



**UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ljiljana (Lj) Tadić**

**KLINIČKI I IMUNOLOŠKI FAKTORI PROGNOZE KOD  
BOLESNIKA SA B DIFUZNIM KRUPNOĆELIJSKIM  
NEHOČKINSKIM LIMFOMOM**

***DOKTORSKA DISERTACIJA***

***NIŠ, 2016.***



**UNIVERSITY OF NIŠ  
MEDICAL FACULTY**

**Ljiljana (Lj) Tadić**

**CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PROGNOSTIC  
FACTORS IN PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE  
B- CELL NON HODGKIN LYMPHOMA**

***DOCTORAL DISSERTATION***

***NIŠ, 2016.***

***Podaci o mentoru:***

*Prof. dr Goran Marjanović, vanredni profesor, Medicinski Fakultet Niš,  
Univerziteta u Nišu*

***Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije:***

- *Prof. Dr Lana Mačukanović- Golubović, redovni profesor  
Medicinski fakultet Niš, predsednik*
- *Prof. Dr Goran Marjanović, vanredni profesor  
Medicinski fakultet Niš, mentor i član*
- *Prof. Dr Tatjana Jevtović- Stoimenov, vanredni profesor  
Medicinski fakultet Niš, član*
- *Prof. Dr Predrag Đurđević, vanredni profesor  
Medicinski fakultet Kragujevac, član*
- *Doc. Dr Miljan Krstić, docent, Medicinski fakultet Niš, član*

*Počasni član:*

*Doc. Dr Miloš Kostov, docent, počasni član  
Medicinski fakultet, Univerziteta Odbrane, Vojno Medicinska Akademija*

*„Zdrav čovek ima hiljadu želja. Bolestan samo jednu.”*

*Anton Pavlovič Čehov*

*Neizmerno se zahvaljujem Prof. dr sc. med. Goranu Marjanoviću, mom mentoru, na nesebičnoj pomoći, podršci, sugestijama i strpljenju u svakom trenutku.*

*Zahvaljujem se Prof. dr sc. med. Lani Mačukanović- Golubović na konstruktivnim savetima, pomoći i podršci.*

*Velika zahvalnost Prof. dr sc. med. Tatjani Jevtović- Stoimenov na pomoći i podršci u molekularno- genetičkom istraživanju.*

*Zahvaljujem se Prof. dr sc. med. Predragu Đurđeviću na posvećenom vremenu i poverenju.*

*Za pomoć u histopatološkom i imunohistohemijskom delu ovog rada, zahvalnost dugujem Doc. dr sc. med. Miljanu Krstiću i Doc. dr sc. med. Milošu Kostovu.*

*Bez ove divne ekipe stručnjaka i dobrih ljudi, moj rad ne bi ugledao svetlost dana.*

*Na kraju, ali ne zato što zaslužuju začelje, već zato što su svojim postojanjem učinili da ne samo moj rad, već i moj život budu radost i lepota, hvala mojoj porodici: majci Jelici, sestri Ivani, mojim sinovima Nikoli i Dimitriji i mom Zoranu sa kim je svaki trenutak našeg zajedničkog života čaroban.*

*Za finansiranje i pruženu priliku da ovim radom krunišem svoju karijeru, zahvaljujem Ministarstvu odbrane Republike Srbije i svojoj matičnoj ustanovi - Vojnoj bolnici u Nišu.*

***Rad posvećujem svom dragom ocu Ljubomiru Tadiću (1947-1999)***

### Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr sc. med. Goran Marjanović, Univerzitet Niš, Medicinski fakultet
Naslov:	Klinički i imunološki faktori prognoze kod bolesnika sa B difuznim krupnoćelijskim nehoćkinskim limfomom

Rezime:

Oboleli od B difuznog krupnoćelijskog nehoćkinskog limfoma (DLBCL) imaju veoma heterogen klinički tok i prognozu. Postoji stalna potreba za pronalaženjem novih prognostičkih faktora radi procene rizika kod obolelih. Imunohistohemijski biomarkeri u korelaciji sa kliničkim i bihemijskim parametrima, kao i sa prognostičkim skorovima, mogu biti prediktori rizika obolelih. Osnovni cilj ovog istraživanja bio je analiza preživljavanja obolelih od B difuznog krupnoćelijskog nehoćkinskog limfoma prema kliničkim faktorima prognoze i ekspresiji proteina koji učestvuju u aktivaciji imunog odgovora, regulaciji ćelijskog ciklusa i programirane ćelijske smrti (Ki-67, Bcl-2, Bcl-6, CD10, CD5, CD138, MUM1 i prisustvo mutacije L265P MyD88), uz klasifikovanje obolelih prema aktuelnim prognostičkim scoring sistemima. Upoređivanjem kliničkih i imunoloških faktora prognoze kod obolelih od DLBCL, napraviti predlog za prognostički scoring sistem koji bi objedinio obe grupe parametara. Svim pacijentima je određivan klinički stadijum bolesti. Tokom studije su sakupljeni i obrađivani klinički i laboratorijski parametri, za koje se zna da imaju prognostički značaj i koje je bilo moguće sakupiti za sve pacijente uključene u istraživanje. Reč je o polu, starosnoj dobi, Ann Arbor kliničkom stadijumu bolesti, broju ekstranodalnih manifestacija bolesti, performans statusu, prisustvu „B“ simptoma, vrednosti hemoglobina, broju trombocita, brzini sedimentacije eritrocita, vrednosti C reaktivnog proteina, beta 2 mikroglobulina, vrednosti albumina i LDH u serumu. Histopatološki materijal sastojao se od 68 parafinskih blokova. Od imunohistohemijskih parametara analizirani su : CD5, CD10, Ki 67, Bcl-2, Bcl-6, MUM1 po EnVision proceduri. Za molekularno-genetičko istraživanje genskog polimorfizma Myd88 L265P korišćena je genomski DNK izolovana iz tkiva fiksiranog u parafinu pacijenata obolelih od DLBCL. Lančanom reakcijom polimerizacije umnožavani su segmenati DNK u okviru kojih se nalazi SNP ispitivanog gena MYD88 L265P. Statističke analize uključivale su primenu neparametarskih metoda i parametarskih testova. Period trajanja OS (ukupno preživljavanje) je ispitivan primenom Kaplan-Meierove analize. Statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju (OS) postoji u odnosu na godine života (u korist mlađih od 60 godina), u odnosu na pol (u korist žena) i koncentraciju albumina u serumu (niže vrednosti albumina u serumu kod obolelih od DLBCL su udružene sa kraćim OS , pa su oni pokazali najveći prediktorni značaj). U predikciji rizika značajnost su pokazali

	<p>prekategorisani performans status (2 kategorije: <math>\leq 2</math>; <math>&gt; 2</math>), prekategorisani klinički stadijum bolesti („limitirani“ i „uznapredovali“ DLBCL) i R- IPI. Analizom dužine restrikcioniha fragmenata utvrđen je homozigotni, normalni (divlji, engl. wild type) genotip za ispitivani polimorfizam. Svi ostali klinički, biohemijski i imunohistohemijski parametri, nisu pokazali prediktorni značaj kod obolelih od DLBCL. U odnosu na primenjeni terapijski protokol postoji izrazita statistička značajnost u dužini preživljavanja u korist pacijenata lečenih R- CHOP protokolom. Standardizovali smo PCR-RFLP metodu za Myd 88 L265P za DNK uzorke izolovane iz parafinskih kalupova. Po našim saznanjima ne postoje dostupni podaci o istraživanju Myd 88 L265P polimorfizma za populaciju obolelih od DLBCL u Srbiji. U populaciji pacijenata sa područja jugoistočne Srbije patoloski signalni put koga ostvaruje mutacija Myd 88 L265P, nije odgovoran za razvoj DLBCL. Muški pol, starosna dob preko 60 godina, niske vrednosti albumina u serumu su negativni prediktorni faktori kod obolelih od DLBCL. R-IPI skor je u eri imunohemoterapije korisniji prognostički skor u odnosu na IPI.</p>
Naučna oblast:	Medicina
Naučna disciplina:	Hematologija
Ključne reči:	DLBCL, imunohemoterapija, imunohistohemijski parametri, Myd 88 L265P, IPI, R-IPI.
UDK:	616.428-006.44: 616-071-097-037(043.3)
CERIF klasifikacija:	B 490 Hematologija
Tip licence kreativne zajednice:	<b>CC BY-NC-ND</b>

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: Prof. dr sc. med. Goran Marjanović , University of Niš, Faculty of Medicine

Title: Clinical and immunological prognostic factors in patients with diffuse large B- cell non Hodgkin lymphoma

Abstract:

Patients with diffuse large B cell non Hodgkin lymphoma (DLBCL) have a very heterogeneous clinical course and prognosis. There is a constant need to find new prognostic factors to assess risk in patients. Immunohistochemical biomarkers correlated with clinical and biochemical parameters, as well as prognostic scores may be predictors of risk patients. The main aim of this study was to analyze the survival of patients with diffuse large B- cell non Hodgkin lymphoma according to clinical prognostic factors and expression of proteins involved in the activation of immune response, cell cycle regulation and programmed cell death (Ki-67, Bcl-2, Bcl-6 , CD10, CD5, CD138, MUM1 and the presence of mutations L265P MyD88), by classifying patients according to current prognostic scoring systems comparing the clinical and immunological factors prognosis in patients with DLBCL, make a proposal for a prognostic scoring system that would unite the two groups of parameters. All patients was determined by clinical stage of the disease. During the study were collected and processed by clinical and laboratory parameters, that are known to have a prognostic value and that it was possible to collect for all patients included in the study. It is about gender, age, Ann Arbor clinical stage of disease, extranodal number of cities affected processes, performance status, presence of "B" symptoms, hemoglobin, platelet count, erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein levels, beta 2 microglobulin, serum albumin and serum LDH. Histopathological material consisted of 68 paraffin blocks. From immunohistochemical parameters were analyzed: CD5, CD10, Ki- 67, Bcl-2, Bcl-6, MUM1 by EnVision procedure. Molecular-genetic study of gene polymorphism MyD88 L265P was used genomic DNA isolated from fixed tissue in paraffin patients with DLBCL. Polymerization chain reaction were amplified by DNA segments within which the SNP is tested gene MyD88 L265P. Statistical analyzes included the use of nonparametric methods and parametric tests. Period of OS (overall survival), was studied using Kaplan-Meier analysis. A statistically significant difference in overall survival (OS) exists in relation to the age (the benefit under the age of 60 years), compared with gender (in favor of women) and the albumin concentration in serum (lower serum albumin levels in patients with DLBCL are associated with shorter OS, as they showed the greatest predictive value). In the prediction of the risk significance showed recategorized performance status (category :  $\leq 2$ ;  $> 2$ ), recategorized



clinical stage of the disease (limited and advanced DLBCL) and R- IPI. The analysis of restriction fragment length is determined homozygous, normal wild type genotype polymorphisms tested. All other clinical, biochemical and immunohistochemical parameters showed no predictive value in patients with DLBCL. in relation to the applied therapeutic protocol there is a strong statistical significance in overall survival in favor of the patients treated at R- CHOP protocol. We standardized PCR-RFLP method for Myd 88 L265P DNA samples isolated from paraffin molds. According to our knowledge there are no data available on the study Myd 88 L265P polymorphism in a population of patients with DLBCL in Serbia. In the population of patients with areas of southeast Serbia pathological signaling pathway which achieves mutation Myd 88 L265, is not responsible for the development DLBCL. Male gender, age over 60, low levels of serum albumin were negative predictor factors in patients with DLBCL. R-IPI score is in the era imunochemotherapy, useful prognostic score in relation to the IPI.

Scientific Field: Medicine  
Scientific Discipline: Haemathology

Key Words: DLBCL, imunochemotherapy, immunohistochemical parameters Myd 88 L265P, IPI, R-IPI

UDC: 616.428-006.44: 616-071-097-037(043.3)

CERIF Classification: B 490 Haemathology

Creative Commons License Type: **CC BY-NC-ND**

### Popis skraćenica

AA-IPI:	age adjused IPI
ADCC:	citotoksičnost zavisna od AT
Ag:	antigen
AIF:	apoptoza indukujući faktor
AP-1:	activator protein 1
APAF-1:	Apoptotic protease-activating factor 1
APC:	aktivacija multimernog kompleksa
B2MG:	beta 2 mikroglobulini
BCR:	B cell receptor
CDC:	citotoksičnost posredovana komplementom
CDK:	ciklin zavisna kinaza
CHOP:	hemioterapijski protokol (cyclophosphamide, hydroxyldaunomycin, Vincristine [Oncovin], i prednisone)
CHOP:	terapijski protokol (cyclophosphamide, hydroxyldaunomycin, vincristine, prednisone)
CLL/SLL:	hronična limfocitna leukemija/limfom malih limfocita
CNS:	centralni nervni sistem
CRP:	C reaktivni protein
CVP:	hemioterapijski protokol (cyclophosphamide, vincristine, prednisone)
DHAP:	hemioterapijski protokol (dexamethasone, cytarabine- ARA-C, cisplatin).
DLBCL:	difuzni B krupnoćelijski nehoćinski limfom
EBV:	Epstein-Barr virus
EDTA:	etilendiamin sirćetna kiselina
EN manifestacije:	ekstranodalne manifestacije
ESHAP:	hemioterapijski protokol (etoposide, methylprednisolone, cytarabine- ARA-C, cisplatin)
GC:	germinativni centar
HCV:	hepatitits C virus

HE:	hematoksilin-eozin bojenje
HHV-8:	humani herpes virus 8
HTLV-1:	humani T limfotropni virus 1
IFN:	interferon
Ig:	imunoglobulin
IHH:	imunohistohemija
IKK:	I $\kappa$ B kinase kompleks
IL-2:	interleukin 2
IPI:	Internacionalni Prognostički Indeks
IRAK-4:	IL-1 receptor-associated kinase 4
IRF3:	interferon regulatorni faktor 3
I $\kappa$ B:	inhibitor NF- $\kappa$ B
JAK-STAT3:	Janus kinase-signal transducer and activator of transcription 3
LDH:	laktat dehidrogenaza
Mal/TIRAP:	Myd88 adaptor like/TIR domain containing adaptor molecule
MALT :	mucosa associated lymphoid tissue
MOMP:	propustljivost spolj.membrane mitohondrija
MUM 1:	(multiple myeloma oncogene1) /IRF4: (interferon regulatory factor 4)
Myd 88:	Myeloid differentiation primary response adaptor protein
Myd88L265P:	mutacija Myd88
NCCN-IPI:	enhanced International Prognostic Index
NF- $\kappa$ B :	nuclear factor kappa B
NHL:	nehočkinski limfom
NOS:	(not otherwise specified) drugačije neoznačeno
OS:	overall survival (ukupno preživljavanje)
PCR:	lančana reakcija polimerizacije
PCR-RFLP metoda:	(PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism method) Dužina polimorfnih restrikcionih fragmenata
PFS:	period bez bolesti
RAG:	recombination activating gene

R-CHOP:	hemioterapijski protokol (rituksimab+CHOP)
R-CHOP:	hemioterapijski protokol (rituksimab+CHOP)
R-CVP:	hemioterapijski protokol (rituksimab+CVP)
R-IPi:	revidirani internacionalni prognostički indeks
R-MACOP-B:	hemioterapijski protokol (rituximab, methotrexate, leucovorin, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, bleomycin)
SA:	albumini u serumu
SNP:	jednonukleotidni polimorfizam
SZO(WHO):	svetska zdravstvena organizacija
TICAM1:	TIR domain containing molecules
TIR domen:	TLR/IL1 receptor domain
TLR:	toll like receptor
TNF:	tumor necrosis factor
TRAF6:	TNF receptor associated factors 6
TRIF:	TIR domain containing adapter-inducing INFB

Lista tabela

<b>Tabela 1.</b>	Broj novoobolelih i incidencija od raka na 100.000 stanovnika prema primarnoj lokalizaciji, uzrastu i polu, centralna Srbija, 2011.
<b>Tabela 2.</b>	Broj novoobolelih slučajeva od raka, prema primarnoj lokalizaciji (MKB-10), uzrastu i polu, centralna Srbija, 2011.
<b>Tabela 3.</b>	Ukupan broj novoobolelih, broj i procenat histološki i citološki verifikovanih slučajeva DLBCL prema polu, centralna Srbija, 2011.
<b>Tabela 4.</b>	Broj umrlih slučajeva od raka, prema primarnoj lokalizaciji (MKB-10), uzrastu i polu, centralna Srbija, 2011.
<b>Tabela 5.</b>	Klasifikaciji tumora hematopoetskog i limfoidnog tkiva SZO 2008 zrelih B ćelijskih neoplazmi.
<b>Tabela 6.</b>	Klasifikaciji tumora hematopoetskog i limfoidnog tkiva SZO 2008 DLBCL
<b>Tabela 7.</b>	Translokacije koje zahvataju imunoglobulinske lokuse u DLBCL
<b>Tabela 8.</b>	Ann Arbor klasifikacija kliničkog stadijuma limfoma
<b>Tabela 9.</b>	ECOG performas scoring
<b>Tabela 10.</b>	Korišćena monoklonalna primarna mouse anti-human antitela i IHH analizi
<b>Tabela 11.</b>	Sastav reakcione smeše za lančanu reakciju polimerizacije
<b>Tabela 12.</b>	Sekvence prajmera korišćenih za određivanje genskih polimorfizama
<b>Tabela 13.</b>	Uslovi odvijanja lančane reakcije polimerizacije
<b>Tabela 14.</b>	Restrikcioni enzimi korišćeni za određivanje ispitivanih polimorfizama
<b>Tabela 15.</b>	Aleli i veličina restrikcionih fragmenata za ispitivane polimorfizme
<b>Tabela 16.</b>	Prikaz kliničkih, biohemijskih i imunohistohemijskih karakteristika pacijenata u odnosu na godine starosti
<b>Tabela 17.</b>	Prikaz kliničkih, biohemijskih i imunohistohemijskih karakteristika pacijenata u odnosu na pol
<b>Tabela 18.</b>	Prosečno preživljavanje u odnosu na klinički stadijum bolesti DLBCL
<b>Tabela 19.</b>	Uticaj sadejstva IHH markera na prosečno preživljavanje DLBCL obolelih
<b>Tabela 20.</b>	Prosečno preživljavanje obolelih od DLBCL u odnosu na terapijski protokol
<b>Tabela 21.</b>	Poređenje vrednosti prosečnog preživlj. između grupa R-CHOP i nonR-CHOP
<b>Tabela 22.</b>	Karakteristike obolelih od DLBCL sa relapsom bolesti

## Lista grafikona

- Grafikon 1.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na godine starosti
- Grafikon 2.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na pol
- Grafikon 3.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na klinički stadijum bolesti (1-4)
- Grafikon 4.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na prekategorisani klinički stadijum bolesti
- Grafikon 5.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na IPI scor. syst.
- Grafikon 6.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na R- IPI scor. syst.
- Grafikon 7.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na ECOG
- Grafikon 8.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na prekategorisani ECOG
- Grafikon 9.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na postojanje EN manifestacija
- Grafikon 10.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na prisustvo ili odsustvo B simptoma
- Grafikon 11.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na podtip DLBCL
- Grafikon 12.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na vrednost hemoglobina
- Grafikon 13.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na vrednosti SE eritrocita
- Grafikon 14.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na vrednosti trombocita
- Grafikon 15.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na vrednosti CRP
- Grafikon 16.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na vrednosti LDH
- Grafikon 17.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na vrednosti albumina
- Grafikon 18.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na vrednosti B2MG
- Grafikon 19.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na ekspresiju Ki-67
- Grafikon 20.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na ekspresiju CD5
- Grafikon 21.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na ekspresiju CD10
- Grafikon 22.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na ekspresiju Bcl-2
- Grafikon 23.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na ekspresiju Bcl-6
- Grafikon 24.** Preživljavanje kod obolelih od DLBCL u odnosu na ekspresiju MUM1
- Grafikon 25.** Ukupno preživljavanje svih ispitanika sa DLBCL
- Grafikon 26.** Kaplan-Meierova kriva OS u odnosu na terapijski protokol
- Grafikon 27.** Prediktorni značaj biohemijskih parametara na preživljavanje (Cox r.)
- Grafikon 28.** Prediktorni značaj EN manifestacija i B simptomatologije na preživljavanje (Cox r.)
- Grafikon 29.** Prediktorni značaj IHH parametara na preživljavanje (Cox r.)

Lista slika

- Slika 1** Prikaz porasta incidence i mortaliteta od NHL u SAD
- Slika 2.** (a) Imunohistohemijski algoritam Hansa i saradnika za podelu DLBCL;  
(b) Alternativni imunohistohemijski algoritam za podelu DLBCL
- Slika 3.** Put u sazrevanju i selekciji B limfocita
- Slika 4.** Imunofenotipske karakteristike B limfocita perifernog krvotoka
- Slika 5.** V(D)J rekombinacija u B ćelijskom razvoju
- Slika 6.** Stečene osobitosti neoplazmi
- Slika 7.** Faze normalnog ćelijskog ciklusa
- Slika 8.** Familija BCL2 proteina
- Slika 9.** Proteini Bcl-2 familije u zdravoj i apoptotski izmenjenoj ćeliji
- Slika 10.** Signalni put toll like receptora: Myd 88 zavisni i Myd 88 nezavisni put
- Slika 11.** Šematski prikaz aktivacije NF- $\kappa$ B
- Slika 12.** HE bojenje DLBCL
- Slika 13.** DLBCL: CD 20<sup>+</sup> ekspresija
- Slika 14.** DLBCL: CD5<sup>+</sup> ekspresija
- Slika 15.** DLBCL: Ki- 67 pozitivan 50% i Ki 67 pozitivan 40%
- Slika 16.** DLBCL: CD10<sup>+</sup> ekspresija; CD10 +/- ekspresija
- Slika 17.** DLBCL: Bcl- 2<sup>+</sup> ekspresija
- Slika 18.** DLBCL: Bcl- 6<sup>+</sup> ekspresija
- Slika 19.** DLBCL: MUM 1<sup>+</sup> ekspresija
- Slika 20.** Poliakrilamidna gel elektroforeza za MYD88 L265P polimorfizam
- Slika 21.** Agarozna elektroforeza za proveru PCR reakcije za MYD88 L265P

## Sadržaj:

UVOD .....	1
Epidemiologija i etiologija.....	1
Klasifikacija nehoćinskih limfoma .....	7
Diferencijacija normalnih B limfocita: od puta do stranputice.....	12
Patogeneza nehoćinskih limfoma v.s. mračna strana B ćelijske diferencijacije (molekularne osnove poremećaja ćelijskog ciklusa) .....	17
Poremećaj normalnog ćelijskog ciklusa: početak i kraj u patogenezi NHL .....	18
Apoptoza.....	21
Proteini, signalni putevi i faktori, koji svojom ekspresijom značajno utiču na patogenezu DLBCL, poremećajem kontrole ćelijskog ciklusa.....	24
BCL2.....	24
CD10.....	27
CD5.....	28
CD138.....	29
Ki-67 .....	30
Bcl-6.....	30
MUM 1.....	31
MyD88 (Toll receptori) i mutacija MyD88- L 265P .....	32
NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) .....	34
Klinički i laboratorijski parametri prognoze.....	37
Prognostički scoring sistemi .....	38
Terapijski modaliteti .....	41
CILJ RADA .....	43
RADNA HIPOTEZA.....	44
BOLESNICI I METODEDE.....	45
Pristupi lečenju.....	46
Metodologija.....	47
Obrada biopsijskog materijala .....	48
Imunohistohemijska analiza.....	48
Bodovanje (scoring) imunohistohemijskih bojenja .....	49
Molekularno genetičko istraživanje.....	50
Izolacija DNK .....	50
Lančana reakcije polimerizacije .....	50
Elektroforeza na agaroznom gelu .....	52
Određivanje dužine restrikcionih fragmenata.....	52
Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE).....	53
Analiza fragmenata dobijenih PCR-RFLP metodom .....	54
Statistička analiza.....	55
REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....	56
Klinički faktori prognoze kod bolesnika sa DLBCL .....	56
Godine starosti .....	56
Pol .....	59
Klinički stadijum bolesti.....	62



Internacionalni prognostički indeks; Revidirani internacionalni .....	64
prognostički indeks (IPI/R- IPI).....	64
Performans status- ECOG.....	66
Ekstranodalne manifestacije .....	68
“B” simptomatologija .....	68
Podtip DLBCL (GCB/neGCB).....	69
Laboratorijski- biohemijski faktori prognoze kod bolesnika sa DLBCL .....	70
Hemoglobin.....	70
Sedimentacija eritrocita .....	71
Broj trombocita u perifernoj krvi.....	71
C- reaktivni protein (CRP).....	73
Laktat dehidrogenaza u serumu (LDH) .....	73
Albumini u serumu .....	74
Beta 2 mikroglobulini u serumu (B2MG).....	74
Prikaz IHH karakteristika (DLBCL) kao faktora prognoze.....	76
Analiza dužine preživljavanja u odnosu na ekspresiju IHH markera .....	79
Ki- 67 .....	79
CD5 .....	79
CD10.....	80
Bcl-2.....	81
Bcl-6.....	82
MUM1.....	83
Analiza dužine preživljavanja u odnosu na primenjeni terapijski protokol u lečenju obolelih od DLBCL.....	85
Relaps bolesti.....	87
Prediktorni uticaj pojedinih varijabli na preživljavanje obolelih od DLBCL.....	89
Ispitivanje genskog polimorfizma za Myd88 L265P.....	91
DISKUSIJA .....	93
Prediktorni značaj godina starosti u DLBCL.....	93
Prediktorni značaj polnih grupa u DLBCL.....	94
Karakteristike relapse bolesti u DLBCL.....	95
Prediktorni značaj kliničkog stadijuma bolesti u DLBCL.....	96
Prediktorni značaj vrednosti albumina u serumu u DLBCL.....	97
Prediktorni značaj vrednosti LDH u serumu u DLBCL .....	98
Prediktorni značaj IPI i R- IPI u DLBCL .....	99
Prediktorni značaj prisustva B simptomatologije u DLBCL .....	101
Prediktorni značaj ECOG performans statusa u DLBCL .....	101
Prediktorni značaj godina postojanja EN manifestacija u DLBCL .....	102
Prediktorni značaj anemijskog sindroma u DLBCL.....	103
Prediktorni značaj vrednosti sedimentacije eritrocita u DLBCL.....	104
Prediktorni značaj vrednosti B2MG u serumu u DLBCL .....	104
Prediktorni značaj broja trombocita u DLBCL.....	105
Prediktorni značaj vrednosti CRP u serumu u DLBCL .....	106
Prediktorni značaj u odnosu na GCB i ne GCB DLBCL .....	106
Prediktorni značaj imunohistohemijskih markera u DLBCL .....	107
Prediktorni značaj Bcl-2 u DLBCL .....	108

Prediktorni značaj Bcl-6 u DLBCL .....	108
Prediktorni značaj MUM1 u DLBCL .....	109
Prediktorni značaj Ki- 67 u DLBCL.....	109
Prediktorni značaj CD5 u DLBCL.....	110
Prediktorni značaj CD10 u DLBCL.....	111
Značaj terapijskog modaliteta u lečenju DLBCL .....	112
Prediktorni značaj mutacije Myd88 L265P u DLBCL .....	113
ZAKLJUČCI.....	116
LITERATURA .....	118
PRILOG .....	141
Biografija kandidata .....	141
Izjava 1	
Izjava 2	
Izjava 3	

## ***UVOD***

Nehoćkinski limfomi (*NHL, engl. Non-Hodgkin lymphoma*), obuhvataju skup veoma heterogenih limfoproliferativnih neoplazmi kako po histološkoj strukturi tako i prema biološkim osobinama.

