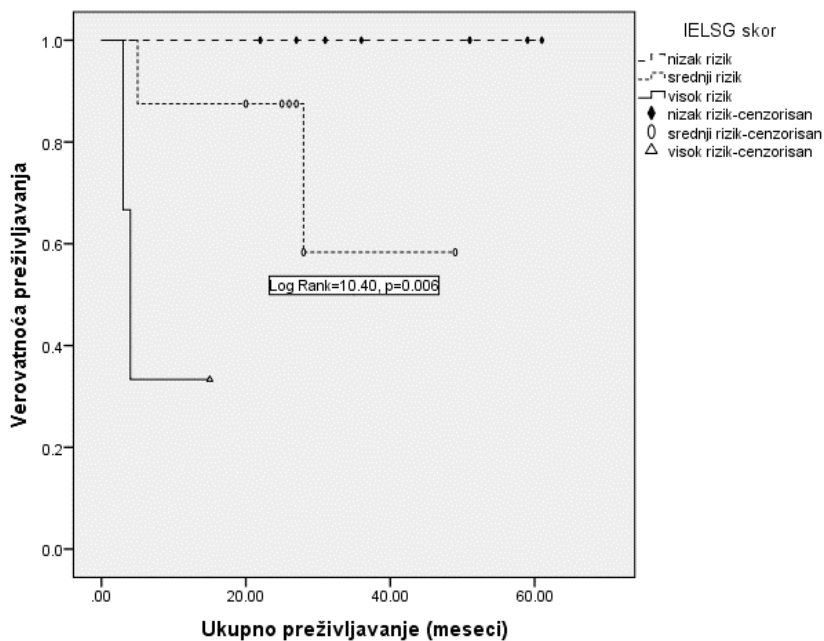
Upotrebom Cox-og regresionog modela analizirani su parametri koji su u univarijantnoj analizi pokazali statističku značajnost uz isključenje mulikolinearnosti (prisustvo B simptoma, NCCN-IPI, ALC, ALC/AMC, ćelijsko poreklo (GCB vs. non-GCB) prema Visco-Young algoritmu, gustina tumorske vaskularizacije). Analiza je pokazala da je NCCN-IPI bio naprediktivniji za procenu preživljavanja (95% CI, 1.19-1.82, $p < 0.0001$) uz gustinu tumorske vaskularizacije (95% CI, 0.21-0.89, $p = 0.023$) (Tabela 28).

Tabela 28. Coxova regresiona analiza sa parametrima koji su bili značajni u univarijantnoj analizi.

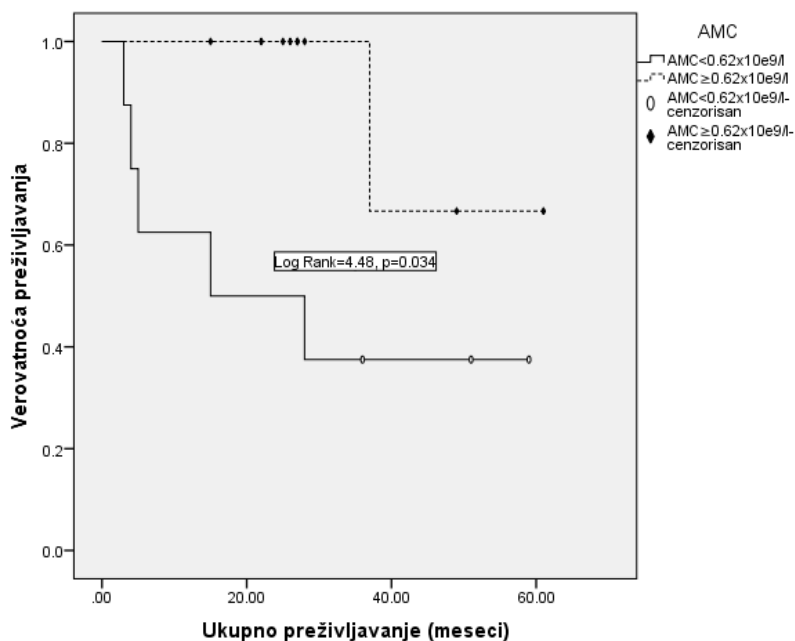
	B	Standardna greška	Wald	Stepen slobode	p	95.0% CI	
						Donja granica	Gornja granica
B simptomi	-0.826	0.467	3.135	1	0.077	0.175	1.092
NCCN-IPI	0.386	0.109	12.600	1	0.000	1.188	1.819
ALC	-0.426	0.402	1.122	1	0.289	0.297	1.436
ALC/AMC	-0.437	0.433	1.017	1	0.313	0.276	1.510
GCB vs. non-GCB (Visco-Young)	-0.670	0.403	2.765	1	0.096	0.232	1.127
MVD	-0.842	0.371	5.138	1	0.023	0.208	0.892

Kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS, godine starosti i pol nisu uticali na ukupno preživljavanje ($p = 0.068$, $p = 0.91$). IELSG skor je uticao kako na OS (Log Rank=10.40, $p = 0.006$) tako i na EFS (Log Rank=8.36, $p = 0.015$) (Grafikon 28). ALC i ALC/AMC nisu imali uticaj na EFS i OS ($p > 0.05$), dok su bolesnici sa $AMC < 0.62 \times 10^9/l$ imali bolji OS u odnosu na bolesnike sa $AMC \geq 0.62 \times 10^9/l$ (medijana nije dostignuta vs. 15 meseci, Log Rank=4.48, $p = 0.034$) i EFS (medijana nije dostignuta vs. 13 meseci, Log Rank=4.92, $p = 0.027$) (Grafikon 29). U odnosu na poreklo ćelije prema Visco-Young i Hansovom algoritmu nije bilo razlike u odnosu na OS ($p = 0.61$, $p = 0.57$) i EFS ($p = 0.69$, $p = 0.65$), kao ni u odnosu na MVD (OS, $p = 0.27$; EFS, $p = 0.49$). Ekspresija CD44s na tumorskim ćelijama je imala graničnu značajnost na OS (Log Rank=3.86, $p = 0.049$), ali ne i na EFS (Log Rank=2.81, $p = 0.094$). Pozitivna ekspresija CD10 nije imala uticaj na OS ($p = 0.61$) i EFS ($p = 0.69$), kao ni BCL2 (OS, $p = 0.65$, EFS, $p = 0.72$). Takođe ekspresija BCL6 nije uticala na OS ($p = 0.88$) i EFS ($p = 0.92$) kao ni visoka ekspresija MUM1 (OS,

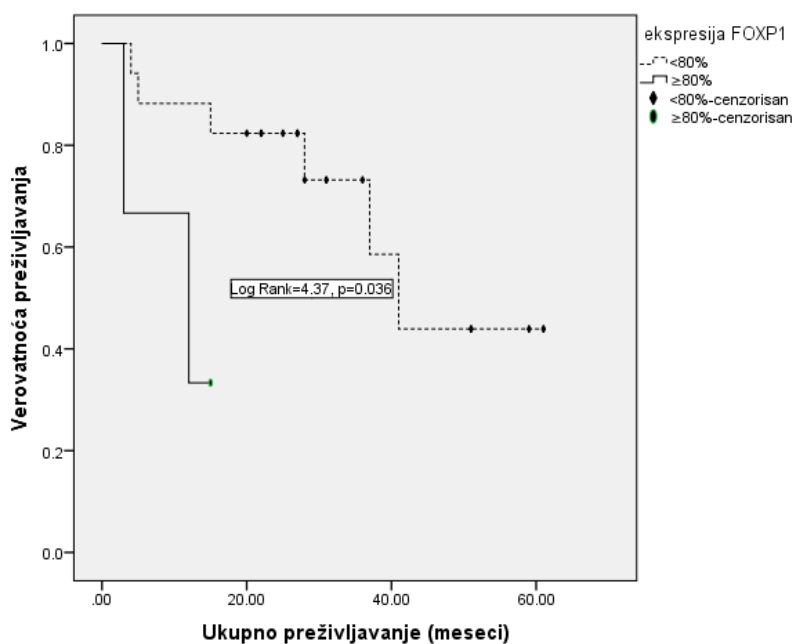
p=0.16; EFS, p=0.15) i ekspresija FOXP1 \geq 60% (OS, p=0.99, EFS, p=0.86). Međutim bolesnici sa ekspresijom FOXP1 \geq 80% imali su lošije preživljavanje u odnosu na bolesnike sa nižom ekspresijom (OS, medijana 12 meseci vs. 41 mesec, Log Rank=4.37, p=0.036), dok vrednost FOXP1 nije uticalo na EFS (p=0.073) (Grafikon 30).



Grafikon 28. Preživljavanje bolesnika sa primarnim DBKL CNS u odnosu na IELSG.

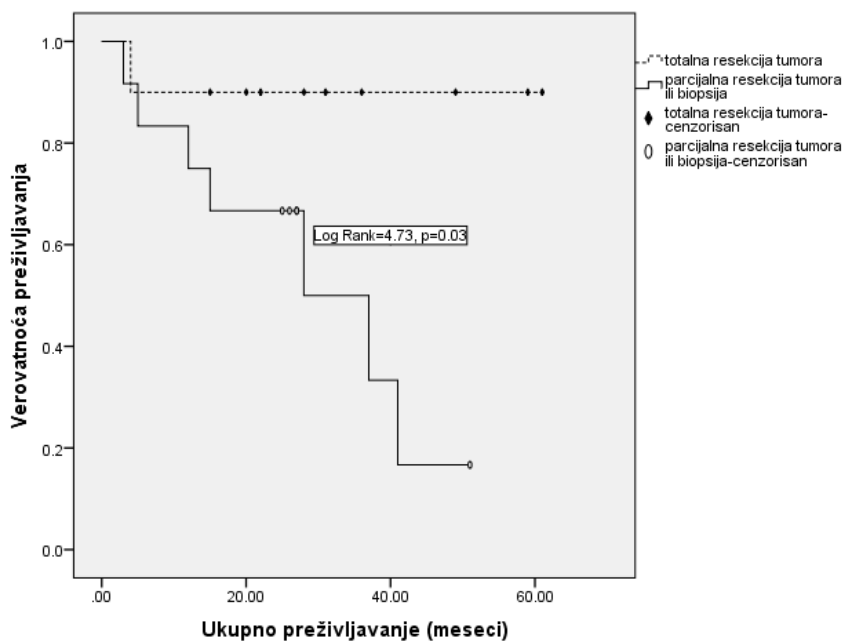


Grafikon 29. Preživljavanje bolesnika sa primarnim DBKL CNS u odnosu na AMC.



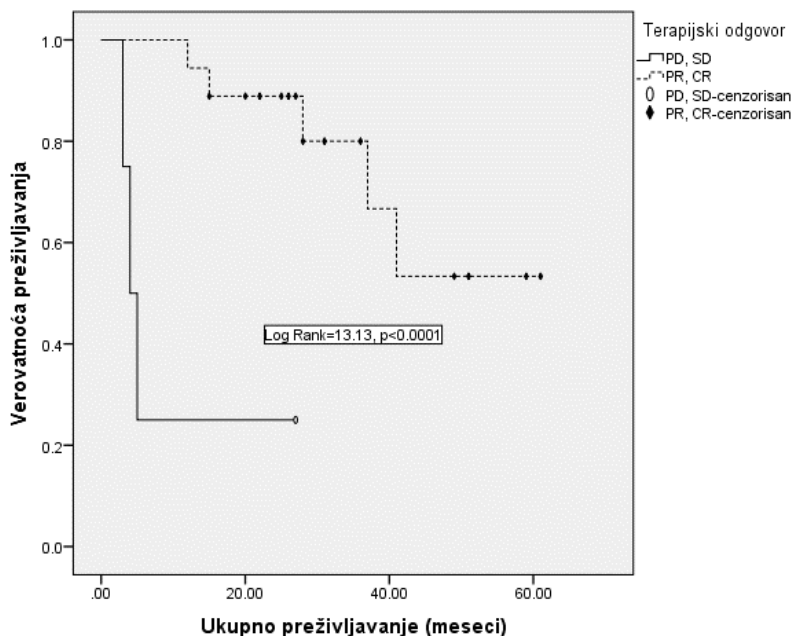
Grafikon 30. Preživljavanja bolesnika sa DBKL CNS-a u odnosu na ekspresiju FOXP1.

Bolesnici koji su pred započinjanje hemioterapije imali ekstenzivnu hiruršku intervenciju sa kompletnom tumorskom ekstirpacijom su imali značajno bolji OS (medijana nije dostignuta vs. 36 meseci, Log Rank=4.73, p=0.03) i EFS (medijana nije dostignuta vs. 28 meseca, Log Rank=4.47, p=0.034) u odnosu na bolesnike koji su imali samo parcijalnu resekciju tumora ili biopsiju (Grafikon 31).



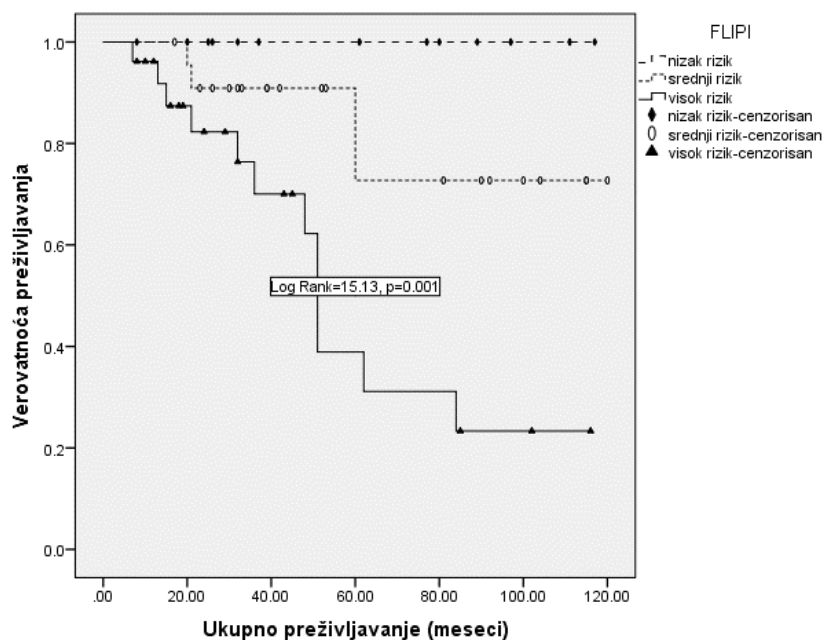
Grafikon 31. Preživljavanje bolesnika sa DBKL CNS u odnosu na terapijski pristup.

Očekivano bolesnici koji nisu postigli povoljan terapijski odgovor na inicijalnu terapiju, imali su značajno lošije preživljavanje u odnosu na bolesnike koji su postigli CR ili PR (medijana 4 meseci vs. medijana nije dostignuta, Log Rank=13.13, $p<0.0001$) (Grafikon 32).



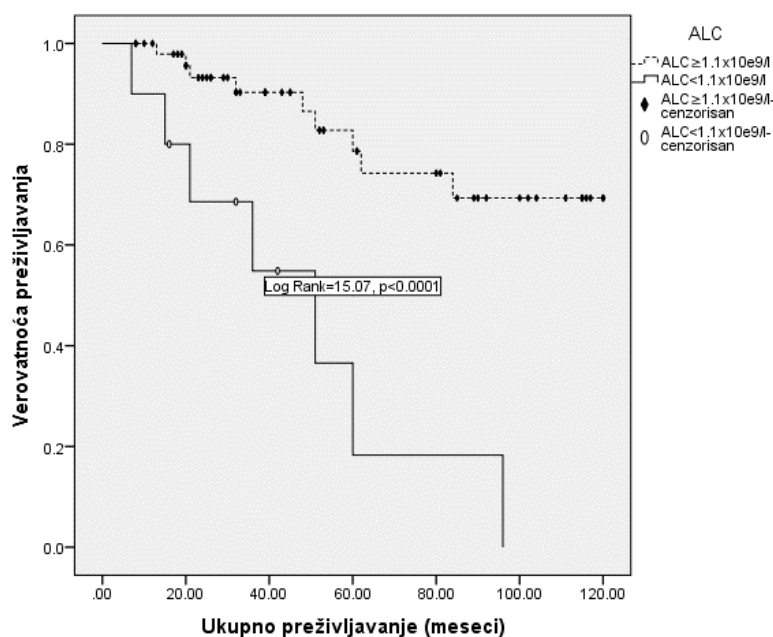
Grafikon 32. Preživljavanje bolesnika sa primarnim DBKL CNS u odnosu na terapijski odgovor.

Kod bolesnika sa FL na preživljavanje nisu uticale godine starosti (OS, $p=0.185$; EFS, $p=0.28$), Ann Arbor klinički stadijum (OS, $p=0.88$; EFS, $p=0.18$), ECOG PS (OS, $p=0.10$; EFS, $p=0.048$), prisustvo B simptoma (OS, $p=0.314$; EFS, $p=0.245$), bulky bolesti (OS, $p=0.33$; EFS=1.28, $p=0.26$), ni komorbiditeta (OS, $p=0.86$; EFS, $p=0.87$). U analiziranoj grupi pol je uticao na OS (Log Rank=4.93, $p=0.026$) i EFS (Log Rank=4.46, $p=0.035$). FLIPI je bio visoko statistički značajan u odnosu na OS (Log Rank=15.13, $p=0.001$) i EFS (Log Rank=14.39, $p=0.001$) (Grafikon 33). Trogodišnje preživljavanje u analiziranoj grupi je bilo 100% za bolesnike sa niskim rizikom, 82% srednjim i 70% sa visokim rizikom. Kod 8 bolesnika (12.3%) je verifikovana transformacija bolesti u DBKL.

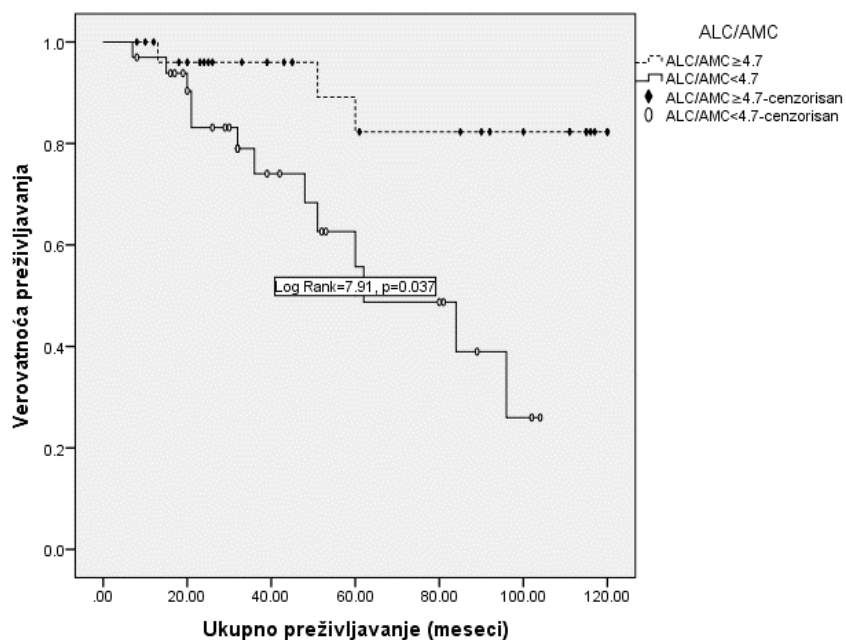


Grafikon 33. Preživljavanje bolesnika sa FL-om u odnosu na FLIPI.