### ***Epidemiologija i etiologija***

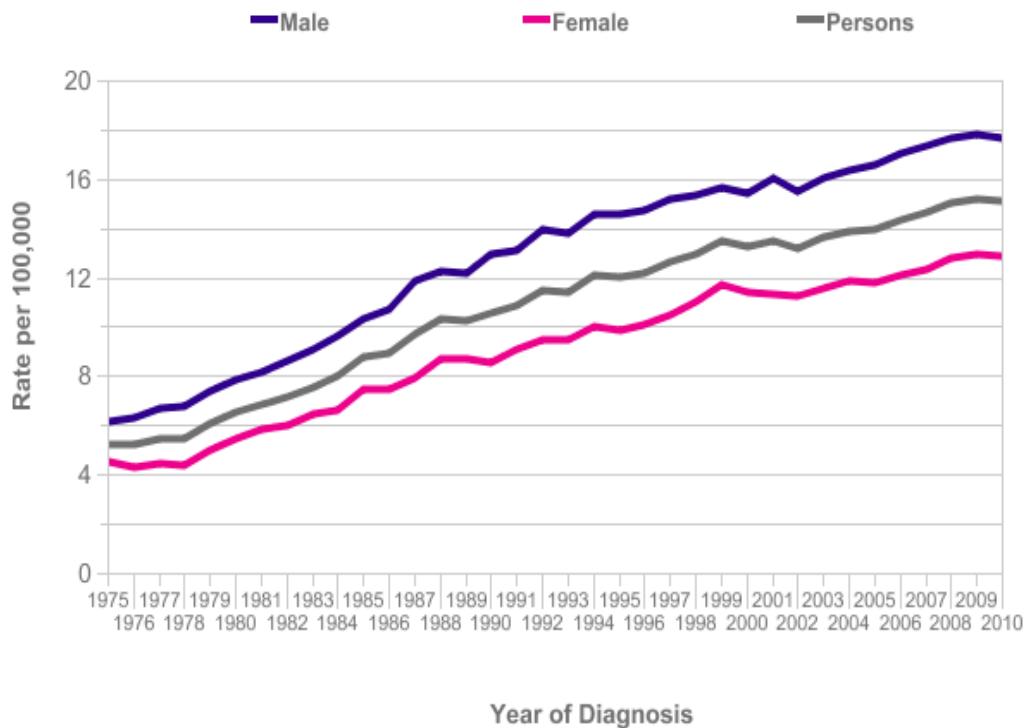
Novije klasifikacije ovih neoplazmi imunog sistema prepoznaju preko 30 razlićitih entiteta, ćija je etiologija i patogeneza većinom nedovoljno razjašnjena. Najćešće su lokalizovani u limfnim nodusima, ali se mogu javiti i u ekstralimfatićkim organima ili kao proširena bolest sa leukemijskom slikom.<sup>199</sup> Preko 85% svih NHL su poreklom od B limfocita.<sup>136</sup> Difuzni B-krupnoćelijski limfom (DLBCL, engl. diffuse large B-cell lymphoma) ćini oko trećinu svih slućajeva nehoćkinskih limfoma, taćnije oko 30-40% svih NHL i ćešće se javlja kod srednjovećnih muškaraca i kod belaca, sa petogodišnjim preživljavanjem oko 50%.<sup>84,120,163,170,191,199</sup> Predstavlja grupu tumora koja je heterogena po svom klinićkom ishodu, morfologiji, imunofenotipu, molekularnoj genetici i citogenetici. DLBCL je agresivni limfom i predstavlja difuznu proliferaciju velikih neoplastićnih B-limfocita, veoma heterogen, kako na klinićkom tako i na genetskom i molekularnom nivou. Ova razlićitost je uslovljena stanjem bolesnika, proširenošću bolesti, podtipom DLBCL, genetskim aberacijama, ekspresijom i mutacijom razlićitih gena i molekularnim podgrupama definisanim profilom genske ekspresije. Podaci za SAD ukazuju da su NHL na šestom mestu kao uzrok smrti od malignih bolesti, a drugi po porastu stope mortaliteta. Isti podaci pokazuju porast stope incidence za 60% u odnosu na

1970 god. koja se održava na 3 do 4% godišnje, što je brže u odnosu na većinu kancera/ National cancer institute (slika 1). Oboleli od NHL u SAD čine 4% svih obolelih od malignih bolesti. Preko 85% svih NHL su poreklom B limfocita. Po podacima »Cancer research UK« iz 2013. godine, preko 13000 pacijenata godišnje u Engleskoj, se dijagnostikuje kao NHL i to je 6. najrasprostranjeniji malignitet. U 2012.godini, kod više od 4500 pacijenata smrtni ishod uzrokovan je NHL.

Ovakvi trendovi su uočeni i na našem području zbog čega su predmet ovog istraživanja upravo B limfomi, konkretno, difuzni B limfom krupnih ćelija. Tako je u registru za maligne bolesti izdatom od strane higijenskog zavoda u Nišu i Instituta za zaštitu zdravlja Srbije "dr Milan Jovanović-Batut", Beograd za 1999 godinu standardna stopa incidence NHL na 100 000 stanovnika u Srbiji iznosila 1,0, a u 2010. godini 2,0. Statistički podaci Instituta za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanovi Batut", Odeljenja za prevenciju i kontrolu nezazarnih bolesti, objavljeni 2013. godine, a koji prikazuju incidence i mortalitet maligniteta u Srbiji za 2011. godinu vrlo su ilustrativni i kada je u pitanju DLCLB. <sup>91</sup> Tu je stopa incidence samo za DLCBL na 100 000 stanovnika u Srbiji u zavisnosti od pola od 2,2-3,2 (tabela 1), sa diskretnom prevalencom muškog pola u ukupnoj stopi oboljevanja (tabela 2). Ono što ohrabruje je da je procenat patohistološki dijagnostikovanih bolesnika 100%, jer je sa pravovremenom dijagnozom i mogućnost terapijskog delovanja bolja, a samim tim i prognoza bolesti (tabela 3). Procenat smrtnosti obolelih od DLBCL u odnosu na ukupan broj dijagnostikovanih i prijavljenih maligniteta je od 0.7-0.9% u zavisnosti od pola (tabela 4).

Procenjuje se da je u Evropi u 2012. godini, oko 38000 ljudi umrlo od NHL (14. najčešći uzrok smrti od maligniteta) , a širom sveta, više od 199 000 ljudi (11. najčešći uzrok smrti od maligniteta).

Najniža stopa smrtnosti uzrokovana NHL u Evropi je u Albaniji, a najviša na Malti i u Hrvatskoj. U svetu, najveća stopa smrtnosti od NHL je u Maleziji, a najniža u centralnoj Aziji (po podacima „Cancer research UK).



**Slika 1.** Prikaz porasta incidence i mortaliteta od NHL (National cancer institute USA)

Navedeni porast incidence delom se može tumačiti i poboljšanom i pravovremenom dijagnostikom. Distribucija i učestalost DLBCL je relativna i pokazuje značajne varijacije u zavisnosti od geografske regije sveta.

Smatra se da su kliničke i biološke osobine NHL posledica transformacije ali i nasleđa karakteristika ćelije od koje su postali. Iz tog razloga sve više pažnje se pridaje proučavanju biologije i histogeneze malignog limfoma.

**Tabela 1.** Broj novoobolelih i incidencija od raka na 100.000 stanovnika prema primarnoj lokalizaciji, uzrastu i polu, centralna Srbija, 2011. godina <sup>91</sup>

MKB 10	pol	ukupno	Sirova Incidencija (crude rate)	Standardizovana incidencija		
				ASR (E)	ASR (W)	ASR TRUNC
DLCBL	muškarci	98	3,8	3,2	2,5	1,5
C 83	žene	82	3,0	2,2	1,7	0,9

Standardizovane stope incidencije i mortaliteta predstavljaju fiktivne vrednosti koje se dobijaju određenim tehničkim postupkom, uvođenjem standardne populacije, obično je to: populacija sveta (ASR-W), Evrope (ASR-E) ili tranka (ASR-TRUNC). Njima se prevazilaze razlike (najčešće po polu i uzrastu) koje postoje u različitim populacijama, tako da su pogodne za poređenja.

**Tabela 2.** Broj novoobolelih slučajeva od raka, prema primarnoj lokalizaciji (MKB-10), uzrastu i polu, centralna Srbija, 2011. godina <sup>91</sup>

MKB10	pol	Ukupno (br.)	0-29 godina	30-59 godina	60-74 godina	>75 godina	% *
DLBCL	muškarci	98	7	45	33	13	0,7%
C 83	žene	82	3	32	29	17	0,6%

\* % u odnosu na ukupan broj maligniteta

**Tabela 3.** Ukupan broj novoobolelih, broj i procenat histološki i citološki verifikovanih slučajeva DLBCL prema polu, centralna Srbija, 2011. godina <sup>91</sup>

	<b>pol</b>	<b>ukupan br.novoobolelih</b>	<b>broj HP verifikovanih</b>	<b>%</b>
DBCLB	muškarci	98	98	100%
C83 /MKB10/	žene	82	82	100%

**Tabela 4.** Broj umrlih slučajeva od raka, prema primarnoj lokalizaciji (MKB-10), uzrastu i polu, centralna Srbija, 2011. godina <sup>91</sup>

<b>MKB10</b>	<b>pol</b>	<b>Ukupno umrli</b>	<b>0-29 godina</b>	<b>30-59 godina</b>	<b>60-74 godina</b>	<b>&gt;75 godina</b>	<b>%*</b>
DLBCL	muškarci	62	4	17	24	17	0,7%
C 83	žene	55	3	13	26	13	0,9%

\* % u odnosu na ukupan broj maligniteta

Brojni eksperimentalni i klinički podaci ukazuju na izuzetan značaj virusa u etiopatogenezi non Hodgkin's limfoma. Više humanih „lymphoma-associated“ virusa kodiraju NF-kB aktivaciju: EBV, human herpesvirus 8 (HHV-8)/Kaposi sarcoma-associated herpesvirus i human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1).<sup>160</sup> Među DNK virusima koji se najčešće dokazuju u ćelijama najučestaliji je Epstein-Barr-ov virus. To je herpes virus koji pokazuje limfotropizam i onkoviralna svojstva. Epstein-Barr virus ulazi u B limfocit preko CD21 antigena (receptora za C3 komponentu komplemента) i vezuje se za genom domaćina. Taj početni korak priprema B limfocit za EBV infekciju. Patohistološke karakteristike EBV<sup>+</sup> DLBCL su polimorfne, pa se na preparatima mogu videti i mali i veliki limfociti, imunoblasti i ćelije slične Reed-Sternberg ćelijama.<sup>169,201</sup>

Drugi poznati retrovirus je humani T leukemija virus (HTLV-1). HTLV spada u rod Deltaretrovirusa, podfamiliju Onkovirinae a familiju Retroviridae, velike grupe RNK virusa. Virusna RNK se inkorporira u limfocit i ta hronična stimulacija može imati važnu ulogu u malignoj proliferaciji. HTLV-1 sintetiše protein koji služi kao transkripcioni faktor sposoban da poveća produkciju IL-2 i njegovih receptora čime se stvara autokrini mehanizam važan za rane faze razvoja limfoma.<sup>134</sup> Hepatitis C virus (HCV) se takođe pominje u epidemiološkim studijama i dovodi u vezu sa indolentnim limfomima. Pa iako DLCBL ne spada u grupu indolentnih limfoma, dovodi se u vezu sa HCV infekcijom. Više teorija pokušava da objasni na koji način HCV infekcija indukuje nastanak limfoma. Najprihvaćenija je „hit and run“ teorija po kojoj HCV indukuje genetsko oštećenje B ćelije uzrokujući Bcl-2 translokaciju.<sup>211</sup>

*Helicobacter pylori* stalnom antigenom stimulacijom svojim moćnim enzimima i lipopolisaharidima, kao i toksinima kojima je naoružana, stvara uslove za razvoj limfoidnih neoplazmi u sluznici želuca (*mucosa associated lymphoid tissue - MALT*). MALT limfomi želuca nastaju na mestima gde se normalno ne nalazi limfno tkivo, a nastaju kao posledica hronične infekcije zbog nakupljanja limfocita kao odgovor na infekciju.<sup>104,213</sup>

Različite nokse, pesticidi, veštačke boje i čitav niz drugih faktora spoljne sredine su dovođeni u vezu sa pojačanom incidencijom NHL ali ni za jedan od brojnih faktora nije identifikovana precizna etiološka uloga. Očita je i možda presudna uloga hromozomskih translokacija - najčešća t (8;14), delecija i tačkastih mutacija. Važan patogenetski faktor predstavlja imunosupresija koja značajno onesposobljava mehanizme imunološkog nadzora. Imunosupresija se smatra najodgovornijom za povećanje incidence limfoma u kongenitalnim imunodeficijencijama i kod transplantiranih na hroničnoj imunosupresivnoj terapiji. Značaj disregulacije imunog sistema za razvoj NHL se ogleda i kroz porast incidencije limfoma kod obolelih od autoimunih bolesti.<sup>65,136</sup>

U vrlo oskudnim podacima, na temu uloge selenijuma u DLBCL čini se da ima mesta novim istraživanjima.<sup>106,118</sup>



### ***Klasifikacija nehoćinskih limfoma***

Morfološka, biološka i klinička heterogenost je prepoznata od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), tako da u Klasifikaciji tumora hematopoetskog i limfoidnog tkiva SZO iz 2008, 4. izdanje, u odnosu na prethodnu klasifikaciju<sup>97</sup>, postoje različite morfološke varijante DLBCL, molekularne i imunohistohemijske podgrupe DLBCL, kao i različiti klinički entiteti DLBCL koji nisu drugačije specifikovani (not otherwise specified, NOS) i obuhvataju one tipove DLBCL koji ne pripadaju specifičnim podtipovima ili entitetima, kojih nije bilo u ranijim klasifikacijama.<sup>96</sup> Klasifikacija limfoma iz 2008. godine, predviđa prepoznavanje ranih i in situ lezija, prepoznavanje starosne dobi kao karakteristike određenih limfomskih entiteta, (kod starijih osoba i kod dece), kao i prepoznavanje „border-line“ kategorija.<sup>96,163,191</sup> Klasifikacija neoplazmi zrelih B limfocita<sup>96</sup> prikazana je u tabeli 5, a DLBCL po istoj klasifikaciji u tabeli 6.

Tumorska ćelija je B veliki transformirani limfocit, ali morfološka slika DLBCL je šarolika i prema prevladavajućem morfološkom tipu ćelija može se razlikovati više podtipova DLBCL.<sup>184</sup>

Imunohistohemijska analiza je postala integralni deo dijagnostičke hematopatologije i neophodna je u dijagnostici limfoma. Panel antitela (CD20, CD10, Bcl-6, MUM1/IRF-4, Bcl-2, CD5, CD138) može mnogo pomoći u svrstavanju različitih tipova limfoma u skladu sa morfološkim izgledom i stepenom diferencijacije. Određeni markeri korespondiraju sa setom ključnih proteina uključenih u ćelijski ciklus, apoptozu i B ćelijsku diferencijaciju.<sup>67,132,177</sup> Promene u klasifikaciji B ćelijskih limfoma su nastale kao rezultat prepoznavanja važnosti mesta nastanka tumora kao i određenih kliničkih karakteristika. Poznavanje novih kliničko-patoloških entiteta je ključno za razvoj i primenu specifičnije i preciznije terapije.

**Tabela 5.** Klasifikaciji tumora hematopoetskog i limfoidnog tkiva SZO/ 2008. godina, zrelih B ćelijskih neoplazmi.<sup>96</sup>

Hronična limfocitna leukemija/limfom malih limfocita
B-ćelijska prolimfocitna leukemija
Splenični marginalno zonalni B-ćelijski limfom
Leukemija vlasastih ćelija
Splenični limfom/leukemija, neklasifikovana B difuzni sitnoćelijski splenični limfom crvene pulpe Leukemija vlasastih ćelija-variant
Limfoplasmacitni limfom Waldenström makroglobulinemija
Bolest teških lanaca α bolest teških lanaca γ bolest teških lanaca μ bolest teških lanaca
Plazma ćelijski mijelom
Solitarni plazmocitom kostiju
Ekstraosealni plazmocitom
Ektranodalni B ćelijski limfom marginalne zone MALT tipa
Nodalni marginalno zonalni B-ćelijski limfom (MZL) Pedijatrijski tip nodalnog MZL
Folikularni limfom Pedijatrijski tip folikularnog limfoma
Primarni kutani folikularno centarski limfom
Mantle ćelijski limfom
Difuzni B krupnoćelijski limfom (DLBCL), not otherwise specified (NOS)
Hodgkin Lymphoma

Modifikacija, napravljena u klasifikaciji limfoma iz 2008. godine, rezultat je saradnje patologa, kliničkih lekara i biologa i odskočna je daska za budućnost i nove klasifikacije u skladu sa situacijom i dešavanjem u kliničkom radu<sup>96,191</sup>, a sve sa ciljem da se poboljša preciznost dijagnostikovanja i terapijski pristup. Druge specifične kategorije DLBCL vezane za mesto nastanka su: DLBCL centralnog nervnog sistema i primarni kutani DLBCL „leg type“ koji se izdvaja kao poseban entitet.<sup>85,200</sup>

**Tabela 6.** Klasifikaciji tumora hematopoetskog i limfoidnog tkiva SZO/ 2008. godina, DLBCL.<sup>163,191</sup>

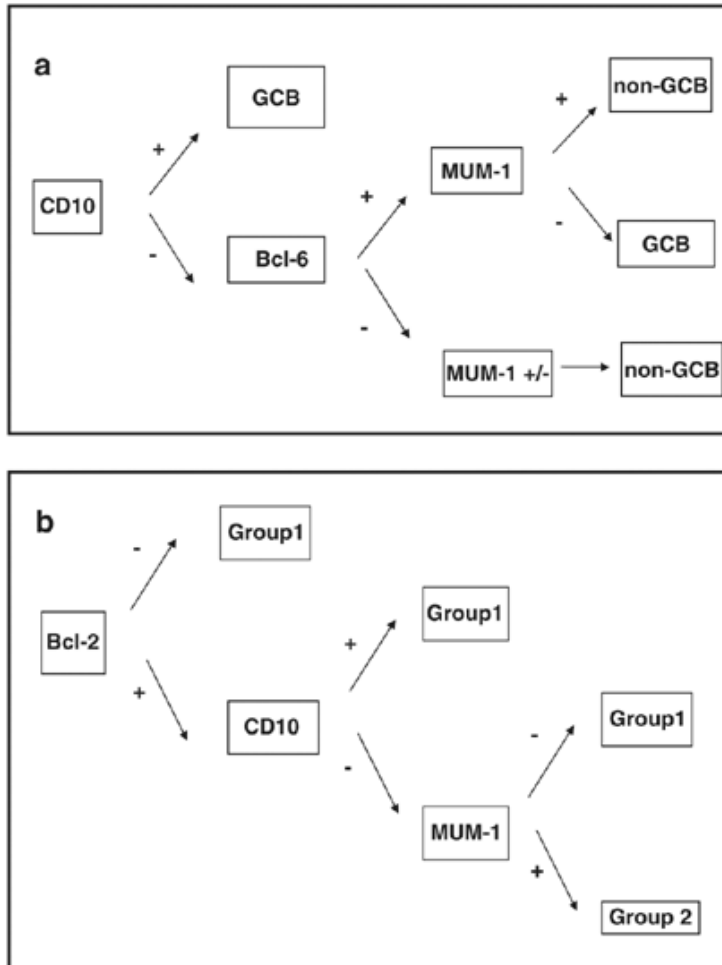
Tip Morfološke varijante	Tip Morfološke varijante
<i>Difuzni B krupnoćelijski limfom, (DLBCL) NOS</i>	Centroblastni
	Imunoblastni
	Anaplastični
	Retke morfološke varijante
	Molekularne podgrupe
	GCB tip
	ABC tip
	Imunohistohemijske podgrupe
	CD5 + DLBCL
	GCB
	Non-GCB
<i>DLBCL, podtipovi</i>	DBKL T-cell/histiocyte-rich tip
	Primarni DLBCL centralnog nervnog sistema
	Primarni kutani DLBCL, leg type
	EBV pozitivni DLBCL starijih
<i>Ostali limfomi krupnih B ćelija</i>	Primarni medijastinalni B krupnoćelijski limfom
	Intravaskularni B krupnoćelijski limfom
	DLBCL 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
<b>“Borderline” limfomi</b>	
<i>B-ćelijski limfom, neklasifikovan, sa karakteristikama između DLBCL i Burkitt-ovog limfoma</i>	
<i>B-ćelijski limfom, neklasifikovan, sa karakteristikama između DBKL i Hodgkin-ovog limfoma</i>	

Klasifikacija SZO iz 2008. godine prepoznaje kategoriju tumora nazvanu B ćelijska neoplazma, sa karakteristikama između DLBCL i Hodgkin-ovog limfoma. Ovi tumori nastaju najčešće kod mlađih muškaraca. Takođe, prepoznata je grupa limfoma koju nije moguće klasifikovati ni kao Burkitt ni kao DLBCL. Ova kategorija je nazvana B-ćelijski limfom, sa karakteristikama između DLBCL i Burkitt-ovog limfoma.<sup>163</sup>

Na osnovu istraživanja u oblasti molekularne genetike i imunohistohemije, napravljen je veliki napredak u subklasifikaciji DLBCL u klinički relevantne grupe: porekla germinativnog centra (GCB) i ne-GCB tip ili aktiviranih B ćelija (ABC). Germinativni centri (GC) u limfnim tkivima su mesta klonske ekspanzije i uređivanja Ig receptora u B limfocitima i ta GC reakcija je fiziološki deo humornog imunog odgovora. Somatska hipermutacija je deo GC reakcije i to dovodi do nagomilavanja somatskih mutacija u onkogenima i tumor- supresornim genima u B limfocitu.<sup>121,122,128</sup> Stadijum diferencijacije B limfocita na kome se dešava neoplastična transformacija može definisati biološko ponašanje i ishod bolesti kod obolelih od DLBCL. Hans i saradnici su predložili algoritam koji je baziran na imunohistohemijskoj ekspresiji sledećih markera: CD10, Bcl-6 i MUM1/IRF4 (proteini koji su uključeni u proces normalne B ćelijske diferencijacije<sup>13</sup>), a pomoću koga se mogu razlikovati 2 grupe DLBCL.<sup>73</sup> Kombinovana analiza ekspresije ovih antitela u skladu sa predloženim algoritmom može biti surogat za “gene expression” potpis prognostički različitih tipova. Difuzni B krupnoćelijski limfomi porekla germinativnog centra (GCB) su imunohistohemijski CD10 pozitivni (>30% ćelija) ili CD10 negativni, Bcl-6 pozitivni i IRF4/MUM1 negativni. Svi ostali slučajevi se svrstavaju u ne-GCB tip (slika 2).<sup>45,73,81,188</sup>

Mnoge studije su pokazale da podela DLBCL na grupu tumora koji imaju profil B ćelija porekla germinativnog centra (GCB) i na grupu tumora koji imaju profil aktiviranih B ćelija (ABC odnosno “ne GCB”) ima klinički značaj, odnosno da pacijenti iz GCB grupe imaju značajno bolje preživljavanje. Postoje i studije koje i pored ove podele, ne nalaze da ima razlike u preživljavanju, što je naročito izraženo u eri imunohemoterapije.<sup>11,176</sup> Umesto skupe i teško dostupne tehnologije “cDNA microarray gene expression profiling” može se koristiti imunohistohemijska analiza, pomoću koje je moguće klasifikovati DLBCL u molekularno i prognostički različite grupe. Ovakav pristup omogućava široku praktičnu primenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Od izuzetnog značaja je

identifikovati, u vreme postavljanja dijagnoze, one pacijente koji mogu imati koristi od agresivnijeg terapijskog pristupa.<sup>67,81,184,185,188</sup>



**Slika 2:** (a) Imunohistohemijski algoritam Hansa i saradnika za podelu DLBCL u prognostičke podgrupe. (b) Alternativni imunohistohemijski algoritam za podelu DLBCL u : grupa 1 – povoljan i grupa 2 – nepovoljan.<sup>73</sup>

Proces limfomogeneze je vrlo kompleksan a kakva je uloga BCR (B cell receptor) hronične aktivne signalizacije<sup>41</sup>, diferencijacije i poremećaja diferencijacije B limfocita, ekspresije proteina, signalnih puteva i faktora a pre svega poremećaja ćelijskog ciklusa, je pitanje na koje tražimo odgovor.

## ***Diferencijacija normalnih B limfocita: od puta do stranputice: histogeneza B limfoma***

Limfocitna diferencijacija, je u nekom smislu, nepogoda koja se može očekivati u svakom trenutku. Naime, B limfocit stavlja svoj genomski integritet u opasnost za vreme formiranja i revizije njegovih antigenskih receptora. Druga potencijalna opasnost je odgovor na antigen. Kada ovaj odgovor normalno funkcioniše, klonalna ekspanzija B limfocita je pod kontrolom homeostatskih mehanizama.<sup>1</sup> Tkiva koja se smatraju primarnim limfnim tkivom su: koštana srž i timus. Razvoj i sazrevanje B ćelija započinje u koštanoj srži. Progenitori B ćelija proliferišu pa nastaje veliki broj prekursora B ćelija: pre- B ćelije. U fazi pre-B ćelija, Ig geni u lokusu za teške lance jednog hromozoma podležu rekombinaciji pa nastaje protein teškog  $\mu$ - lanca, što predstavlja jedno od osnovnih obeležja pre- B ćelija. Neki od  $\mu$ - proteina eksprimiraju se na površini ćelije udruženi sa dva druga nepromenljiva proteina koji se nazivaju „surogat“ lakih lanaca jer liče na lake lance, i vezuju se za teške lance. Spajanjem teškog lanca  $\mu$  i surogata lakog lanca nastaje receptorski kompleks pre- B ćelija: pre- BCR kompleks- prva kontrolna tačka u razvoju B limfocita.<sup>1</sup> Ako zbog greške u rekombinaciji  $\mu$ - gena ne dođe do produkcije ovog teškog lanca, takve ćelije ne mogu da budu selektovane i umiru u procesu apoptoze. Rearanžiranjem lokusa lakih lanaca se kompletira gen molekula imunoglobulina, koji se zatim sintetiše i pojavljuje na površini ćelije.<sup>1,116</sup> Procesom pozitivne selekcije se odabiru prekursorne B ćelije sa funkcionalnim imunoglobulinskim receptorima i dalje diferenciraju do "naivnih B limfocita". Ćelije sa nefunkcionalnim imunoglobulinskim receptorima se eliminišu u samoj koštanoj srži. Formiranjem "nezrelih ćelija" završava se antigen-nezavisna faza razvoja B limfocita. Posle napuštanja koštane srži, B limfociti krvotokom odlaze u limfne čvorove gde migriraju u spoljašnji region odnosno u tzv "primarne" folikule a kasnije u mantl zonu folikula. U završnoj fazi sazrevanja zajedno se eksprimiraju IgM i IgD. Ovi B limfociti su poznati kao "naivni zreli B-limfociti". Limfni nodusi i slezina spadaju u grupu sekundarnih limfoidnih tkiva. To su mesta gde se "naivni" limfociti prvi put susreću sa egzogenim antigenom.<sup>1</sup>

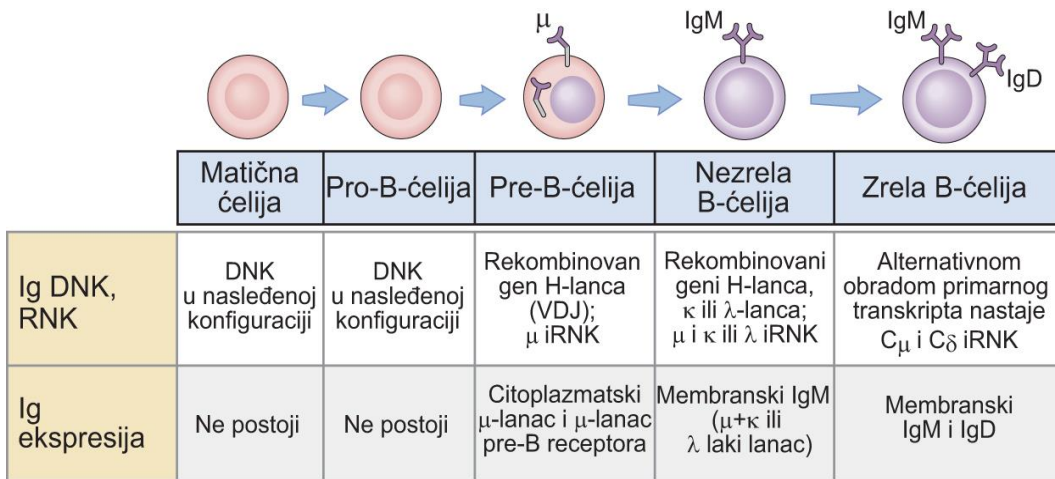
Kada naivni B limfociti dođu u kontakt sa antigenom (Ag), započinje njihova transformacija u proliferišuće ekstralimfne B blaste od kojih nastaju plazma ćelije kratkog životnog veka, kao i "aktivirane B ćelije" poznate kao "antigenom indukovani B limfociti".

Aktivirane B ćelije započinju formiranje germinativnog centra. U germinativnom centru se tokom mitotske proliferacije i diferencijacije akumuliraju nove somatske tačkaste mutacije u već rearanžiranim genima teških i lakih lanaca mehanizmom somatske hipermutacije, koji modifikuje afinitet površinskih antitela prema antigenu. Ćelije koje steknu mutaciju sposobnu da poveća afinitet imunoglobulinskog receptora, nastavljaju svoju diferencijaciju, prelazeći iz germinativnog centra u regione gde se diferenciraju u dugoživuće plazma ćelije i u "memory" B limfocite. Memory ćelije ostaju u marginalnoj zoni limfnog folikula.<sup>1,136</sup>

Prekursorima germinativno-centarskih B limfocita se smatraju CD5<sup>+</sup> subpopulacije na koje otpada prosečno 15% svih B limfocita periferne krvi. Sekundarna limfna tkiva sadrže naivne CD5<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> ćelije zajedno sa CD5<sup>+</sup> B limfocitima u primarnim folikulima i u mantle zoni sekundarnih folikula. Memorijski B limfociti stiču somatične hipermutacije gena za varijabilne regije kada uđu u germinativni centar što se smatra pouzdanim dokazom da je ćelija prošla kroz germinativni centar.<sup>1</sup>

Drugi parametar za razlikovanje memorijskih ćelija je ekspresija CD27, a u slezini i nalaz CD148 površinskog markera, koji su generalne oznake da je reč o ovoj ćelijskoj populaciji.<sup>197</sup> Međutim, osim ovih imunoglobulina značajan broj humanih memorijskih B limfocita je zadržao na svojoj površini i IgM. Nakon rođenja većina B ćelija periferne krvi nosi nemutirane gene za varijabilne regione dok se tokom godina odeljak memorijskih B limfocita povećava dostižući 40% svih B limfocita. Memorijski B limfociti u sekundarnim limfnim organima postoje samo na mestima primarnog dejstva patogena.<sup>1,136</sup>

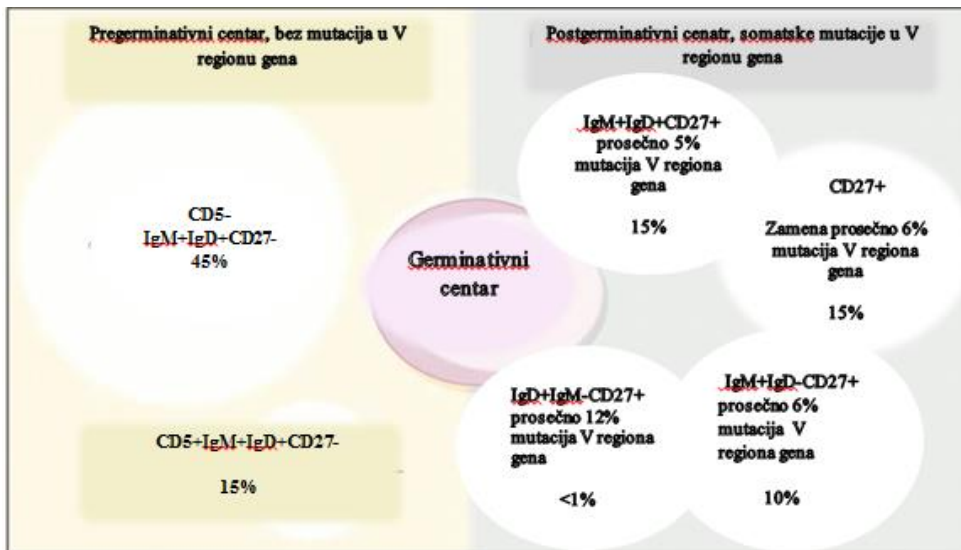
Put diferencijacije normalnog B limfocita prikazan je na slici 3. Imunofenotipske karakteristike B limfocita periferne krvi prikazane su na slici 4.



**Slika 3:** Put u sazrevanju i selekciji B limfocita.\*

(Sazrevanje B limfocita prolazi kroz faze za koje su karakteristične određene promene u ekspresiji Ig gena i različiti obrasci ekspresije Ig proteina. Neuspešna ekspresija funkcionalnih antigenskih receptora teškog Ig lanca u fazi pro-B ćelije, odnosno lakog lanca u fazi pre-B ćelije, prouzrokuje smrt ćelije apoptozom).<sup>1</sup>

\*Abbas AK, Lichtman AH. Osnovna imunologija, funkcije i poremećaji imunskog sistema. 3.izdanje. Beograd: Data status: 2008, s.83.<sup>1</sup>



**Slika 4:** Imunofenotipske karakteristike B limfocita perifernog krvotoka.\*

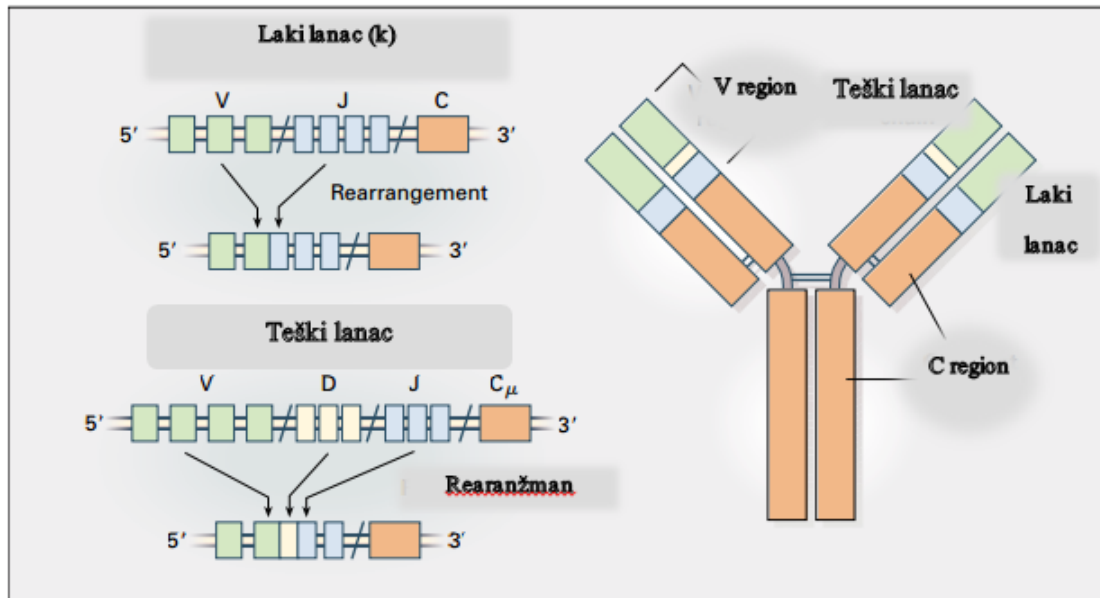
\*Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. NJEM 1999; 11(341): 1520-1529.<sup>116</sup>



Međutim, najrazličitiji stimulusi tipa hroničnih infekcija ili jonizujućeg zračenja mogu poremetiti te homeostatske mehanizme, poremetiti odgovor na sopstvene antigene, što može voditi ka limfoidnoj neoplaziji. Mnogi onkogeni događaji koji se dešavaju u limfoidnim malignitetima, prekidaju molekularne puteve koji regulišu B ćelijsku diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu. Prva opasna prepreka u B ćelijskoj diferencijaciji je razmeštaj gena B ćelijskih prekursora u koštanoj srži pri formiranju B ćelijskih receptora- BCR. Ovaj molekularni proces obuhvata prekidanje dvolančane DNK što je inicirano genima RAG<sub>1</sub> i RAG<sub>2</sub> (*engl. recombination activating gene*).<sup>6,22</sup>

Kako RAG nisu eksprimirani u stadijumima zrelog B limfocita, navedena translokacija je moguća u pre GC B ćeliji.<sup>1</sup> Histogeneza NHL se sagledava kroz definisanje ćelijske linije i određivanje stadijuma diferenciranosti limfoma koji se poredi sa normalnim stadijumima razvoja limfocita. Nastajanje većine B ćelijskih limfoma kod ljudi iz ćelija koje su u stadijumu germinativnog centra ili kasnijim ukazuje da se maligna transformacija često odigrava ili bar inicira u B limfocitima u germinativnom centru. Ovo je posledica specifičnosti B limfocitne diferencijacije u mikrookolini germinativnog centra. Intenzivna klonalna ekspanzija normalnih germinativno-centarskih B limfocita sama po sebi predstavlja proces sa visokim rizikom za razvoj maligne transformacije. Proliferativna ekspanzija je udružena sa molekularnim procesima koji modifikuju DNK germinativno-centarskih B limfocita među koje spadaju i prekidi DNK lanaca (preključivanje izotipova imunoglobulina; somatska hipermutacija; editovanje receptora). Povremene greške u kontroli ovih procesa su verovatno od presudnog značaja za stvaranje B ćelijskih neoplazmi jer stvaraju hromozomske translokacije na lokusima imunoglobulinskih gena. Hromozomske translokacije na teškim lancima imunoglobulina u regionima koji su predmet izotipskog preključivanja su opisane za čitav niz B limfoma, pa i DLBCL<sup>228</sup> i verovatno su izazvane poremećenom V(D)J rekombinacijom segmenata gena za teške lance i najčešće se javljaju u B ćelijskim prekursorima koštane srži, ali se ovakvi rearanžmani povremeno mogu odigrati i u germinativno-centarskim B limfocitima.<sup>116,136,177</sup> (slika 5). Translokacije mogu nastati i pri somatskoj hipermutaciji zbog činjenice da često izazivaju delecije ili duplikacije gena za varijabilne regione

stvarajući prekide na DNK.<sup>116,177</sup> Translokacije koje zahvataju imunoglobulinske lokuse u DLBCL<sup>178</sup> prikazane su u tabeli 7.



**Slika 5.** V (D) J rekombinacija u B ćelijskom razvoju.\*

(Antitela se sastoje od 2 identična teška lanca 2 identična k ili  $\lambda$  laka lanca. Svaki od ovih lanaca je podjeljen u konstantne- C i varijabilne regione- V. Geni varijabilnog regiona su sastavljeni od V, D i J segmenata za teške lance i V i J segmenata za lake lance. U procesu rekombinacije, DNK locirana između rearanžiranih genskih elemenata se briše iz hromozoma, a u nekim slučajevima i obrnuto. U svom začetku DNK sadrži mnogo različitih V, D i J segmenata, pa se tako može stvoriti mnogo različitih antitela).<sup>116</sup>

\*(Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. NJEM 1999; 11(341): 1520-1529)<sup>116</sup>

**Tabela 7.** Translokacije koje zahvataju imunoglobulinske lokuse u DLBCL

Translokacija DLBCL	%	Zahvaćeni geni
t(14;18)(q21;q32)	20%	Bcl-2
t(8;14)(q24;q32)	10%	Myc
t(3;14)(q27;q32)	5-10%	Bcl-6
t(14;15)(q32;q11-13)	<1%	Bcl-8
t(10;14)(q24;q32)	<1%	NF-kB2

---

## ***Patogeneza nehoćinskih limfoma v.s. mračna strana B ćelijske diferencijacije(molekularne osnove poremećaja ćelijskog ciklusa)***

Patogeneza limfoma kao i većine neoplazmi je složeni proces akumuliranja multiplih genetskih lezija koje remete normalnu funkciju protoonkogeni i tumor supresornih gena. Osnovne biološke karakteristike malignih ćelija koje su posledica ovih oštećenja se prema Hannahan-u i saradnicima<sup>71</sup>, mogu grupisati u:

- Nereagovanje na inhibitorne signale koji zaustavljaju ćelijsku proliferaciju (neograničeni replikativni potencijal);
- Nereagovanje na proliiferativne signale;
- Sposobnost neprekidne perzistentne proliferacije;
- Nereagovanje na apoptozne signale;
- Težnja ka invaziji u druga tkiva;
- Izazivanje angiogeneze.

Prve četiri grupe poremećaja spadaju u poremećaje regulacije ćelijskog ciklusa zbog čega je poznavanje kontrole ćelijskog ciklusa od primarnog značaja za razumevanje i efikasnije lečenje limfoidnih neoplazmi i svih ostalih neoplazmi (slika 6). Ova koncepcija biologije malignih ćelija iz 2000. godine je vrlo precizno definisala oštećenja koja su karakteristike malignih ćelija.<sup>71</sup> U reviji iz 2011. godine istih autora<sup>72</sup>, ovom konceptu dodaju se još 2 grupe poremećaja:

- Reprogramiranje energetskeg metabolizma ćelije i
- Zaobilazjenje imune razgradnje.

Osim ovoga, neoplazma pokazuje i drugo lice svoje složenosti. Tumorsko tkivo sadrži paletu naizgled normalnih ćelija, koje doprinose stvaranju pogodne tumorske mikrosredine.<sup>71,72</sup>



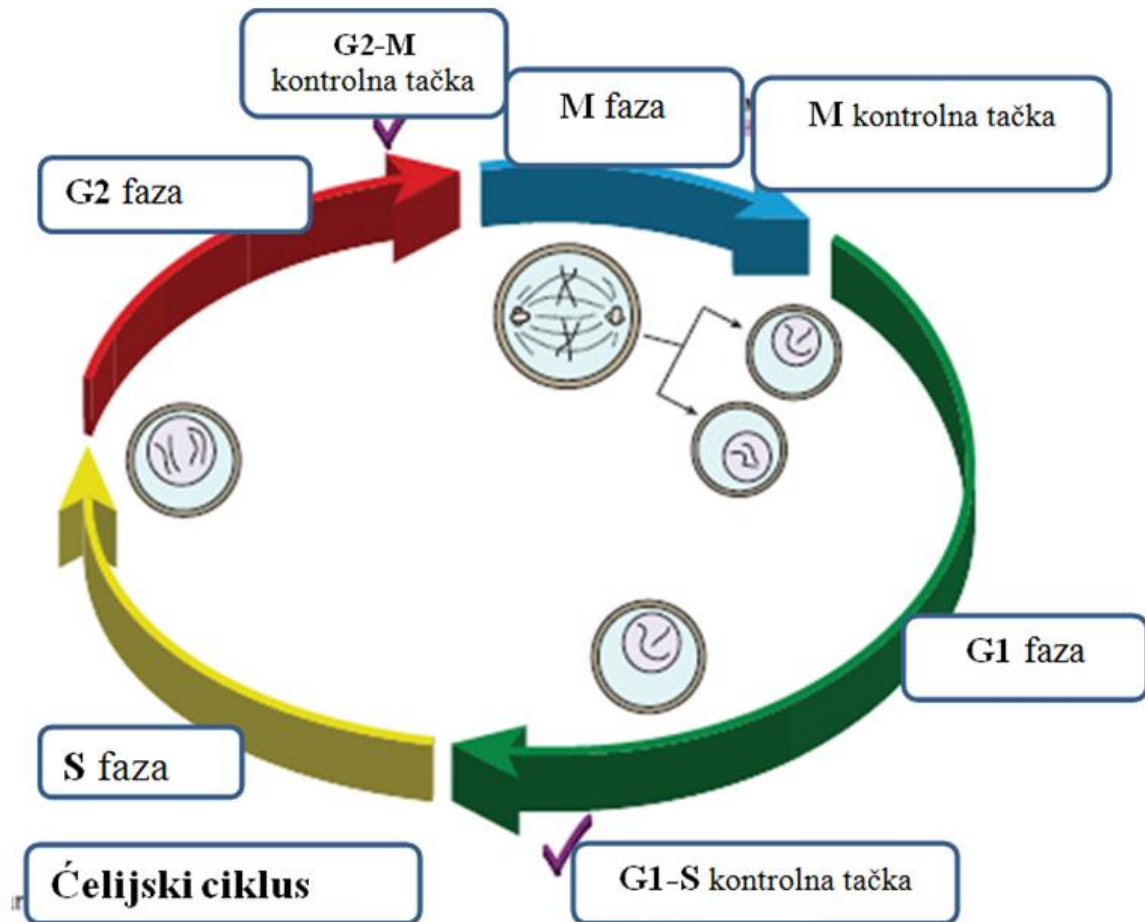
**Slika 6:** Stečene karakteristike neoplazmi.\*

\*Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100 (1): 57-70.<sup>71</sup>

### ***Poremećaj normalnog ćelijskog ciklusa: početak i kraj u patogenezi nehoćinskih limfoma***

Da bi se uopšte diskutovalo o povezanosti B ćelijske diferencijacije, apoptoze i proliferacije u DLBCL, sledi povratak na normalni ćelijski ciklus.

Tradicionalno se ćelijski ciklus deli u četiri stadijuma ili faze: M, G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub> (slika 7).<sup>222</sup>



**Slika 7:** Faze normalnog ćelijskog ciklusa\*

\*Wong E.V. Cells: Molecules et Mechanisms. Chapter 15, Cell Cycle: 230-252.<sup>222</sup>

Za odvijanje ćelijskog ciklusa najvažnije su tri grupe proteina: ciklin zavisne kinaze (CDK, cyclin dependent kinases), ciklini i inhibitori ciklin-zavisnih kinaza.

Ciklin-zavisne kinaze: enzimi koji vrše fosforilaciju (dodavanje fosfatnih grupa na specifične aminokiseline u proteinima) određenih ključnih proteina, pa ih tako najčešće aktiviraju.

Ciklini : proteini koji kada su prisutni u dovoljnom broju aktiviraju CDK, dok inhibitori ciklin-zavisnih kinaza kada su prisutni u dovoljnoj koncentraciji sprečavaju njihovu aktivnost.<sup>8,13,19,20,136</sup>

G<sub>1</sub> faza – početak ćelijskog ciklusa: (*engl. G=gap, pukotina*) interval između završene mitoze (M faze) i početka S faze. Najduža i najvarijabilnija faza ćelijskog ciklusa. U toku ove faze ćelija donosi ključnu odluku: da li da započne nov ciklus ćelijske deobe ili ne, da li da ostane privremeno ili trajno van ćelijskog ciklusa, u G<sub>0</sub> fazi, odnosno da započne proces diferencijacije i specijalizacije. Ishod odluke zavisi pre svega od prisustva i vrste faktora rasta (mitogena), interakcije sa vanćelijskim matriksom i drugim ćelijama (kontaktna inhibicija).<sup>20</sup> Faktori rasta deluju preko specifičnih receptora na ćeliju i najčešće znače signal za započinjanje ćelijskog ciklusa. S druge strane, odsustvo faktora rasta (mitogena) sprečava ulazak ćelije u deobni ciklus. Na taj način ćelija sumira stimulišuće i inhibišuće signale i donosi konačnu odluku. Tokom najvećeg dela G<sub>1</sub> faze ćelijskog ciklusa ćelija je prijemčiva na dejstvo signala iz spoljne okoline.<sup>20</sup> Međutim, pred kraj ove faze, ukoliko prođe tzv. restrikcionu tačku, prestaje njena prijemčivost na spoljašnje signale i dalja progresija kroz ćelijski ciklus ne zavisi više od spoljnih signala. S druge strane, ukoliko pre prolaska kroz restrikcionu tačku prestane dejstvo mitogena, ćelija se zaustavlja u G<sub>1</sub> fazi (Faktor transformacije rasta beta- TGFβ najčešće predstavlja signal za zaustavljanje progresije ćelijskog ciklusa).<sup>20,222</sup> Ako ova inhibicija duže traje, uz prisustvo odgovarajućih signala, započinje proces diferencijacije i u nekim slučajevima ćelija nepovratno gubi mogućnost ponovnog ulaska u ćelijski ciklus. U ključne proteina čija sinteza zavisi od prisustva mitogena spadaju proteini iz grupe ciklina D (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>). Na samom kraju G<sub>1</sub> faze detektuje se porast količine Ciklina E koji je vezan sa CDK<sub>2</sub> (ciklin zavisna kinaza 2). Reč je proteinskom kompleksu koji je ključan za prelazak u S fazu ćelijskog ciklusa i to kroz R kontrolnu tačku na kojoj ćelija proverava da li su sve neophodne radnje iz G<sub>1</sub> faze obavljene na odgovarajući način.<sup>20,222</sup> Ova faza traje od 6-12 sati.

S faza – replikacija DNK: U toku S faze ćelijskog ciklusa odvija se najvažniji element pripreme ćelije za deobu, replikacija DNK. U S fazi, veoma brzo dolazi do razgradnje ciklina E, a njegovu ulogu polako preuzima ciklin A koji se takođe vezuje za CDK<sub>2</sub> i na taj način aktivira. Koncentracija ciklina A počinje da raste krajem G<sub>1</sub> faze, a njegova osnovna uloga je da provede ćeliju kroz S fazu ćelijskog ciklusa. Pri kraju S faze, ciklin A počinje da se vezuje za CDK<sub>1</sub> i aktivira je, što uvodi ćeliju u G<sub>2</sub> fazu ćelijskog ciklusa.<sup>20,222</sup> S faza traje 6-8 sati.

G<sub>2</sub> faza: je period u kome se ćelija priprema da uđe u deobu. Količina DNK je u ćelije duplirana u odnosu na G<sub>1</sub> fazu. G<sub>1</sub> i G<sub>2</sub> faza omogućavaju dodatno vreme ćeliji da uveća svoju masu i udvostruči količinu ćelijskih organela, da bi posle deobe, ćerke ćelije imale odgovarajuću količinu organela i ćelijsku masu.<sup>20,222</sup>

M faza (mitoza): odigravaju se mikroskopom najuočljiviji događaji, vrši se podela jedrovog materijala – kariokineza, i podela ćelije – citokineza. To je najkraća faza ciklusa i kod tipične ćelije sisara traje oko jednog sata. Kontrolu početka i napredovanje mitoze obavlja kompleks ciklin B-CDK<sub>1</sub>. Kao i za ciklin D, postoje i tri različita ciklina B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> i B<sub>3</sub>). Iako se svi oni vezuju za CDK<sub>1</sub>, ispoljavaju različitu unutarćelijsku lokalizaciju i fosforilišu različite proteine. Pored aktivnosti odgovarajućih kompleksa ciklin- CDK, za početak anafaze i kompletiranje mitoze, neophodna je i aktivacija multimernog kompleksa (APC) uključenog u razgradnju ciklina.<sup>20,222</sup>

Period između dve mitotske faze, naziva se interfaza i čine je opisane G<sub>1</sub>, S i G<sub>2</sub> faza ćelijskog ciklusa.

DNK spada u primarne molekule čiji se integritet kontinuirano nadgleda i ukoliko dođe do njenog oštećenja zaustavlja se progresija ćelijskog ciklusa. Protein nazvan P53 je ključan u zaustavljanju ćelijskog ciklusa u slučaju oštećenja DNK. p53 je transkripcioni faktor, koji kada je aktiviran, omogućava ekspresiju nekoliko gena. Jedan od ovih je gen za proteinski produkt p21 koji spada u grupu inhibitora CDK. Na taj način, p53 aktiviran usled oštećenja DNK dovodi do sinteze p21 koji sprečava aktivnost CDK i zaustavlja ćeliju u G<sub>1</sub> fazi ćelijskog ciklusa.<sup>13,20</sup>

Pored ovog opisanog mehanizma, p53 ispoljava i druge načine zaustavljanja napredovanja ćelijskog ciklusa, ne samo u G<sub>1</sub> fazi, već i u G<sub>2</sub> fazi i tokom mitoze. Takođe, u slučajevima nepovratnog oštećenja DNK, p53 može da indukuje aktivaciju apoptoze. Značajna uloga P53 ogleda se u činjenici da u velikom procentu malignih oboljenja P53 mutiran. Pokazano je da su mnogobrojne promene koje mogu menjati p53 put udružene sa lošijom prognozom bolesti.<sup>121</sup> Tokom ćelijskog ciklusa, pored restrikcione tačke, postoji čitav niz kontrolnih punktova, koje ćelija može da prođe samo ukoliko su određeni uslovi zadovoljeni, tj. ukoliko su prethodne faze kompletirane. Kada ovo nije slučaj, ćelija biva zaustavljena, bilo privremeno do ispravke ili kompletiranja



prethodne faze, a ukoliko ispravke nisu moguće, posebno u slučajevima težih oštećenja DNK, aktivira se proces apoptoze.<sup>8,19,20,136</sup>

### ***Apoptoza***

Programirana ćelijska smrt ili apoptoza je mehanizam komplementaran ćelijskoj proliferaciji, koji obezbeđuje homeostazu svih tkiva. Procenjuje se da svakog dana u prosečnoj odrasloj osobi procesom apoptoze propada 50 do 70 milijardi ćelija, što tokom jedne godine u svakoj jedinki znači proizvodnju i uništenje mase ćelija koja odgovara celokupnoj telesnoj težini. Svaki defekt apoptoznog mehanizma može dovesti do produžetka ćelijskog života i stvaranja povoljnih uslova za akumulaciju mutacija i genetsku nestabilnost. Defekti apoptoze pospešuju rezistenciju na hemioterapiju, radijaciju i imunološki posredovanu ćelijsku destrukciju.<sup>172</sup> Do sada su poznata tri puta aktivacije programirane ćelijske smrti kojima je zajednička posledica aktivacija cistein proteinaze poznate kao kaspaza-3.

- Prvi put aktivacije se ostvaruje oslobađanjem citohroma C iz mitohondrija: *mitohondrijski put*.
- Drugi signalni put započinje vezivanjem aktivacionih liganada za receptore na površini ćelije koji pripadaju TNF-receptorskoj porodici (FAS i TRAIL receptori): *receptorski put*.
- Treći način aktivacije ostvaruju *citotoksični T limfociti* svojim enzimima (perforin/granzim-zavisnu smrt) kao i direktni uticaj radijacije i virusnih faktora.<sup>48</sup>



Mitohondrijski i receptorski put aktiviraju enzimi nazvani kaspaze (engl. caspase, cysteine aspartyl proteases). Kaspaze su proteolitički enzimi (citoplazmatske cisteinil-aspartatno specifične endoproteaze) koji podstiču apoptozu. U citoplazmi ćelije nalaze se u obliku proenzima, a mogu biti aktivirane autokatalitički ili drugom kaspazom. Postepena- stepenasta razgradnja u kojoj jedna kaspaza može aktivirati druge kaspaze, ali i samu sebe, pojačava apoptotski signalni put i dovodi do vrlo brze smrti ćelije. Inhibitori kaspaza zaustavljaju apoptozu.

Za sada porodicu kaspaza čini 14 članova koje se označavaju rednim brojem 1-14, pri čemu prokaspaze 2, 8, 9 i 10 ubrajamo u pokretačke, a prokaspaze 3, 6 i 7 u izvršne kaspaze. U receptorskom putu prva se aktivira kaspaza 8, a u mitohondrijskom kaspaza 9. Navedene kaspaze aktiviraju kaspazu 3. Tokom apoptoze kaspaza 3 je odgovorna, delimično ili u potpunosti, za razgradnju velikog broja proteina u ćeliji, fragmentaciju DNK i zgušnjavanje hromatina. U receptorskom putu aktivacije apoptoze važnu ulogu igra porodica TNF receptora- grupa membranskih proteina koja se proteže od spoljne do unutrašnje površine ćelijske membrane<sup>34,48,113,240</sup>.

U mitohondrijskom putu aktivacije apoptoze centralno mesto zauzimaju mitohondrije.<sup>119</sup> Apoptoza-indukujući faktor (AIF) i citohrom C predstavljaju dva ključna molekula koji se oslobađaju iz mitohondrija i aktiviraju apoptozu. Povećnje propustljivosti spoljašnje membrane mitohondrija (*mitochondrial outer membrane permeability, MOMP*) predstavlja "tačku bez povratka".<sup>29,48,202</sup> Otpušteni citohrom C veže se uz APAF-1 (Apoptotic protease-activating factor 1) pa se aktivira kaspaza 9.<sup>102,123</sup> Osim receptorskog i mitohondrijskog puta, apoptozu mogu direktno aktivirati enzimi citotoksičnih T-limfocita. Glavni izvršni molekuli u ovom putu aktivacije apoptoze su granzim A i B, serinske esteraze citotoksičnih T limfocita i NK ćelija. Granzim B može direktno aktivirati kaspaze 3, 7, 8 i 10 i tako pokrenuti apoptozu. Granzim A aktivira kaspaza nezavistan put apoptoze posredovan DN-azom NM23-H1 tako što razgrađuje protein SET koji inaktivira gen za NM23-H1. Uloga ovog puta naročito je važna u imunološki posredovanoj prevenciji karcinoma putem apoptoze tumorskih ćelija.<sup>139</sup> Kaspaza nezavisna smrt ćelije odvija se puno sporije od kaspaza zavisne apoptoze.