Bolesnici sa $ALC \geq 1.1 \times 10^9/l$ su imali duži OS (medijana nije dostignuta vs. 51 meseci, Log Rank=15.07, $p < 0.0001$) i EFS (medijana nije dostignuta vs. 20 meseci, Log Rank=13.82, $p < 0.0001$). AMC nije uticalo na OS i EFS. $ALC/AMC < 4.7$ je povezan sa kraćim OS (62 meseci vs. medijana nije dostignuta, Log Rank=7.91, $p = 0.005$) i EFS (48 meseci vs. medijana nije dostignuta, Log Rank=4.34, $p = 0.037$) (Grafikon 34, 35).

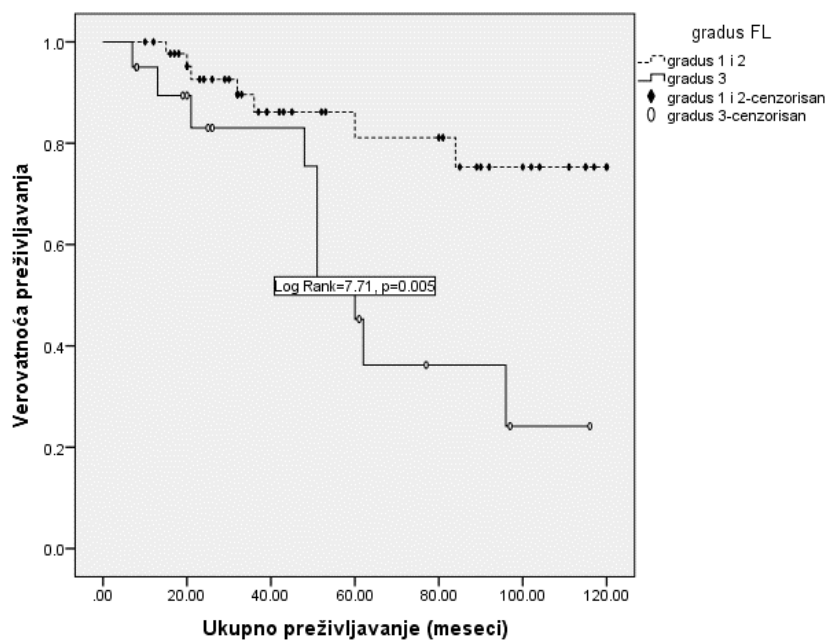


Grafikon 34. Preživljavanje bolesnika sa FL-om u odnosu na ALC.



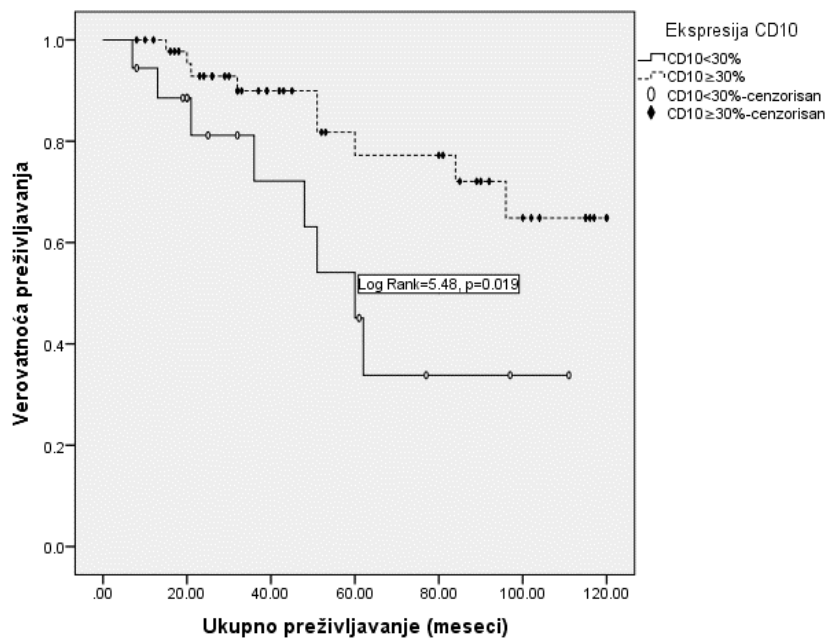
Grafikon 35. Preživljavanje bolesnika sa FL-om u odnosu na ALC/AMC.

Bolesnici sa gradusom 3 FL su imali lošiji OS (60 meseci vs. medijana nije dostignuta, Log Rank=7.71, p=0.005) i EFS (45 meseci vs. medijana nije dostignuta, Log Rank=7.54, p=0.006) u odnosu na bolesnike sa gradusom 1 i 2 (Grafikon 36).



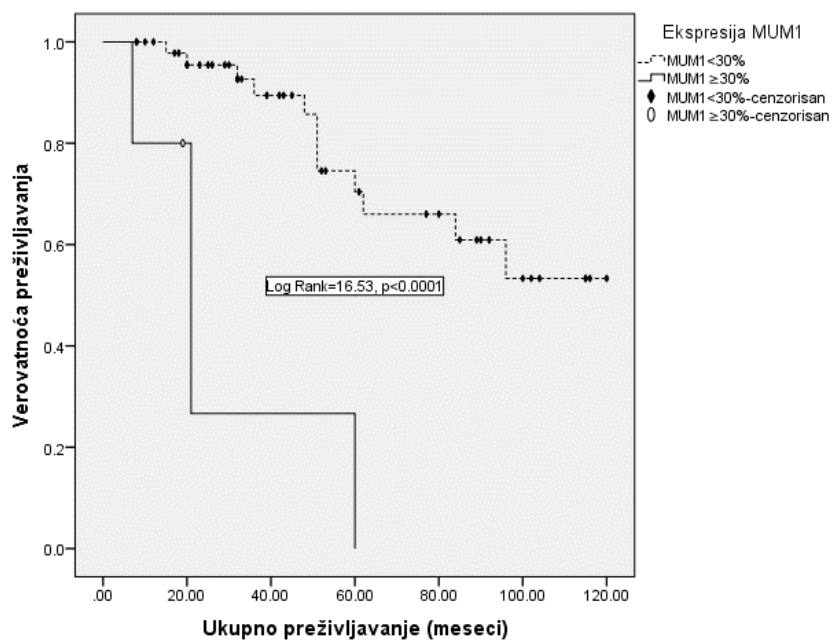
Grafikon 36. Preživljavanje bolesnika sa FL-om u odnosu na gradus limfoma.

Bolesnici sa pozitivnom ekspresijom CD10 su imali značajno duže OS (medijana nije dostignuta vs. 60 meseci, Log Rank=5.80, p=0.019) i EFS (medijana nije dostignuta vs. 54 meseci, Log Rank=4.43, p=0.035) (Grafikon 37). U odnosu na 1 i 3-godišnje preživljavanje bolesnici sa pozitivnom ekspresijom CD10 su imali 93% vs. 90%, nasuprot 81% vs. 72% kod bolesnika bez ekspresije CD10.



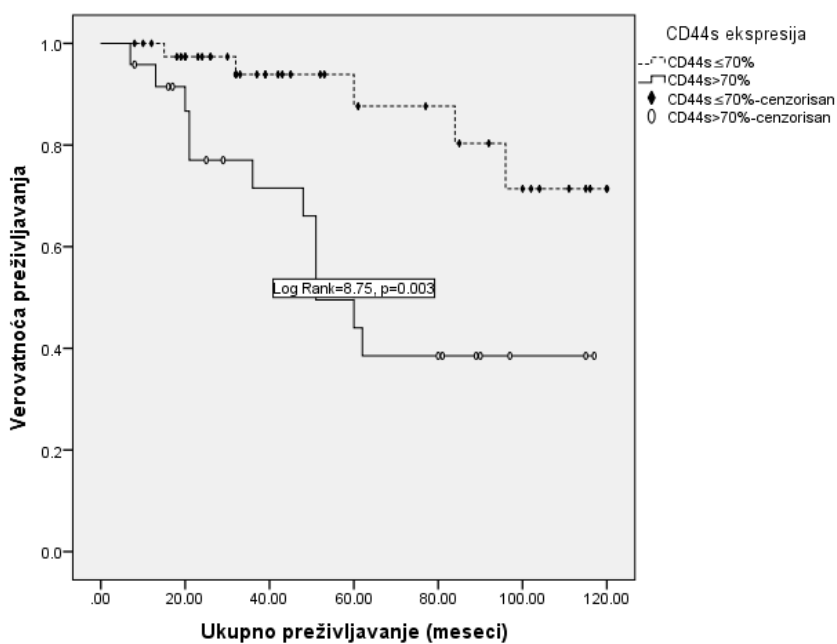
Grafikon 37. Preživljavanje bolesnika sa FL-om u odnosu na ekspresiju CD10.

Ekspresija BCL6 nije uticala na OS (p=0.86) i EFS (p=0.97). Bolesnici sa pozitivnom ekspresijom MUM1 su imali veoma loše ukupno preživljavanje (medijana 21 mesec, Log Rank =16.53, p<0.0001) i EFS (medijana 18 meseci, Log Rank=15.63, p<0.0001) u odnosu na bolesnike bez visoke MUM1 ekspresije (Grafikon 38).



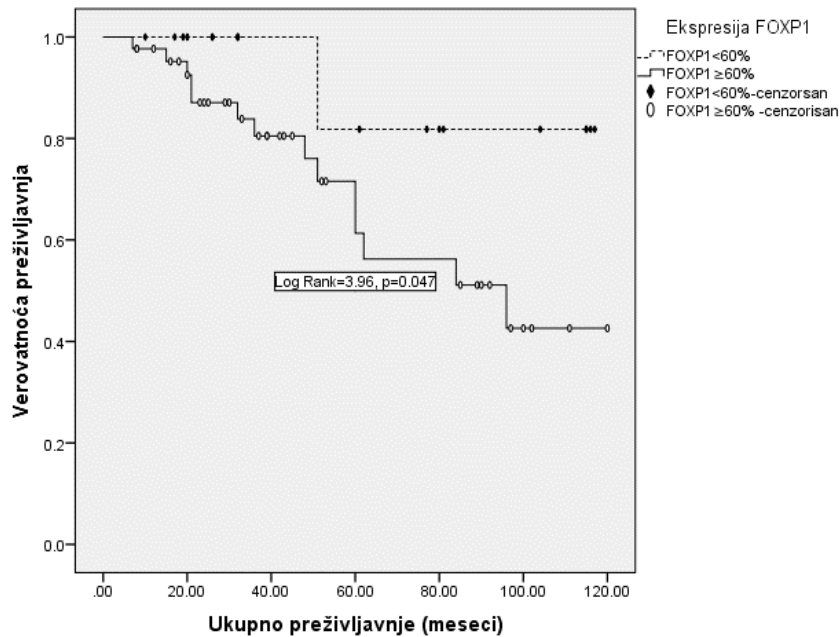
Grafikon 38. Slika. Preživljavanje bolesnika sa FL-om u odnosu na ekspresiju MUM1.

Pojačana MVD interfolikularne zone tumora nije uticala na OS ($p=0.70$) i EFS ($p=0.70$). Visokom ekspresija CD44s je povezana sa lošijim OS (medijana 51 meseci vs. medijana nije dostignuta, Log Rank=8.75, $p=0.003$) i EFS (45 meseci vs. medijana nije dostignuta, Log Rank=7.77, $p=0.006$) u odnosu nisku CD44s ekspresiju (Grafikon 39).



Grafikon 39. Preživljavanje bolesnika sa FL-om u odnosu na ekspresiju CD44s.

Kod bolesnika sa FL, ekspresija FOXP1 \geq 60% je povezana sa lošijim OS (Log Rank=3.96, p=0.047) i EFS (Log Rank=4.05, p=0.044) u odnosu na bolesnike sa nižom ekspresijom (Grafikon 40). Kod bolesnika sa visokom FOXP1 ekspresijom 1-godišnje i 3-godišnje preživljavanje iznosi 87% i 80%.



Grafikon 40. Preživljavanje bolesnika sa FL-om u odnosu na ekspresiju FOXP1 u tumorskim ćelijama.

U Cox-ovoj regresionoj analizi su razmatrane varijable koje su pokazale uticaj na preživljavanje kada su analizirane kako individualni parametric (pol, FLIPI, ALC, ALC/AMC, gradus limfoma, ekspresija FOXP1, MUM1 i CD44s). Među analiziranim parametima najznačajniji faktori koji su uticali na prognozu bili su FLIPI (95% CI, 1.84-37.06, p=0.006), pol (95% CI, 0.002-0.36, p=0.007), ALC/AMC (95% CI, 0.002-0.54, p=0.016), gradus FL (95% CI, 0.031-0.87, p=0.034) i visoka ekspresija FOXP1 (95% CI, 0.001-0.44, p=0.014), dok je vrednost ALC, ekspresije MUM1 i CD44s izgubila svoju značajnost (Tabela 29).

Tabela 29. Cox-ova regresiona analiza sa parametrima koji su značajni u univarijantnoj analizi (pol, FLIPI, ALC, ALC/AMC, gradus limfoma, ekspresija FOXP1, MUM1 i CD44s).

	B	Standardna greška	Wald	Stepen slobode	p	95.0% CI	
						Donja granica	Gornja granica
pol	-3.629	1.338	7.363	1	0.007	0.002	0.365
FLIPI	2.112	0.766	7.613	1	0.006	1.844	37.065
ALC	-0.967	0.837	1.335	1	0.248	0.074	1.960
ALC/AMC	-3.313	1.380	5.759	1	0.016	0.002	0.545
Gradus FL	-1.800	0.849	4.497	1	0.034	0.031	0.872
Ekspresija FOXP1 ($\geq 60\%$)	-4.072	1.662	6.005	1	0.014	0.001	0.443
Ekspresija MUM1 ($\geq 80\%$)	-1.520	1.027	2.191	1	0.139	0.029	1.637
Ekspresija CD44s ($>70\%$)	0.141	0.885	0.025	1	0.874	0.203	6.527

4.11. Mutacioni profil bolesnika sa primarnim DBKL CNS dobijen upotrebom analize genskog sekvencioniranja

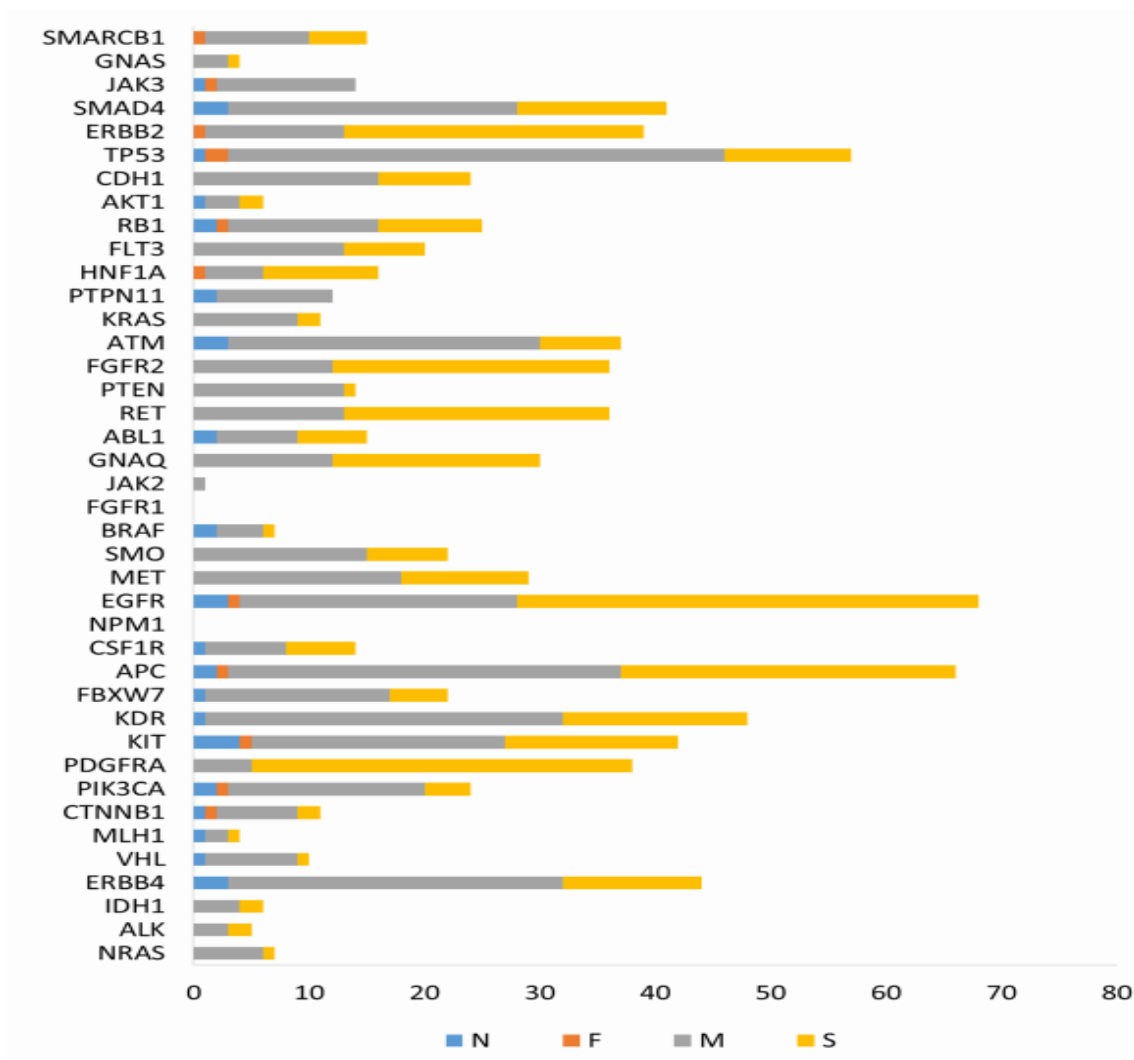
U cilju određivanja mutacionog profila 19 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a obrađeno je 6.65×10^8 bp. Prosečna pokrivenost visoko kvalitetnih sekvenci je bila 835x po ampikonu. Osam gena je eliminisano iz dalje analize zbog neadekvatne pokrivenosti i posledično je 187 ampikona iz 40 gena korišćeno u postupnoj analizi. Varijante su identifikovane u relaciji sa referentnim genomom korišćenjem Bajesovog pristupa i poređenjem sa dostupnim genetičkim bazama varijanti. U okviru analize detektovana je visoka stopa mutacija u pojedinim genima koji su imali ≥ 40 mutacija po genu identifikovanih u kodirajućim regionima 7 ciljnih gena uključujući ERBB4, KIT, KDR, APC, EGFR, TP53 i SMAD4. U genima NPM1 i FGFR1 nije detektovana nijedna mutacija, dok su geni MLH1, JAK2 i GNAS imali ispod 5 mutacija (Tabela 30).