Sve ovo govori u prilog da ljudski organizam ne može zavisiti samo od jedne grupe enzima u odstranjivanju oštećenih ćelija.<sup>170,201</sup>

U eksperimentalnom modelu, rađenom sa ciljem pronalaženja uzroka za postojanje rezistencije na terapiju a radi poboljšanja preživljavanja kod obolelih od limfoma, ukazano je na značaj i antiapoptotski uticaj oksidativnog stresa na mitohondrije.<sup>218</sup>

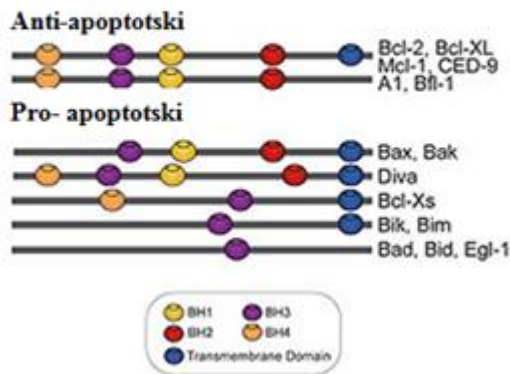
### ***Proteini, signalni putevi i faktori, koji svojom ekspresijom značajno utiču na patogenezu DLBCL, poremećajem kontrole ćelijskog ciklusa***

#### ***BCL2***

*BCL2* gen (*B-cell lymphoma/leukemia-2 gene*) kodira 26-kDa protein koji inhibira apoptozu indukovanu mitohondrijalnim putem. *BCL2* je dao ime celoj porodici molekula regulatora apoptoze koju čine i antiapoptotski (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, MCL1 i dr.) i proapoptotski (Bax, Bak, Bcl-X<sub>S</sub>, Bid, Bik, Bad, Bim i dr.) proteini.<sup>29,172,240</sup> (slika 8) Proapoptotski proteini prisutni su u citoplazmi kao senzori ćelijskog oštećenja ili stresa, dok se antiapoptotski proteini nalaze u intermembranskom prostoru mitohondrija. Odnos proapoptotskih i antiapoptotskih faktora određuje osetljivost ćelije na apoptozu. Važno je naglasiti da taj odnos bitno određuje odgovor ćelija tumora na zračenje i hemioterapiju. Bcl-2 protein eksprimiran je u pre B ćelijama, resting B ćelijama (u fiziološkim uslovima, ćelije se nalaze u tzv. eng. *quiscent* ili *resting* stanju koje bi se moglo označiti kao stanje mirovanja) uključujući mantl zone limfocita, kao i u nekim tipovima proliferišućih B limfocita.<sup>10</sup> Članovi porodice BCL2 regulišu broj i tip jonskih kanala u unutrašnjoj membrani mitohondrija, pri čemu Bad i Bax dovode do stvaranja većih jonskih kanala kroz koje izlaze citohrom C i drugi proapoptotski molekuli. U svim molekulima ove porodice su pronađena četiri važna BCL2 strukturna homologa i to: BH1, BH2, BH3 i BH4 pri čemu je BH4 prisutan samo u antiapoptotskim proteinima.<sup>230</sup> Ključna funkcija Bcl-2 proteina i drugih njemu sličnih (Bcl-X<sub>L</sub>) je da zadrže citohrom C u mitohondrijama što ostvaruju blokiranjem efekata Bax molekula ali se ne isključuje mogućnost da Bcl-2 transportuje citohrom C natrag u mitohondrije. Mnogi proteini iz BCL2 porodice se međusobno na složen način povezuju u homo ili heterodimere zavisno od interakcija

između njihovih domena. Odnos antiapoptotskih i proapoptotskih dimera je važan za opredeljenje ćelije da se odupre apoptozi. Ipak u istraživanjima su dobijeni rezultati da u ćelijama koje ispoljavaju različite nivoe Bcl-2 i Bax, stepen zaštite od apoptoze zavisi od količine Bcl-2 koji nije vezan za Bax i da ne zavisi od broja Bcl-2/ Bax heterodimera.<sup>160</sup>

### BCL2 familija proteina



**Slika 8:** Familija BCL2 proteina\*

\*Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395–419.<sup>29</sup>

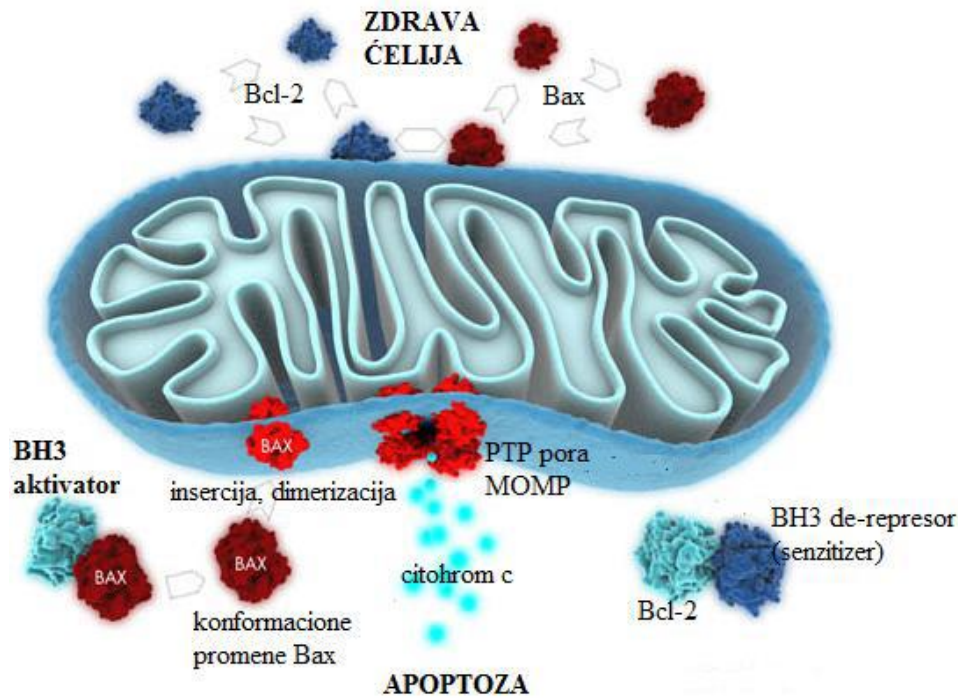
U fiziološkim uslovima, anti-apoptotski članovi vezani su za spoljašnju membranu mitohondrija i održavaju stabilnost i nepropustnost spoljašnje membrane. Anti-apoptotski proteini neutrališu proapoptotske vezivanjem za BH3 domene antiapoptotskih Bcl-2 proteina. Da bi došlo do MOMP i apoptoze, moraju se istovremeno odigrati dva procesa:

- (1) svi anti-apoptotski proteini moraju biti inhibirani
- (2) Bax i Bak moraju biti aktivirani BH3-only aktivatorima.

Tokom ćelijskog stresa, aktivni oblici *BH3-only* aktivatora (Bid, Bim) direktnom interakcijom (*“hit and run”*) izazivaju konformacione promene, dimerizaciju i inserciju Bax i Bak u mitohondrijalnu membranu dovodeći do formiranja delikatnih pora (*permeability transition pore, PTP*) i MOMP (slika 9).<sup>52</sup>

Iako je ekspresija Bcl-2 proteina blisko povezana sa prisustvom translokacije u izvesnim slučajevima ona je nezavisna od translokacije. Takvi alternativni mehanizmi Bcl-2 ekspresije su genska amplifikacija ili izmenjena kontrola ekspresije gena. U DLBCL 57%

slučajeva sa t (14;18) i 75% bez t (14;18) ima imunocitohemijsku pozitivnost za Bcl-2.<sup>87</sup>  
 Translokacioni status Bcl-2 ne korelira sa preživljavanjem u DLBCL.<sup>126</sup>



**Slika 9** . Proteini BCL2 familije u zdravoj i apoptotski izmenjenoj ćeliji\*

\*Ehrlich E. Regulation of BAX mediated apoptosis by BCL2 family members. [homepage on the Internet]. Created: june 17, 2011. A.f:<http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/minireview/apoptosis.php>.<sup>52</sup>

Izolovana hiperekspresija Bcl-2 nije dovoljna da izazove maligni fenotip što dokazuje i nalaz klonalnih Bcl-2 -Ig rearanžmana i u nekim normalnim B limfocitima sa dugim životom kakvi su mirujućí/memory B limfociti. U normalnim limfnim tkivima reaktivini germinativni centri su Bcl-2 negativni. U B-NHL, Bcl-2 ekspresija, se ispoljava u različitim procentima pa u DLBCL iznosi 70%. Prognostički značaj Bcl-2 najviše je ispitivan u DLBCL gde je označen kao parametar loše prognoze. Imunohistohemijski je 22-80% DLBCL Bcl-2<sup>+</sup> (pozitivnim su smatrani slučajevi sa >50% obojenih ćelija).<sup>133</sup>  
 Laboratorijski izazvana fosforilacija Bcl-2, poništava sposobnost Bcl-2 da deluje antiapoptotski. Osim toga tako fosforilisan ne može da spreči lipidnu peroksidaciju u cilju sprečavanja apoptoze.<sup>29,69</sup>

Ukoliko se prognostički značaj Bcl-2<sup>+</sup> ekspresija razmatra izolovano i samo na osnovu imunohistohemije, pokazalo se da je prognostička moć zavisna od prisustva drugih markera i kliničkih parametara. Dokazano da je prognostički potencijal Bcl-2 ograničen markerima diferencijacije germinativnog centra (Bcl-6 i CD10), p53 mutacionim statusom, odsustvom ili prisustvom t (14;18) i Internacionalnim Prognostičkim Indeksom (IPI) odnosno revidiranim IPI (R- IPI). Protein p53 može pokrenuti apoptozu tako da poremeti odnos proapoptotskih i antiapoptotskih mitohondrijskih proteina porodice BCL2. Zbog toga u DLBCL sa germinativno-centarskim fenotipom (35% slučajeva DLBCL) ekspresija Bcl-2 ne utiče na prognozu. U varijantama DLBCL koje nisu germinativno-centarske (CD10<sup>-</sup> / Bcl-6<sup>-</sup>), ekspresija Bcl-2 je udružena sa lošom prognozom.<sup>87,136</sup> Članovi BCL2 familije međusobno intereaguju i stvaraju neku vrstu dinamične ravnoteže između homo i heterodimera, dok in vivo postoji nadmetanje između proapoptotskih i antiapoptotskih članova BCL2 familije, a neki od tih članova deluju i potpuno nezavisno.<sup>241</sup> Analizirajući strukturu dimera, čini se da osim članova BCL2 familije, tu postoji i prisustvo drugih Bcl-2 like proteina, koji ne pripadaju ovoj familiji. U eri primene imunohemoterapije, konkretno rituximaba, sve više je uloga Bcl-2 kao markera loše prognoze diskutabilna.<sup>142</sup>

.

### **CD10**

*Common acute lymphoblastic leukaemia antigen* (CALLA, CD10) je membranska metaloproteinaza koja učestvuje u postsekretornoj razgradnji neuropeptida, inaktivaciji zapaljenskih i vazoaktivnih peptida.<sup>126</sup> Nalazi se u različitim tkivima - mozgu, jetri, tankom crevu, bubregu, kori nadbubrežne žlezde, gonadama, placenti i leukocitima.

U normalnom limfnom tkivu CD10 protein je eksprimiran u ranim limfoidnim progenitornim ćelijama i B ćelijama germinativnog centra, na površini ćelije. Prihvaćen je kao marker centrolikularnog porekla B ćelija.<sup>44,53</sup> Mogućnost CD10 da inaktivira signalne peptide na površini ćelije, može uticati na proliferaciju, migraciju i diferencijaciju ćelija.<sup>201</sup> Ekspresija proteina CD10 prisutna je u 20-40% DLBCL.<sup>209</sup>

Njegova ekspresija se označava kao marker dobre prognoze u GCB DLBCL, mada u svetlu primene imunohemioterapije i u korelaciji sa drugim imunohistohemijskim obeležjima odnosno proteinima i kliničkim obeležjima, to je sve više predmet diskusije.<sup>53</sup>

### **CD5**

CD5 antigen je T ćelijski marker, koji je takođe eksprimiran u B hroničnoj limfocitnoj leukemiji, Mantle cell limfomu i 5-10 % DLBCL, lociran je na dugom kraku 11. hromozoma.<sup>126,146</sup> Citogenetske analize identifikuju grupu pacijenata sa de novo CD5<sup>+</sup> DLBCL sa hromozomskom abnormalnošću u 8p21 ili 11q13, a koji imaju lošu prognozu bolesti.<sup>224,225</sup> To je 67-kd signal-transdukujući protein uključen u proces aktivacije T ćelija. Takođe je dokumentovano da CD5 može učestvovati u ushodnoj regulaciji i biti eksprimiran za vreme aktivacije B ćelija. Identifikovane su CD5<sup>+</sup> B ćelije i nazvane B1 ćelije (IgM sekretujuće B ćelije) i označene su kao deo urođenog imunog odgovora. Razlika u odnosu na B2 ćelije je u imunoglobulinima koje proizvode.<sup>75,80</sup> Glavna uloga CD5<sup>+</sup> B-limfocita je stvaranje antitela sa niskim afinitetom i niskom specifičnošću. Smatra se da CD5 produžava vek B-limfocita stimulacijom autokrine produkcije interleukina 10. *Ennishi et al. (2008)* u svom istraživanju su po prvi put pokušali da odrede distribuciju ekspresije CD5 obzirom na imunohistokemijsku klasifikaciju DLBCL prema algoritmu *Hans et al. (2004)*.<sup>51,73</sup> Za razliku od sličnih studija koje su molekularnim metodama utvrdile da se CD5<sup>+</sup> DLBCL uglavnom nalaze u prognostički nepovoljnoj grupi ne GCB (ABC)<sup>225</sup>, rezultati *Ennishi et al. (2008)* nisu potvrdili povezanost ekspresije CD5 i GCB kao ni CD5 i ne GCB(ABC) grupe<sup>51</sup>.

## **CD138**

Syndecan-1 (CD138) je transmembranski heparan sulfat proteoglikan. Ekspresija je prisutna na površini epitelnih ćelija, normalnim B ćelijskim prekursorima u koštanoj srži, a nema je u ćelijama germinativnog centra, da bi opet bila prisutna u postgerminativnim ćelijama i zrelim plazma ćelijama.<sup>155</sup> Interakcijom sa različitim efektorskim molekulima reguliše adheziju i migraciju ćelija, pa podstiče interakciju i aktivnost faktora rasta. Evaluacija prisutnosti CD138 u NHL u radu *O' Conel et al.* (2004) , rezultuje pozitivnošću CD138 u 6/57 bolesnika, od kojih su 2 bolesnika sa DLBCL - imunoblastičnog subtipa<sup>155</sup>. Smatra se karakterističnim markerom plazma ćelija, ali može biti izražen i u nekim podvrstama DLBCL, naročito u imunoblastičnoj varijanti DLBCL i u plazmablastičnom limfomu. U radu *Colomo et al.*(2003) korišten je kao marker ne-GCB (ABC) fenotipa.<sup>36</sup>

## **Ki-67**

Ki-67 protein je strogo regulisan proliferativnim zahtevima ćelije. Ki-67 kao nuklearni protein, uključen u regulaciju ćelijske proliferacije, uglavnom se koristi kao marker za procenu proliferativne aktivnosti limfoma. Detaljne analize ćelijskog ciklusa otkrivaju da je Ki-67 antigen prisutan u jedrima proliferišućih ćelija (G<sub>1</sub>, S , G<sub>2</sub>, M faza ćelijskog ciklusa) ali ne i u jedrima ćelija koje miruju (G<sub>0</sub>-faza).<sup>63</sup> Maksimalna koncentracija se postiže tokom faze mitoze, da bi neposredno posle njenog završetka količina antigena pala na manji nivo.<sup>63</sup> Tokom interfaze Ki-67 protein je pretežno udružen sa nukleolima<sup>107</sup> dok se tokom mitoze tesno povezuje sa hromozomima.<sup>50,63</sup> Na osnovu ove karakteristike, Ki-67 protein je vrlo važan za procenu proliferativne frakcije u ćelijskim populacijama. Ki- 67 je negativan prognostički faktor kod obolelih od DLBCL. U meta-analizi *He et al.*(2014) koja analizira 27 studija, rezultat potvrđuje da je Ki- 67 snažan prediktor rizika kod obolelih od DLBCL, ali da je njegov značaj zavistan od tipa DLBCL i da ne koreliše sa ostalim kliničko- patološkim faktorima prognoze, kao ni sa IPI skorom.<sup>76</sup>



## ***Bcl-6***

Bcl-6 protein je marker germinativnog centra. Može se naći i u drugim tkivima ali je najintenzivnija ekspresija u limfocitima. Zbog toga su onkogene karakteristike ovog molekula najbolje ispitane u limfoidnom sistemu gde se ispoljava u germinativnim B i T limfocitima, pojedinačnim limfocitima interfolikularnih regiona limfnog čvora i kortikalnim timocitima.<sup>43</sup>

Zbog selektivne ekspresije Bcl-6 u B limfocitima germinativnog centra, ovaj molekul je iskorišćen kao pokazatelj malignog porekla B neoplazmi nastalih iz germinativnog centra. U celini, nalaz Bcl-6 je karakteristika ćelija sa visokim proliferativnim indeksom. Izmenjena ekspresija Bcl-6 može vršiti represiju gena uključenih u apopozu favorizujući neoplastičan rast.<sup>136,137</sup> Postoje i mišljenja da Bcl-6 inhibira apoptozu<sup>111,112,115</sup>, kao i da ga odlikuju proapoptotska svojstva.<sup>195</sup> Ova dvostruka uloga Bcl-6 u regulaciji apoptoze može zavistiti od tipa ćelije ili intenziteta ekspresije.

Prognostički značaj translokacije ekspresije Bcl-6 je ispitivan u brojnim studijama. Visok nivo ekspresije Bcl-6 u većini studija predstavlja povoljan faktor prognoze<sup>16,186,241</sup> pa to utiče na povećanje ukupnog preživljavanja kod obolelih od DLBCL. Ovi nalazi se objašnjavaju visokom produkcijom informacione RNK *BCL6* gena u translokacijama na Ig lokusima, dok je niža ekspresija prisutna u translokacijama na lokusima koji su van imunoglobulinskih gena. U drugim studijama nije dokazana značajna razlika dužine ukupnog preživljavanja u odnosu na pozitivnu ili negativnu ekspresiju Bcl-6 u DLBCL.<sup>36,111,112,144</sup> Postoje studije u kojima se ekspresija Bcl-6 posmatra u svetlu primenjenog terapijskog protokola kod obolelih od DLBCL.<sup>221</sup>

Neki autori u svojim studijama Bcl-6 razmatraju u novom svetlu nezavisnog prediktornog faktora kod obolelih od DLBCL.<sup>181</sup> Prognostički značaj Bcl-6 ekspresije je prihvaćen kod obolelih od DLBCL lečenih CHOP protokolom, pa je Bcl-6 inkorporirana u prediktivni model preživljavanja.<sup>126,175</sup>



## ***MUM1***

*MUM1 (multiple myeloma oncogene1) /IRF4 (interferon regulatory factor4)* gen je identifikovan u multiplom mijelomu. MUM1 je član porodice interferon regulatornih faktora (IRF) koju aktivira interferon (IFN) u svrhu odbrane od virusa i pri ćelijskoj proliferaciji.<sup>24,66,74,149,196</sup> Ekspresija MUM1 gena je povezana sa ekspresijom NF-κB puta koji inače kontroliše ekspresiju niza drugih gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa, proliferaciju i apoptozu, kao i sa stalnom aktivacijom NF-κB puta pa je identifikovan kao negativni prognostički faktor u DLBCL i CLL/SLL.<sup>138</sup> Najintenzivniju ekspresiju MUM1 imaju plazma ćelije kod B limfocita i aktivisane ćelije među T ćelijskom populacijom.<sup>136</sup> Zbog svoje ekspresije koja je regulisana u procesu limfoidne diferencijacije, MUM1 se koristi kao marker histogenetske diferencijacije limfoma.<sup>207</sup> Isti autori nalaze da se ekspresija MUM1 odigrava u finalnim fazama diferencijacije B limfocita germinativnih centara - centrocita kao i u narednim fazama na putu sazrevanja B limfocita u plazma ćelije. Uočena je razlika u ekspresiji MUM1 i Bcl-6 u germinativnom centru gde se Bcl-6 ispoljava u B limfocitu neposredno nakon ulaska u germinativni centar dok se MUM1 pojavljuje u centrocitima i post-germinativno-centarskim ćelijama<sup>24</sup>. Zbog toga se MUM1 koristi za detekciju ćelija koje su u fazi tranzicije od Bcl-6<sup>+</sup> (germinativno-centarske) ka CD138<sup>+</sup> ćelijama (imunoblasti i plazmablasti). U skladu sa ovim je i potpuno odsustvo MUM1 antigena na limfocitima mantle ćelijskih i folikularnih limfoma (pre-germinativno i germinativno-centarske ćelije).<sup>207</sup>

MUM1 je eksprimiran u približno 75% DLBCL. Za razliku od normalnih ćelija germinativnog centra gde je ekspresija MUM1 suprotna ispoljavanju Bcl-6, u približno 50% slučajeva DLBCL, tumorske ćelije koeksprimiraju MUM1 i Bcl-6 ukazujući na disregulisanu gensku ekspresiju u ovom limfomu. Takođe, prisustvo MUM1 zajedno sa CD138, Bcl-6 i CD10 pomaže u razlikovanju pojedinih subpopulacija DLBCL.<sup>24</sup> Studije ekspresije gena u DLBCL su otkrile da prisustvo IRF4/MUM1 visoko koreliše sa aktivisanim tipom ove neoplazme, pa je MUM1 označen kao negativni prognostički faktor.<sup>82,126,127,147</sup> U radovima drugih autora nema značajne korelacije u odnosu na ekspresiju MUM1 i preživljavanje kod obolelih od DLBCL.<sup>76,177,181</sup> Kako je prisustvo

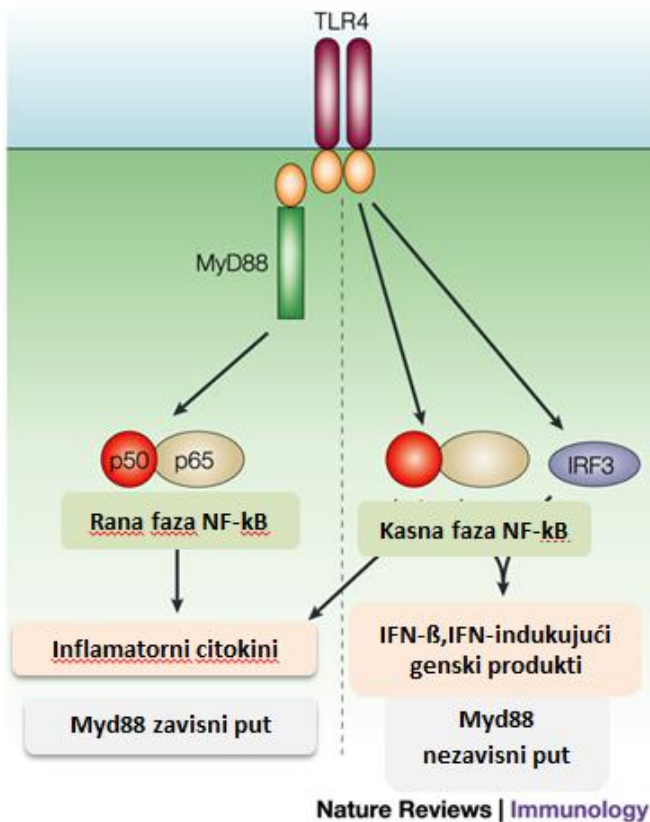
MUM1 povezano sa konstantnom aktivacijom NF- $\kappa$ B puta, imunohistohemijska detekcija može poslužiti kao surogatni marker za limfome kojima se terapijski može ordinirati inhibitor NF- $\kappa$ B puta – bortezomib.<sup>66</sup> Prognostički značaj ekspresije MUM1 u DLBCL još uvek je predmet diskusija.

### ***MyD88 (Toll receptori) i mutacija MyD88- L 265P***

Myd 88 (Myeloid differentiation primary response) je intracelularni adaptor protein koji prenosi signale sa toll-like receptora (TLR) i koji može igrati vrlo važnu ulogu u patogenezi limfoma.<sup>7,23,105,193</sup>

TLR su membranski glikoproteini, koji se obzirom na sličnost citoplazmatskog dela domena ubrajaju u istu porodicu kao i receptori za IL-1. Vezivanje liganda za TLR uzrokuje dimerizaciju i stvaranje TIR (TLR/IL1). Znači, spoljni domen TLR ima funkciju u prepoznavanja liganda, a citoplazmatski domen TIR, u otpočinjanju signalizacijske kaskade koja rezultuje prelaskom transkripcionog faktora u jedro. Prenos signala omogućavaju adaptor proteini, među kojima Myd88 ima centralnu ulogu u odgovoru B ćelije nakon nadražaja preko TLR. Myd88 ima 2 domena: TIR domen (TLR/IL-1 receptor domain) i DD (death domain). Identifikovana su 2 signalna puta koji se razlikuju po tome koji adaptor protein prenosi signal.<sup>7,105,140,179,193,212</sup> Najuobičajeniji je signalni put koji prenosi Myd88, a koji se naziva Myd88 zavisni put. U ovom putu, Myd88 se vezuje za receptore TLR1,2,4,6 u prisustvu Mal/TIRAP (Myd88-adaptor-like/TIR-domain-containing adaptor molecule). Na TIR domen Mal/TIRAP se svojim TIR domenom vezuje Myd88, a svojim DD domenom se Myd88 vezuje za IRAK4 (IL-1 receptor-associated kinase 4). Ta veza omogućava vezivanje i IRAK1 (IL-1 receptor-associated kinase 1). IRAK4 uzrokuje fosforilaciju IRAK1 a samim tim i aktivaciju. Na takav IRAK1 se vezuje TRAF6 (TNF receptor associated factor 6), pa se kompleks IRAK1/TRAF6 oslobađa receptora i formira kompleks sa setom proteina i kinaza što rezultuje degradacijom IRAK1 na plazma membrani. Preostali deo kompleksa u nizu reakcija fosforiliše IKK (inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)-kinase complex), koji potom osforiliše I $\kappa$ B. I $\kappa$ B se razgrađuje, što dovodi do oslobađanja NF- $\kappa$ B iz inhibitornog kompleksa.

U Myd88 nezavisnom putu koji se još naziva i TRIF(TIR domain containing adaptor-inducing INF- $\beta$ ) ili (TICAM1:TIR-domain-containing molecule1) zavisni put, po aktivaciji receptora TLR3 i 4, TRIF se vezuje sa IKK kinazama, aktivira se IRF3 (IFN regulatory factor 3), koji kao dimer putuje u jedro i i involvira se u kasnu fazu aktivacije NF- $\kappa$ B.<sup>7,148,193,212,213,214</sup> Rezultat oba puta MyD88 je da se aktivira kaskadu koja rezultira aktivacijom NF- $\kappa$ B puta. (slika 10)



**Slika 10.** Signalni put toll like receptora: Myd 88 zavisni i Myd 88 nezavisni put\*

(Stimulacija TLR 4 olakšava aktivaciju 2 puta: Myd 88 zavisni i Myd 88 nezavisni put. Myd 88 zavisni put involviran je u ranu fazu aktivacije NF- $\kappa$ B, što vodi produkciji inflamatornih citokina. Myd 88 nezavisni put aktivira interferon (IFN) regulatorni factor 3 (IRF3) i involvira se u kasnu fazu aktivacije NF- $\kappa$ B. Oba puta vode ka produkciji IFN- $\beta$  i ekspresiji IFN inducibilnih gena).<sup>7</sup>

\*Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. Nature Reviews Immunology 2004; 4(7): 499-511.<sup>7</sup>

Myd88 promoviše i JAK-STAT3 (Janus kinase–signal transducer and activator of transcription 3) signalni put, što se ogleda u preživljavanju limfomskih ćelija.<sup>213,214,216</sup>

Mutacija Myd 88 L 265P nastaje zamenom leucina prolinom na poziciji 265. I Myd88 L265P mutacija takođe je vrlo potentna u povećanju aktivnosti JAK-STAT3 signalnog puta, što vodi produkciji proinflamatornih citokina (IL6,IL10,IFN- $\beta$ ) i daljoj aktivaciji JAK-STAT3 signalnog puta.<sup>100,212,214</sup>

Prekomerna ekspresija Myd 88, kao i prisustvo mutacije Myd 88 L 265P rezultuje hroničnom aktivacijom B ćelijskog receptorskog signalnog sistema, i aktivacijom NF- $\kappa$ B puta.<sup>7,100,148,162</sup> Dosadašnji podaci ukazuju da je visoka ekspresija MyD88 povezana sa recidivima bolesti kod pacijenata sa DLBCL, tako da može biti od presudnog značaja za prognozu bolesti nezavisno od MyD88 L 265P mutacije.<sup>32</sup> Myd88 je zapravo veza, i to vrlo važna, u aktivaciji i proliferaciji B ćelija pod uticajem mnogobrojnih ekstracelularnih stimulusa, što vodi prekomernoj aktivaciji NF- $\kappa$ B puta.<sup>212,214</sup>

Prisustvo mutacije Myd88 L265P, zabeleženo je kod limfoplazmocitnog limfoma, Waldenstromove makroglobulinemije, a u manjem procentu i kod neGCB B difuznih krupnoćelijskih limfoma. Opstanak ne GCB DLBCL ćelija koji nose mutaciju L265P je podržan od strane mutanta, ali ne i divljeg tipa (wild type) MyD88 izoforme. MyD88 signalni put je sastavni deo patogeneze ne GCB DLBCL, koji se karakteriše hroničnom aktivacijom B ćelijske receptor signalizacije i stalnom aktivacijom NF- $\kappa$ B puta.