Tablela 30. Identifikacija 28 gena u odnosu na broj mutacija - protein kodirajućih (nonsense, frameshift and missense) kod najmanje 5 od 19 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a.

Gen	Broj mutacija	Broj pacijenata
TP53	46	19
KDR	32	13
KIT	27	11
ERBB4	32	10
EGFR	28	10
FBXW7	17	10
APC	37	9
ATM	30	9
MET	18	9
JAK3	14	9
RET	13	9
PIK3CA	20	8
RB1	16	8
ERBB2	13	8
GNAQ	12	8
SMAD4	28	7
CDH1	16	7
SMO	15	7
PTEN	13	7
SMARCB1	10	7
CSF1R	8	7
FLT3	13	6
FGFR2	12	6
VHL	9	6
CTNNB1	9	6
ABL1	9	6
KRAS	9	5
HNF1A	6	5

Detektovano je ukupno 1247 varijanti, od kojih je 825 varijanti bilo u kodirajućim regionima i 422 u ne-kodirajućim. Među njima 38 su bili mali indeli, a 1209 SNV-ovi. U skladu sa biološkim značajem mutacija utvrđeno je da su nonsense (N), frameshift (F) i missense (M) mutacije u preko 80% detektovane u 8 sledećih gena: CTNNB1, PIK3CA,

PTEN, ATM, KRAS, PTPN11, TP53 i JAK3 (Grafikon 41). Preko 30 NFM mutacija je detektovano u ciljnim sekvencama 5 gena ERBB4, KDR, APC, ATM, and TP53) (Grafikon 41).

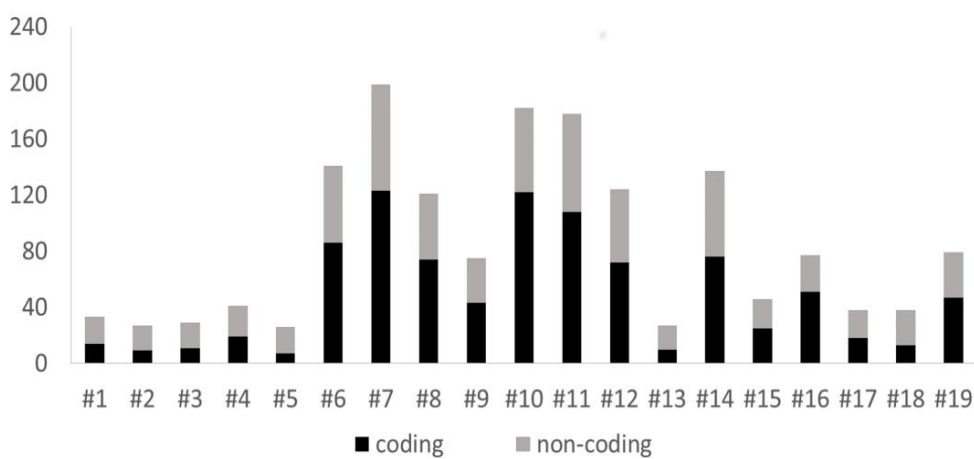


Grafikon 41. Broj mutacija po ciljnom genu. Distribucija nonsense (N), frameshift (F), missense (M), and synonymous (S) mutacija u kodirajućim regionima ciljnih gena.

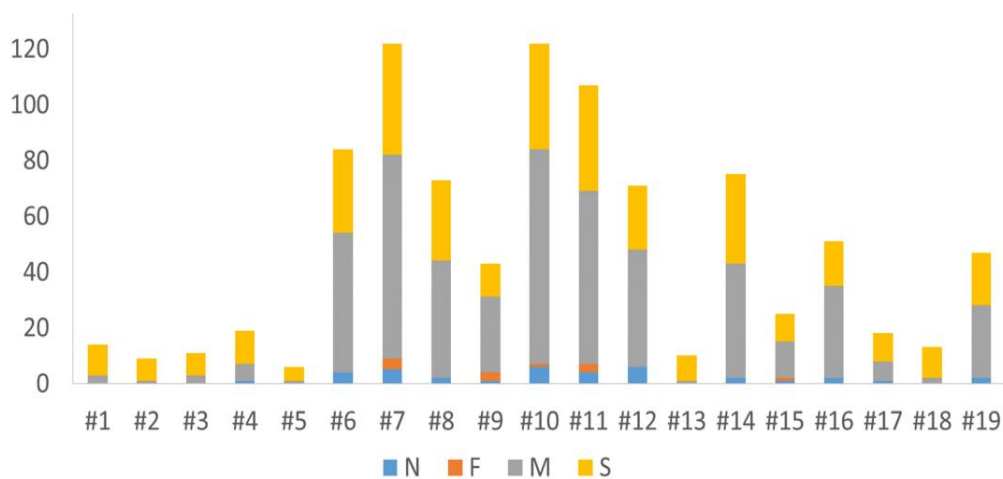
U analiziranom uzorku je identifikovano ukupno 920 mutacija u kodirajućim regionima (medijana 43, opseg 6-122) i 690 mutacija u ne-kodirajućim regionima (medijana 26, opseg 17-76) (Grafikon 42 a). Od svih bolesnika uključenih u analizu, ukupno 559 mutacija u kodirajućim regionima (medijana 28, opseg 1-84) su bile udružene sa genima koji kodiraju proteinske molekule uključujući među njima i NFM mutacije

(Grafikon 3C). Četiri bolesnika je imalo preko 50 NFM mutacija (#6, #7, #10 i #11 (Grafikon 42b). TP53 je jedini gen koji je bio mutiran kod svih 19 bolesnika sa prosečno 2 NFM mutacije (opseg 1-5). Najmanje jedna NFM mutacija po pacijentu je bila prisutna u sledećih 8 gena ERBB4, PIK3CA, KIT, KDR, APC, EGFR, SMO, ATM i TP53.

a)



b)



Grafikon 42. Broj mutacija po bolesniku sa primarnim DBKL CNS-a. Ukupan broj mutacija u kodirajućim i nekodirajućim regionima testiranih NGS-om (a). Distribucija nonsense (N), frameshift (F), missense (M), i synonymous (S) mutacija u kodirajućim regionima ciljnih gena (b).

U preko 50% (10/19) bolesnika pronađeno je preko 20 NFM mutacija u TP53, KDR, KIT, ERBB4 i EGFR. APC i ATM su bili geni u kojima je verifikovana visok broj mutacija od 37 odnosno 30. Kod 9 bolesnika sa visoko mutiranim ATM genom detektovano je 1234 mutacija sa medijanom od 137 (opseg 75-199) i u preostalih 10 bolesnika bez mutacija u ATM genu je identifikovano 384 mutacija sa medijanom od 35.5 (opseg 26-79).

Analizirajući pojedinačno svaki gen kod kojih je verifikovana neka NFM mutacija (ERBB4, PIK3CA, KIT, KDR, APC, EGFR, SMO i ATM) nije uočena korelacija sa kliničkim ni imunohistohemijskim parametrima.

Analiza preživaljavnja je ukazala na potencijalnu povezanost pojedinih NMF mutacija sa ishodom bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a. Naime, misense mutacija u genu ATM je verifikovana kod 8 bolesnika i bila je povezana sa kraćim trajanjem EFS-a (Log Rank=4.39, $p=0.036$), ali ne i OS-a ($p>0.05$) (Grafikon 43).

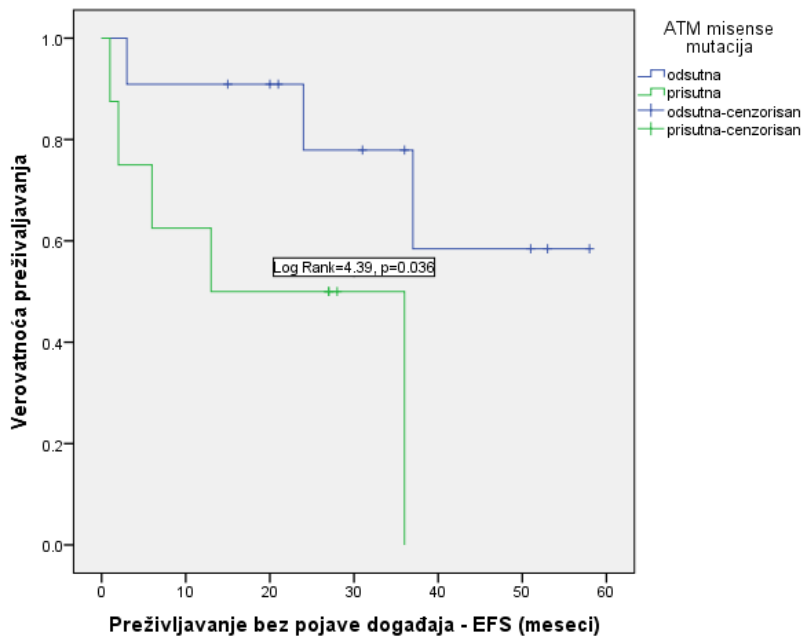
Nonsense mutacija u APC genu je verifikovana kod dva bolesnika koji su imali značajno lošiji OS (Log Rank=7.24, $p=0.007$) i EFS (Log Rank=9.0, $p=0.003$) u odnosu na ostatak grupe (Grafikon 44).

Osam bolesnika je imalo missense mutaciju u genu PTEN sa graničnim uticajem na OS (Log Rank=3.62, $p=0.057$) i bez uticaja na EFS ($p>0.05$). Uočeno je da je od 3/4 bolesnika sa GCB podtipom imalo misens mutciju u PTEN genu.

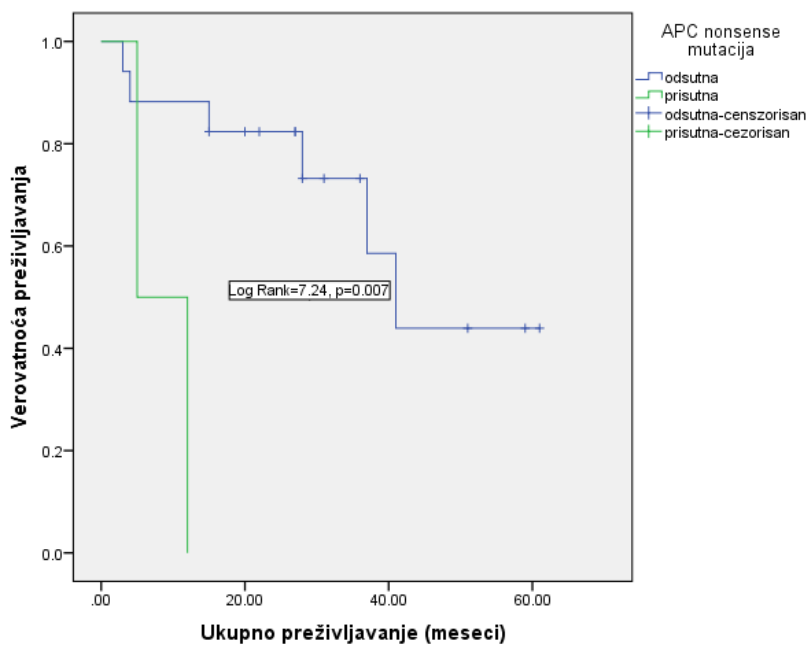
Misense mutacija u genu SMO je pronađena kod 9 bolesnika koji su imali značajno lošiji OS (Log Rank 5.72, $p=0.017$) i EFS (Log Rank=6.46, $p=0.011$) u odnosu na bolesnike bez mutacije. Takođe utvrđeno je da prisustvo visokorizičnih mutacija u SMO genu koreliraju sa ranijom pojavom recidiva bolesti (Fišerov test tačne verovatnoće $p=0.023$).

Samo dva bolesnika su imala nonsense mutaciju u genu ERBB4 i značajno lošiji OS (Log Rank 6.67, $p=0.01$) i EFS (EFS Log Rank 8.34, $p=0.004$) u odnosu na bolesnike bez mutacije.

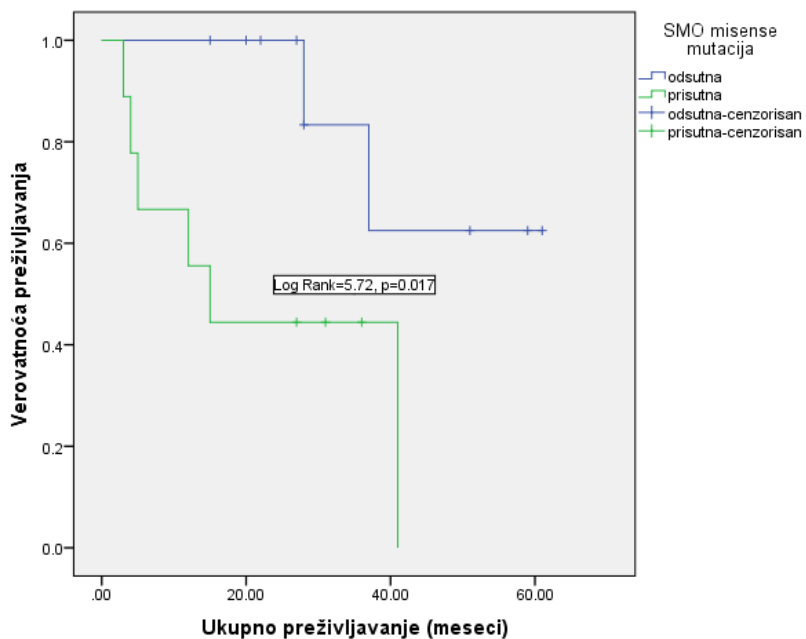
Samo jedan bolesnik je imao frameshift mutaciju u genu KIT i smrtni ishod unutar godinu dana.



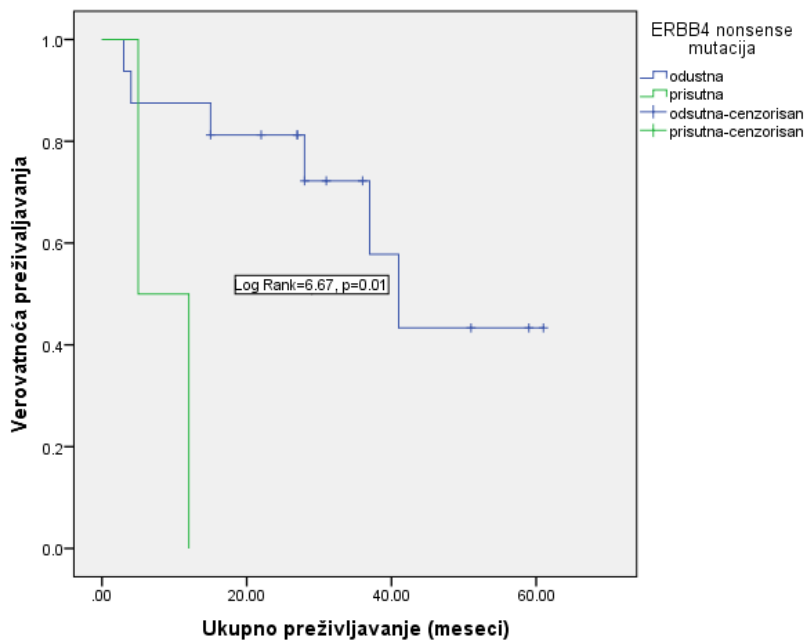
Grafikon 43. Analiza preživljanja kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS u odnosu na misense mutaciju u ATM genu.



Grafikon 44. Analiza preživljanja kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS u odnosu na nonsens mutaciju u APC genu.



Grafikon 45. Analiza preživljanja kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS u odnosu na misense mutaciju u genu SMO.



Grafikon 46. Analiza preživljanja kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS u odnosu na nonsense mutaciju u ERBB4 genu.

5. DISKUSIJA:

Difuzni B krupnoćelijski limfom predstavlja heterogenu bolest sa veoma varijabilnom prognozom. Iako oko 60% ovih bolesnika biva izlečeno primenom imunochemioterapije, veliki procenat njih doživi relaps bolesti ili ima primarno rezistentno oboljenje koje je često fatalno. Bolesnici sa primarnim limfomom centralnog nervnog sistema imaju izuzeno lošu prognozu uprkos naprecima načinjenim na terapijskom nivou. Bolesnici sa folikularnim limfomom uprkos indolentnom toku bolesti mogu imati česte recidive kao pojavu transformacije oboljenja u DBKL, veoma agresivnu formu bolesti sa lošim ishodom. Ova studija je osmišljena u cilju prepoznavanja dostupnih kliničkih i patoloških parametara koji mogu izdvojiti grupu bolesnika sa nepovoljnim ishodom. Metodom NGS-a smo pokušali da doprinesemo razjašnjavanju genetske osnove agresivnosti primarnog DBKL CNS-a.

Medijana starosti bolesnika sa DBKL se u analiziranim populacijama u literaturi se kretala od 47 do 66 godina. U pogledu starosti, grupa u našoj studiji je imala prosečnu vrednost od 59 godina što je više u odnosu na prosečnu starost bolesnika Dalekog istoka gde su Shen i sar. prijavili medijanu od 47 godina (18-79 godina) i niže u odnosu na Zapadnu Evropu gde su Hasselblom i sar. verifikovali prosečnu starost od 66 godina^{168,169}. Prosečna starost bolesnika sa primarnim DBKL CNSa je bila 53.5 godine što je mlađe životno doba u poređenju sa literaturnim podacima gde je medijana starosti 60 godina⁶⁵. Medijana starosti bolesnika sa FL u studiji Behl i sar. je iznosila 56.6 godina, a Solal Celigny i sar. 56 godina, dok je u naša analizirana grupa imala nešto nižu medijanu od 54 godine¹⁴⁴. Uopšteno, naši bolesnici su u poređenju sa zemljama Zapadne Evrope imali pojavu analiziranih maligniteta u mlađoj životnoj dobi što je prevashodno pored moguće genetske predispozicije povezano i sa socijalno-ekonomsko-političkom situacijom. Bolesnici starije životne dobi, naročito stariji od 70 godina, imaju lošiji terapijski ishod i preživljavanje u odnosu na mlađe bolesnike što je pre svega posledica prisustva komorbiditeta, posledičnog subdoziranja, a ne prirodne agresivnosti limfoma u stajem životnom dobu¹⁰⁵. Naša analiza kod bolesnika sa DBKL, primarnim DBKL CNS-a i FL nije pokazala uticaj starosti na preživljavanje prevashodno zbog maloga broja bolesnika koji su imali visok komorbiditetni indeks i dominacije populacije bolesnika mlađeg životnog doba (7.8% sa DBKL, 4.8% sa primarnim DBKL CNS-a i 6.2% sa FL).

U odnosu na klinički stadijum, I i II Ann Arbor stadijum je imalo 48.7% bolesnika, a III i IV 51.3% što je više od studije Hasselblom i sar. koji su imali 39% bolesnika u uznapređovalom stadijumu ¹⁶⁹. Naši podaci odgovaraju nađenoj učestalosti u većini ostalih studija gde se broj bolesnika u III i IV stadijumu kreatao do 53% ¹⁶⁸. Klinički stadijum je u studiji Shen i sar. označen kao nezavistan prognostički parametar u preživljavanju bolesnika sa DBKL ¹⁶⁸. Naši bolesnici u uznapređovalom Ann Arbor kliničkom stadijumu su takođe imali lošije preživljavanje. Većina bolesnika kao što je i slučaj i u našoj studiji ima dijagnostikovani FL u uznapređovalom stadijumu.

U našoj analizi je ženski pol dominirao kod bolesnika sa DBKL (52.2%) i primarnim DBKL CNS-a (68.1%), dok je skoro podjednaka zastupljenost bila u grupi sa FL (muškarci 50.8%, žene 49.2%). Većina studija pokazuje ipak blagu predominaciju muškog pola, mada je studija Gratzingera prikazala blagu predominaciju ženskog pola ¹⁷⁰. Prognostički značaj pola nije jasno definisan, ali postoje studije koje pokazuju da žene imaju bolju prognozu, koja je uzrokovana sporijim klirensom leka (rituksimaba) i njegovim dužim efektom ¹⁰⁶. U našoj analizi pol je jedino uticao kao individualni parametar na preživljavanje kod bolesnika sa FL, ali je u multivarijantnoj analizi izgubio svoju značajnost.

B simptomatologija koja uključuje prisustvo povišene telesne temperature, noćnog preznojavanja, svraba po koži i/ili gubitka telesne težine preko 10% za šest meseci se javlja u do 60% bolesnika sa DBKL. U našoj studiji bolesnici sa prisutnim B simptomima su imali značajno lošiji OS i EFS, što je verovatno posledica lošeg performans statusa s obzirom na nađenu udruženost ova dva parametra (Kendall $\tau=0.360$, $p=0.0001$). Kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS je nađena niska učestalost B simptoma (13.6%), ali su ovi bolesnici imali mahom izraženu neurološku simptomatologiju. Prisustvo B simptoma kod ove grupe kao i kod FL nije bilo udruženo sa preživljavanjem.

Komorbidity predstavljaju pridružene bolesti koje su označene kao značajan faktor koji dovodi do lošijeg preživljavanja bolesnika sa limfomom. Postoji više skala koja boduju značaj svakog ponaosob komorbidityenog stanja. U našoj analizi je korišćena jednostavna i široko upotrebljavanja skala prema Charlson komorbidityetnom skor ¹⁰⁴. Uticaj komorbidityeta nije pronađeni u našoj studiji zbog veoma malog broja bolesnika koji su imali $CCI \geq 2$.

Analizirani bolesnici sa DBKL koji su imali loš ECOG PS ≥ 2 (29.5%) su imali značajno lošije ukupno preživljavanje ali i EFS. Bolesnici sa primarnim DBKL CNS u

većinom imali loš performans status (77.3%) što je mahom oslikavalo lokalizaciju tumora CNS-a i posledičnu neurološku simptomatologiju. Najveći broj naših bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a je naprezentaciji imao slabost ekstremiteta 59%, mučninu i/ili povraćanje 45.4% glavobolju 36.4%), otežan govor 36.4%, kognitivnu izmenjenost 22.7% i diplopije 29.1%. Navedene kliničke manifestacije su mahom zavisile od mesta lokalizacije⁶⁴. U literaturi se opisuju fokalni neurološki deficiti kod 50-80% bolesnika, dok se psihijatrijski simptomi mogu javiti kod 30% slučajeva⁸. Prisustvo single lezija u moždanom parenhimu je bila prisutna kod 54.5% naših bolesnika, što je u skladu sa literaturnim podacima gde se kod oko 60% bolesnika se verifikuje jedna tumorska lezija od čega njih 48% ima zahvaćenost jedne od moždanih hemisfera Kod bolesnika sa FL ECOG PS \geq 2 (24.6%) je uticao na kraći period bez progresije bolesti. Prognostički značaj ECOG PS je prepoznat u većem broju radova, zbog čega je i uvršćen u aktuelne prognostičke indekse¹⁹⁻²².

U većini studija “bulky” bolest se označava kao prisustvo tumorske mase veće od 7 cm, što je bila granica koja je korišćena i u našoj studiji kojom je verifikovano prisustvo bulky bolesti kod 19.1% bolesnika sa DBKL i 32.3% kod bolesnika sa FL. Od uvođenja rituksimaba pojedine studije su naglasile značaj prisustva velike tumorske mase kao negativnog prognostičkog parametra kod bolesnika sa DBKL¹⁷¹. Međutim naša studija nije potvrdila značaj velike tumorke mase na preživljavanje kod bolesnika sa DBKL. Značaj bulky bolesti u osoba sa FL u našoj studiji nije uticao na preživljavanje, mada je njegov uticaj teže definisati uzimajući u obzir mali broj bolesnika u neuznapredovalom stadijumu. Očekivano, bolesnici koji su postigli povoljan terapijski odgovor na inicijalnu terapiju su imali očekivano značajno duže ukupno preživljavanje kao i EFS.

Unazad više od dvadeset godina se u cilju procene prognoze koristi IPI koji stratifikuje bolesnike u četiri kategorije sa različitim 5-godišnjim preživljavanjem grupe niskog rizika od 70%, srednje niskog rizika 51%, srednje visokog 40% i visokog 26%¹⁸. U našoj analiziranoj grupi IPI je zadržao svoj prognostički značaj, ali nije bio dovoljno senzitivna u prepoznavanju četiri grupe rizika, zbog čega smo poredili grupu sa niskim i niskim srednjim rizikom u odnosu na bolesnike sa srednje visokim i visokim rizikom. U ovakvoj podeli postojala je značajna razlika u preživljavanju ovih bolesnika. Manje studije su takođe potvrdile da IPI u eri rituksimaba nije u mogućnosti da jasno stratifikuje bolesnike u inicijalno navedene kategorije¹⁹⁻²². Međutim meta-analiza Zieperta i sar. je na osnovu

1062 bolesnika iz tri studije (MINT, RICOVER-60, Mega CHOEP) potvrdila doprinos rituksimaba u preživljavanju kao i prognostički značaj IPI-ja⁹⁵. U odnosu na ovu studiju, naša analiza je pokazala nižu učestalost bolesnika sa niskim rizikom (57% vs. 40.9%), a višu ostalih rizičnih kategorija - srednje niskog (21% vs. 27%), srednje visokog (17% vs. 20.9%) i visokog rizika (10% vs. 11%). Sa uvođenjem rituksimaba, IPI je doživeo više revizija u cilju boljeg prepoznavanja visokorizičnih bolesnika¹⁹⁻²². Sehn i sar. su analizirajući 365 bolesnika lečenih imunohemioterapijom predložili reviziju IPI-ja (R-IPI) u okviru koga su razdvojili bolesnike na grupu niskog rizika (10%), intermedijernog rizika (45%) i visokog rizika (45%) sa posledičnim 4-godišnjim preživljavanjem od 94%, 79% i 55%. Naša grupa se odlikovala većom učestalošću bolesnika niskog rizika (17.4%), srednjeg rizika (50.4%) i nižom visokog rizika (32.2%). Pokazano je da je R-IPI bio visoko statistički značajan u proceni OS i EFS. Četvorogodišnje preživljavanje analizirane grupe je bilo 89%, 60%, 41%. Hong i sar. su potvrdili značaj R-IPI-ja na ishod kod bolesnika lečenih R-CHOP¹⁷². Imajući u vidu da oko 20-30% bolesnika sa DBKL ne raguje na terapiju, u cilju još bolje stratifikacije bolesnika prema riziku, razvijen je NCCN-IPI koji na osnovu pet kliničkih parametara uključujući i gradacije za godine starosti i vrednost LDH, razvrstava bolesnike u 4 rizične kategorije sa boljim prepoznavanjem 5-godišnjeg preživljavanja grupe niskog rizika u odnosu na grupu visokog rizika (96% vs. 33%) u poređenju sa IPI-jem (OS, 90% vs. 54%)²⁰. Grupu niskog rizika je činilo 19% bolesnika, srednje niskog 42%, srednje visokog 31% i visokog 8% što se nije značajno razlikovalo od naše grupe gde je zabeležena sledeća distribucija bolesnika: 16.5%, 33%, 36.5%, 11.3%. Naša studija je pokazala visoku značajnost NCCN-IPI-ja u odnosu na OS i EFS zbog čega je ovaj indeks korišćen u regresionom modelu. Prognostički značaj NCCN-IPI-ja je potvrđen i u drugim studijama¹⁷³.

Iako široko korišćen kod bolesnika sa NHL-om, IPI nema prognostički značaj kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS⁶⁰. Pojedine studije su utvrdile prognostički značaj starosti, povišenih vrednosti LDH, kao i prisustva zahvaćenosti dubokih moždanih struktura (periventrikularni prostor, bazalne ganglije, moždano stablo, mali mozak), što je rezultovalo formiranjem IELSG skora^{60,174}. Validnost ovog skora je potvrđena u više studija, kao i u našoj uprkos ograničenom broju analiziranih bolesnika^{60,174}.

IPI je incijalno dizajniran za agresivne limfome, ali može biti korišćen kod indolentnih limfoma²². Međutim, neki važni prognostički parametri za FL nisu uvršćeni u

IPI i stoga samo oko 10-15% bolesnika se selektuje u grupu visokog rizika. Imajući ovo u vidu, Solal-Celigny i sar. su dizajnirali prognostički indeks za folikularne limfome – FLIPI. Na osnovu ovog skora razlikuju se tri grupe rizika nizak (36%), srednji (37%) i visok (27%) sa 5-godišnjim preživljavanjem od 90.6%, 77.6% i 52.5%²². Naša grupa bolesnika se odlikovala većom učeslalošću bolesnika u visokom riziku (40%), i nižem u srednjem (37%) i niskom stadijumu (20%). Iako je FLIPI dizajniran u vreme kada bolesnici nisu lečeni rituksimabom, studija Buskea i sar. je potvrdila prognostički značaj FLIPI-ja bolesnika sa uznapredovalim FL lečenih R-CHOP terapijom u prvoj liniji¹⁷⁵. U našoj studiji na 65 bolesnika sa FL u svim stadijumima bolesti, potvrđen je prognostički značaj FLIPI-ja koji je zadržao svoju vrednost i u multivarijantnoj regresionoj analizi.

Na osnovu GEP analize dva podtipa DBKL su identifikovana uključujući GCB i non-GCB podtip koji se razlikuju u pogledu preživljavanja i prisustva genskih aberacija koje pokazuju uključenost različitih onkogenih puteva u patogenezi tumora^{37,38}. Lenz i sar. su analizom 414 bolesnika identifikovali dve grupe bolesnika na osnovu GEP-a uključujući bolesnike sa povoljnom prognozom i stromalnim potpisom 1, koji reflektuje depoziciju vanćelijskog matriksa i infiltraciju ćelijama monocitne linije, kao i bolesnike sa stromalnim potpisom 2, koji reflektuje visoku gustinu krvnih sudova tumora, i imaju nepovoljni ishod. S obzirom da je upotreba imunohemioterapije u lečenju bolesnika sa DBKL modifikovala ishod, predmet brojnih studija je bila reprodukcija rezultata GEP-a u odnosu na ćelijsko protoklo (GCB vs. non-GCB) upotrebom različitih imunohistohemijskih algoritama kao i obeležavanje tumorske mikrosredine putem imunohistohemije imajući u vidu skupoću i nedostupnost GEP analize u rutinskoj praksi. U FL GEP analiza je potvrdila uticaj ne-neoplastičnih tumor infiltrirajućih T-ćelija i makrofaga na osnovu dva genska potpisa: IR-1 koji je visoko eksprimiran u T-ćelijama i IR2 koji je predominantno eksprimiran u monocitima.

Na bazi GEP analize, započela su istraživanja prognostičke uloge ALC, AMC, ALC/AMC kao lako dostupnih kliničkih parametara i biomarkera tumorske mikrosredine^{128,152,176–178}. Cox i sar. su pokazali da je $ALC < 0.84 \times 10^9/l$ na dijagnozi negativan prognostički faktor u odnosu na OS ($p=0.0004$), EFS ($p<0.0001$) i PFS ($p<0.0001$) i nezavistan od R-IPI-ja u multivarijantnoj analizi na osnovu čega su zanovali svoj model sastavljen iz ALC i R-IPI-ja¹⁷⁷. Drugu cut off vrednost za ALC su koristili Oki i sar. koji su pokazali, takođe da je nizak $ALC < 1.0 \times 10^9/l$ udružen sa nižom stopom postizanja CR, lošijim

OS i PFS-om ¹²⁸. Naša analiza je potvrdila prognostički uticaj ALC (cut off $1.1 \times 10^9/l$) kod bolesnika sa DBKL lečenih imunohemioterapijom na OS i EFS, ali ne i na stopu postizanja povoljnog terapijskog odgovora.

Prognostički značaj AMC na ishod je potvrđen u nekoliko studija, ali ne i našoj što može biti posledica upotrebe različitih cut off vrednosti ^{96,97}. Naša studija je pokazala povezanost AMC i terapijskog odgovora, ali ne i dužine preživljavanja. Nitta i sar. su nedavno utvrdili postojanje povezanosti AMC sa pojavom recidiva DBKL u CNS, što nije bio predmet našeg ispitivanja, ali smo dokazali prognostički uticaj AMC-a na ishod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a ¹⁷⁹.

Li i sar. su na osnovu 438 DBKL bolesnika lečenih imunohemioterapijom pokazali da je $ALC/AMC < 2.6$ nezavisni negativni prognostički parametar, zbog čega je navedena vrednost iskorišćena kao cut off vrednost u našoj analizi ¹⁶⁷. Prognostički značaj ALC/AMC su ispitivali Belotti i sar. sa cut off vrednošću od 2.4 čime su dokazali lošiji 2-godišnji PFS-om, ali ne i uticaj na postizanje CR⁹⁸. Lin i sar. su objedinili rezultate uticaja ALC/AMC u meta-analizu u okviru koje su analizirali 4198 bolesnika sa zbirnim odnosom hazarda za OS od 2.00 ($p=0.0001$) kod bolesnika lečenih R-CHOP protokolom i 1.12 ($p=0.479$) za bolesnik lečene CHOP. Odgovarajući odnos za EFS je bio 1.93 ($p=0.000$) i za PFS 2.31 ($p=0.000$) kod bolesnika lečenih R-CHOP ¹⁸⁰. Naša studija je potvrdila prognostički značaj ALC/AMC kako na OS tako i na EFS (OS, $p=0.005$; EFS, $p=0.006$).

Prognostički značaj ALC, AMC i ALC/AMC je analiziran i u FL. Naime, Behl i sar. su ispitivali bolesnike sa FL gradusa 1 i 2 lečenih na Mejo klinici, sa pretpostavkom da jači imuni sistem domaćina pred primenu imunohemioterapije rezultuje pojavom viših stopa povoljnog odgovora i dužim vremenom do progresije bolesti. Autori su pokazali da je medijana vremena do progresije bolesti bila 12.5 meseca sa boljim ishodom kod bolesnika koji su mali $ALC \geq 0.89 \times 10^9/l$ ($n = 40$) u odnosu na bolesnike sa $ALC < 0.89 \times 10^9/l$ ($n = 39$). Takođe ovi bolesnici su imali više stope postizanja CR ($p < 0.0001$) ¹⁴⁴. Siddiqui i sar. su potvrdili da je i viša cut off vrednost ($ALC \geq 1.0 \times 10^9/l$) udružena sa boljim OS, što je potvrđeno i u našoj studiji, ali bez uticaja na postizanje CR ¹⁸¹.

Marcheseli i sar. su na osnovu analize bolesnika lečenih u FOLL05 studiji pokazali da je vrednost AMC-a od značaja na preživljavanje (PFS), što nije bilo potvrđeno u studiji Watanabea i sar na 150 bolesnika sa FL lečenih imunohemioterapijom. ^{99,101}. Naša studija nije pokazala uticaj AMC kod bolesnika sa FL na postizanje povoljnog terapijskog

odovora, kao ni na dužinu preživljavanja (OS, EFS) što može biti posledica terapijskog uticaja rituksimaba, čime se prevazilazi prethodno verifikovan negativni prognostički značaj.

U odnosu na ALC/AMC postoji veća razlika u određivanju cut off vrednosti. Belotti i sar. su pokazali da je ALC/AMC>2 udružen da dužim periodom do početka lečenja u odnosu na ALC/AMC<2 ($p=0.0096$) kod bolesnika koji su bili na „*watch and wait*“ pristupu, dok je kod 92 bolesnika lečenih imunohemioterapijom sa superiornijim 2-godišnjim PFS-om ⁹⁸. Kumagai i sar. su analizirajući 99 bolesnika sa FL lečenih imunohemioterapijom utvrdili da je ALC/AMC<4.7 udružen sa lošijim PFS, što je poslužilo u našoj analizi u cilju određivanja presečne tačke kojom je pokazan uticaj ove vrednosti ALC/AMC i na OS i na EFS ¹⁰⁰. Osnovne razlike u odnosu na preživljavanje u analiziranim studijama su prevashodno posledica različitog terapijskog pristupa, heterogenosti analizirane populacije i različitih vrednosti presečnih tačaka koje su razmatrane u navedenim studijama.