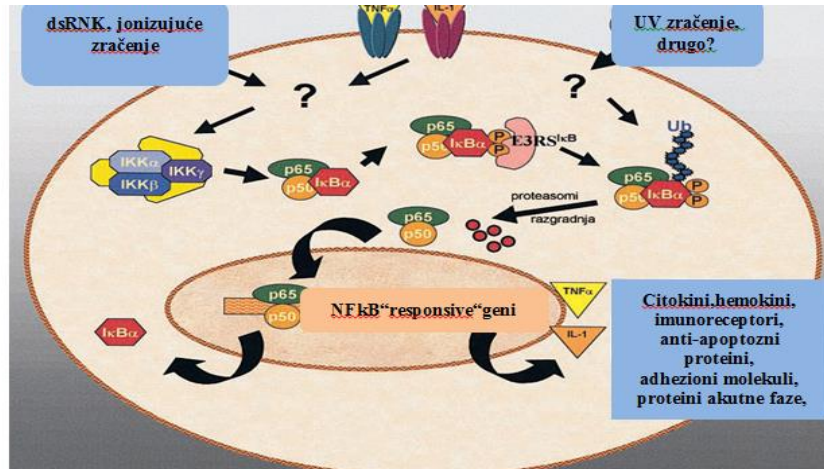
Postoji postulat da mutacija Myd88 u postgerminativnom centru B ćelija vodi u limfogenezu, naročito tipa DLBCL i da je Myd 88 eksprimiran u citoplazmi limfomske ćelije.<sup>156</sup> Sa duge strane, i prekomerna akumulacija Myd88 uzrokuje disregulaciju B ćelija. Ekspresija Myd88 je u B ćelijama tada visoka i korelira sa lošijom prognozom bolesti.<sup>213, 32</sup>

Sa terapijskog stanovišta, signalni kompleks koji je koordiniran od strane MyD88 L 265P predstavlja primamljivu metu.<sup>100,148,212,214</sup> Kako je aberantna NF- $\kappa$ B aktivacija definitivno faktor loše prognoze bolesti, cilj je sprečiti aktiviranje NF- $\kappa$ B na bilo kom delu signalnog puta. Najpotentniji terapijski cilj je zapravo istovremeno dejstvo na TLR i BCR (B cell receptor) signalni put, naročito za neGCB DLBCL, sa ciljem supresije NF- $\kappa$ B puta, sinergističkim dejstvom imunomodulatora lenalidomida i inhibitora BTK Bruton tyrosine kinase) koji je deo BCR puta, verovatno putem indukcije INF- $\beta$  puta.<sup>212,214,227</sup>

---

***NF-κB (nuclear factor kappa B)***

Transkripcijski faktor NF-κB (*engl.* nuclear factor kappa B) nalazi se u gotovo svim tipovima ćelija i učestvuje u regulaciji ekspresije velikog broja gena. Učestvuje u imunom odgovoru kao regulator ekspresije gena, uključujući one koji kodiraju anti-apoptotske molekule i regulatore ćelijskog ciklusa, citokine i površinske receptore. U fazi mirovanja proteini NF-κB su sekvstrirani u citoplazmi zbog interakcije sa IκB inhibitorima (inhibitor NF-κB). U nestimulisanim ćelijama dimeri NF-κB nalaze se u citoplazmi povezani s inhibitornim proteinima klase IκB. Porodicu proteina IκB čine: IκB-α, IκB-β, IκB-γ, IκB-δ, IκB-ε i Bcl-3, mada i p105 i p100 mogu delovati kao IκB.<sup>152</sup> NF-κB je zajednički naziv za transkripcijske faktore sastavljene od proteina porodice Rel koji vežu DNK. Porodicu proteina Rel čini pet članova: Rel (c-Rel), RelA (p65/NF-κB3) RelB, NF-κB1 (p50 i njegov prekursor p105) i NF-κB2 (p52 i njegov prekursor p100).<sup>152</sup> Svi oni sadrže homologni domen Rel (*engl.* Rel homology domain) veličine oko 300 aminokiselina, koji je odgovoran za njihovu dimerizaciju, vezivanje DNK i interakciju sa inhibitornim IκB proteinima, a ujedno je i regulatorni domen.<sup>103</sup> Generalno se smatra da se NF-κB signalni put aktivira preko klasičnog/-kanonskog puta i alternativnog-nekanonskog puta. U klasičnom putu, nakon stimulacije proinflamatornim citokinima kao što je tumor necrosis factor α (TNFα), signalni put vodi ka aktivaciji IKK kompleksa (IκB kinase complex). Aktivirani IKK kompleks pretežno delujući putem IKKβ i IKKγ-zavisnim putem katalizuje fosforilaciju IκBs (po lokaciji ekvivalent Ser32 i Ser36 IκBα) ubikvitira ga<sup>#</sup> i usmerava do 26S proteasoma gde se hidrolitički razgrađuje. Degradacija IκBα otkriva NLS (*engl.* nuclear localization sequence) na NF-κB, što rezultira translokacijom u jedro. Oslobođeni NF-κB dimeri (najčešće the p50-RelA dimer) u jedru regulišu transkripciju ciljnih gena uključujući i IκBα koji treba da prekine aktivnost NF-κB (slika 11).<sup>103,152</sup> Alternativni put je strogo zavistan od IKKα. Aktivirani IKKα fosforiliše p100 i 2C terminalna kraja. Fosforilacija p100 vodi njegovoj ubikvitinaciji i proteazemalnoj obradi na p52, formirajući transkripciono kompetentan NF-κB p52/RelB kompleks koji se seli u jedro i indukuje ekspresiju ciljnih gena.<sup>101,103</sup>



**Slika 11.** Šematski prikaz aktivacije NF-κB\*

(\*Ubikvitinacija: modifikacije nekog proteina, njegovim vezivanjem za jedan ili više ubikvitinskih monomera. Najčešća svrha ubikvitinacije je označavanje proteina za razgradnju u proteasomu)

\*Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-κB activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-63.<sup>103</sup>

Aktivaciju NF-κB klasičnim putem mogu izazvati različiti stimulusi (npr. citokini, bakterijski ili virusni produkti, UV i  $\gamma$  zračenje).<sup>18</sup> Citokini stimuliraju nakupljanje receptora i oligomerizaciju TRAF (TNF receptor associated factors), što je ključni događaj za aktivaciju kinaze IκB. Te kinaze fosforiliraju ili IκB i NF-κB ili transaktivacijske domene AP-1 (engl. activator protein 1), aktivirajući na taj način NF-κB i AP-1.<sup>58</sup> Aktivirani NF-κB u jedru povećava ekspresiju gena ćelijskog ciklusa kao što je ciklin D1, inhibira apoptozu (putem Bcl-X<sub>L</sub>) i eksprimira aktivnost proteasoma. Istraživanje u oblasti terapije vezane za anti apoptotski aspekt NF-κB puta, je od velikog interesa, obzirom da veliki broj svetskih studija uključuje ovaj put kao vrlo važan u patogenezi limfoma i GC (germinal centers) limfomagenezi.<sup>77,103</sup> Disocijacija IκB i translokacija NF-κB u jedru je ključni momenat, i čini se da u tom procesu, a možda i u samoj aktivaciji IKK učestvuju i neke od protein kinaza aktiviranih mitogena. Razumevanje, na koji način NF-κB aktivacija promoviše tumorogenezu, zahteva i razumevanje uloge NF-κB u tumorskim prekursorskim ćelijama. Nađeno je da je c-Rel subjedinica NF-κB potrebna za aktiviranje metaboličkih funkcija koje stimuliraju ćelijsku proliferaciju. Ovo je važno znati zbog daljeg istraživanja na polju antitumorske terapije, sa ciljem selektivne inhibicije komponenti aberantne aktivnosti NF-κB.<sup>109,187</sup>



### ***Klinički i laboratorijski parametri prognoze***

Po svom klinickom toku, DLBCL se ubraja u grupu agresivnih limfoma, što znaci da nelečenje dovodi do letalnog ishoda kroz nekoliko meseci. Simptomi i klinicki znakovi DLBCL-a mogu se podeliti na one uzrokovane tumorskom masom i opšte simptome. Simptomi uzrokovani tumorskom masom zavise od veličine i lokalizacije. Poznavanje faktora prognoze kod bolesnika sa DLBCL ima izuzetno veliku ulogu u orijentaciji kliničara za adekvatan individualizovan pristup terapiji. Brojni klinički parametri spadaju u veoma pouzdane i nezavisne faktore prognoze zbog njihove dobro dokumentovane povezanosti sa reaktivnošću na terapiju i preživljavanjem. Ovi parametri predstavljaju indirektno pokazatelje malignog potencijala tumora, imune reakcije protiv tumora i sposobnost obolelog da toleriše lečenje.<sup>136</sup> U svetskoj literaturi, najčešće analizirani kao prediktorni faktori su sledeći klinički i laboratorijski parametri:

- Klinički stadijum bolesti prema kriterijumima iz Ann Arbora (tabela 8)
- Performans status ECOG (tabela 9)
- Broj ekстранodalnih manifestacija: veoma često se smatra mnogo značajnijim od mesta primarne ekстранodalne lokalizacije. Shodno tome, iako je u DLBCL infiltracija koštane srži prisutna u samo 20-25% ona koreliše sa slabijim reagovanjem na terapiju i ukupnim preživljavanjem.
- Prisustvo „B“ simptoma (telesna temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$ , noćno znojenje i gubitak telesne težine. To su paraneoplasticki simptomi uzrokovani otpuštanjem citokina iz tumorskih ćelija ili ćelija imunološkog sistema koje reaguju na prisustvo tumorske mase.)
- Vrednost hemoglobina u serumu
- Vrednost sedimentacije eritrocita
- Vrednost C- reaktivnog proteina u serumu
- Vrednost serumske LDH
- Vrednost  $\beta_2$  mikroglobulina u serumu
- Vrednost albumina u serumu

**Tabela 8.** Klinički stadijumi bolesti: Ann Arbor kriterijumi

- 
- I- bolest ograničena na mesto nastanka odnosno samo u jednoj regiji sa uvećanim limfnim nodusima.
  
  - II- bolest prisutna u više regiona limfnih nodusa ali samo sa jedne strane dijafragme (npr ispod levog i desnog pazuha, na vratu ali ne i trbuhu i ne u preponama)
  
  - III- limfnih nodusa ima sa obe strane dijafragme (npr. i u trbuhu i u sredogruđu)
  
  - IV- limfne mase ima i u tkivima koja se normalno ne odlikuju velikim prisustvom limfnih ćelija kao što je - kostna srž, želudac, sluznica tankog creva, mozak, testis.
- 

**Tabela 9.** ECOG performas scoring.\*

- 
- ECOG performance status (Eastern Cooperative Oncology Group)**
- 0 - Potpuna aktivnost, bez ograničenja.
  
  - 1- Ograničenje u fizičkim aktivnostima. Mogućnost lakšeg fizičkog rada ili rada u sedećim uslovima, rad u kancelariji.
  
  - 2- Mogućnost brige o sebi- vise od 50% sati u budnom stanju, ali bez ikakve radne aktivnosti.
  
  - 3- Ograničena briga o sebi. Mogućnost ležanja u krevetu ili sedenja u stolici više od 50% sati u budnom stanju.
  
  - 4- Nemogućnost brige o sebi. Potpuna zavisnost od ležanja u krevetu ili sedenja u stolici.
- 

\*Oken M.M, Creech R.H, Tormey D.C et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 1982; 5:649-655.<sup>158</sup>



### *Prognostički skoring sistemi*

Radi adekvatnijeg sagledavanja bolesnika u svetlu mnogobrojnih kliničkih, laboratorijskih i imunohistohemijskih parametara, u velikim centrima su razvijani različiti prognostički skoring sistemi.

MD Anderson centar još 1989 godine je razvio "Huston prognostic index". On je bio primenjiv za sve nehoćinske limfome a zasnivao se na analizi serumske aktivnosti LDH i nivoa  $\beta 2$  mikroglobulina.<sup>190</sup>

Godine 1992 se pojavio "Tumor Skor". Ovaj sistem je kombinovao Ann Arbor stadijum bolesti, nivoe LDH i  $\beta 2$  mikroglobulina u serumu, prisustvo "Bulky" mase i B simptoma.<sup>174</sup>

Zbog pojave sve većeg broja prognostičkih sistema, u multicentričnoj studiji sa 3273 bolesnika obolelih od više vrsta agresivnih limfoma izvršna je analiza kliničkih parametara koji su pretočeni u efikasan i jednostavan skoring sistem. Tako je 1993 godine nastao Internacionalni prognostički indeks (IPI) koji je kombinovanjem nezavisnih parametara, bolesnike svrstao u četiri rizične grupe. Skoring sistemom je obuhvćeno pet nezavisnih prognostičkih faktora u koje spadaju: rasprostranjena bolest (III i IV klinički stadijum po Ann Arboru), povišen nivo LDH u serumu, aktivnost bolesnika (2-4 ECOG skale za performans status), više od dve regije ekstranodalnog zahvatanja i starost preko 60 godina. Grupa sa niskim rizikom obuhvata bolesnike sa 0-1 rizik faktora, intermedijerni-niži rizik su imali bolesnici sa 2, intermedijerni-viši ukoliko su registrovana 3, a visok rizik ukoliko je kod bolesnika bilo 4-5 nepovoljnih faktora prognoze.<sup>185</sup>

U okviru IPI izdvojilo se više modela, a jedan od njih je i "age adjusted IPI" (AA-IPI) koji je takođe izdvajao četiri grupe bolesnika sa ciljem da se prilagodi populaciji bolesnika mlađih od 60 godina, sa primarnim refraktornim agresivnim limfomima.<sup>70</sup>

Revidirani Internaciounalni prognostički indeks (R- IPI) razlikuje 3 grupe pacijenata: Prva grupa - „very good“ prognostička grupa u koju spadaju bolesnici bez faktora rizika, sa približno 90% šansi za dugoročno preživljavanje bez progresije bolesti; Druga grupa - „good“ prognostička grupa u koju spadaju bolesnici sa 1 ili 2 faktora rizika sa približno 80% šansi za dugoročno preživljavanje bez progresije bolesti; Treća grupa- „poor“

prognostička grupa sa 3,4 ili 5 rizik faktora i 50% šansi za dugoročno preživljavanje bez progresije bolesti. R- IPI daje više klinički korisnih podataka za predikciju rizika obolelih od DLBCL.<sup>180</sup>

Prognostički indeksi IPI i R-IPI, nemaju sposobnost identifikacije obolelih sa mogućnošću preživljavanja manje od 50%.<sup>180</sup>

Jedan od prognostičkih modela je i  $\beta$ -2M-IPI model, koji u IPI prognostički model uvodi i vrednost B2 mikroglobulina, obzirom da se B2 mikroglobulin obeležava kao snažan prediktor rizika kod obolelih od DLBCL. Koristan je kod obolelih od DLBCL sa visokim rizikom.<sup>37</sup>

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) na bazi podataka sakupljenih tokom godina primene rituksimaba u terapiji, formirala je pojačani IPI sistem: NCCN- IPI sa ciljem unapređenja stratifikacije rizika. Kliničke karakteristike 1650 odraslih de novo dijagnostikovanih pacijenata sa DLBCL, a koje su prema IPI kriterijumima definisane kao 5 rizik faktora (RF), sada se boduju sa maksimalno 8 bodova (boduju se još: pol, velika tumorska masa „bulky disease”  $\geq 10$  cm i prisustvo “B” simptoma) . Na osnovu toga su formirane 4 rizik grupe: 1.grupa/ nizak rizik sa 0-1 bodova; 2. grupa/ nizak intermedijarni rizik sa 2-3 boda; 3.grupa/ visok intermedijarni rizik sa 4-5 bodova i 4. grupa/ visok rizik sa 6-8 bodova.

U poređenju sa IPI, modifikovani NCCN- IPI (An enhanced International Prognostic Index) bolje definiše grupe sa niskim i visokim rizikom, pa se smatra da je bolji prediktor rizika u rituximab eri.<sup>180,239</sup> Takođe u svetlu boljeg definisanja bolesnika sa visokim rizikom u eri imunohemoterapije, pruža i mogućnost individualizacije u lečenju i izdvajanja bolesnika za druge modalitete lečenja- postremisiona autologna transplantacija matičnih ćelija.

### *Terapijski modaliteti*

Cilj u lečenju obolelih od NHL, a samim tim i obolelih od DLBCL, je individualizovani pristup svakom pacijentu u odnosu na kliničke, laboratorijske i imunohistohemijske parametre prognoze. U skladu sa tim formiraju se kriterijumi za modalitete lečenja, a terapijski pristup je uvek multidisciplinaran. U praksi se u lečenju obolelih od NHL primenjuje:

- Radioterapija
- Hemioterapija (kombinacijom lekova u hemioterapijskim protokolima, od kojih svaki deluje na određenu fazu ćelijskog ciklusa, na različite načine)
  1. Antimikrotubularni lekovi: modifikuju sintezu DNK (vinkristin, vinblastin i dr.)
  2. Alkilirajući lekovi: modifikuju strukturu DNK (ciklofosamid, hlorambucil, dakarbazin i dr)
  3. Antimetaboliti: modifikuju sintezu DNK; najizraženije dejstvo na ćelije u M i S fazi ćelijskog ciklusa (metotreksat, citozar, fludarabin, gemcitabin i dr)
  4. Topoizomerni inhibitori: modifikuju strukturu DNK (doksorubicin, daunorubicin, etopozid i dr)
  5. Platinski analozi: modifikuju strukturu DNK (cisplatin, karboplatin i dr)
  6. Ostali citostatici
- Hirurška terapija
- Biološka terapija (monoklonska antitela, imunomodulatori, alogena i autologna transplantacija matičnim ćelijama hematopoeze i dr.)

Kako se radi o veoma heterogenoj grupi bolesti, u praksi se primenjuju i drugi, kombinovani modaliteti lečenja, u zavisnosti od konkretnog nalaza i stanja u kome se oboleli nalazi, kao i terapija neophodna u lečenju eventualnih komplikacija.

Monoklonska antitela su relativno nova klasa lekova. To su preparati imunoglobulina ili njihovih fragmenata sa tačno određenom specifičnošću, a produkti su jednog klona ćelija, koji svoju antitumorsku ulogu ostvaruju vezivanjem za ciljno mesto na malignoj ćeliji.

Značajno poboljšanje preživljavanja beleži se od perioda uvođenja rituximaba u terapiju obolelih od DLBCL. Rituksimab (u Evropi pod fabričkim imenom Mabthera®, Hoffmann-La Roche AG), je IgG1 kapa monoklonsko AT usmereno protiv CD20 antigena, molekula koji se nalazi samo na površini B limfocita. Građen je od humane konstantne regije (Fc) i mišje varijabilne regije (Fv) što mu daje optimalna farmakokinetička svojstva.<sup>39</sup>

Budući da CD20 normalno ne cirkuliše slobodno u plazmi, predstavlja odličnu metu za ciljanu terapiju. Nije izražen na matičnim ćelijama, ranim limfoblastima i zrelim plazma ćelijama. Fiziološka uloga CD20 molekula nije poznata i smatra se da je važna za razvoj i diferencijaciju B-limfocita. Od 1997. godine kada je odobren u SAD za lečenje CD20 pozitivnih indolentnih limfoma u relapsu, njegova primena se iz godine u godinu širom sveta povećavala, a spektar kliničkih indikacija proširen je i na druge tipove B-ćelijskog limfoma. Rituksimab smanjuje broj CD20 ćelija različitim mehanizmima:

- citotoksičnošću zavisnoj od AT (ADCC),
- citotoksičnošću posredovanom komplementom (CDC),
- indukcijom apoptoze,
- pojačava i citotoksičnu aktivnost nekih lekova (povećanje hemosenzitivnosti) i radioterapije.

U MInT studiji (MabThera International Trial) koja je sprovedena na 824 bolesnika, prvi put je pokazan benefit od dodavanja rituksimaba konvencionalnoj indukcionoj hemioterapiji CHOP (bolesnici od 18–60 godina, AA-IPI skora 0-1, kliničkog stadijuma II-IV ili I klinički stadijum sa „Bulky volumenom”). Bolesnici lečeni hemioterapijom uz rituksimab, imali su produženo preživljavanje bez novog događaja (event free survival-EFS) u 3-godišnjem praćenju (79% vs 59%,  $p < 0,0001$ ), i produženo 3-godišnje ukupno preživljavanje (overall survival-OS) (93% vs 84%,  $p = 0,0001$ ) u odnosu na one koji su lečeni hemioterapijom bez dodavanja rituksimaba.<sup>164,165</sup>

Na osnovu napred iznetog rituksimab, koji predstavlja prvu generaciju anti CD20 monoklonskih antitela, pridodat nekom od hemioterapijskih protokola (CHOP, ACVBP ili dr.) predstavlja okosnicu aktuelne terapije DLBCL.

## *CILJ RADA*

U ovom istraživanju su postavljeni sledeći ciljevi:

1. Analiza preživljavanja obolelih od B difuznog krupnoćelijskog nehoćinskog limfoma prema kliničkim faktorima prognoze, uz klasifikovanje obolelih prema aktuelnim prognostičkim scoring sistemima.
2. Analiza poremećaja biologije malignih ćelija B limfoma detekcijom proteina koji učestvuju u aktivaciji imunog odgovora, regulaciji ćelijskog ciklusa i programirane ćelijske smrti: Ki-67, Bcl-2, Bcl-6, CD10, CD5, CD138, MUM1 i prisustvo mutacije L265P MyD88 molekula.
3. Analiza preživljavanja obolelih prema prisustvu odnosno procentu pozitivnih ćelija na gore pomenute molekule sa ciljem utvrđivanja najpouzdanijih nezavisnih prognostičkih faktora u B difuznim krupnoćelijskim nehoćinskim limfomima.
4. Izvršiti upoređivanje kliničkih i imunoloških faktora prognoze i napraviti predlog za prognostički scoring sistem koji bi objedinio obe grupe parametara.

## ***RADNA HIPOTEZA***

U ovom istraživanju su postavljene sledeće radne hipoteze:

1. Negativni prognostički faktori preživljavanja kod obolelih od B difuznog krupnoćelijskog nehoćinskog limfoma su: febrilnost veća od 38 C°, noćno znojenje i gubitak telesne težine veći od 10% telesne mase za 6 meseci, loš performans status, ekstranodalne manifestacije, niske vrednosti hemoglobina, visoke vrednosti serumskog LDH, albumina i  $\beta$ 2 mikroglobulina.
2. Prisustvo Bcl-2, CD5, MUM1, CD138 i pojačana ekspresija Ki-67 proteina predstavljaju nepovoljne faktore prognoze preživljavanja obolelih od B difuznog krupnoćelijskog nehoćinskog limfoma.
3. Pojačana ekspresija odnosno prisustvo mutacije L265P u MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein) adaptornom proteinu, koreliše sa agresivnijim imunofenotipom DLBCL i nepovoljnim kliničkim tokom bolesti.
4. Pojačana ekspresija Bcl- 6 i CD10 ima povoljan prognostički značaj u preživljavanju obolelih od B difuznog krupnoćelijskog nehoćinskog limfoma.

## ***BOLESNICI I METODE***

Klinički je praćeno i analizirano 68 bolesnika sa patohistološkom dijagnozom B difuzni krupnoćelijski nehoćkinski limfom, koji su dijagnostikovani i lećeni u Klinici za hematologiju i klinićku imunologiju Klinićki Centar (KC) Niš, Odeljenju za interne bolesti Vojne Bolnice (VB) Niš i Klinici za hematologiju Vojno Medicinske Akademije (VMA) u Beogradu, od januara 2009 do decembra 2013. godine. Presek stanja naćinjen je 31. decembra 2015. godine. Kontrolnu grupu je ćinilo 14 bolesnika (7 ženskog i 7 mušskog pola), sa dijagnozom DLBCL, lećenih u Klinici za hematologiju i klinićku imunologiju KC Niš 1991-2002. godine, starosti 41-75 godina, kod kojih su praćeni parametri koji su analizirani i u ispitivanoj grupi (izuzev Myd88 L265P mutacije). Tokom ovog ispitivanja su sakupljani i obraćivani klinićki i laboratorijski parametri, za koje se zna da imaju prognostićki znaćaj i koje je bilo moguće sakupiti za sve bolesnike ukljućene u ispitivanje. Reć je o polu, starosnoj dobi, Ann Arbor klinićkom stadijumu bolesti, broju ekstrapodalnih mesta zahvaćenih procesom, performans statusu, prisustvu „B“ simptoma, vrednosti hemoglobina, broju trombocita, brzini sedimentacije eritrocita, vrednosti C reaktivnog proteina, beta 2 mikroglobulina, vrednosti albumina i LDH u serumu. Na osnovu statistićeke obrade odrećivane su granićne vrednosti, za svrstavanje bolesnika u rizićne grupe. To su sledeće vrednosti: brzina sedimentacije eritrocita preko 60 mm u prvom ćasu, vrednost hemoglobina nića od 120 g/l, broj trombocita ispod  $100\ 000 \times 10^9$ , vrednost serumske LDH preko 460 U/l, vrednosti serum albumina 30g/l. Nalazi infiltrata u koštanom srći, slezini, želucu, mokraćnoj bećici i tonzilama su ubrajani u ekstrapodalne manifestacije. Pod „B“ simptomima smatrani su: febrilnost veća od 38° C, noćno znojenje i gubitak telesne mase veći od 10% telesne mase u poslednjih 6 meseci. Beta 2 mikroglobulin (cut off vrednost 3,5 mg/l) i C reaktivni protein (cut off vrednost 20 mg/l) u restrospektivnom delu istraćivanja nisu se rutinski radili i nisu bili prisutni kod svih bolesnika. Od imunohistohemijskih parametara analizirani su : CD5, CD10, Ki- 67, Bcl-2, Bcl-6, MUM1. Protein CD138 u restrospektivnom delu studije nije rutinski raćen, pa rezultat nije prisutan kod većine bolesnika, i kao takav nije bio relevantan za tumaćenje. Na osnovu imunohistohemijskih parametara CD10, Bcl-6 i

MUM1, oboleli od DLBCL uključeni u ovo istraživanje subklasifikovani su u dve grupe: porekla germinativnog centra (GCB) tip i ne-GCB tip. Genski polimorfizam Myd 88 L 265P urađen je kod svih bolesnika. Bolesnici uključeni u istraživanje su bili novodijagnostikovani, prethodno nelečeni pacijenti sa dijagnozom DLBCL, bez razvrstavanja po morfološkim varijantama po WHO/2008 klasifikaciji DLBCL, u dobi od 24-86 godina. Bolesnici su prema prisustvu rizik faktora: starosna dob  $\geq 60$  godina, stadijum bolesti III/IV,  $2 \geq$  ektranodalne manifestacije, povišene vrednosti laktat dehidrogenaze i ECOG performans status  $\geq 2$ , svrstani u 4 grupe (IPI). Grupa sa niskim rizikom obuhvata bolesnike sa 0-1 rizičnim faktorom, intermedijerni-niži rizik su imali bolesnici sa 2, intermedijerni-viši ukoliko su registrovana 3 a visok rizik ukoliko je kod bolesnika bilo 4-5 nepovoljnih faktora prognoze. Prema prisustvu navedenih rizik faktora, po revidiranom IPI (R- IPI) svrstani su u 3 grupe: prva grupa sa 0 rizik faktora što odgovara pacijentima po prognostičkoj grupi „very good“: druga grupa sa 1 i 2 rizik faktora „good“ prema R- IPI skor; treća grupa sa 3, 4 i 5 rizik faktora, što odgovara prognostičkoj grupi „poor“ prema R- IPI skor. Iz obrade je isključeno 9 bolesnika, od kojih su kod 3 bolesnika parafinski kalupovi bili oštećeni i neadekvatni za dalju obradu. Kod 6 bolesnika je revizijom nalaza potvrđen folikularni oblik nehoćkinskog limfoma.

### ***Pristupi lečenju***

U lečenju obolelih korišćene su sledeće terapijske strategije:

- 4 bolesnika (5,88%) su lečena radioterapijom.
- 5 bolesnika (7,35%) su inicijalno lečena hemioterapijskim protokolom R- CHOP, ali je zbog ranog relapsa bolesti primenjen hemoterapijski protokol ESHAP (etoposide, methylprednisolone, cytarabine- ARA-C, cisplatin) kod 1 bolesnika (1,48%), a kod 4 bolesnika (5,88%) terapijski protokol DHAP (dexamethasone, cytarabine- ARA-C, cisplatin).
- 1 bolesnik (1,47%) je lečen po protokolu CHOP (cyclophosphamide, hydroxyldaunomycin, vincristine [Oncovin] i prednisone).



- 2 bolesnika (2,94%) sa CNS lokalizacijom bolesti je lečeno po terapijskoj šemi: I/ Rituximab, Metotreksat, Leucovorinom, Cytarabine- ARA C; II/ Metotreksat, Cytosar.
- 1 bolesnik (1,47%) je lečen CVP protokolom (cyclophosphamide, vincristine, prednisone).
- 1 bolesnik (1,47%) lečen R- CVP protokolom (rituximab, cyclophosphamide, vincristine, prednisone).
- 2 bolesnika (2,94%) su lečena R-MACOP-B protokolom (rituximab, methotrexate, leucovorin (LV), doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, bleomycin).
- a svi ostali : 51 bolesnik (75 %) lečeni su R- CHOP protokolom (Mabthera (rituximab), cyclophosphamide, hydroxyldaunomycin, vincristine [Oncovin], i prednisone).
- Jedan bolesnik (1,47%) je lečen simptomatskom terapijom.

### ***Metodologija***

Svim bolesnicima je određivan klinički stadijum bolesti. Rasprostranjenost bolesti je određivana standardnim metodama procene kliničkog stadijuma bolesti: radiografijom pluća, multi slize kompjuteriozovanom tomografijom grudnog koša i abdomena i dodatnih regija- paranazalnih šupljina, endokranijuma, male karlice i aspiracionom punkcijom koštane srži. Preživljavanje je računato od momenta postavljanja dijagnoze, jer datum početka terapije u pojedinim slučajevima nije bio poznat. Izračunavano je prosečno preživljavanje (medijana preživljavanja) i ukupno preživljavanje (*OS/overall survival*: period od trenutka postavljanja dijagnoze, do trenutka smrti ili zadnje posete lekaru). Period bez bolesti (*progression-free survival (PFS)*: od datuma postavljanja dijagnoze do datuma zabeležene progresije bolesti) izračunavan je za one bolesnike koji su imali relaps bolesti, i kod kojih je dalje lečenje nastavljeno po drugom terapijskom protokolu. Kriterijumi za relaps bolesti<sup>31,171</sup>: pojava bilo kakve nove lezije, ili povećanje za više od 50% u veličini prethodno lečenih promena, nakon postizanja remisije. Porast za vise od 50%, u najvećem dijametri, bilo kog, prethodno verifikovanog limfnog nodusa

većeg od 1cm (u najkraćoj osi), ili u zbiru prečnika (*SPD- sum of product of diameters*) vise od jednog limfnog nodusa. Ekstranodalnom manifestacijom se smatra postojanje bolesti, izvan limfnog nodusa (nalazi infiltrata u koštanoj srži, slezini, želucu, mokraćnoj bešici i tonzilama).

### ***Obrada biopsijskog materijala***

Histopatološki materijal koji je bio dostupan za analizu sastojao se od 68 parafinskih blokova inicijalno obrađivanih u Centru za patologiju i patološku anatomiju KC u Nišu , Odseku za patološku anatomiju VB u Nišu i Institutu za patologiju i sudsku medicinu VMA Beograd u periodu od januara 2009 do decembra 2013. godine. Biopsije su, nakon fiksacije u 10% rastvoru formaldehida, obrađivane standardnim histopatološkim procesom i kalupljene u parafin. Učinjeni su standardni histološki preseći debljine 4 mikrona koji su rutinski bojani Hematoksilinom i Eosinom (HE). Nakon histopatološkog ispitivanja, birani su reprezentativni uzorci za imunohistohemijsku analizu.<sup>60</sup> Reprezentativna polja patohistoloških preparata, fotografisana su digitalnom mikroskopskom kamerom „Nikon DS- Fi1“ na mikroskopu „Olympus BS 41“.

### ***Imunohistohemijska analiza***

Imunohistohemijska (IHH) analiza rađena je u Centru za patologiju i patološku anatomiju, KC u Nišu i Institutu za patologiju i sudsku medicinu VMA Beograd. Tkivni isecci su najpre deparafinirani (kroz seriju ksilola 4 puta po 5 minuta) i rehidratirani (u seriji alkohola 3 puta po 5 minuta). Pretretman (pobuđivanje antigena) je izvršen u citratnom puferu (pH 8), 10 minuta na 120°C u autoklavu. Posle ispiranja u fosfatnom puferu (PBS, pH 7,4), usledilo je blokiranje endogene peroksidaze u trajanju od 20 minuta u 3% rastvoru vodonik peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) u metanolu. Sledilo je ispiranje u PBS, a zatim inkubacija sa primarnim antitelom preko noći na 4°C. Obeleženi antigeni su posle detaljnog ispiranja u PBS detektovani pomoću DAKO EnVIsion kita (EnVision®+Dual Link System-HRP (DAB+), DakoCytomation) koji je korišćen kao univerzalni imunoperoxidazni polimer, sekundarno antitelo, sa kojim su isecci inkubirani na sobnoj

temperaturi 1 sat. Posle novog ispiranja u PBS rađena je vizuelizacija pomoću diaminobenzidin-tetrahidrohlorida (DAB) koji je markirao mesta antigen-antitelo reakcije braon bojom, a zatim je urađeno bojenje ostatka tkiva/pozadine hematoksilinom. Korišćena su monoklonalna primarna mouse anti-human antitela: Bcl-2, Bcl-6, CD5, CD10, MUM1, Ki 67. (tabela 10)

### ***Bodovanje (scoring) imunohistohemijskih (IHH) bojenja***

IHH bodovanje bazirano je na German ImmunoReactive Score (*distribucija* pozitivnih ćelija u analiziranom tkivu i *intenzitet* IHH bojenja u pojedinačnim ćelijama). Distribucija je ocenjena od 0 do 4: 0- bez pozitivnih ćelija (<1%); 1- malo pozitivnih ćelija (1-25%); 2- dobro definisana područja pozitivnih ćelija (26-50%); 3- obimna područja pozitivnih ćelija (51-75%); 4- skoro sve obojene ćelije (>75%). Intenzitet bojenja/reakcije je rangiran od 0 do 3: 0- bez pozitivnih ćelija (-); 1- slaba (-/+); 2-umerena (+/-); 3- jaka reakcija (+).

U cilju kohezivnosti, pacijenti su, prema imunohistohemijskoj ekspresiji svrstani u 2 grupe: I/ sa negativnom ekspresijom (0-1); II/ sa pozitivnom ekspresijom (2-3).

**Tabela 10.** Korišćena monoklonalna primarna mouse anti-human antitela i IHH analizi

<b>Antitelo</b>	<b>Razblaženje (r)</b>	<b>Klon</b>	<b>Proizvođač</b>	<b>Kod</b>
Bcl-2	1:100	Clone124	Dako-Glostrup, Denmark	Code M0887
Bcl-6	1:20	ClonePG-B6p	Dako-Glostrup, Denmark	Code M7211
CD5	1:50	Clone 4C7	Dako-Glostrup, Denmark	Code M3641
CD10	1:40	CloneC56C6	Dako-Glostrup, Denmark	Code M7308
MUM1	1:50	CloneMUM1p	Dako-Glostrup, Denmark	Code M7259
CD138	1:50	CloneMI15	Dako-Glostrup, Denmark	Code M7228
Ki 67	RTU	Clone MIB-1	Dako-Glostrup, Denmark	

### ***Molekularno genetičko istraživanje***

Molekularno-genetičko istraživanje genskog polimorfizma Myd88 L265P sprovedeno je u Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku, Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu. U eksperimentalnom radu korišćena je genomska DNK izolovana iz tkiva fiksiranog u parafinu obolelih od DLBCL i iz krvi zdravih ispitanika (kontrolna grupa) dobijene punkcijom kubitalne vene pri rutinskom laboratorijskom pregledu. U epruvetu koja je kao antikoagulans sadržala EDTA (etilendiamin sirćetna kiselina) venepunkcijom je uzeto 3 ml krvi od čega je 200 µl korišćeno za izolaciju DNK.

### ***Izolacija DNK***

Izolacija DNK iz tkiva fiksiranog u parafinu izvedena je korišćenjem komercijalnog seta za izolaciju DNK Kapa Express Extract kitom (Kapa Biosystems Inc. Wilmington, MA, SAD). Rađeno je u 100 µl ukupne zapremine na aparatu Agilent Technologies Sure Cycler 8800 po sledećoj proceduri: 10 µl pufera Kapa Express Extract Buffer, 2 µl enzima Kapa Express Extract enzima, približno 2 mm<sup>3</sup> tkiva i i dejonizovana voda do 100 µl (86 µl dejonizovane vode). Uslovi reakcije su bili: 10 minuta na 75°C; 5 minuta na 95 °C. Potom se uzorak vorteksira 2-3 sekunde, centrifugira 1 minut na maksimalnoj brzini 14,5 RPM. Izvlači se supernatant i prebacuje u novu ependorficu od 1,5 ml. Koncentracija DNK merena je na aparatu BIO-SPEC NANO (Schimadzu, Japan), rastvorena TE puferom do finalne koncentracije od 50 ng/ µl. Izolovana DNK čuvana je u zamrzivaču na temperaturi od -20 °C do početka daljeg rada.

### ***Lančana reakcije polimerizacije***

Lančanom reakcijom polimerizacije (Polymerase Chain Reaction/ PCR) umnožavani su segmenati DNK u okviru kojih se nalazi SNP (*Single-nucleotide polymorphism*) ispitivanog gena MYD88 L265P.

**Tabela 11.** Sastav reakcione smeše za lančanu reakciju polimerizacije

Sastav reakcione smeše	Finalna koncentracija	Sastav smeše za ukupnu zapreminu od 25 $\mu$ l
Voda	/	varijabilno
KAPA2G Fast HotStart ReadyMix*	1X	12,5 $\mu$ l
F prajmer (10 $\mu$ M)	0,1 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
R prajmer (10 $\mu$ M)	0,1 $\mu$ M	1,25 $\mu$ l
BSA (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)		1.25 $\mu$ l
DNK	20 ng	varijabilno

(\* KAPA2G Fast HotStart ReadyMix sadrži KAPA2G Fast HotStart DNK polimerazu, KAPA2G Fast HotStart PCR pufer, dNTP-ove (0.2 mM svakog 1X dNTP-a), 1X MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM) i stabilizatore)

Za PCR reakciju je korišćen KAPA2G Fast HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems Inc. Wilmington, MA, SAD). Umnožavanje segmenta DNK izvršeno je u reakcionoj smeši zapremine 25  $\mu$ l kojoj je dodato 20 ng/ $\mu$ l DNK i po 10  $\mu$ M svakog prajmera (tabela 11). Korišćene su prethodno poznate sekvence prajmera, a sekvence oligonukleotida koji su korišćeni kao prajmeri u PCR reakcijama date su u tabeli 12.

**Tabela 12.** Sekvence prajmera korišćenih za određivanje genskih polimorfizama

Polimorfizam	Sekvence prajmera
rs387907272	F 5'- GGG ATA TGC TGA ACT AAG TTG CCA C-3', R 5'-GAC GTG TCT GTG AAG TTG GCA TCT C- 3'

Za izvođenje lančane reakcije polimerizacije korišćen je PCR aparat SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies, Inc, SAD). Uslovi odvijanja PCR reakcije prikazani su u tabeli 13.

**Tabela 13.** Uslovi odvijanja lančane reakcije polimerizacije

	Temperatura [°C]	Vreme [s]	
Inicijalna denaturacija	95	120	30 ciklusa
Denaturacija	95	15	
Hibridizacija	66	30	
Elongacija	72	45	
Finalna ekstenzija	72	600	

***Elektroforeza na agaroznom gelu***

Uspešnost PCR amplifikacije proveravana je metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Za pripremanje 2% agaroznog gela korišćeni su 1,2 g agaroze (Serva, Nemačka) i 60 ml 1X TBE pufera sledećeg sastava: 0,89 M Tris-HCl, 0,89 M borna kiselina, 0,5 M EDTA pH 8,0. Elektroforeza se odvijala u istom puferu u trajanju od 30 minuta za MYD88 rs387907272 polimorfizam, pri struji jačine 100 mA i naponu 100 V. Nakon završene elektroforeze gel je bojen u rastvoru etidijum bromida u trajanju od 30 minuta, a zatim je izvršena vizuelizacija pod UV svetlošću transiluminatora (MacroVue UVis-20 Transilluminator, Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD). Za određivanje veličine PCR produkata korišćen je marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka).

***Određivanje dužine restrikcionih fragmenata***

Posle verifikacije PCR produkata na agaroznom gelu izvršena je restrikciona digestija primenom odgovarajućih (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka) restrikcionih endonukleaza, enzima koji prepoznaju specifičnu palindromsku sekvencu i hidrolizom fosfodiesterarnih veza DNK daju fragmente odgovarajuće dužine (Tabela 14). Reakcionu smešu za reakcije restrikcione digestije činili su: 2 µl pufera Tango, 0,5 µl BsiEI enzima,

10 µl PCR produkta i voda do ukupne zapremine od 20 µl. Reakcija se odvijala u vodenom kupatilu preko noći na temperaturi od 37 °C .

**Tabela 14.** Restrikcioni enzimi korišćeni za određivanje ispitivanih polimorfizama

Polimorfizam	Restrikcioni enzim	Palindromske sekvence
rs387907272	BsiEI	5'...CGRY <sup>Y</sup> CG...3' 3'...GCY <sup>A</sup> RG...5'

#### *Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)*

Identifikacija dobijenih restrikcioni fragmenata izvršena je na 8,8% poliakrilamidnom gelu (poliakrilamidna gel elektroforeza- PAGE). Poliakrilamidni gel se dobija polimerizacijom akrilamida i bisakrilamida uz primenu odgovarajućih katalizatora. Proces polimerizacije u reakcionoj smeši odvija se istovremenim dodavanjem 10% amonijumpersulfata (APS) i N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin (TEMED) u 30% rastvor akrilamida (29:1 akrilamid: N'N'-metilenbisakrilamid u vodi).

**Tabela 15.** Aleli i veličina odgovarajućih restrikcioni fragmenata za ispitivane polimorfizme.

Polimorfizam	Alel	Veličina restrikcioni fragmenata
rs387907272	T	726 bp
	C	726bp+448bp+278bp

Elektroforeza se odvijala u 1X TBE puferu u trajanju od 90 min pri struji jačine 20 mA i naponu 120 V.

Posle završene elektroforeze gel je bojen u rastvoru etidijum bromida u trajanju od 30 min, a zatim je izvršena vizuelizacija pod UV svetlošću transiluminatora (MacroVue UVis-20 Transilluminator, Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD). Za određivanje dužine restrikcionih fragmenata korišćen je marker GeneRuler 50bp DNA Ladder (Fisher Scientific GmBH, Schwerte, Nemačka). Veličine restrikcionih fragmenata za ispitivane polimorfizme prikazane su u tabeli 15.

### ***Analiza fragmenata dobijenih PCR-RFLP metodom (PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism method)***

#### ***Analiza dužina polimorfnih restrikcionih fragmenata***

Analizom dužine restrikcionih fragmenata utvrđen je genotip za ispitivani polimorfizam. Homozigotni, normalni (divlji, engl. *wild type*) genotip TT predstavljen je prisustvom jednog fragmenta veličine 726bp , dok u prisustvu dva polimorfna alela nastaje CC genotip koji se na akrilamidnom gelu vidi kao dva fragmenta veličine 448bp i 278bp. Prisustvo sva tri fragmenta (726bp, 448bp i 278bp) odgovara heterozigotnom TC genotipu.



### *Statistička analiza*

Statistička analiza je urađena korišćenjem standardnih programa za obradu podataka – MS EXCEL i programskog paketa SPSS verzija 18.0.

Deskriptivnom statističkom analizom u prikazu podataka su korišćeni sledeći statistički parametri: apsolutna frekvencija (N) i indeks strukture (%), aritmetička sredina ( $\bar{X}$ ), standardna devijacija (SD), koeficijent varijacije (CV), medijana, minimalna (min) i maksimalna vrednost (max). Procena rizika za oboljevanje određivana je unakrsnim odnosom šansi (engl. odds ratio, OR) i 95% intervala poverenja (engl. confidence interval, CI).

Analitičkom statističkom metodologijom izmerena je statistička značajnost međusobnih razlika frekvenci pojavljivanja određenih obeležja kod svih ispitanika. Upoređivanje učestalosti javljanja pojedinih modaliteta atributivnih obeležja vršeno je Pearson  $\chi^2$  testom ili Fisher exact testom.

Poređenje srednjih vrednosti numeričkih obeležja između dve grupe ispitanika vršeno je Student-ovim t testom ili Mann-Whitney U testom (ako je  $CV > 30\%$ ). Kod više od dve grupe radjen je Kruskal Wallis test kao neparametrijska analiza varijanse.

Za merenje povezanosti određenih obeležja urađena je korelaciona analiza, a za meru povezanosti između dve varijable korišćen je Spearmanov neparametrijski koeficijent korelacije.

Preživljavanje (Overall survival/OS) je izračunavano po metodi Kaplan-Meier-a.

Log-rank test je korišćen u svrhu utvrđivanja razlika u preživljavanju za svaki prognostički faktor. Prediktorni uticaj pojedinih obelezja na preživljavanje uradjen je Cox regresionom analizom. Kao prag značajnosti postavljena je vrednosti  $p < 0,05$ .

## ***REZULTATI ISTRAŽIVANJA***

Retrospektivno- prospektivnim istraživanjem obuhvaćeno je 68 bolesnika sa dijagnozom DLBCL, 46 ženskog pola (67,6%) i 22 muškog pola (32,4%) , prosečne starosti  $61,1 \pm 15,29$  godina sa rasponom od 24-86 godina, gde je 37 bolesnika bilo starije od 60 godina (54,4%). Prosečna starost muškaraca bila je  $60,18 \pm 14,80$  godina, a žena  $61,52 \pm 15,66$  godina.

### ***Klinički faktori prognoze kod bolesnika sa DLBCL***

#### ***Godine starosti***

Nije bilo značajne statističke razlike između bolesnika muškog i ženskog pola u odnosu na godine starosti ( $t=0.336$   $p=0.738$ ).

Distribucija starosnih kategorija po polu ne pokazuje statističku značajnost ( $\chi^2=0,255$   $p=0,613$ ; OR=1,3 95% CI[0.469 -3.601]). Godine starosti ne koreliraju sa polom  $p=0.620$ .

Distribucija modaliteta performans statusa- ECOG u odnosu na starosne kategorije nije statistički značajna ( $\chi^2=7.328$   $p=0,120$ ). Godine starosti i performans status- ECOG ( $p=0,094$ ) ne koreliraju značajno.

Distribucija kliničkog stadijuma bolesti u odnosu na godine starosti nije statistički značajna ( $\chi^2=0,956$   $p=0,812$ ).

Distribucija ektranodalnih manifestacija u odnosu na godine starosti ( $\chi^2=0,143$   $p=0,705$  OR 1,206 95% CI[ 0,456- 3,190]) je bez statističke značajnosti, kao i korelacije ( $p=0,710$ ).

Godine života ne koreliraju sa vrednošću hemoglobina ( $p=0,268$ ); vrednosti CRP ( $p=0,628$ ); beta 2 mikroglobulina ( $p=0,448$ ) ; vrednosti albumina u serumu ( $p=0,147$ ); brojem trombocita ( $p=0,370$ ) i prisustvom „B“ simptomatologije ( $p=0,436$ ). Distribucija modaliteta R- IPI u odnosu na starosne kategorije je statistički značajna ( $\chi^2=14,874$ ,  $p=0,001$ ), gde bolesnici stariji od 60 godina značajno manje imaju prognostički indeks R- IPI 1, a mlađi od 60 godina značajno manje imaju prognostički indeks R- IPI 3. R- IPI

korelira sa godinama starosti ( $p=0,001$ ), pa mlađi od 60 godina značajno manje imaju prognostički indeks R- IPI 3.

Distribucija modaliteta IPI u odnosu na starosne kategorije nije statistički značajna ( $\chi^2=5,633$   $p= 0,131$ ), ali postoji statistički značajna korelacija između godina starosti i IPI skora ( $p=0,042$ ) pa stariji od 60 godina češće imaju IPI 4.

Statistički značajna razlika u distribuciji postoji između godina starosti i vrednosti LDH u serumu ( $\chi^2=5,996$   $p= 0,014$  OR 3,951, 95% CI[ 1,271- 12,278]). LDH u serumu korelira sa godinama života. Stariji od 60 godina imaju značajno veće vrednosti LDH u serumu ( $p=0,014$ ).

Statistički značajna razlika u distribuciji postoji između godina starosti i vrednosti sedimentacije eritrocita ( $\chi^2=4,835$   $p= 0,028$  OR 4,000, 95% CI[ 1,104- 14,489]). Sedimentacije eritrocita korelira sa godinama starosti  $p=0,028$ . Stariji od 60 godina značajno češće imaju veće vrednosti sedimentacije eritrocita u prvom satu.

U odnosu na imunohistohemijske markere prognoze i godine starosti, statistički značajna korelacija postoji sa proteinom Bcl-2 ( $p=0,043$ ) - češće je negativan kod bolesnika mlađih od 60 godina. U odnosu na CD5 ( $p=0,211$ ), MUM1 ( $p=0,104$ ), Bcl-6 ( $p=0,818$ ), CD10 ( $p=0,842$ ) i Ki- 67 ( $p=0,211$ ) ne postoji značajna korelacija u odnosu na godine starosti.

Ne postoji značajna korelacija između godina starosti i tipa DLBCL (GCB/neGCB) ( $p=0,654$ ).

Relapsi bolesti su češći kod žena starosti do 60 godina (60%) .

Navedeni statistički podaci prikazani su u tabeli 16.

Preživljavanje kod starijih od 60 godina se statistički značajno razlikuje u odnosu na mlađe od 60 godina ( $\chi^2=6,507$   $p= 0,011$  OR 3,750, 95% CI[ 1,332- 10,557]), uz značajnu korelaciju navedenih varijabli ( $p=0,010$ ).

Po metodi Kaplan-Meier-a, postoji značajna statistička razlika u odnosu na ukupno preživljavanje u korist bolesnika mlađih od 60 godina (Log rank  $p=0,027$ ) (grafikon 1).

Ali iako postoji statistička značajnost u navedenoj varijabli, dužina prosečnog preživljavanja u odnosu na godine starosti ne pokazuje statističku značajnost : mlađi od 60 godina  $25,20\pm 14,95$  meseci: stariji od 60 godina  $20,06\pm 11,03$  meseci ( $p=0,136$ ).

**Tabela 16.** Prikaz kliničkih, biokemijskih i imunohistochemijskih karakteristika bolesnika u odnosu na godine starosti ( $\leq 60$  godina i  $> 60$  godina)

	Godine starosti			Godine starosti	
	$\chi^2$ p	Spearman's Correl Coeff		$\chi^2$ p	Spearman's Correl Coeff
Pol	$\chi^2=0,255$ p= 0,613	p=0.620	*B2 mikroglobulini	$\chi^2=0,628$ p= 0,428	p=0,448
Klinički stadijum	$\chi^2=0,956$ p= 0,812	p=0,360	*CRP	$\chi^2=0,244$ p= 0,621	p=0,628
IPI	$\chi^2=5,633$ p= 0, 131	p=0,042	Subtip DLBCL	$\chi^2=0,208$ p= 0,648	p=0,654
R- IPI	$\chi^2=14,874$ p= 0, 001	p=0,001	*Albumini	$\chi^2=2,148$ p= 0,648	p=0,147
ECOG	$\chi^2=7.328$ p= 0,120	p=0, 094	Preživljavanje	$\chi^2=46,507$ p= 0,011	p=0,010
EN manifestacije	$\chi^2=0,143$ p= 0,705	p= 0,710	#CD10	$\chi^2=0,042$ p= 0,838	p=0,842
“B” simptomatologija	$\chi^2=0,628$ p= 0,428	p= 0,436	#CD5	$\chi^2=1,623$ p= 0,203	p=0,211
*LDH	$\chi^2=5,996$ p= 0,014	p=0,014	# MUM1	$\chi^2=2,707$ p= 0,100	p=0,104
*Hemoglobin	$\chi^2=1,264$ p= 0,261	p=0,268	#Bcl-2	$\chi^2=4,137$ p= 0,042	p=0,043
*Trombociti	$\chi^2=0,830$ p= 0,362	p=0,370	#Bcl-6	$\chi^2=0,055$ p= 0,814	p=0,818
*Sedimentacija eritrocita	$\chi^2=4,835$ p= 0,028	p=0,028	#Ki- 67	$\chi^2=0,416$ p= 0,519	p=0,211

\*LDH ( $\leq 460$  U/L ;  $> 460$  U/L)

Hemoglobin ( $\leq 120$  g/l;  $> 120$  g/l)

Trombociti ( $\leq 100\ 000 \times 10^9$ ;  $> 100\ 000 \times 10^9$ )

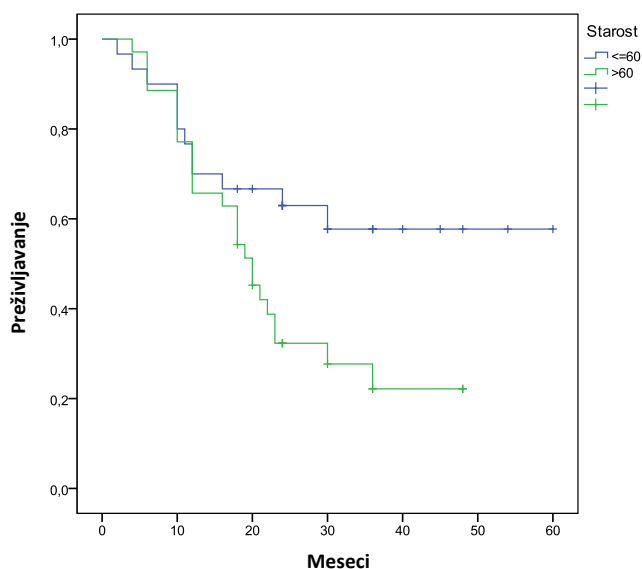
Sedimentacija eritrocita ( $\leq 60$  mm/h;  $> 60$  mm/h)

B2 mikroglobulini ( $\leq 3,5$  mg/l;  $> 3,5$  mg/l)

CRP ( $\leq 20$  mg/l;  $> 20$  mg/l)

Albumini ( $\leq 30$  g/l;  $> 30$  g/l)

#CD10, CD5, MUM1, Bcl-2, Bcl-6, Ki-67: + / - ekspresija



**Grafikon 1.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL prema godinama starosti. Log rank (Mantel- Cox) 0,027

### *Pol*

Korelacionom analizom utvrđeno je da ne postoji statistički značajan stepen korelacije između pola i performans stausa- ECOG ( $p=0,093$ ), kao ni između pola i IPI ( $p=0,258$ ) i R-IPI ( $p=0,156$ ), ali da postoji korelacija između pola i prisustva ekстранodalnih manifestacija, te su kod muškaraca statistički značajnije prisutne ekстранodalne manifestacije ( $p=0,033$ ).

Statistički značajna razlika u stepenu korelacije ne postoji ni između pola i vrednosti sedimentacije eritrocita ( $p=0,729$ ), hemoglobina ( $p=0,128$ ), vrednosti CRP ( $p=0,463$ ), vrednosti LDH u serumu ( $p=0,077$ ), beta 2 mikroglobulina ( $p=0,206$ ), kliničkog stadijuma bolesti ( $p=0,642$ ) i prisustva „B“ simptomatologije ( $p=0,413$ ).

U odnosu na vrednost albumina u serumu i pol, postoji granična statistički značajna korelacija ( $p=0,057$ ), sa nižim vrednostima albumina kod muškaraca.

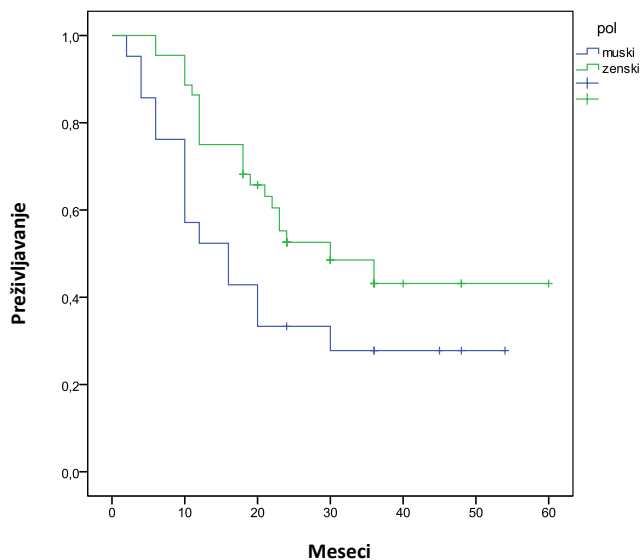
Prema imunohistohemijskim markerima prognoze, značajna korelacija postoji sa proteinom MUM1 ( $p=0,006$ ) - češće je negativan kod muškaraca, kao i sa CD10

( $p=0,001$ ) koji je češće negativan kod žena. Prema CD5 ( $p=0,389$ ), Bcl-2 ( $p=0,325$ ), Bcl-6 ( $p=0,928$ ) i Ki-67 ( $p=0,464$ ) ne postoji značajna korelacija u odnosu na pol.

Tip DLBCL (GCB/neGCB) ne korelira sa polom ( $p=0,264$ ). Relapsi bolesti su češći kod osoba ženskog pola.

Dužina prosečnog preživljavanja kod bolesnika muškog pola je  $19,95 \pm 15,68$  meseci, a ženskog pola je  $23,61 \pm 11,75$  meseci i ne pokazuje statistički značajnu razliku ( $p=0,095$ ) i ne korelira u odnosu na istu varijablu  $p=0,106$ .

Međutim, ukupno preživljavanje po metodi Kaplan Maier-a je značajno različito u odnosu na pol (Log rank  $p=0,043$ ), u korist ženskog pola (grafikon 2). Navedeni statistički podaci prikazani su u tabeli 17.



**Grafikon 2.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na pol. Log rank (Mantel- Cox) 0,043

**Tabela 17.** Prikaz kliničkih, biohemijskih i imunohistohemijskih karakteristika bolesnika u odnosu na pol (muškarci/žene).