Od trenutka kada su rezultati GEP-a ukazali na postojanje dva različita podtipa DBKL sa boljim preživljavanjem grupe GCB podtipa lečenih hemioterapijom, više studija je načinjeno u cilju reprodukcovanja ovih nalaza u lako dostupne imunohistohemijske algoritme ^{52,53,56,115}. GEP analiza je još uvek nedostupna u većini laboratorija i nije standardna metoda za određivanje podgrupa DBKL. Uprkos načinjenim naporima u formiranju imunohistohemijskih algoritama koji razlikuju GCB grupu od non-GCB grupe, postoje veoma nekonzistentni rezultati u pogledu preživljavanja ovih bolesnika u eri imunohemioterapije. Razlozi za ovakvu heterogenost su pre svega biološki i tehnički ⁵³. Naime, biološki faktori se odnose na heterogenost analizirane populacije i različite terapijske pristupe, dok tehnički podrazumevaju varijacije u bojenjima, razlike u analizi TMA uzoraka ili celih preseka, kao i tehnika fiksacije pločica ⁵³. Jedan od najčeće korišćenih algoritama je Hansov algoritam koji na bazi CD10, BCL6 i MUM1 razvrstava bolesnike na GCB podgrupu sa 5-godišnjim preživljavanjem od 76% i samo 34% non-GCB podgrupe ($p<0.001$). Prema Hans i sar. navedeni prognostički algoritam je bio nezavistan u multivarijntnoj analizi ⁵⁶. U analizu je bilo uključeno 152 bolesnika sa DBKL koji su lečeni hemioterapijom. Ovaj algoritam je pokazao najmanji stepen slaganja sa GEP-om sa stepenom slaganja od 86.3% u GCB podgrupi i 88.3% u non-GCB podgrupi ⁵¹. Muris algoritam (baziran na upotrebi BCL2, CD10, MUM1) i Nyman algoritam (koristi MUM1, FOXP1) imaju visoko slaganje sa GEP analizom ali nisku senzitivnost od 67% za Nyman

algoritam i specifičnost od samo 54% za Murisov algoritam ¹⁸². Choi algoritam na bazi sledećih antitela GCET, MUM1, CD10, BCL6 i FOXP1 razvrstava bolesnike u dve podgrupe, dok Visco Young tri markera algoritam koristi CD10, FOXP1 i BCL6 u podeli bolesnika ⁵². Najveći stepen slaganja sa GEP analizom su pokazali upravo Choi algoritam (88.6% za GCB podtip, 91.9% za non-GCB podtip) i Visco Youngov tri markera algoritam (93.1% za GCB, 92% za non-GCB)⁵¹. Choi algoritam koristi najviše antitela (pet antitela) koja nisu u često upotrebi što je i najveća mana uprkos visokom slaganju sa GEP analizom ¹⁸². Imajući u vidu navedeno i činjenicu da Visco-Young algoritam ima takođe visok stepen slaganja sa GEP analizom, odlučili smo se da u našoj studiji obradimo Visco-Young algoritam kao i najčešće korišćeni Hansov algoritam. Ova dva algoritma su pokazala visoko međusobno slaganje (proporcija slaganja 0.876) sa senzitivnošću od 91.7% i specifičnošću od 82.2%, što je potvrđeno i u studiji Coutinha i sar ⁵⁴.

Efikasnost navedenih algoritama u odnosu na preživljavanje kod bolesnika lečenih imunohemioterapom je predmet brojnih ispitivanja, što je rezultovalo kontradiktornim podacima ^{51,52,54}. Hansov algoritam se u pojedinim studijama nije pokazao prediktivan kod bolesnika lečenih imunohemioterapijom ^{172,53}. S druge strane, Fu i sar. su analizirajući 243 bolesnika sa DBKL (131 CHOP/112 R-CHOP) ukazali da je rituksimab poboljšao 3-godišnje preživljavanje kako u grupi bolesnika sa GCB podtipom tako i grupi sa non-GCB podtipom (85% vs. 69%, p=0.032) u odnosu na bolesnike lečene samo hemioterapijom (42% vs. 77%, p<0.001) ⁴⁶. Ova studija je potvrdila značaj Hansovog algoritma u eri rituksimaba, što je bio slučaj i u našoj studiji gde smo utvrdili 3-godišnje preživljavanje bolesnika sa GCB u odnosu na non-GCB podtip 71% vs. 50%. Naši rezultati su takođe potvrdili značaj Visco-Young tri markera algoritmu koji je formiran na osnovu analize 475 de novo DBKL bolesnika od strane Visco i sar. koji su pokazali razliku između dve podgrupe u odnosu na 5-godišnje OS (71±3% za GCB vs. 51±5% za non-GCB, p=0.003) i PFS (64±4% za GCB vs. 48±5% non-GCB, p=0.002), a koje se nije značajnije razlikovalo kada su grupe stratifikovane na osnovu GEP-a u odnosu na OS (69±3% za GCB vs. 53±5% za ABC, p=0.02) i PFS (64±3% za GCB vs. 46±5% za ABC, p=0.002) ⁵¹.

Naša dalja analiza je obuhvatila razmatranje prognostičkog značaja pojedinačnih imunohistohemijskih parametara. **CD10** je membranska metaloproteinaza koja se eksprimira na normalnim i malignim hematopoeznim ćelijama kao i nekim nemalignim ćelijama. Ima ulogu u regulisanju B ćelijske diferencijacije i pojavljuje se na pro-B ćelijama

tokom diferencijacije limfocita, a gubi se tokom sazrevanja B ćelije, i ponovo se pojavljuje tokom antigen zavisnog sazrevanja u germinativnom centru. Zbog navedenog predstavlja marker ćelije porekla germinalnog centra i polazni marker u definisanju ćelijskog porekla pojedinih imunohistohemijskih algoritama (Hans, Visco-Young)^{10,51,56}. U našoj grupi pozitivna ekspresija CD10 je verifikovana kod 27.5% bolesnika sa DBKL, što je nešto niže nego što je opisano u literaturi, dok je još niža ekspresija (19%) zapažena u grupi bolesnika sa primarnim DBKL CNS što odgovara činjenici da ovi bolesnici imaju najčešće non-GCB podtip limfoma. Pozitivna ekspresija CD10 je bila tipično prisutna u većini bolesnika sa FL¹⁰. U grupi DBKL CD10 je korelirala sa terapijskim odgovorom dok u grupi bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a i FL nije korelirala sa kliničko-patološkim markerima. Prognostički značaj CD10 nije jasno definisan s obzirom na kontradiktorne kliničke podatke. Naša studija je potvrdila nalaze Culpina i sar kao i Sjo i sar. koji su pozitivnu ekspresiju CD10 označili kao povoljan prognostički marker^{55,112}. U FL pozitivna ekspresija CD10 u našoj studiji je korelirala sa nižim gradusom i posledičnom povoljnijom prognozom, što je potvrdilo rezultate prethodnih istraživanja¹⁴⁸.

BCL6 je deo familije inhibitora transkripcije koji svoje efekte ostvaruje preko većeg broja gena koji kontrolišu ćelijski ciklus i diferencijaciju. Neophodan je u formiranju germinativnog centra i ima ulogu u olakšavanju somatske hipermutacije, kojim se generiše raznovrsnost antitela i povećava afinitet antigena supresijom apoptoze uzrokovane posredstvom p53, kao odgovor na oštećenje DNK. Ekspirira se u normalnim B ćelijama germinativnog centra i folikularnim T helper ćelijama^{24,33}. S obzirom na navedeno iskorišćen je kao marker porekla ćelija u imunohistohemijskim algoritmima^{51,52}. U DBKL se opisuje translokacija u regionu gena za BCL6 kao najčešća sa dobrom prognozom¹¹². BCL6 je označen kao marker povoljne prognoze¹⁸³. Studija Sjo i sar. je pokazala da je BCL6 povoljan prognostički marker kod bolesnika koji su lečeni primenom hemioterapije što je potvrdila i studija Wintera i sar. koji su na uzorku od 199 bolesnika utvrdili uticaj BCL6 na ishod bolesnika lečenih hemioterapijom, ali bez benefita kod bolesnika koji su lečeni R-CHOP. U ovoj studiji ekspresija BCL6 nije uticala na stopu postizanja povoljnog terapijskog odgovora¹⁸⁴. Istraživanje sprovedeno od strane Jovnovic Perunicic i sar. je pokazalo da značajan benefit kod bolesnika bez ekspresije BCL6 lečenih rituksimabom¹⁸⁵. Naša studija je pokazala bolje preživljvanje bolesnika sa DBKL i pozitivnom ekspresijom BCL6 u odnosu na bolesnike bez BCL6 ekspresije sa cut off vrednošću od 30%. Studija Culpina i sar. je

potvrdila povoljan prognostički značaj ekspresije BCL6, ali su autori podigli granicu za cut off vrednost na 60%⁵⁵. BCL6 u našoj grupi nije uticao na postizanje povoljnog terapijskog odgovora kod bolesnika sa DBKL kao ni kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a. Braaten i sar. su na 33 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a pokazali potencijalni prognostički značaj BCL6 na OS, što nije bilo potvrđeno u našoj studiji gde ekspresija BCL6 nije uticala ni na OS, EFS kao ni na postizanje povoljnog terapijskog odgovora¹⁸⁶. Ott i sar. su pokazali da se BCL6 češće eksprimira u višem gradusu FL, što nije bio slučaj sa našim rezultatima¹⁴⁷.

BCL2 je antiapoptotički gen, deo familije gena u koju još spadaju proapoptotički geni BID, BAD i BAX. Ima značajnu ulogu u normalnom razvoju i diferencijaciji B ćelija¹¹³. Prisustvo BCL2 ekspresije se verifikuje u nezrelim B ćelijama i memorijskim B ćelijama, uz privremen gubitak u ćelijama germinativnog centra¹¹⁴. Promene u genu BCL2 uključuju t(14;18)(q32;q21). Mutacije u ovom genu, s obzirom na njegovu antiapoptotsku funkciju, dovode do inhibicije apoptoze i omogućavanja preživljavanja tumorskih ćelija. Ekspresija BCL2 proteina u analiziranoj grupi je bila 63.3% kod bolesnika sa DBKL i 58.8% kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a, što je u skladu sa literaturnim podacima⁸. U eri pre rituksimaba, BCL2 je označen kao marker nepovoljne prognoze, ali sa uvođenjem imunohemioterapije podaci su kontradiktorni^{184,187}. Još su krajem 90-tih Gascoyne i sar. testirajući rearanžmane BCL2 gena i imunohistohemijsku ekspresiju utvrdili da je pozitivna ekspresija BCL2 udružena sa lošijim ishodom, što je kasnije potvrđeno u studiji Iqbala i saradnika^{188,115}. Takođe, Nyman i sar. su analizirajući 112 bolesnika sa DBKL pokazali da bolesnici sa pozitivnom ekspresijom BCL2 imali lošije preživljavanje u odnosu na bolesnike bez ekspresije BCL2 (OS 82% vs. 97%, p=0.034; EFS, 71% vs. 97%, p=0.0001)¹⁸⁹. Nasuprot navedenim rezultatima Winter i sar su analizirajući bolesnike lečene hemioterapijom i imunohemioterapijom, utvrdili da BCL2 ekspresija nije od značaja na preživljavanje u obe grupe. Mounier i sar. su potvrdili benefit od dodavanja rituksimaba hemioterapiji kod BCL2 pozitivnih bolesnika¹⁰⁷. Naša analiza je obuhvatila bolesnike lečene imunohemioterapijom u okviru koje nismo našli uticaj ekspresije BCL2 na OS, EFS kao ni njegovu povezanost sa terapijskim odgovorom, što je potvrdilo rezultate prethodno navedenih studija koje su indikovale prevazilaženje negativnog prognostičkog značaja ekspresije BCL2 u eri rituksimaba^{107,184}.

MUM1/IRF4 je onkogen koji pripada familiji Interferon regulatornih faktora (IRF4)^{8,10}. Aktivira se kao posledica translokacije t(6;14)(p25,q32). Ima ulogu u regulisanju sazrevanja, diferencijaciji imunih ćelija kao i odgovoru na različite patogene činioce, citokine i apoptozu. MUM1 se eksprimira u jedru B ćelija i plazma ćelija kao i ponekad u T ćelijama¹¹⁶. U skladu sa literaturnim podacima ekspresija u našoj grupi je pronađena u 49.8% bolesnika sa DBKL i 70.6% bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a¹¹⁶. Ekspresija MUM1 je pre uvođenja rituksimaba bio označen kao marker negativne prognoze, međutim studija Seki i sar. je potvrdila negativni prognostički značaj ekspresije MUM1 u bolesnika lečenih hemioterapijom, ali ne i imunohemioterapijom¹⁹⁰. U našoj grupi bolesnika koji su svi lečeni imunohemioterapijom pokazano je da rituksimab prevazilazi negativni prognostički značaj ekspresije MUM1 u pogledu OS, ali je udružen sa kraćim EFS-om. Nedavno je opisano da u FL povišena ekspresija MUM1 ima lošiji ishod¹⁵⁰. U našoj grupi samo 9.1% bolesnika je imalo ekspresiju MUM1 \geq 30% i odlikovali su se izuzetno lošim OS sa medijanom preživljavanja od 21 meseci i EFS sa medijanom od 18 meseci. Neophodna su dalja istraživanja u cilju utvrđivanja prognostičkog značaja MUM1 u eri rituksimaba.

FOXP1 je transkripcioni faktor koji ima ulogu u ranom B ćelijskom razvoju¹¹⁷. Od momenta kada je GEP analiza potvrdila da je FOXP1 mRNA ekspresija jedan od najznačajnijih markera ABC podtipa DBKL, više studija je sprovedeno u cilju određivanja prognostičkog značaja FOXP1¹¹⁷. Na osnovu navedenog postao je deo imunohistohemijskih algoritama za određivanje ćelijskog porekla^{52,115}. U cilju procene prognostičkog značaja ekspresije FOXP1 kao individualnog parametra, različite cut off vrednosti su korišćene što je za posledicu imalo diskrepantne nalaze. Visoka ekspresija FOXP1 je udružena sa lošijim ishodom kod DBKL i nekih "low grade" limfoma¹¹⁷⁻¹¹⁹. Analizirajući bolesnike sa DBKL, Nyman i sar. nisu našli povezanost ekspresije FOXP1 i ishoda kod bolesnika lečenih imunohemioterapijom ali su kao pozitivne slučajeve razmatrali samo one koji su imali visoku ekspresiju u limfomskim ćelijama i to sa 100% ćelija koje imaju izraženu, uniformnu nuklearnu ekspresiju¹⁸⁹. Nepovoljan prognostički značaj ekspresije FOXP1 kao individualnog parametra je razmatrana u studijama Banhama i sar. kao i Barransa i sar^{118,119}. U našoj studiji je potvrđeno da visoka ekspresija FOXP1 $>$ 80% ima negativan prognostički značaj u pogledu OS i EFS kod bolesnika sa DBKL i primarnim DBKL CNS-a. Uloga FOXP1 u FL nije dovoljno ispitana, ali je metodom qRT-PCR-a utvrđena povišena

ekspresija FOXP1 u FL. Naši rezultati impliciraju potencijalnu ulogu povišene ekspresije FOXP1 ($\geq 60\%$) na OS i EFS ali su neophodna dalja istraživanja na ovom polju.

Ki 67 (MIB-1) je nuklearni protein, marker proliferacije koji je eksprimiran u ćelijama u deobi, a odsutan je za vreme G0 faze. Zbog različitog procenta kojom je definisana Ki-67 pozitivnost, prognostički značaj ovog markera nije jasno utvrđen. Veoma oprečni podaci postoje u literaturi ¹⁰⁸. Treba imati u vidu da pojedini tumori sa niskim proliferativnim indeksom mogu biti rezistentni na terapiju, zbog prisustva većeg broja ćelija u G0/G1 fazi ciklusa ^{10,23}. Gaudio i sar. su pokazali da je visoka ekspresija Ki-67 ($\geq 80\%$) udružena sa lošijim OS i PFS, ali ima i kontradiktornih podataka ¹⁷¹. Naime Hasselblom i sar. su utvrdili da bolesnici sa Ki-67 $\leq 49\%$ imaju lošiji PFS i OS, nezavisno od drugih parametara ¹⁶⁹. U svakom slučaju, u našoj studiji nije nađena povezanost ekspresije Ki-67 kod bolesnika sa DBKL, primarnim DBKL CNS-a i FL ni sa analiziranim kliničkim ni imunohistohemijskim parametrima.

I pre nego što je GEP analiza potvrdila uticaj genskog potpisa 2 na ishod bolesnika sa DBKL, kao i mikrosredine FL predstavljene kroz IR-2, udružene sa neovaskularizacijom, angiogeneza je predstavljala značajno područje istraživanja. Neoangiogeneza je od značaja za tumorski rast, invazivnost i progresiju ^{120,121}. Značaj angiogeneze je teško utvrditi s obzirom na analiziranu heterogenu populaciju, primenjene različite terapijske pristupe kao i korišćenje različitih markera za označavanje krvnih sudova ¹²¹. Naime angiogeneza može biti analizirana upotrebom većeg broja metoda uključujući MVD, angiogenu molekularnu kvantifikaciju unutar tumora, zatim ekspresiju angiogenih receptora u tumoru, merenje angiogenih faktora u serumu ili urinu bolesnika sa malignitetom. Uloga angiogeneze u eri novih terapijskih modaliteta nije jasno definisana.

Cardesa-Salzmann i sar. su korišćenjem GEP analize i anti CD31 antitela za imunohistohemijsku procenu MVD, zaključili da visok MVD korelira sa nepovoljnom prognozom nezavisno od IPI-ja kod bolesnika sa DBKL lečenih imunohemioterapijom indikujući potencijalnu korist od primene antiangiogenih agenasa ⁵⁷. Takođe uočena je povezanost ABC podtipa DBKL sa višom MVD, što može biti posledica aktivacije NF- κ B puta, imajući u vidu da je NF- κ B transkripcioni faktor udružen sa brojnim aspektima angiogeneze regulišući nekoliko gena odgovornih za angiogenezu kao što su VEGF, IL-8, i između ostalog nekoliko metaloproteinaza ⁵⁷. Gratzinger i sar. su pokazali da je visoka ekspresija MVD, procenjena upotrebom anti CD34 antitela, povezan sa lošijim ukupnim

preživljavanjem kod bolesnika lečenih samo hemioterapijom, dok je rituksimab u kombinaciji sa CHOP značajno poboljšao preživljavanje uključujući i bolesnike sa povišenim MVD^{137,170}. Takođe isti autori su pokazali da je VEGFR2 je udružena sa lošijim OS, nezavisno od IPI-ja, dok je VEGFR1 udružen sa dužim preživljavanjem u grupi bolesnika lečenih CHOP ali ne i R-CHOP¹⁷⁰. U cilju procene MVD-ja u našoj analizi je korišćeno anti CD34 antitelo koje prepoznaje veći broj krvnih sudova u poređenju sa anti CD31 i anti Faktor VIII antitelima¹⁹¹. Analiza je pokazala da visok MVD ima povezanost sa lošijim ishodom ($p=0.001$) kada se posmatra kao individualni parametar, ali u kombinaciji sa drugim kliničkim parametrima njegova značajnost se gubi. Tačan mehanizam na koji rituksimab prevazilazi prethodno verifikovan negativan prognostički značaj visoke MVD nije jasan. Alshenawy je ukazao na varijabilnost MVD u zavisnosti od analiziranih histoloških tipova limfoma korišćenjem anti CD34 antitela kao i povezanost visoke MVD sa uznapredovalim kliničkim stadijumom i visokim proliferativnim indeksom Ki-67¹⁹². Navedeni rezultati nisu potvrđeni u našoj studiji u kojoj MVD nije korelirao sa visokim kliničkim stadijumom kao ni sa Ki-67, što može biti rezultat malog broja analiziranih slučajeva u prethodno navedenoj studiji (33 bolesnika sa DBKL). U tumorskom tkivu primarnog DBKL CNS često se viđa akumulacija malignih B ćelija oko krvnih sudova, ali bez jasnog prognostičkog značaja. He i sar. su upotrebom anti CD34 antitela pokazali da je prisustvo perivaskularnog tumorskog agregata u primarnom DBKL CNS udruženo sa višom stopom progresije bolesti i kraćim preživljavanjem u odnosu na bolesnike bez navedenog nalaza¹⁹³. U našoj studiji nije uočena korelacija povišene MVD sa progresijom bolesti kao ni sa ishodom, što je najverovatnije posledica terapijskog pristupa.

Jorgensen i sar. su u studiji koja je uključila 107 bolesnika sa FL uočili značajno višu mikrovaskularnu gustinu interfolikularno u odnosu na intrafolikularnu zonu, što je bio slučaj i u našoj studiji¹⁵³. Ovakav nalaz reflektuje rezultat GEP-a i IR-2 potpisa imajući u vidu da makrofagi/monociti imaju značajnu ulogu u angiogenezi, brojučano koreliraju sa MVD u limfomima i mogu da proizvode angiogene i inflamatorne medijatore koji vrše ushodnu regulaciju ekspresije angiogenih molekula. Autori su pokazali da je visok interfolikularni MVD bio povezan sa značajno lošijim OS-om i EFS-om ($p=0.025$, $p=0.013$). Takođe, ovi bolesnici su imali veću učestalost pojave transformacije bolesti u agresivniji oblik odnosno u DBKL ($p=0.02$). Intrafolikularna MVD nije bila povezana sa IPI-jem, gradusom FL kao ni sa ishodom¹⁵³. Rezultati naše studije ne podržavaju navedene rezultate,

imajući u vidu na nismo našli uticaj visoke MVD na ishod kao ni na pojavu transformacije FL u DBKL. Razlog ovakvih rezultata može biti u činjenici da su Jorgensen i sar. analizirali istorijsku grupu koja je lečena samo radioterapijom ili hemioterapijom (leukeran, CHOP-like protokoli) u uznapredovalom stadijumu, dok su bolesnici u našoj studiji lečeni primenom imunohemioterapije. Rituksimab u kombinaciji sa hemioterapijom najverovatnije prevazilazi prethodno verifikovani negativni prognostički značaj visoke interfolikularne MVD.

Porodica CD44 transmembranskih glikoproteina je udružena sa proteinima koji imaju ulogu u ćelijskoj adheziji, rastu, preživljavanju, diferencijaciji i angiogenezi. U toku angiogeneze, proces formiranja novih krvnih sudova iz postojećih, velikim delom je rezultat interakcije HA i CD44 u procesu zaceljivanja krvnih sudova i posledičnog tumorskog rasta¹²³. CD44s predstavlja standardnu formu 10 od 20 egzona, čiji se ostalih 10 egzona iseca u cilju formiranja varijanti CD44. Prethodne studije su pokazale da povezanost ekspresije CD44s i OS i EFS kod bolesnika sa DBKL lečenih hemioterapijom^{194,124}. U eri rituksimaba, prognostički značaj ekspresije CD44s nije dovoljno poznat. Wei i sar. su analizirali 117 de novo bolesnika sa DBKL, od kojih je 53 lečeno primenom CHOP protokola, dok je ostalih 64 lečeno primenom R-CHOP protokola¹²⁵. U celoj kohorti bolesnika uočeno je da je CD44s korelirao sa lošijim OS ($p=0.002$) i EFS ($p=0.0011$) što je takođe primećeno u grupi koja je lečena samo CHOP protokolom (OS, $p=0.021$; EFS, $p=0.044$). Kada je analizirana R-CHOP grupa posebno, nije uočen uticaj ekspresije CD44s na OS ($p=0.095$) i EFS ($p=0.21$)¹²⁵. U našoj studiji nije uočena povezanost visoke CD44s ekspresije sa OS i EFS, što može biti posledica uticaja rituksimaba koji prevazilazi negativni prognostički uticaj visoke ekspresije CD44s. Takođe, imajući u vidu zbrisanu strukturu primarnog tkiva koje je infiltrirano tumorom, samo do 10% ćelija mikrosredine je ekspimiralo CD44s. Nagel i sar. su pokazali udruženost CD44s i CD44v sa non-GCB podtipom, što je potvrdila naša studija¹⁹⁴. He i sar. su analizirali patohistološke uzorke 62 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a utvrdivši lošije preživljavnje bolesnika sa prisustvom akumulacija tumorskih ćelija oko krvnih sudova, a koje su visoko ekspimirale CD44s¹⁹³. Yuan i sar. su analizirali 20 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a utvrdivši ekspresiju CD44s u 19 slučajeva i korelaciju sa non-GCB podtipom¹⁹⁵. Braaten i sar. na osnovu analize 33 bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a su utvrdili prisustvo CD44s pozitivnosti u 35% bolesnika, ali bez korelacije sa ishodom bolesti, što je potvrđeno i u našoj studiji¹⁸⁶.

Uticaj ekspresije CD44s na tumorskim i stromalnim ćelijama kod bolesnika sa FL nije detaljno analiziran u literaturi. Higashi i sar. su analizirali 28 bolesnika sa FL podelivši ih u četiri grupe i to intrafolikularnu, infiltrativnu, parcijalno folikularnu i minimalno folikularnu grupu prema Likes Collins klasifikaciji ¹⁵⁴. Utvrđena je ushodna regulacija CD44s sa difuznom evolucijom FL ¹⁵⁴. Naša studija je pokazala prognostički značaj CD44s kao individualnog parametra na ishod bolesti, ali bez povezanosti ekspresije CD44s i gradusa FL. Tumorsko tkivo se odlikovalo varijabilnom ekspresijom CD44s na tumorskim ćelijama i veoma visokom ekspresijom u stromalnim ćelijama ($\geq 90\%$).

Uprkos značajnom napretku načinjenom na molekularno-genetskom polju, polju mikrosredine i lečenja primarnim DBKL CNS, dalja unapređenja su mahom usporena zbog veoma male incidence oboljenja, lošeg kliničkog stanja bolesnika na prezentaciji, malih dijagnostičkih uzoraka i nedostatka prospektivnih istraživanja ^{65,174,196}. Od trenutka uvođenja intravenske primene visokih doza MTX u lečenju bolesnika sa primarnim DBKL CNS, postignut je značajan napredak u preživljavanju ovih bolesnika u poređenju sa ranijom primenom samo zračne terapije koja je dovodila do trenutne i privremene kontrole bolesti ^{174,197}. U odnosu na hirurški pristup oboljenju, u literaturi je većim brojem studija potenciran rizik od opsežne tumorske resekcije limfoma mozga u vidu razvoja brojnih komplikacija kao što su neurološki deficiti bez značajnijeg poboljšanja OS ^{174,196}. Međutim u jednoj od najvećih studija Wellera i sar. na uzorku od 526 bolesnika sa primarnim i sekundarnim limfomom mozga, pokazan je potencijalni benefit od hirurškog pristupa ¹⁴¹. U našoj studiji su bolesnici sa kompletnom tumorskom resekcijom imali značajno bolje preživljavanje u odnosu na bolesnike kod kojih je učinjena samo parcijalna resekcija ili biopsija tumora. Ovakav rezultat može biti posledica napretka načinjenog na polju neurohirurgije kao i činjenice da su operisani bolesnici imali najčešće singl lezije i bili u boljem opštem stanju. Naši rezultati i rezultati Wellera i sar. upućuju na potrebu ponovnog razmatranja mesta hirurgije u lečenju bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a, naročito kod bolesnika u dobrom opštem stanju sa singl lezijama koje su dostupne hirurškoj intervenciji.

Uprkos načinjenim poboljšanjima u lečenju ovih bolesnika postoji potreba za razjašnjenjem etiologije limfoma u mozgu i uzroka neuobičajenog tropizma limfomskih ćelija za pojedine moždane strukture ¹⁷⁴. Dosadašnje analize su se usmerile na molekularno-patogenetsku analizu bolesti prepoznajući akumulaciju somatskih mutacija i hipermutacija, promene u VH genima koje su potencijalni okidači nastanka tumora uključujući i mutacije

u pojedinim onkogenima i tumor supresornim genima ⁷². Upravo napredak na polju NGS tehnologije omogućava široku analizu somatskih mutacija brojnih solidnih tumora i hematoloških maligniteta ⁷¹. S obzirom da su solidni tumori CNS-a značajno češći u odnosu na primarnim DBKL CNS, na osnovu NGS analize pokušali smo da utvrdimo prognostički značaj mutacija u genima primarnog DBKL CNS koji su ranije opisani kao značajni u solidnim malignitetima imajući u vidu agresivno ponašanje primarnog DBKL CNS koje može odgovoriti solidnim tumorima.

U studiji Bruna i sar. na osnovu analize 9 bolesnika sa primarnim DBKL CNS identifikovane su rekurentne somatske mutacije u genima koji imaju ključnu ulogu u biološkim procesima uključujući transkripciju (ETV6, IRF2BP2, EBF1, IRF4, TBL1XR1), ćelijski ciklus (PIM1, BTG1), formiranje nukleozoma (HIST1H1D, HIST1H2AC) i ćelijsku adheziju (MUC16, ACTG1) kao i NF-κB, signalnom putu i signalnom putu preko B ćelijskog receptora ⁷⁰. Slično ovom nalazu, Vater i sar. su identifikovali mutacije u genima koji su odgovorni za B ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, TLR i regulatore NF-κB signalnog puta kao i gene koji imaju ulogu u formiranju strukture hromatina i njegovim modifikacijama, regulaciji ćelijskog ciklusa i imunog odgovora ⁷². Mutacije u pojedinim genima (MYD88, TBL1XR1, PIM1, CD79B, CARD11) su identifikovane upotrebom različitih tehnologija ^{69,198-200}. Međutim Luthra i sar. i Bruno i sar. upotrebom WGS analize, nisu identifikovali somatske mutacije koje su poznate kao kancer udruženi geni. Prema navodima autora, veoma veliki proteini (>4 000 aminokiselina) kao i oni sa dugačkim intronskim sekvencama se odlikuju čestim mutacijama što pojedine gene može označiti kao lažno udružene sa različitim malignitetima. Larence i sar. su na osnovu integrativnog pristupa identifikovali značajno mutirane gene, koji su udruženi sa pojedinim karcinomima, kao što su TP53, CDKN2A, PIK3CA, PTEN, ERBB1, KEAP1, NFE2L2, NOTCH1 i FBXW7²⁰¹. U DBKL su česte mutacije pronađene u genima MYD88, CARD11, EZH2 i CREBBP, kao i novije u MEF2B, MLL2, BTG1, GNA13, ACTB, P2RY8, PCLO i TNFRSF14 ²⁰². U poređenju sa prethodno navedenim, naša analiza je pokazala drugačiji mutacioni status primarnog DBKL CNS u poređenju sa DBKL i to sa ERBB4, KIT, KDR, APC, EGFR, TP53 i SMAD4 genima koji su se odlikovali visokom stopom mutacija sa preko 40 mutacija dok geni ERBB4, KDR, APC, ATM i TP53 imaju 30 i više NFM mutacija u ciljnim sekvencama. U osam gena smo detektovali preko 80% NFM mutacija (CTNNB1, PIK3CA, PTEN, ATM, KRAS, PTPN11, TP53 i JAK3). Braggio i sar. su indikovali

potencijalnu genetsku razliku između primarnog DBKL CNS i sistemskog oblika DBKL, s obzirom da su identifikovali TOX i PRKCD mutirane u primarnom DBKL CNS, ali ne i u DBKL. Imajući u vidu da je B ćelijski receptor/ Toll-like/ NF-κB put pogođen u preko 90% slučajeva primarnog DBKL CNS, navedeni nalaz otkriva potencijalnu metu za ciljnu terapiju ²⁰³. Većina navedenih studija je koristila WGS i WES metode koje predstavljaju sveobuhvatne analitičke procese za detekciju kancerskih mutacija koje su ograničene dubinom čitanja što dalje limitira njihovu sposobnost za detektovanje SNV-ova sa niskom alelskom frekvencom (ispod 5%), tj. somatskih mutacija. S druge strane ciljano sekvencioniranje pojedinih gena predstavlja alternativni pristup WGS i WES metodama, a koji omogućava veću dubinu čitanja i veću preciznost u detekciji nisko frekventnih somatskih varijanti ²⁰⁴. U našoj analizi korišćen je TSACP, prethodno validiran panel ²⁰⁵. Devet gena (MPL1, FGFR3, CDKN2A, NOTCH1, HRAS, AKT1, STK11, GNA11 i SRC) je imalo nisku pokrivenost (<x 100) zbog čega su isključeni iz dalje analize. U skladu sa prethodno navedenim podacima, većina sekvenci niske pokrivenosti je imala GC sadržaj sa više od 64% sugerišući da je visok procenat GC bio jedan od faktora loše ampikon performance ²⁰⁵. U našoj analizi je pokazano prisustvo mutacija u genima TP53, KDR, KIT, ERBB4 i EGFR u više od 50% bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a. Prethodno je verifikovano da su geni KIT, KDR, ERBB4 i EGFR onkogeni udruženi u nekoliko ključnih ćelijskih funkcija kao što su proliferacija, apoptoza, adhezija i angigeneza čija disregulacija je odgovorna za kancerogenezu ^{66,206,207}. U našoj analizi nije uočena korelacija navedenih gena sa gustinom vaskularizacije kao ni sa ekspresijom CD44s. Mutacija u genu ERBB4 je uticala na ukupno preživljavanje naših bolesnika što može objasniti oštećenje nekog od navedenih mehanizama zaštite. U analiziranoj grupi su svi bolesnici imali mutaciju TP53, gena koji predstavlja čuvara genoma tj. tumor supresorni gen koji je zadužen za inhibiciju štetnih efekata onkogene ekspresije ²⁰⁸. Prethodne studije su pokazale da je, naročito u hematološkim malignitetima, kao i u ostalim tumorima prisutna mutacija TP53.

Naša studija je pokazala visoku korelaciju između broja mutacija (1234 ukupno) kod bolesnika sa mutiranim ATM genom u odnosu na bolesnike bez mutacije u ovom genu koji su imali značajno manji broj ostalih mutacija (ukupno 384). Naime, ATM gen je označen kao krucijalna kontrolna kinaza odgovorna za stabilnost genoma i njegov integritet ²⁰⁹. Takođe ova kinaza je opisana kao jedna od najčešće mutiranih u humanim tumorima. Uzimajući u obzir da su ATM i TP53 odgovorne za stabilnost genoma u odnosu na broj

mutacija nije neočekivano što su mutacije na ovom genu u našoj analizi pokazale klinički značaj u smislu kraćeg EFS-a.

Dva bolesnika u našoj studiji su imala nonsense mutacije u APC genu i značajno lošije preživljavanje u odnosu na bolesnike bez ove mutacije. Ovaj gen je najčešće povezan sa kolorektalnim karcinomom i predstavlja tumor supresorni gen koji kontroliše učestalost ćelijske deobe, adheziju za druge ćelije u tkivu i ispravno kretanje ćelija u tkivu²¹⁰. Nedavno su objavljene studije koje ukazuju na mutacije APC gena kod bolesnika sa moždanim metastazama²¹¹.

Naša studija je pokazala da geni PTEN i SMO ukoliko su mutirani dovode do kraćeg ukupnog preživljavanja (PTEN, SMO) i EFS-a (SMO). Ovi geni su često mutirani u solidnim tumorima mozga. PTEN predstavlja tumor supresorni gen koji ima važnu ulogu u nastanku maligniteta²¹². Ovaj gen utiče na ćelijski ciklus preko sprečavanja ulaska oštećene ćelije u ćelijski ciklus i njen posledični rast i umnožavanje. Mutacije PTEN gena su inicijalno opisane u karcinomu dojke, prostate, tiroidne žlezde i melanomima, a kasnije i u moždanim tumorima (astrocitomi, ependimomi, oligodendrogliomi)²¹². Aktuelne studije pokazuju lošije preživljavanje bolesnika sa gliomima, a naša studija je ukazala takođe da ovaj gen u primarnim DBKL CNS-a može biti povezan sa lošijim ishodom. S obzirom da obećavajuća ciljna terapija uključuje PI3k/AKT/mTOR put koji se aktivira kroz PTEN inaktivaciju u GCB podtipu DBKL, treba imati na umu retke bolesnike sa GCB podtipom koji bi mogli imati benefit od ovakve ciljne terapije. Interesantno, u našoj studiji od 4 bolesnika sa GCB podtipom, 3 su imala misense mutaciju u genu PTEN⁵⁰. Drugi gen koji je bio mutiran kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a je SMO gen koji u slučaju prisustva mutacija može dovesti do razvoja brojnih maligniteta. Inicijalno su povezani sa melanomima, ali su opisane mutacije i u tumorima mozga (meningeomi) naročito u dečijoj populaciji²¹³. Naša studija je pokazala udruženost mutacija SMO gena i lošijeg preživljavanja ovih bolesnika. Takođe, mutacije u ovom genu dovode do ranije pojave recidiva bolesti. Navedena analiza može delom objasniti jedinstveno ponašanje primarnim DBKL CNS-a, mada su neophodne veće prospektivne studije u cilju prognostičko-terapijske procene mutacija navedenih gena.