	Pol			Pol	
	$\chi^2$ p	Spearman's Correl Coeff		$\chi^2$ p	Spearman's Correl Coeff
Godine starosti	$\chi^2=0,255$ p=0,613	P=0,620	*B2 mikroglobulini	$\chi^2=1,671$ p=0,196	p=0,206
Klinički stadijum	$\chi^2=1,676$ p=0,642	p=0,642	*CRP	$\chi^2=0,559$ p=0,455	p=0,463
IPI	$\chi^2=3,396$ p=0,335	p= 0,258	Subtip DLBCL	$\chi^2=1,281$ p=0,258	p=0,264
R- IPI	$\chi^2=3,182$ p=0,204	p= 0,156	*Albumini	$\chi^2=3,680$ p=0,055	p= 0,057
ECOG	$\chi^2=5,098$ p=0,277	p=0, 093	Preživljavanje	$\chi^2=2,662$ p= 0,103	p= 0,106
EN manifestacije	$\chi^2=4,570$ p=0,033	p=0,033	#CD10	$\chi^2=12,808$ p=0,000	p=0,001
“B” simptomatologija	$\chi^2=0,693$ p=0,405	p= 0,413	#CD5	$\chi^2=0,775$ p=0,379	p=0,389
*LDH	$\chi^2=3,165$ p=0,075	p=0,077	# MUM1	$\chi^2=7,253$ p=0,007	p=0,006
*Hemoglobin	$\chi^2=2,365$ p=0,124	p=0,128	#Bcl-2	$\chi^2=0,998$ p=0,318	p=0,325
*Trombociti	$\chi^2=0,356$ p=0,651	p=0,666	#Bcl-6	$\chi^2=0,008$ p=0,927	p=0,928
*Sedimentacija eritrocita	$\chi^2=0,124$ p=0,724	p=0,729	#Ki- 67	$\chi^2=0,557$ p=0,456	p=0,464

\*LDH ( $\leq 460$  U/L ;  $> 460$  U/L)

Hemoglobin ( $\leq 120$  g/l;  $> 120$  g/l)

Trombociti ( $\leq 100\ 000 \times 10^9$ ;  $> 100\ 000 \times 10^9$ )

Sedimentacija eritrocita ( $\leq 60$  mm/h;  $> 60$  mm/h)

B2 mikroglobulini ( $\leq 3,5$  mg/l;  $> 3,5$  mg/l)

CRP ( $\leq 20$  mg/l;  $> 20$  mg/l)

Albumini ( $\leq 30$  g/l;  $> 30$  g/l)

#CD10, CD5, MUM1, Bcl-2, Bcl-6, Ki-67: + / - ekspresija

### *Klinički stadijum bolesti*

U odnosu na klinički stadijum bolesti, obolelih od DLBCL sa kliničkim stadijumom III i IV statistički značajno češće imaju R- IPI 3 ( $\chi^2=21,014$  p= 0,002). R -IPI značajno korelira sa kliničkim stadijumom bolesti p= 0,000, tj. viši klinički stadijum korelira sa R- IPI 3.

U III i IV kliničkom stadijumu statistički značajno je češći performans status ECOG 2,3 i 4 ( $\chi^2=531,741$  p= 0,002).

Prisustvo ekстранodalnih manifestacija je statistički značajno češće u kliničkom stadijumu III i IV ( $\chi^2=36,926$ , p=0,000). U kliničkom stadijumu III i IV statistički značajno su veće vrednosti sedimentacije eritrocita ( $\chi^2=12,654$ , p= 0,049).

Značajno više obolelih od DLBCL ima „B“ simptome ako su u III i IV kliničkom stadijumu ( $\chi^2=8,394$ , p= 0,039) .

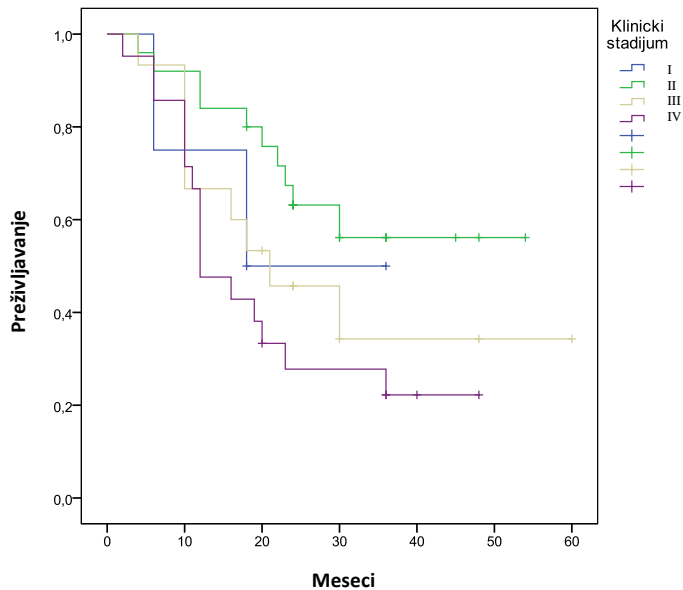
Nema statistički značajne razlike kod obolelih od DLBCL u distribuciji vrednosti hemoglobina u odnosu na klinički stadijum ( $\chi^2=5,210$ , p= 0,157), beta 2 mikroglobulina ( $\chi^2=2,906$ , p=0,406), trombocita ( $\chi^2=6,339$ , p=0,096), LDH u serumu ( $\chi^2=5,398$ , p=0,145), CRP ( $\chi^2=0,334$ , p=0,954) i vrednosti albumina u serumu ( $\chi^2=1,814$ , p=0,612). Nema značajne razlike u distribuciji ni po tipu DLBCL (GCB/neGCB) ( $\chi^2=0,202$ , p=0,977) u odnosu na klinički stadijum bolesti.

Prema imunohistohemijskim markerima prognoze i kliničkom stadijumu bolesti, statistički značajna korelacija postoji sa Bcl-2 (p=0,026) sa najvećom distribucijom pozitivne Bcl-2 ekspresije u kliničkom stadijumu IV. Statistički značajna korelacija u odnosu na klinički stadijum ne postoji u odnosu na ekspresiju: MUM1 (p=0,381) , CD10 (p=0,129), CD5 (p=0,686), Bcl-6 (p=0,440) i Ki- 67 (p=0,423).

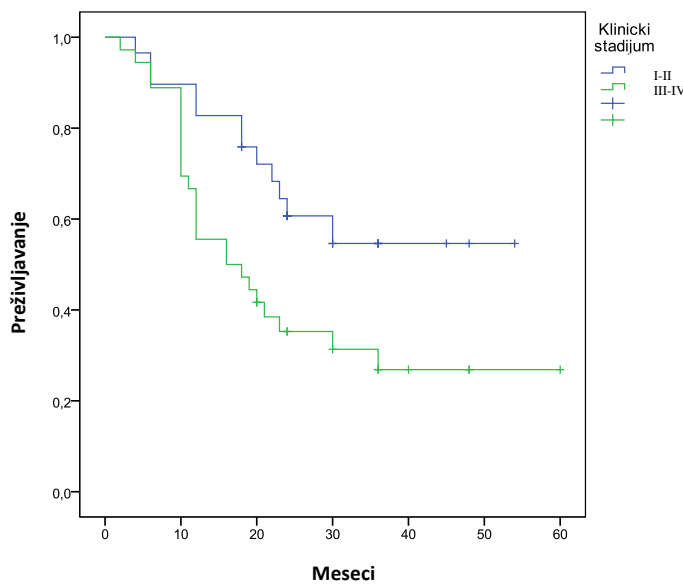
Nema statistički značajne razlike u prosečnom preživljavanju u odnosu na klinički stadijum bolesti ( $\chi^2=6,235$ , p=0,102). Preživljavanje obolelih od DLBCL po metodi Kaplan-Meier-a, prema kliničkom stadijumu bolesti nije imalo statistički značajnu različitost (Log rank p=0,071) i prikazano je na grafikonu 3. Na grafikonu 4. je takođe prikazano preživljavanje obolelih od DLBCL prema kliničkom stadijumu bolesti, ali su klinički stadijumi, sa ciljem manjeg rasipanja između grupa, svrstani u dve kategorije:



1. kategorija/objedinjeni I i II klinički stadijum ("limitirani DLBCL") i 2. kategorija/odmakli klinički stadijumi III i IV ("uznapredovali DLBCL"). Bolesnici svrstani u 1. kategoriju su imali bolje preživljavanje od bolesnika svrstanih u 2. kategoriju (Log rank  $p=0,018$ ) (grafikon 4).



**Grafikon 3.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na klinički stadijum bolesti (I-IV) obolelih od DLBCL Log Rank (Mantel-Cox) 0,071



**Grafikon 4.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na prekategoriisani klinički stadijum bolesti: 1:(I,II) i 2: (III, IV). Log Rank (Mantel-Cox) 0,018

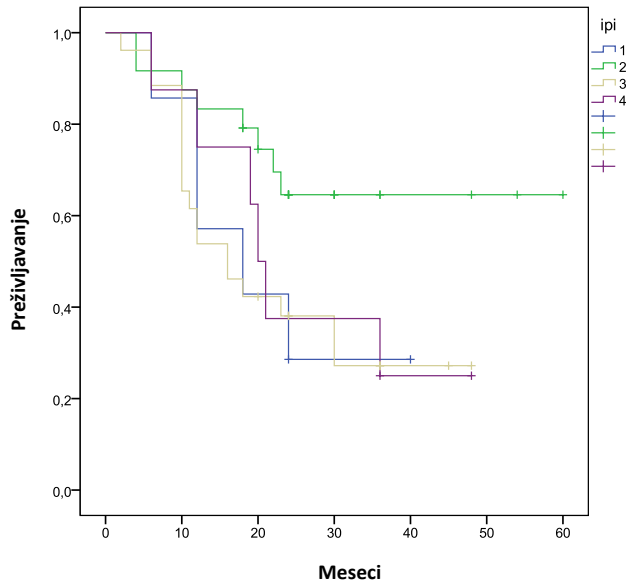
### ***Internacionalni prognostički indeks; Revidirani internacionalni prognostički indeks (IPI/R- IPI)***

Distribucija modaliteta performans status ECOG u odnosu na R- IPI pokazuje statističku značajnost ( $\chi^2=16,559$   $p= 0,035$ ) gde su performans status ECOG 3 i ECOG 4 češći kod bolesnika sa R- IPI 3. Postoji značajna korelacija ECOG i R- IPI ( $p= 0,000$ ), pa bolji performans status imaju pacijenti sa R- IPI 1. ECOG korelira i sa IPI ( $p= 0,000$ ).

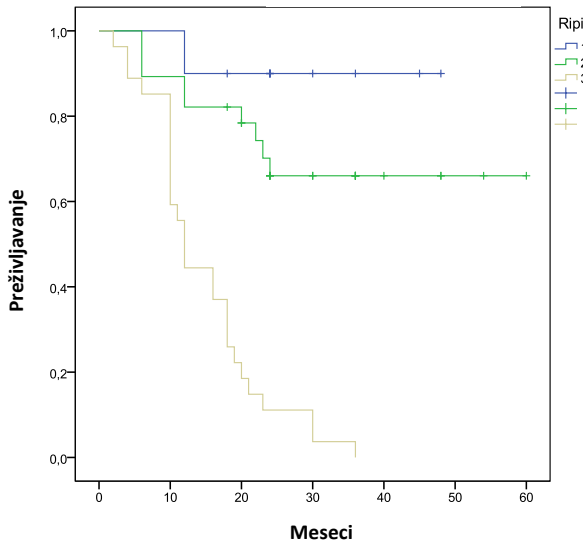
Statistički značajno veći broj ekstrapodalnih manifestacija u grupi R- IPI 2, a naročito u grupi R- IPI 3 ( $\chi^2=10,547$   $p= 0,005$ ), kao i statistički značajna razlika u vrednosti albumina u serumu u odnosu na prediktorni R -IPI, gde su najniže vrednosti albumina kod pacijenata sa R- IPI 3 ( $\chi^2=12,921$   $p=0,002$ ). Vrednosti albumina u serumu jako koreliraju sa R- IPI ( $p= 0,001$ ). Statistički značajno više vrednosti LDH evidentiraju se kod pacijenata sa R- IPI 2 i R- IPI 3 ( $\chi^2=6,094$   $p= 0,48$ ) uz graničnu korelaciju  $p= 0,055$ .

U odnosu na prisustvo "B" simptomatologije ( $\chi^2=1,423$   $p=0,491$ ), vrednost sedimentacije eritrocita ( $\chi^2=4,845$ ,  $p=0,89$ ), vrednost hemoglobina ( $\chi^2=2,454$ ,  $p=0,299$ ), broja trombocita ( $\chi^2=3,459$ ,  $p=0,177$ ), beta 2 mikroglobulina ( $\chi^2=0,879$ ,  $p=0,644$ ), CRP ( $\chi^2=1,996$   $p= 0,369$ ) nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji u odnosu na R- IPI. Ekspresije markera Ki-67 ( $p=0,197$  CD5 ( $p=0,672$ ), CD10 ( $p=0,259$ ), MUM1 ( $p=0,223$ ), Bcl-2 ( $p=0,853$ ), Bcl-6 ( $p=1,000$ ), ne pokazuje statistički značajnu korelaciju u odnosu na grupe R- IPI. Nije bilo ni statistički značajne razlike u zastupljenosti tipova DLBCL (GCB i neGCB) u odnosu na grupe R- IPI ( $\chi^2=0,512$ ,  $p=0,774$ ). Prema polu, godinama života i kliničkom stadijumu bolesti nije bilo značajne statističke razlike (napred opisano) Prosečno preživljavanje u odnosu na R- IPI skor pokazuje značajnu statističku razliku u smislu kraćeg preživljavanja kod bolesnika sa R- IPI 3 ( $\chi^2=19,057$ ,  $p= 0,000$ ), pa prosečno preživljavanje kod obolelih od DLBCL značajno korelira sa R- IPI skorom ( $p=0,000$ ). Prosečno preživljavanje prema IPI skoru ne pokazuje statistički značajnu razliku ( $p=0,326$ ). IPI ne korelira sa dužinom preživljavanja ( $p=0,876$ ). Preživljavanje u odnosu na IPI skor po metodi Kaplan-Meier-a ne pokazuje statističku značajnost Log Rank  $p=0,085$  (grafikon 5). Preživljavanje u odnosu na R- IPI skor po metodi Kaplan-Meier-a pokazuje statističku značajnost Log Rank  $p=0,000$  (grafikon 6).

R- IPI je u ovoj studiji dao korisnije podatke i ima veći prediktorni značaj u odnosu na standardni IPI.



**Grafikon 5.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na IPI scoring sistem. Log Rank (Mantel-Cox) 0,085



**Grafikon 6.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na R- IPI scoring sistem. Log Rank (Mantel-Cox)  $p=0,000$

### *Performans status- ECOG*

Nema značajne statističke razlike u prosečnom preživljavanju u odnosu na ECOG performans status kod obolelih od DLBCL ( $p=0,621$ ), kao ni korelacije između performans statusa i ukupnog preživljavanja obolelih od DLBCL ( $p=0,468$ ). Prosečno preživljavanje u odnosu na performans status predstavljeno je u tabeli 18.

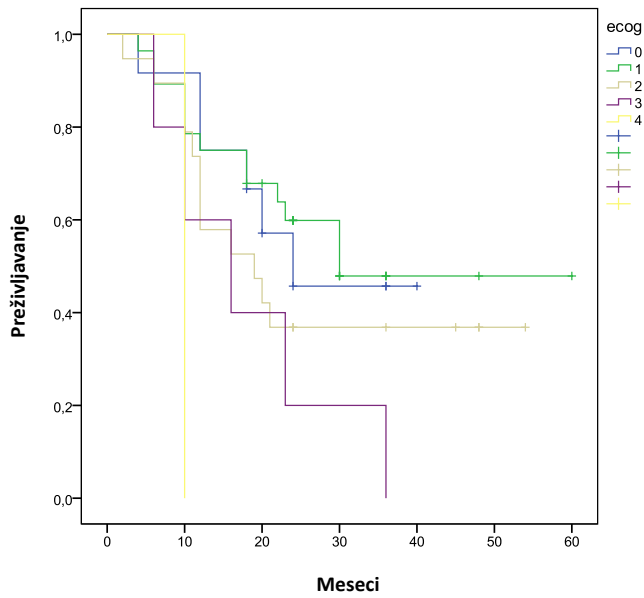
Po metodi Kaplan- Maier-a nema značajne razlike u preživljavanju kod obolelih od DLBCL u odnosu na ECOG kategorije 0-4 (Log rank  $p= 0.110$ ) (grafikon 7).

**Tabela 18.** Prosečno preživljavanje u odnosu na klinički stadijum DLBCL

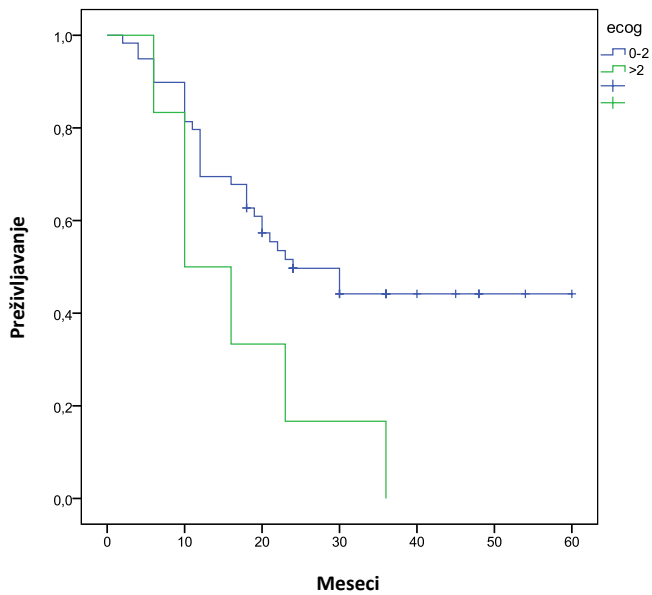
ECOG	Prosečno preživljavanje (meseci)	Standardna devijacija	Standardna greška	Min. Preživljavanje (meseci)	Max. Preživljavanje (meseci)
0	22,00	10,82	3,12	4	40
1	23,68	12,75	2,41	4	60
2	22,63	15,84	3,63	2	54
3	18,20	11,84	5,30	6	36
4	10,00	/	/	10	10
Ukupno	22,43	13,14	1,63	2	60

Ovakvim rasporedom odnosno klasifikovanjem bolesnika, grupe su male i heterogene i nema značajne razlike u preživljavanju, pri čemu je vrlo evidentno da je dužina preživljavanja najveća kod bolesnika sa ECOG 0-2, a najmanja kod bolesnika sa ECOG 4. Grupe su prekategorišane tako da su formirane 2 grupe: I:  $ECOG \leq 2$  I II:  $ECOG >2$ . Ovakvom analizom, postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljavanju po metodi Kaplan- Maier-a u korist bolesnika sa  $ECOG \leq 2$  (Log rank  $p=0,025$ ) (grafikon 8).

Radom na većem broju pacijenata i formiranjem većih grupa u odnosu na ECOG performans status dobijeni rezultati bi bili relevantniji i reprezentativniji. Ovakav način prekategorišanja grupa je takođe vrlo koristan u predikciji rizika.



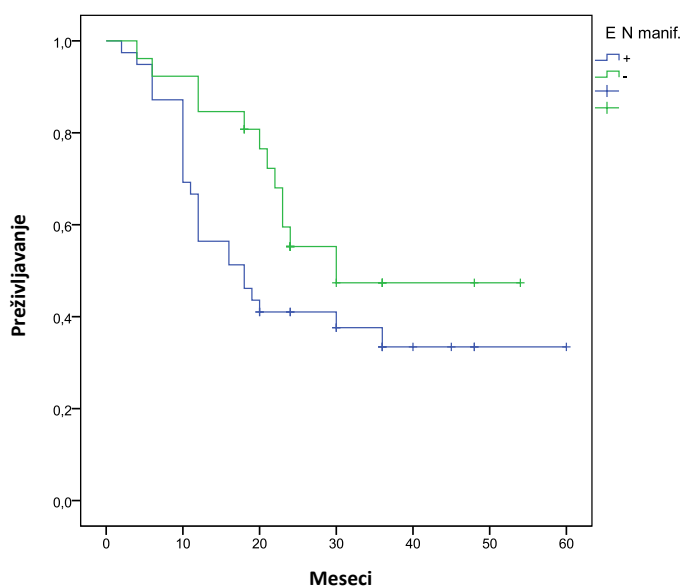
**Grafikon 7.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na ECOG performans status: Log Rank (Mantel-Cox) 0,110



**Grafikon 8.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na prekategoriisani ECOG performans status: Log Rank (Mantel-Cox) 0,025

### *Ekstranodalne manifestacije*

Ekstranodalne manifestacije bile su prisutne kod 57,35% ispitanika sa prosečnim preživljavanjem  $21,10 \pm 14,28$  meseci. Kod obolelih od DLBCL kod kojih nisu bile prisutne EN manifestacije prosečno preživljavanje je bilo  $24,42 \pm 11,18$  meseci. Postojanje ekstranodalnih manifestacija, nije uticalo statistički značajno na dužinu prosečnog preživljavanja ( $p=0,102$ ). Ukupno preživljavanje obolelih od DLBCL u odnosu na prisustvo ili odsustvo ekstranodalnih manifestacija po metodi Kaplan- Maier-a je bez statistički značajne razlike (Log rank  $p=0,089$ ) (grafikon 9).

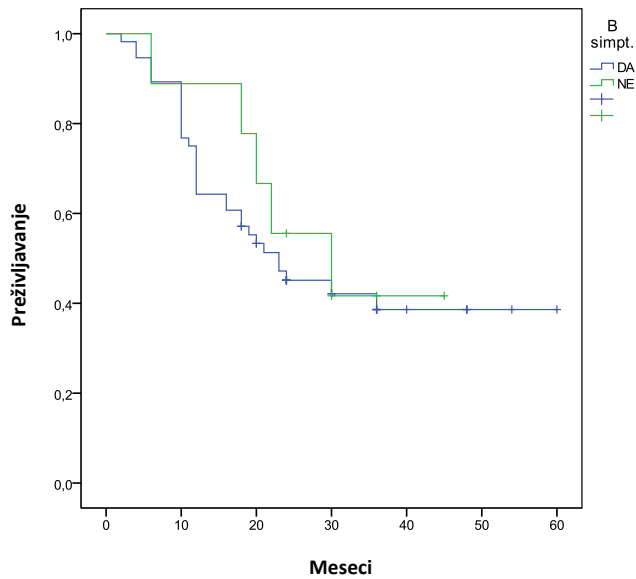


**Grafikon 9.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na postojanje EN manifestacija kod obolelih od DLBCL Log Rank (Mantel-Cox) 0,089

### *“B” simptomatologija*

“B” simptomatologija je bila prisutna kod 86,8% DLBCL bolesnika (prosečno preživljavanje:  $21,91 \pm 13,43$  meseci), a nije bila prisutna kod 13,2% DLBCL bolesnika (prosečno preživljavanje:  $25,67 \pm 11,25$  meseci).

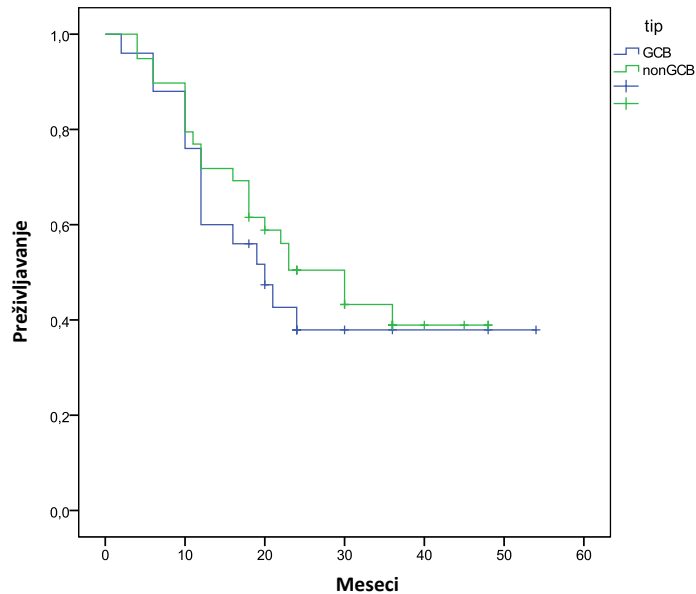
Prosečno preživljavanje u odnosu na prisustvo ili odsustvo “B” simptomatologije ne pokazuje statističku značajnost  $p=0,286$ . Po metodi Kaplan-Meier-a takođe ne postoji statistička značajnost u ukupnom preživljavanju kod obolelih od DLBCL u odnosu na prisustvo ili odsustvo “B” simptoma (Log rank  $p=0,630$ ) (grafikon 10).



**Grafikon 10.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na prisustvo ili odsustvo B simptoma. Log rank (Mantel-Cox) 0,630

### ***Podtip DLBCL (GCB/neGCB)***

Nema statistički značajne razlike u dužini prosečnog preživljavanja u odnosu na podtip DLBCL po algoritmu Hans et al. GCB/neGCB ( $p=0,275$ ). U ovoj studiji podtip GCB DLBCL bio je zastupljen u 40,3%, a neGCB DLBCL podtip u 59,7%. Po metodi Kaplan-Meier-a nije bilo značajne razlike u ukupnom preživljavanju kod obolelih od DLBCL u odnosu na podtip bolesti (Log rank  $p=0,512$ ) (grafikon 11).



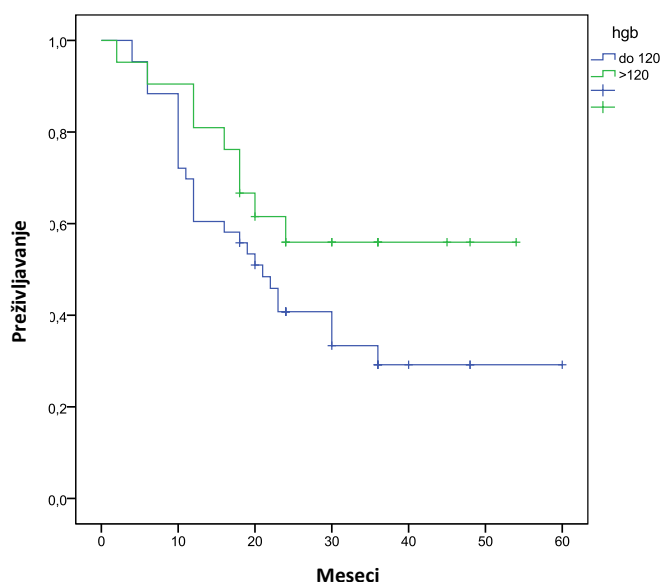
**Grafikon 11.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na podtip DLBCL. Log rank (Mantel-Cox) 0,512

### *Laboratorijski- biohemijski faktori prognoze kod bolesnika sa DLBCL*

#### *Hemoglobin*

U odnosu na vrednost hemoglobina nema statistički značajne razlike u prosečnom preživljavanju ( $p=0,197$ ). Vrednost hemoglobin niža od 120g/l evidentirana je kod 67,2% DLBCL obolelih, a viša od 120g/l kod 32,8%. Po metodi Kaplan -Meier-a, ukupno preživljavanje kod obolelih od DLBCL prema vrednostima hemoglobin u serumu je bez statističke značajnosti (Log rank  $p=0,110$ ) (grafikon 12).





**Grafikon 12.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na vrednost hemoglobina obolelih od DLBCL Log rank (Mantel-Cox) 0,110

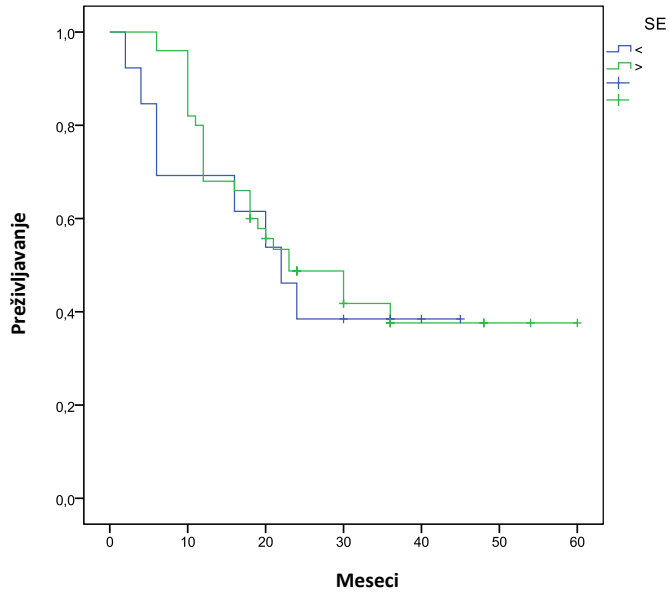
### *Sedimentacija eritrocita*

Prema vrednostima sedimentacije eritrocita ( $p=0,871$ ) nema statistički značajne razlike u dužini prosečnog preživljavanja. Vrednost sedimentacije eritrocita niža od 60 mm/h zabeležena je kod 21,2% DLBCL obolelih, a visa od 60 mm/h kod 78,8%. Po metodi Kaplan- Maier-a nema značajne razlike u dužini ukupnog preživljavanja kod obolelih od DLBCL u odnosu na vrednost sedimentacije eritrocita u prvom satu (Log rank  $p=0,697$ ) (grafikon 13).