6. ZAKLJUČCI

1. Prosečna starosna dob ispitivanih bolesnika sa DBKL, primarnim DBKL CNS-a i FL je bila niža u poređenju sa prosečnom starošću u razvijenim zemaljama.
2. Kod bolesnika sa DBKL, kao pojedinačni klinički parametri koji su uticali na postizanje povoljnog terapijskog odovora, izdvojili su se Ann Arbor klinički stadijum, ECOG PS \geq 2, prisustvo B simptomatologije, ALC i ALC/AMC.
3. IPI zadržava prognostički značaj u slučaju poređenja bolesnika sa niskim i srednje niskim rizikom u odnosu na bolesnike sa srednje visokim i visokim rizikom. Prognostički značaj R-IPI-ja (p=0.01), a posebno NCCN-IPI-ja (p<0.0001) je potvrđen kod bolesnika sa DBKL lečenih primenom imunohemioterapije.
4. U odnosu na ćelijsko poreko kod DBKL bolesnika, Hansov (p=0.035) i Visco-Young algoritam (p=0.014) su pokazali prognostičku značajnost sa boljim preživljavanjem grupe GCB DBKL uz postajanje visokog procenta slaganja između ova dva algoritma.
5. Kao pojedinačni imunohistohemijski markeri sa povoljnim ukupnim preživljavanjem kod bolesnika sa DBKL su se izdvojili pozitivna ekspresija CD10, BCL6 i snižena ekspresija BCL2 i FOXP1 (<80%).
6. Visoka gustina krvnih sudova u tumorskom tkivu je bila u korelaciji sa lošijim preživljavanjem kod bolesnika sa DBKL,
7. Ekspresija adhezivnog molekula CD44s na stromalnim ćelijama u tumorskom tkivu DBKL-a je bila niska (do 10%) uz varijabilnu ekspresiju na tumorskim ćelijama, koja nije imala prognostički značaj.
8. Kod bolesnika sa primarnim DBKL CNS-a utvrđen je prognostički značaj AMC na preživljavanje i potvrđen je prediktivni značaj IELSG skora.
9. Bolesnici kod kojih je pred primenu hemioterapije učinjena kompletna resekcija tumorske mase su imali značajno bolje preživljavanje u odnosu na bolesnike kod kojih je sprovedena paracijalna resekcija ili samo biopsija tumora.
10. Gustina tumorske vaskularizacije kao i visoke ekspresije CD44s na tumorskim ćelijama nisu uticali na preživljavanje bolesnika sa primarnim DBKL CNS.

11. NGS analiza je pokazala prisustvo visokorizičnih mutacija (nonsense, missense, frameshift) u preko 80% u genima CTNNB1, PIK3CA, PTEN, ATM, KRAS, PTPN11, TP53 i JAK3. Mutacija u genu TP53 je bila prisutna u svim primarnim DBKL CNS.
12. Najmanje jedna visokorizična mutacija je bila verifikovana u genima ERBB4, PIK3CA, KIT, KDR, APC, EGFR, SMO i ATM.
13. Visokorizične mutacije u genima ATM, PTEN, SMO i ERBB4 su potencijalno povezane sa lošijim OS-om, dok je prisustvo NMF mutacija u genima ATM, APC SMO i ERBB4 povezano sa kraćim EFS-om. NFM mutacije u genu SMO utiču na raniju pojavu recidiva bolesti (Fišerov test tačne verovatnoće $p=0.023$)
14. Kod bolesnika sa FL na preživljavanje od kliničko-laboratorijskih parametra su imali uticaj pol, FLIPI, ALC i ALC/AMC.
15. Lošije preživljavanje su imali bolesnici sa histološkim gradusom 3 FL u odnosu na bolesnike sa gradusom 1 i 2.
16. Utvrđen je uticaj pojedinačnih imunohistohemijskih markera na preživljavanje uključujući ekspresiju $CD10 \geq 30\%$, $MUM1 \geq 80\%$, $FOXP1 \geq 60\%$.
17. Gustina tumorske vaskularizacije nije bila od prognostičkog značaja kod bolesnika sa FL.
18. Ekspresija adhezivnog molekula na stromalnim ćelijama u tumorskom tkivu FL je bila veoma visoka ($\geq 90\%$) dok je uočena varijabilna ekspresija CD44s na tumorskim ćelijama (0-100%). Visoka ekspresija CD44s molekula na tumorskim ćelijama je bila povezana sa lošijim preživljavanjem bolesnika sa FL.

7. REFERENCE:

1. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 2012;380(9844):848–57.
2. Ferreri AJM, Ernberg I, Copie-Bergman C. Infectious agents and lymphoma development: Molecular and clinical aspects. *J. Intern. Med.* 2009;265(4):421–438.
3. Lyons SK, Clarke AR. Apoptosis and carcinogenesis. *Br. Med. Bull.* 1997;53(3):554–69.
4. Taylor CR, Hartsock RJ. Classifications of lymphoma; reflections of time and technology. *Virchows Arch.* 2011;458(6):637–48.
5. Lennert K, Stein H, Kaiserling E. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *Br. J. Cancer. Suppl.* 1975;2:29–43.
6. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994;84(5):1361–92.
7. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann. Oncol.* 2000;11 Suppl 1:3–10.
8. Swerdlow SH, Campo E, Harris, NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J VJ. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition - WHO - OMS - IARC Lyon. 2008.
9. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2009;523–31.

10. Lossos IS, Morgenztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2006;24(6):995–1007.
11. Gospodarowicz MK, Sutcliffe SB, Brown TC, Chua T, Bush RS. Patterns of disease in localized extranodal lymphomas. *J. Clin. Oncol.* 1987;5(6):875–80.
12. Kodama T, Ohshima K, Nomura K, et al. Lymphomatous polyposis of the gastrointestinal tract, including mantle cell lymphoma, follicular lymphoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Histopathology.* 2005;47(5):467–78.
13. Grogan TM. Immunohistochemistry of lymphomas. U: Canellos G, Lister TA, Sclar J, urednici. *The Lymphomas.* W.B. Saunders, London, 1998;129–150.
14. Narayanan S, Savage KJ. Staging and prognostic factors. U: Armitage JO, Mauch PM, Harris NL, Coiffier B, Dalla-Favera, urednici. *Non-Hodgkin lymphomas.* 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2010;149–171.
15. White LM, Schweitzer ME, Khalili K, et al. MR imaging of primary lymphoma of bone: variability of T2-weighted signal intensity. *AJR. Am. J. Roentgenol.* 1998;170(5):1243–7.
16. Elstrom R, Guan L, Baker G, et al. Utility of FDG-PET scanning in lymphoma by WHO classification. *Blood.* 2003;101(10):3875–6.
17. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971;31(11):1860–1.
18. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N. Engl. J. Med.* 1993;329(14):987–94.
19. 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;109(5):1857–61.
20. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123(6):837–42.
 21. Ferreri AJM, Reni M. Prognostic factors in primary central nervous system lymphomas. *Hematol. Oncol. Clin. North Am*. 2005;19(4):629–49, vi.
 22. Solal-Celigny P. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood*. 2004;104(5):1258–1265.
 23. Colomo L, López-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(1):78–84.
 24. Higgins RA, Blankenship JE, Kinney MC. Application of immunohistochemistry in the diagnosis of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2008;132(3):441–61.
 25. 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.
 26. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J. Clin. Oncol*. 1998;16(8):2780–95.
 27. Harris NL, Stein H, Coupland SE, et al. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2001;194–220.
 28. 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;110(3):972–8.

29. Campbell J, Seymour JF, Matthews J, et al. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur. J. Haematol.* 2006;76(6):473–80.
30. Chung R, Lai R, Wei P, et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood.* 2007;110(4):1278–82.
31. Pileri SA, Dirnhofer S, Went P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. *Histopathology.* 2002;41(6):482–509.
32. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood.* 1997;89(7):2291–7.
33. Garcia CF, Swerdlow SH. Best practices in contemporary diagnostic immunohistochemistry: panel approach to hematolymphoid proliferations. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2009;133(5):756–65.
34. 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.
35. 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.
36. 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;139(4):515–35.

37. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503–11.
38. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2002;346(25):1937–1947.
39. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717–21.
40. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676–9.
41. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.* 2011;43(9):830–7.
42. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011;470(7332):115–9.
43. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature*. 2011;471(7338):377–81.
44. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2008;359(22):2313–2323.
45. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Ann. Oncol.* 1998;9(7):717–720.
46. Fu K, Weisenburger DD, Choi WWL, 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;26(28):4587–94.
47. Morin RD, Mungall K, Pleasance E, et al. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood.* 2013;122(7):1256–65.
 48. Jardin F. Next generation sequencing and the management of diffuse large B-cell lymphoma: from whole exome analysis to targeted therapy. *Discov. Med.* 18(97):51–65.
 49. Rossi D, Ciardullo C, Gaidano G. Genetic aberrations of signaling pathways in lymphomagenesis: revelations from next generation sequencing studies. *Semin. Cancer Biol.* 2013;23(6):422–30.
 50. Vermaat JS, Pals ST, Younes A, et al. Precision medicine in diffuse large B-cell lymphoma: hitting the target. *Haematologica.* 2015;100(8):989–93.
 51. 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 Consortiu. *Leukemia.* 2012;26(9):2103–13.
 52. Choi WWL, 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;15(17):5494–502.
 53. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg M-L, Banham AH, Leppä S. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod. Pathol.* 2009;22(8):1094–101.
 54. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell

- lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin. Cancer Res.* 2013;19(24):6686–95.
55. Culpin RE, Sieniawski M, Angus B, et al. Prognostic significance of immunohistochemistry-based markers and algorithms in immunochemotherapy-treated diffuse large B cell lymphoma patients. *Histopathology.* 2013;63(6):788–801.
 56. 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;103(1):275–82.
 57. Cardesa-Salzmann TM, Colomo L, Gutierrez G, et al. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica.* 2011;96(7):996–1001.
 58. 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;19(11):1921–6.
 59. 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;93(8):1195–202.
 60. Ghesquières H, Drouet Y, Sunyach MP, et al. Evidence of time-dependent prognostic factors predicting early death but not long-term outcome in primary CNS lymphoma: a study of 91 patients. *Hematol. Oncol.* 2013;31(2):57–64.
 61. Kellogg RG, Straus DC, Karmali R, Munoz LF, Byrne RW. Impact of therapeutic regimen and clinical presentation on overall survival in CNS lymphoma. *Acta Neurochir. (Wien).* 2014;156(2):355–65.
 62. DeAngelis LM. Primary central nervous system lymphoma: coming or going? *Blood.* 2009;113(19):4483–4.

63. Booman M, Douwes J, Glas AM, et al. Mechanisms and effects of loss of human leukocyte antigen class II expression in immune-privileged site-associated B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2006;12(9):2698–705.
64. Deckert M, Brunn A, Montesinos-Rongen M, Terreni MR, Ponzoni M. Primary lymphoma of the central nervous system--a diagnostic challenge. *Hematol. Oncol.* 2014;32(2):57–67.
65. Ferreri AJM, Marturano E. Primary CNS lymphoma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2012;25(1):119–30.
66. Montesinos-Rongen M, Van Roost D, Schaller C, Wiestler OD, Deckert M. Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood.* 2004;103(5):1869–75.
67. Cobbers JM, Wolter M, Reifenberger J, et al. Frequent inactivation of CDKN2A and rare mutation of TP53 in PCNSL. *Brain Pathol.* 1998;8(2):263–76.
68. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature.* 2011;476(7360):298–303.
69. Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, Boisselier B, et al. Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clin. Cancer Res.* 2012;18(19):5203–11.
70. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget.* 2014;5(13):5065–75.
71. Luthra R, Patel KP, Reddy NG, et al. Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: applicability for diagnostics and disease monitoring. *Haematologica.* 2014;99(3):465–73.
72. Vater I, Montesinos-Rongen M, Schlesner M, et al. The mutational pattern of primary lymphoma of the central nervous system determined by whole-exome sequencing. *Leukemia.* 2015;29(3):677–85.

73. Achten R, Verhoef G, Vanuytsel L, De Wolf-Peeters C. Histiocyte-rich, T-cell-rich B-cell lymphoma: a distinct diffuse large B-cell lymphoma subtype showing characteristic morphologic and immunophenotypic features. *Histopathology*. 2002;40(1):31–45.
74. Dogan A, Burke JS, Goteri G, et al. Micronodular T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma of the spleen: histology, immunophenotype, and differential diagnosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003;27(7):903–11.
75. Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J. Clin. Oncol.* 2007;25(12):1581–7.
76. Shimoyama Y, Asano N, Kojima M, et al. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders: diagnostic approach to a newly recognized clinicopathological entity. *Pathol. Int.* 2009;59(12):835–43.
77. 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;106(4):1392–9.
78. Barth TFE, Leithäuser F, Joos S, Bentz M, Möller P. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? *Lancet. Oncol.* 2002;3(4):229–34.
79. Zinzani PL, Martelli M, Bertini M, et al. Induction chemotherapy strategies for primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: a retrospective multinational study on 426 previously untreated patients. *Haematologica*. 2002;87(12):1258–64.
80. 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;198(6):851–62.

81. Menon MP, Pittaluga S, Jaffe ES. The histological and biological spectrum of diffuse large B-cell lymphoma in the World Health Organization classification. *Cancer J.* 18(5):411–20.
82. Ponzoni M, Ferreri AJM, 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;25(21):3168–73.
83. 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;109(2):478–85.
84. Ferreri AJM, Campo E, Seymour JF, et al. Intravascular lymphoma: clinical presentation, natural history, management and prognostic factors in a series of 38 cases, with special emphasis on the “cutaneous variant”. *Br. J. Haematol.* 2004;127(2):173–83.
85. Aozasa K, Takakuwa T, Nakatsuka S. Pyothorax-associated lymphoma: a lymphoma developing in chronic inflammation. *Adv. Anat. Pathol.* 2005;12(6):324–31.
86. Narimatsu H, Ota Y, Kami M, et al. Clinicopathological features of pyothorax-associated lymphoma; a retrospective survey involving 98 patients. *Ann. Oncol.* 2007;18(1):122–8.
87. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011;117(19):5019–5032.
88. 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;27(25):4211–6.

89. 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;28(6):736–47.
90. Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina A-R, Rodriguez-Pinilla S-M, et al. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica.* 2010;95(8):1342–9.
91. Cobo F, Hernández S, Hernández 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.
92. Said JW. Aggressive B-cell lymphomas: how many categories do we need? *Mod. Pathol.* 2013;26 Suppl 1:S42–56.
93. 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. Hematop.* 2009;2(4):211–36.
94. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood.* 2011;117(8):2319–31.
95. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(14):2373–80.
96. Tadmor T, Bari A, Sacchi S, et al. Monocyte count at diagnosis is a prognostic parameter in diffuse large B-cell lymphoma: results from a large multicenter study involving 1191 patients in the pre- and post-rituximab era. *Haematologica.* 2014;99(1):125–30.

97. Aoki K, Tabata S, Yonetani N, Matsushita A, Ishikawa T. The prognostic impact of absolute lymphocyte and monocyte counts at diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Acta Haematol.* 2013;130(4):242–6.
98. Belotti A, Doni E, Bolis S, et al. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio predicts outcome in follicular lymphoma and in diffuse large B-cell lymphoma patients in the rituximab era. *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.* 2015;15(4):208–13.
99. Marcheselli L, Bari A, Anastasia A, et al. Prognostic roles of absolute monocyte and absolute lymphocyte counts in patients with advanced-stage follicular lymphoma in the rituximab era: an analysis from the FOLL05 trial of the Fondazione Italiana Linfomi. *Br. J. Haematol.* 2015;169(4):544–51.
100. Kumagai S, Tashima M, Fujikawa J, et al. Ratio of peripheral blood absolute lymphocyte count to absolute monocyte count at diagnosis is associated with progression-free survival in follicular lymphoma. *Int. J. Hematol.* 2014;99(6):737–42.
101. Watanabe R, Tomita N, Kishimoto K, et al. Absolute monocyte count in follicular lymphoma patients treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Leuk. Res.* 2013;37(10):1208–12.
102. Nastoupil LJ, Sinha R, Flowers CR. Management Strategies for Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Eur. Oncol. Haematol.* 2012;8(2):123–126.
103. Fields PA, Townsend W, Webb A, et al. De novo treatment of diffuse large B-cell lymphoma with rituximab, cyclophosphamide, vincristine, gemcitabine, and prednisolone in patients with cardiac comorbidity: a United Kingdom National Cancer Research Institute trial. *J. Clin. Oncol.* 2014;32(4):282–7.
104. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J. Chronic Dis.* 1987;40(5):373–83.

105. Lin T-L, Kuo M-C, Shih L-Y, et al. The impact of age, Charlson comorbidity index, and performance status on treatment of elderly patients with diffuse large B cell lymphoma. *Ann. Hematol.* 2012;91(9):1383–91.
106. Müller C, Murawski N, Wiesen MHJ, et al. The role of sex and weight on rituximab clearance and serum elimination half-life in elderly patients with DLBCL. *Blood.* 2012;119(14):3276–84.
107. 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;101(11):4279–84.
108. Zhang A, Ohshima K, Sato K, et al. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathol. Int.* 1999;49(12):1043–52.
109. Niitsu N, Okamoto M, Nakamura N, et al. Prognostic impact of chromosomal alteration of 3q27 on nodal B-cell lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 329 consecutive patients. *Leuk. Res.* 2007;31(9):1191–7.
110. Au WY, Horsman DE, Gascoyne RD, et al. The spectrum of lymphoma with 8q24 aberrations: a clinical, pathological and cytogenetic study of 87 consecutive cases. *Leuk. Lymphoma.* 2004;45(3):519–28.
111. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol. Today.* 1994;15(9):450–4.
112. Sjö LD, Poulsen CB, Hansen M, Møller MB, Ralfkiaer E. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. *Eur. J. Haematol.* 2007;79(6):501–7.
113. Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1994;54(9):2468–71.

114. Van Imhoff GW, Boerma E-JG, 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;24(25):4135–42.
115. 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;98(2):255–63.
116. 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;95(6):2084–92.
117. Brown PJ, Ashe SL, Leich E, et al. Potentially oncogenic B-cell activation-induced smaller isoforms of FOXP1 are highly expressed in the activated B cell-like subtype of DLBCL. *Blood.* 2008;111(5):2816–24.
118. Barrans SL, Fenton JAL, Banham A, Owen RG, Jack AS. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood.* 2004;104(9):2933–5.
119. Banham AH, Connors JM, Brown PJ, et al. Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(3):1065–72.
120. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1995;1(1):27–31.
121. Ruan J, Hajjar K, Rafii S, Leonard JP. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* 2009;20(3):413–24.
122. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(1):33–45.

123. Orian-Rousseau V, Ponta H. Perspectives of CD44 targeting therapies. *Arch. Toxicol.* 2015;89(1):3–14.
124. Tzankov A, Pehrs A-C, Zimpfer A, et al. Prognostic significance of CD44 expression in diffuse large B cell lymphoma of activated and germinal centre B cell-like types: a tissue microarray analysis of 90 cases. *J. Clin. Pathol.* 2003;56(10):747–52.
125. Wei X, Xu M, Wei Y, et al. The addition of rituximab to CHOP therapy alters the prognostic significance of CD44 expression. *J. Hematol. Oncol.* 2014;7:34.
126. Fisher RI, Miller TP, O'Connor OA. Diffuse aggressive lymphoma. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2004;221–36.
127. Khaled HM, Zekri ZK, Mokhtar N, et al. A randomized EPOCH vs. CHOP front-line therapy for aggressive non-Hodgkin's lymphoma patients: long-term results. *Ann. Oncol.* 1999;10(12):1489–92.
128. Oki Y, Yamamoto K, Kato H, et al. Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic marker in patients with diffuse large B-cell lymphoma and suggests patients' survival benefit from rituximab. *Eur. J. Haematol.* 2008;81(6):448–453.
129. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood.* 2010;116(12):2040–5.
130. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet. Oncol.* 2008;9(2):105–16.
131. Zwick C, Gleissner B, Pfreundschuh M. Aspects of chemotherapy schedules in young and elderly patients with aggressive lymphoma. *Clin. Lymphoma Myeloma.* 2007;8 Suppl 2:S43–9.

132. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet. Oncol.* 2011;12(11):1013–22.
133. Sarkozy C, Coiffier B. Primary refractory diffuse large B cell lymphoma in the rituximab era. *Curr. Opin. Oncol.* 2015;27(5):377–83.
134. Mey U, Hitz F, Lohri A, et al. Diagnosis and treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Swiss Med. Wkly.* 2012;142:w13511.
135. Ribatti D, Nico B, Ranieri G, Specchia G, Vacca A. The role of angiogenesis in human non-Hodgkin lymphomas. *Neoplasia.* 2013;15(3):231–8.
136. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell Res.* 2006;312(5):594–607.
137. Gratzinger D, Zhao S, Marinelli RJ, et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Am. J. Pathol.* 2007;170(4):1362–9.
138. Stopeck AT, Unger JM, Rimsza LM, et al. A phase II trial of single agent bevacizumab in patients with relapsed, aggressive non-Hodgkin lymphoma: Southwest oncology group study S0108. *Leuk. Lymphoma.* 2009;50(5):728–35.
139. Thieblemont C, Gisselbrecht C. Second-line treatment paradigms for diffuse large B-cell lymphomas. *Curr. Oncol. Rep.* 2009;11(5):386–93.
140. DeAngelis LM. Whither whole brain radiotherapy for primary CNS lymphoma? *Neuro. Oncol.* 2014;16(8):1032–4.
141. Weller M, Martus P, Roth P, Thiel E, Korfel A. Surgery for primary CNS lymphoma? Challenging a paradigm. *Neuro. Oncol.* 2012;14(12):1481–4.

142. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med.* 2004;351(21):2159–2169.
143. Lossos IS, Gascoyne RD. Transformation of follicular lymphoma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2011;24(2):147–63.
144. Behl D, Ristow K, Markovic SN, et al. Absolute lymphocyte count predicts therapeutic efficacy of rituximab therapy in follicular lymphomas. *Br. J. Haematol.* 2007;137(5):409–15.
145. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(27):4555–62.
146. Bachy E, Houot R, Morschhauser F, et al. Long-term follow up of the FL2000 study comparing CHVP-interferon to CHVP-interferon plus rituximab in follicular lymphoma. *Haematologica.* 2013;98(7):1107–14.
147. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood.* 2002;99(10):3806–12.
148. Eshoa C, Perkins S, Kampalath B, et al. Decreased CD10 expression in grade III and in interfollicular infiltrates of follicular lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001;115(6):862–7.
149. Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 1999;111(4):488–94.
150. Xerri L, Bachy E, Fabiani B, et al. Identification of MUM1 as a prognostic immunohistochemical marker in follicular lymphoma using computerized image analysis. *Hum. Pathol.* 2014;45(10):2085–93.

151. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, et al. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood*. 1994;84(4):1043–9.
152. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N. Engl. J. Med.* 2004;351(21):2159–69.
153. Jørgensen JM, Sørensen FB, Bendix K, et al. Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes. *Leuk. Lymphoma*. 2007;48(3):584–95.
154. Higashi M, Sugaya Y, Soeta S, et al. CD44 expression during tumor progression of follicular lymphoma. *Oncol. Rep.* 2009;22(5):1135–40.
155. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: r. *Blood*. 2005;106(12):3725–32.
156. Salles G, Ghesquières H. Current and future management of follicular lymphoma. *Int. J. Hematol.* 2012;96(5):544–51.
157. Vidal L, Gafter-Gvili A, Salles G, et al. Rituximab maintenance for the treatment of patients with follicular lymphoma: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J. Natl. Cancer Inst.* 2011;103(23):1799–806.
158. Santos ES, Kharfan-Dabaja MA, Ayala E, Raez LE. Current results and future applications of radioimmunotherapy management of non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma*. 2006;47(12):2453–76.
159. 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;17(4):1244.

160. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin. Cancer Res.* 1999;5(8):1966–75.
161. Li H DR. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. - PubMed - NCBI. *Bioinformatics.* 2009;25 (14): 1754–1760.
162. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D DM. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. - PubMed - NCBI. *Nat. Genet.* 2011;43 (5): 491–498.
163. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M DM. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. - PubMed - NCBI. 2010. .
164. Durinck S, Spellman PT, Birney E HW. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. - PubMed - NCBI. *Nat Protoc.* 2009;4 (8): 1184–1191.
165. Durinck S, Moreau Y, Kasprzyk A, Davis S, De Moor B, Brazma A HW. BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. - PubMed - NCBI. *Bioinformatics.* 2005;21 (16): 3439–3440.
166. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G MJ. Integrative genomics viewer. - PubMed - NCBI. *Nat Biotechnol.* 2011;29 (1): 24–26.
167. Li Z-M, Huang J-J, Xia Y, et al. Blood lymphocyte-to-monocyte ratio identifies high-risk patients in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *PLoS One.* 2012;7(7):e41658.

168. Shen Y, Yao Y, Li J-M, et al. [Prognostic factors analysis for R-CHOP regimen therapy in diffuse large B cell lymphoma]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2008;29(4):252–7.
169. Hasselblom S, Ridell B, Sigurdardottir M, et al. Low rather than high Ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma*. 2008;49(8):1501–9.
170. Gratzinger D, Advani R, Zhao S, et al. Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). *Br. J. Haematol*. 2010;148(2):235–44.
171. Gaudio F, Giordano A, Perrone T, et al. High Ki67 index and bulky disease remain significant adverse prognostic factors in patients with diffuse large B cell lymphoma before and after the introduction of rituximab. *Acta Haematol*. 2011;126(1):44–51.
172. Hong J, Park S, Park J, et al. Evaluation of prognostic values of clinical and histopathologic characteristics in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone therapy. *Leuk. Lymphoma*. 2011;52(10):1904–12.
173. Yamada A, Tamura H, Asayama T, et al. Evaluation of the enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for cases with diffuse large B-cell lymphoma. *Rinsho. Ketsueki*. 2015;56(7):915–8.
174. Rubenstein JL, Gupta NK, Mannis GN, Lamarre AK, Treseler P. How I treat CNS lymphomas. *Blood*. 2013;122(14):2318–30.
175. Buske C, Hoster E, Dreyling M, et al. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vinc. *Blood*. 2006;108(5):1504–8.

176. Bari A, Marcheselli L, Sacchi S, et al. Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a never-ending story. *Ann. Oncol.* 2009;21(7):1486–1491.
177. Cox MC, Nofroni I, Laverde G, et al. Absolute lymphocyte count is a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2008;141(2):265–8.
178. Kim DH, Baek JH, Chae YS, et al. Absolute lymphocyte counts predicts response to chemotherapy and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.* 2007;21(10):2227–2230.
179. Nitta H, Terui Y, Yokoyama M, et al. Absolute peripheral monocyte count at diagnosis predicts central nervous system relapse in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2015;100(1):87–90.
180. Lin B, Chen C, Qian Y, Feng J. Prognostic role of peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at diagnosis in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *Leuk. Lymphoma.* 2015;1–6.
181. Siddiqui M, Ristow K, Markovic SN, et al. Absolute lymphocyte count predicts overall survival in follicular lymphomas. *Br. J. Haematol.* 2006;134(6):596–601.
182. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J. Clin. Oncol.* 2011;29(2):200–7.
183. 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;98(4):945–51.
184. 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;107(11):4207–13.

185. Jovanovic MP, Mihaljevic B, Jakovic L, et al. BCL2 positive and BCL6 negative diffuse large B cell lymphoma patients benefit from R-CHOP therapy irrespective of germinal and non germinal center B cell like subtypes. *J. BUON*. 20(3):820–8.
186. Braaten KM, Betensky RA, de Leval L, et al. BCL-6 expression predicts improved survival in patients with primary central nervous system lymphoma. *Clin. Cancer Res*. 2003;9(3):1063–9.
187. 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(6):961–8.
188. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90(1):244–51.
189. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg M-L, et al. Bcl-2 but not FOXP1, is an adverse risk factor in immunochemotherapy-treated non-germinal center diffuse large B-cell lymphomas. *Eur. J. Haematol*. 2009;82(5):364–72.
190. Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, et al. Prognostic impact of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci*. 2009;100(10):1842–7.
191. Norrby K, Ridell B. Tumour-type-specific capillary endothelial cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and Factor VIII. *APMIS*. 2003;111(4):483–9.
192. Alshenawy HA. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, basic fibroblastic growth factor, and microvessel density and their relation to cell proliferation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann. Diagn. Pathol*. 2010;14(5):321–7.

193. He M, Zuo C, Wang J, et al. Prognostic significance of the aggregative perivascular growth pattern of tumor cells in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *Neuro. Oncol.* 2013;15(6):727–34.
194. Nagel S, Hirschmann P, Dirnhofer S, Günthert U, Tzankov A. Coexpression of CD44 variant isoforms and receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM, CD168) is an International Prognostic Index and C-MYC gene status-independent predictor of poor outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Exp. Hematol.* 2010;38(1):38–45.
195. Yuan J, Gu K, He J, Sharma S. Preferential up-regulation of osteopontin in primary central nervous system lymphoma does not correlate with putative receptor CD44v6 or CD44H expression. *Hum. Pathol.* 2013;44(4):606–11.
196. Ferreri AJM, Reni M, Pasini F, et al. A multicenter study of treatment of primary CNS lymphoma. *Neurology.* 2002;58(10):1513–20.
197. DeAngelis LM, Seiferheld W, Schold SC, Fisher B, Schultz CJ. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. *J. Clin. Oncol.* 2002;20(24):4643–8.
198. Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Brunn A, et al. Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF-kappaB pathway in primary CNS lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2010;120(4):529–35.
199. Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A, et al. Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2011;122(6):791–2.
200. Kraan W, Horlings HM, van Keimpema M, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J.* 2013;3:e139.

201. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214–8.
202. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(10):3879–84.
203. Braggio E, Van Wier S, Ojha J, et al. Genome-Wide Analysis Uncovers Novel Recurrent Alterations in Primary Central Nervous System Lymphomas. *Clin. Cancer Res.* 2015;21(17):3986–94.
204. Xu H, DiCarlo J, Satya RV, Peng Q, Wang Y. Comparison of somatic mutation calling methods in amplicon and whole exome sequence data. *BMC Genomics*. 2014;15:244.
205. Simen BB, Yin L, Goswami CP, et al. Validation of a next-generation-sequencing cancer panel for use in the clinical laboratory. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2015;139(4):508–17.
206. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
207. Soung YH, Lee JW, Kim SY, et al. Somatic mutations of the ERBB4 kinase domain in human cancers. *Int. J. Cancer*. 2006;118(6):1426–9.
208. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*. 2011;2(4):466–74.
209. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11(3):220–8.
210. Jimbo T, Kawasaki Y, Koyama R, et al. Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nat. Cell Biol.* 2002;4(4):323–7.

211. Pećina-Šlaus N, Nikuševa Martić T, Zeljko M, Bulat S. Brain metastases exhibit gross deletions of the APC gene. *Brain Tumor Pathol.* 2011;28(3):223–8.
212. Xiao W-Z, Han D-H, Wang F, et al. Relationships between PTEN gene mutations and prognosis in glioma: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35(7):6687–93.
213. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, et al. Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science.* 2013;339(6123):1077–80.

SKRAĆENICE

ABC-DLBCL	Activated B-cell - like diffuse large B-cell lymphoma
ALC	Absolute lymphocyte count
ALC/AMC	Absolute lymphocyte count/ Absolute monocyte count
ALK+ DBKL	Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B cell lymphoma
AMC	Absolute monocyte count
AUC	Area under the curve
BCL2	B cell lymphoma 2
BCR	B cell receptor signaling
CALLA	Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen
CCI	Charlson Comorbidity Index
CD	Cluster of Differentiation
CD138	Syndecan-1
CHOP	Cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone
CR	Complete Remission
CT	Computed Tomography
DLBCL	Diffuse Large B-cell Lymphoma
DBKL	Difuzni B krupnoćelijski limfom
DBKL CNS	Difuzni B krupnoćelijski limfom centralnog nervnog sistema
DBKL, NOS	Difuzni B krupnoćelijski limfom, not otherwise specified
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
EBV	Epstein Barr virus
EBER	Epstein Barr virus Encoded RNA
EBV LMP	Epstein-Barr virus latent membrane protein 1
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group

EFS	Event Free Survival
EORTC	European Organization for the Research and Treatment of Cancer
FDG	2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose
FLIPI	Follicular lymphoma International Prognostic Score
FFPE	Formalin fixed, paraffin wax embedded
FNAB	Fine Needle Aspiration Biopsy
FISH	Fluorescentna In Situ hibridizacija
FOXP1	Forkhead Box P1
GC	Germinativni Centar
GELLA	Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte
GEP	Gene-expression profiling
GCB-DBKL	Germinal centre B-cell-like DBKL
HA	Hijaluronan
H&E	Hematoksilin i Eosin
HHV8	Humani Herpes Virus 8
HLA	Human Leukocyte Antigen
HIV	Human Immunodeficiency Virus
H. pilory	Helicobacter pylori
HRP	Horse Redish Peroxidase
IELSG	International Extranodal Lymphoma Study Group
IL	Interleukin
IPI	Internacional Prognostic Index
IR-1	Immune-response 1
IR-2	Immune-response 2

IVDBKL	Intravaskularni DBKL
JAK	Janus Kinase
LCA	Leukocyte common antigen
LDH	Laktat dehidrogenaza
LMP-1	Latentni Membranski protein-1
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin method
LYG	Limfomatoidna granulomatoza
MALT	Mucose Associated Lymphoma Tissue
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MR	Magnetna Rezonanca
MTX	Metotreksat
MUM 1/IRF4	Multiple Myeloma-1/interferon regulatory factor-4
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCCN-IPI	National Comprehensive Cancer Network International Prognostic Index
NGS	Next Generation Sequencing
NK	Natural Killer
Non-GCB DBKL	Non Germinal centre DBKL
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NHL	Non-Hodgkin limfom
OS	Overall Survival
PBL	Plazmablastni limfom
PD	Progressive Disease
PEL	Primarni Efuzioni Limfom
PET CT	Positron Emission Tomography Computed Tomography

PFS	Progression Free Survival
PMBCL	Primary Mediastinal B Cell Lymphoma
PR	Partial Remission
R-CHOP	Rituximab Cyclophosphamide Doxorubicine Vincristine Prednisone
REAL	Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms
R-IPI	Revised International Prognostic Index
RNK	Ribonukleinska kiselina
RT	Radioterapija
SD	Stable disease
SNV	Single Nucleotide Variants
STAT	Signaling Transducer and Activator of Transcription
SZO	Svetska Zdravsvena Organizacija
TCHRBCL	T cell/histiocyte-rich large B cell lymphoma
TLR	Toll-like receptor
TMA	Tissue Microarray
TNF	Tumor Necrosis Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WES	Whole Exome Sequencing
WHO	World Health Organisation
WGS	Whole Genome Sequencing

BIOGRAFIJA

Dr Jelena Jelić rođena je 04.08.1986. u Ljubljani, Republika Slovenija. Srednju školu, Gimnaziju u Nemačkoj završila je 2005. godine sa odličnim uspehom (prosečna ocena 5.0) i iste godine upisala Medicinski fakultet u Beogradu. Diplomirala je 2011. sa prosečnom ocenom 9.77. Tokom studija dobitnik je više nagrada i stipendija. Bila je dobitnik Stipendije Republike Srbije 2006/2007, Stipendije grada Nemačke 2006/2007, Stipendije Republičke Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka 2008/2009 i 2009/2010, Stipendije grada Beograda 2010, Stipendije Fonda za mlade talente Republike Srbije 2010/2011. Dobitnik je nagrade za najboljeg studenta Medicinskog Fakulteta, Univerziteta u Beogradu 2007, 2008, 2009 i 2010. godine. Bila je učesnik programa „Dobrodošli u Nemačku“ za šezdeset najboljih studenata Republike Srbije (oktobar 2008.) organizovanog u saradnji Evropskog pokreta u Srbiji i Bavarskog Akademskog Centra za Centralnu, Istočnu i Jugoistočnu Evropu (Bayhost), Univerzitet u Regensburgu. Tokom studija bavila se naučno-istraživačkim radom. Uradila je dva studentska rada, jedan na Klinici za Neurologiju KCS na temu „Gigantocelularni arteritis“ 2009/2010, i drugi na Klinici za Hematologiju KCS na temu „Prognostički značaj ISS skora kod bolesnika sa multiplim mijelomom lečenih terapijom održavanja talidomidom“ 2010/2011. Položila je stručni ispit za doktora medicine 31.01.2012. Upisala je trogodišnje doktorske studije smeru molekularne medicine oktobra 2011. a završila juna 2014. Od februara 2012. do juna 2015. bila je angažovana kao naučni saradnik na Projektu za retke bolesti (No 41004), Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od juna 2015. zaposlena je na Klinici za Hematologiju KCS. Dobitnik je granta za učesnika na ESH Internacionalnoj konferenciji za multipli mijelom (Dablin, Irska, 2013.) i travel granta na XIX EHA Kongresu u Milanu (Italija, 2014.). Autor je i koautor 28 stručnih radova i publikacija, od čega 6 radova in extenso (5 je indeksirano u CC/SCI bazi podataka).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana _____ Jelena Jeličić _____

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

"Prognostički značaj angiogeneze i ekspresije adhezivnih molekula stromalnih ćelija kod bolesnika sa folikularnim i difuznim B krupnoćelijskim limfomom"

- 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, ___02.11.2015._____

J. Jeličić

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _____ Jelena Jeličić _____

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada __,„Prognostički značaj angiogeneze i ekspresije adhezivnih molekula stromalnih ćelija kod bolesnika sa folikularnim i difuznim B krupnoćelijskim limfomom” _____

Mentor _____ Prof. dr Milena Todorović Balint _____

Potpisani _____ Jelena Jeličić _____

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, __02.11.2015. _____

J. Jeličić

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Prognostički značaj angiogeneze i ekspresije adhezivnih molekula stromalnih ćelija kod bolesnika sa folikularnim i difuznim B krupnoćelijskim limfomom”

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 poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, __02.11.2015. _____

J. Jelčić