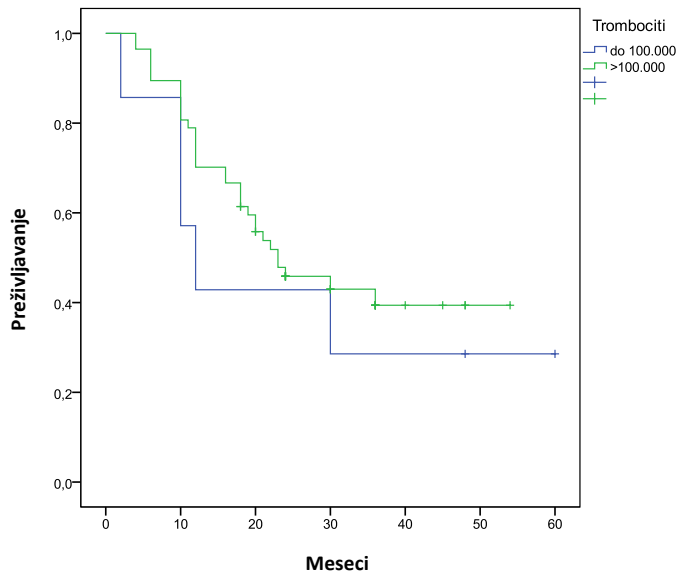
### *Broj trombocita u perifernoj krvi*

U odnosu na broj trombocita nema statistički značajne razlike u prosečnom preživljavanju  $p=0,779$ . Broj trombocita u perifernoj krvi manji od  $100 \times 10^9/l$  evidentiran kod 10,4% DLBCL obolelih, a veći od  $100 \times 10^9/l$  kod 89,6%. Ukupno preživljavanje

obolelih od DLBCL, u odnosu na broj trombocita u perifernoj krvi, po metodi Kaplan - Meier-a je takođe bez statističke značajnosti (Log rank  $p=0,110$ ) (grafikon 14).



**Grafikon 13.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL prema vrednosti sedimentacije eritrocita u prvom satu Log rank (Mantel-Cox) 0,697



**Grafikon 14.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na vrednosti trombocita u perifernoj krvi Log rank (Mantel-Cox) 0,418

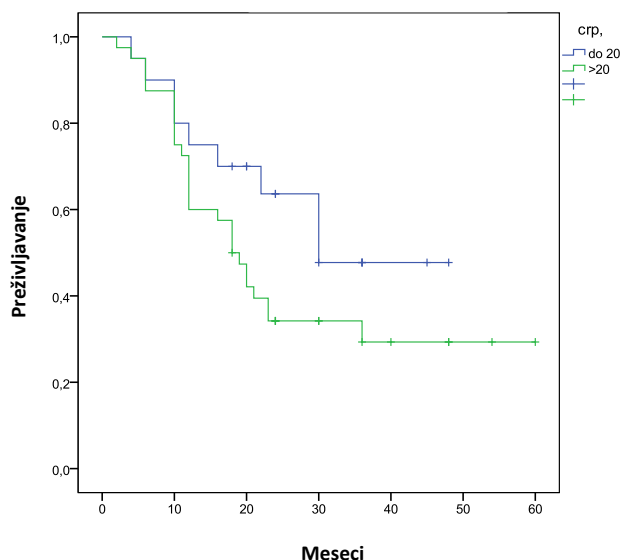
### *C- reaktivni protein (CRP)*

Nema statistički značajne razlike u prosečnom preživljavanju u odnosu na vrednost CRP ( $p=0,278$ ) kod obolelih od DLBCL ( $N=63$ ). Vrednosti C reaktivnog proteina u serumu su bile više od 20 mg/l kod 65,1% DLBCL obolelih, a niže od 20 mg/l kod 34,9%. Takođe, bez statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju u odnosu na vrednosti CRP kod obolelih od DLBCL po metodi Kaplan -Meier-a (Log rank  $p=0,121$ ) (grafikon 15).

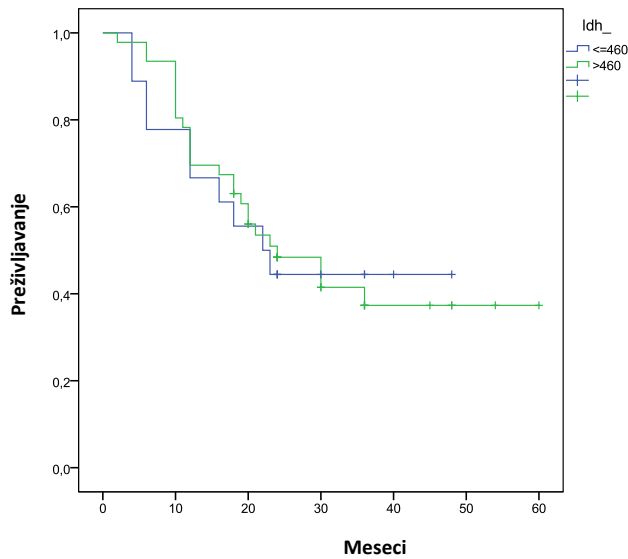
### *Laktat dehidrogenaza u serumu (LDH)*

U odnosu na vrednost LDH u serumu kod obolelih od DLBCL nema značajne razlike u prosečnom preživljavanju  $p=0,764$ . Vrednosti LDH u serumu su bile više od 460 U/l kod 71,6% DLBCL obolelih, a niže od 460 U/l kod 28,4%.

Po metodi Kaplan- Maier-a nema značajne razlike u ukupnom preživljavanju kod obolelih od DLBCL u odnosu na vrednosti LDH u serumu (Log rank  $p=0,945$ ) (grafikon 16).



**Grafikon 15.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na vrednosti CRP u serumu. Log Rank (Mantel-Cox) 0,121



**Grafikon 16.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na vrednosti LDH u serumu. Log rank (Mantel-Cox) 0.945

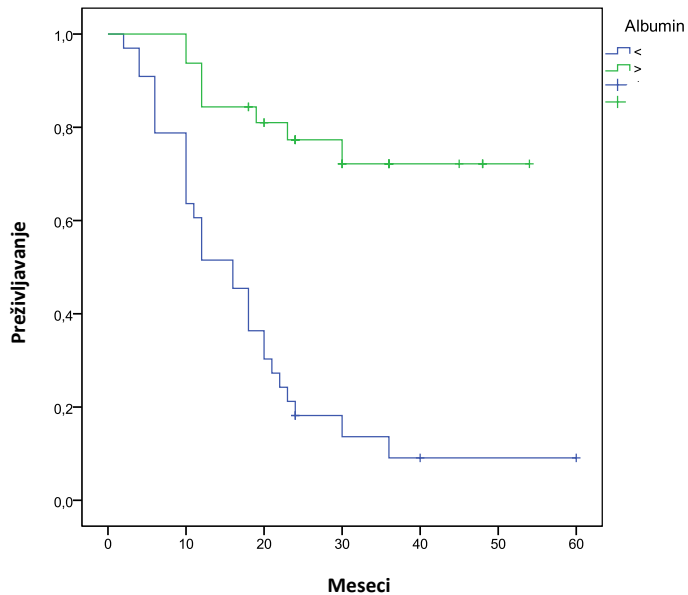
### *Albumini u serumu*

U odnosu na nivo albumina u serumu postoji statistički značajna razlika u dužini prosečnog preživljavanja obolelih od DLBCL. Značajno je duže prosečno preživljavanje kod bolesnika sa vrednostima albumina preko 30 g/l ( $p=0,000$ ). Vrednosti albumina u serumu više od 30 g/l kod 48,5% DLBCL obolelih, a niže od 30 g/l kod 51,5%. Po metodi Kaplan -Meier-a ukupno preživljavanje se značajno razlikuje u odnosu na vrednosti albumina u serumu kod obolelih od DLBCL (Log rank  $p= 0,000$ ) (grafikon 17).

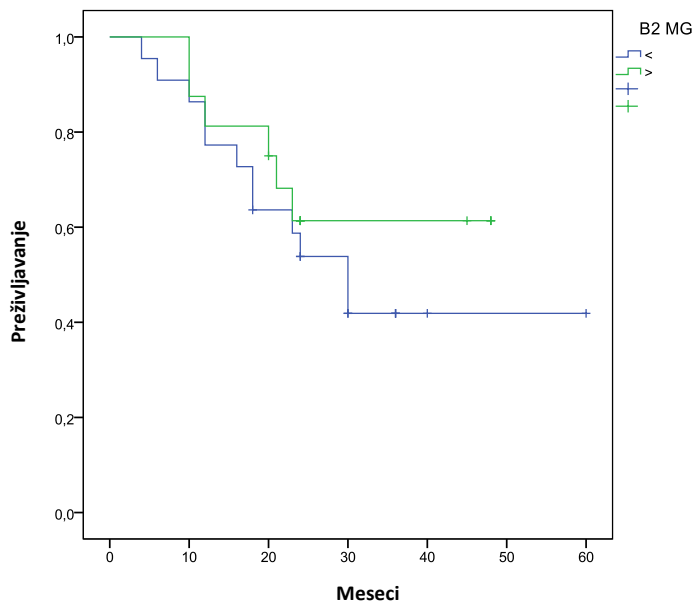
### *Beta 2 mikroglobulini u serumu (B2MG)*

Nema značajne razlike u preživljavanju u odnosu na vrednost B2MG u serumu kod obolelih od DLBCL ( $N=40$ )  $p= 0,418$ . Vrednosti B2MG u serumu više od 3,5 mg/l kod 42,5% DLBCL obolelih, a niže od 3,5 mg/l kod 57,5%. Po metodi Kaplan- Maier-a nema

značajne razlike u ukupnom preživljavanju obolelih od DLBCL u odnosu na vrednosti B2MG u serumu (Log rank  $p=0,418$ ) (grafikon 18).



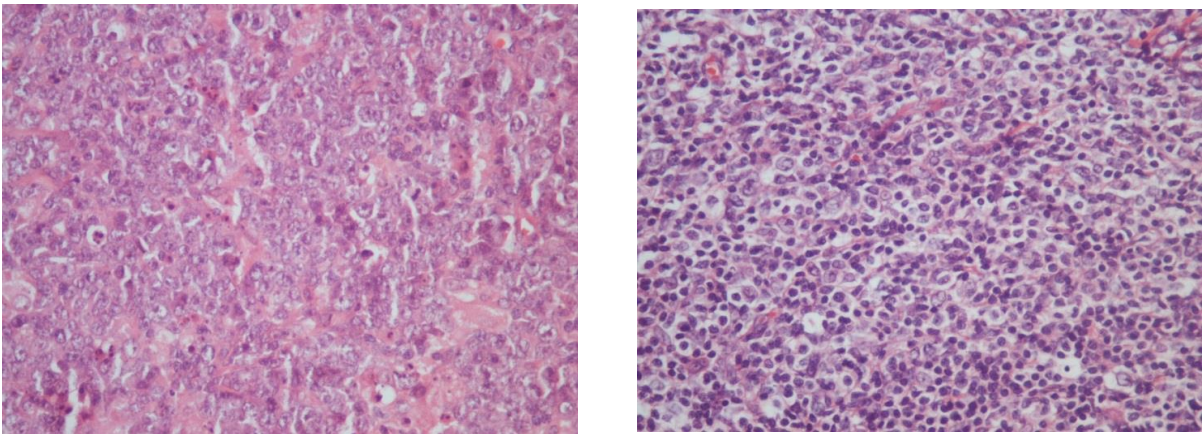
**Grafikon 17.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja u odnosu na vrednosti albumina u serumu obolelih od DLBCL. Long rank (Mantel-Cox) 0,000



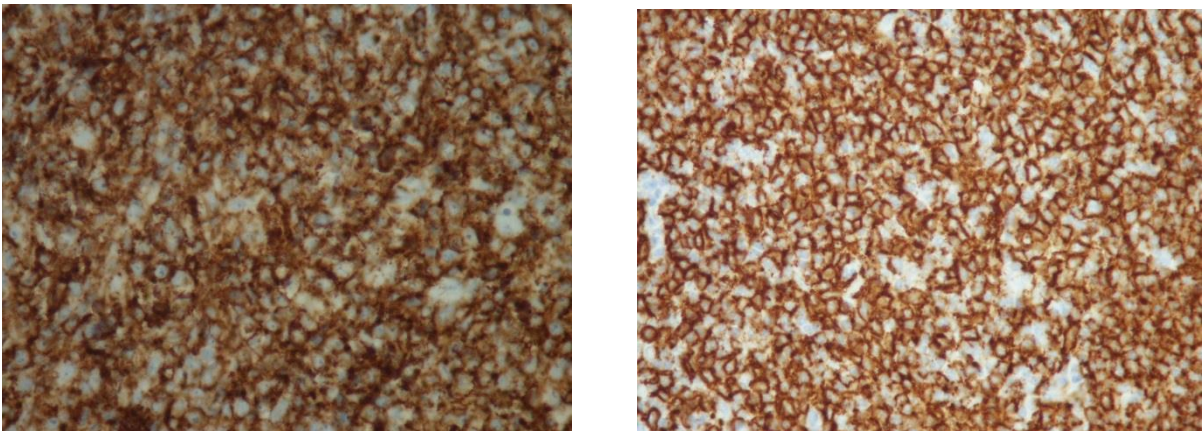
**Grafikon 18.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na vrednosti B2MG u serumu. Log rank (Mantel-Cox) 0,418)

### *Prikaz iminohistohemijskih karakteristika DLBCL kao faktora prognoze*

Kompletnu patohistostološku (slika 12) i imunohistohemijsku (IHH) dijagnozu DLBCL je imalo 68 bolesnika, izuzev IHH markera CD138 koji nije rutinski rađen kod bolesnika u retrospektivnom delu studije, pa se nalazi ne uzimaju kao relevantni. Prikazana je i ekspresija CD20+ jer predstavlja neizostavnu kariku u lancu dijagnoze DLBCL (slika 13).



**Slika 12.** HE bojenje DLBCL uvećanje 40x/0.65



**Slika 13.** DLBCL: CD 20 + ekspresija uvećanje 40x/0.65

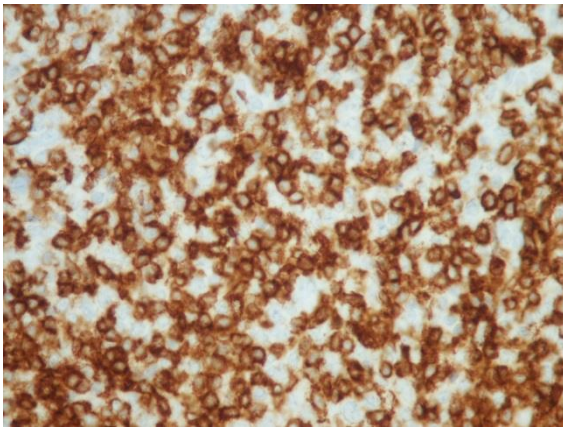


## Rezultati istraživanja

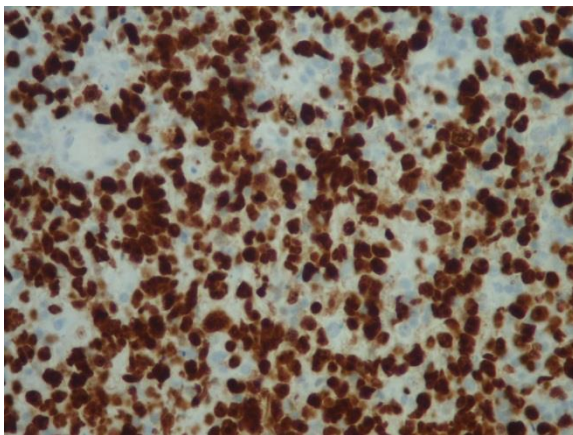
---

Ekspresija antigena na pojedinačnom nivou je bila sledeća:

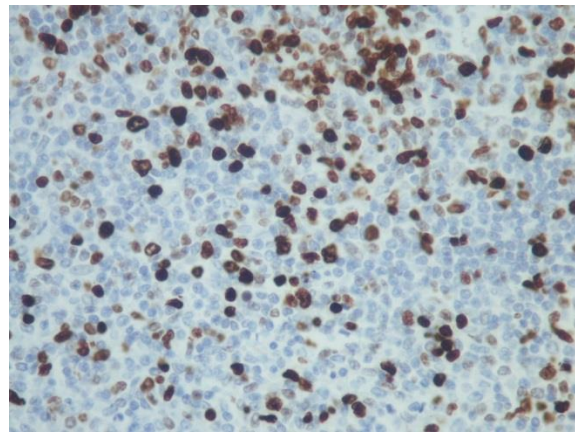
- 68/2 bolesnika 2,94% ..... CD5<sup>+</sup> (slika 14);
- 68/30 bolesnika 44,12% ..... Ki- 67 > 50% (slika 15);
- 68/10 bolesnika 14,71% ..... CD10+ (slika 16);
- 68/52 bolesnika 76,47% ..... Bcl-2+ (slika 17);
- 68/33 bolesnika 48,53% ..... Bcl-6+ (slika 18);
- 68/18 bolesnika 26,47% ..... MUM1+ (slika 19).



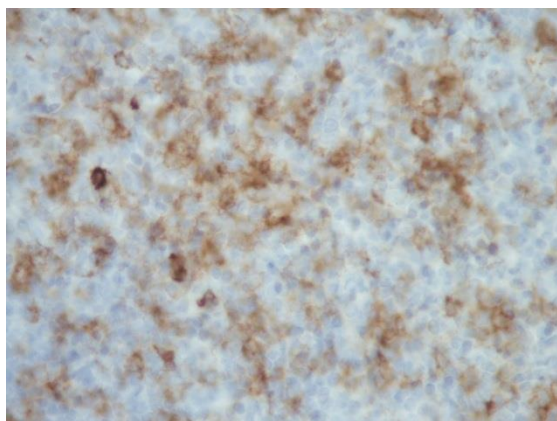
**Slika 14.** DLBCL: CD5<sup>+</sup> ekspresija; uvećanje 40x/0.65



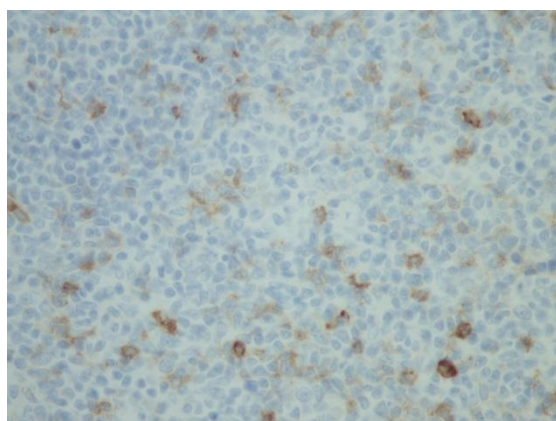
**Slika 15.** DLBCL: Ki- 67 pozitivan 50%



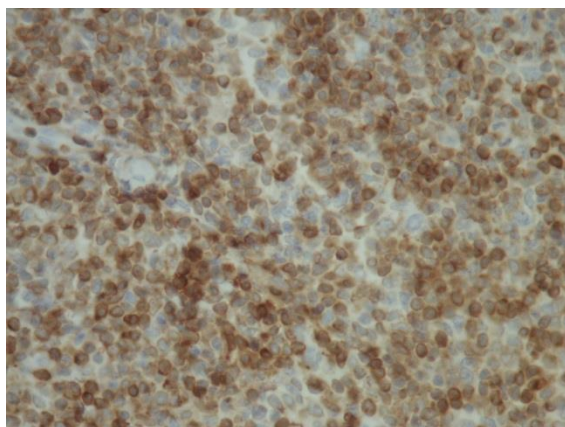
Ki -67 pozitivan 40%; uvećanje 40x/0.65



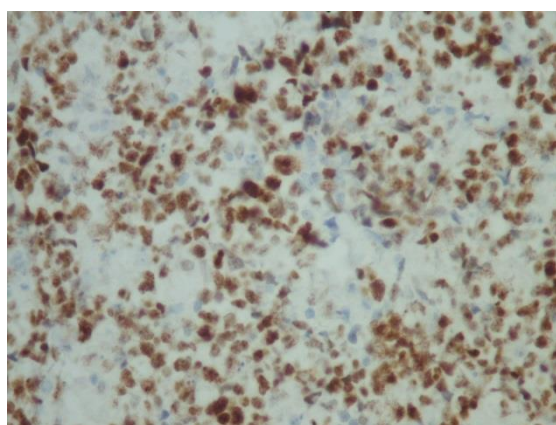
**Slika 16.** DLBCL: CD10<sup>+</sup> ekspresija



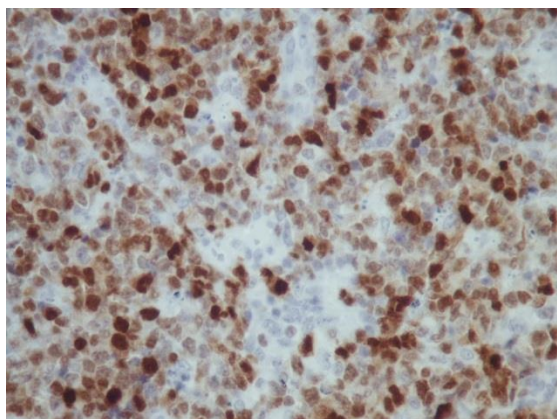
CD10<sup>+/-</sup> ekspresija; uvećanje 40x/0.65



**Slika 17.** DLBCL: Bcl-2<sup>+</sup> ekspresija;  
uvećanje 40x/0.65



**Slika 18.** DLBCL: Bcl-6<sup>+</sup> ekspresija  
uvećanje 40x/0.65

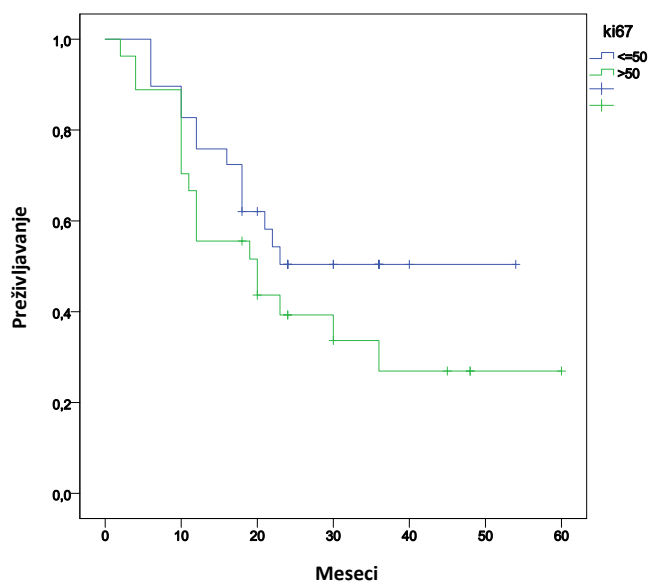


**Slika 19.** DLBCL: MUM1<sup>+</sup> ekspresija  
uvećanje 40x/0.65



*Analiza dužine preživljavanja u odnosu na ekspresiju IHH markera***Ki- 67**

U odnosu na ekspresiju Ki- 67 nije bilo statistički značajne razlike u dužini prosečnog preživljavanja. Distribucija ekspresije Ki-67 kod obolelih od DLBCL (N=59) ( $\geq 50\%$  v.s.  $\leq 50\%$ ) bila je približno jednaka. Za bolesnike sa ekspresijom Ki-67  $\leq 50\%$  prosečno preživljavanje je  $22,97 \pm 11,66$  meseci, a za bolesnike sa ekspresijom Ki-67  $> 50\%$  je  $21,19 \pm 15,02$  meseci ( $p=0,340$ ). Po metodi Kaplan- Maier-a, takođe nije bilo razlike u ukupnom preživljavanju u odnosu na ekspresiju ovog markera (log rank  $p=0,160$ ) (grafikon 19).

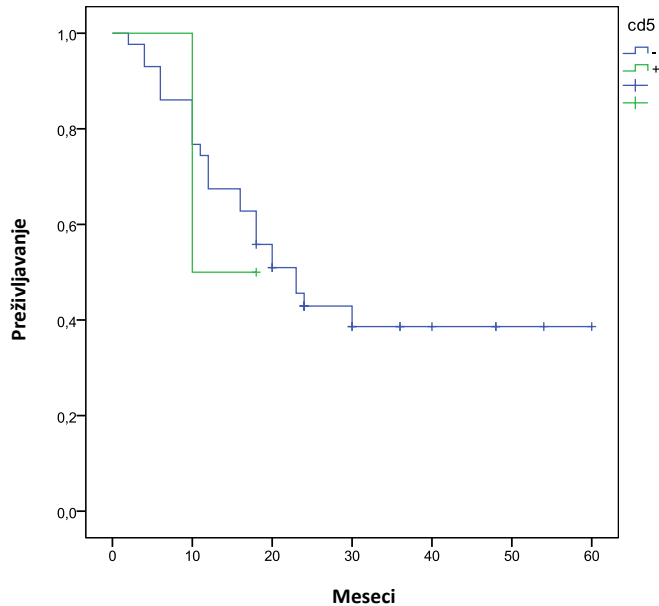


**Grafikon 19.** Kaplan-Meier kriva preživljavanje obolelih od DLBCL u odnosu na ekspresiju Ki-67. Log rank (Mantel-Cox) 0,160

**CD5**

Ekspresija CD5 nije značajno uticala na prosečno preživljavanje obolelih od DLBCL (N=58) ( $p=0,347$ ). Dominantan je bio izostanak CD5 ekspresije kod 63,24% obolelih od

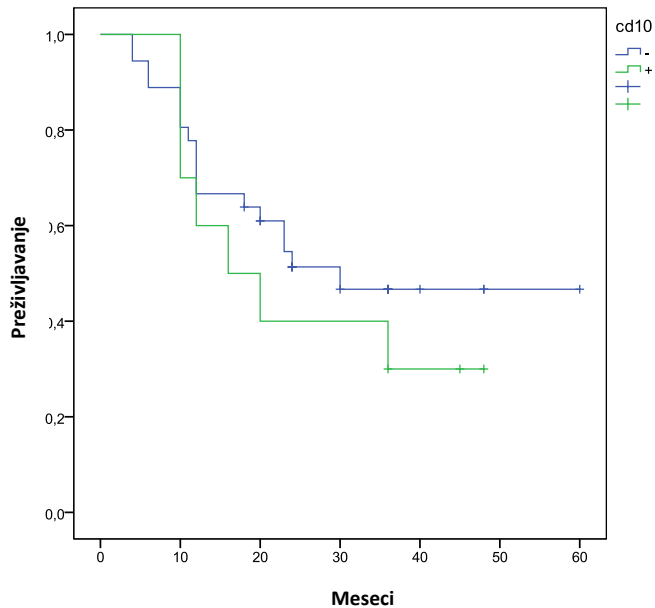
DLBCL. Prosečno preživljavanje u odnosu na CD5 negativnu ekspresiju je  $21,51 \pm 13,55$  meseci, a CD5 pozitivnu ekspresiju  $14,00 \pm 5,66$  meseci. Ukupno preživljavanje po metodi Kaplan- Maiera-a u odnosu na ekspresiju CD5 +/- kod obolelih od DLBCL, takođe nije statistički značajno (log rank 0,843) (grafikon 20).



**Grafikon 20.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na ekspresiju CD5. Log rank (Mantel-Cox) 0,843

### **CD10**

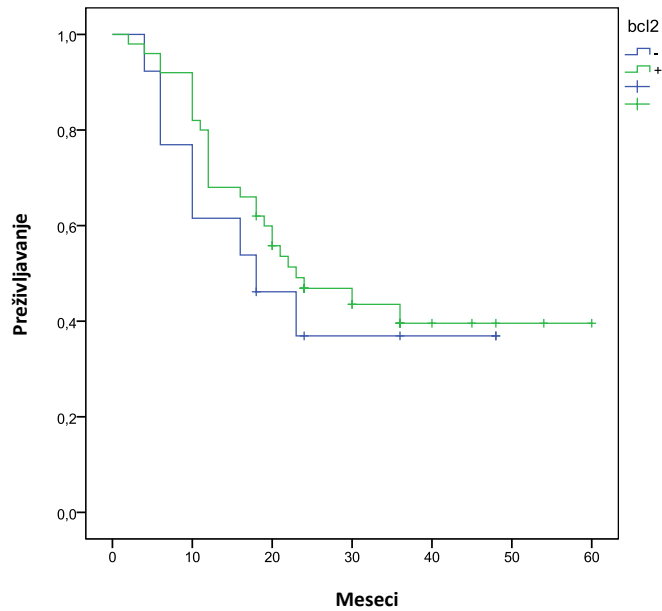
Ekspresija CD10 nije uticala značajno na prosečno preživljavanje obolelih od DLBCL (N=59) ( $p=1,000$ ). CD10 negativna ekspresija je verifikovana kod 52,94% bolesnika sa DLBCL i rezultovala je prosečnim preživljavanjem od  $23,08 \pm 13,49$  meseci, a CD10 pozitivna ekspresija preživljavanjem od  $24,30 \pm 15,33$  meseci. Log rank je takođe bez statističke značajnosti u odnosu na ekspresiju CD10 kod obolelih od DLBCL (log rank  $p=0,410$ ) (grafikon 21).



**Grafikon. 21.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na ekspresiju CD10 . Log rank (Mantel- Cox) 0,410

### *Bcl-2*

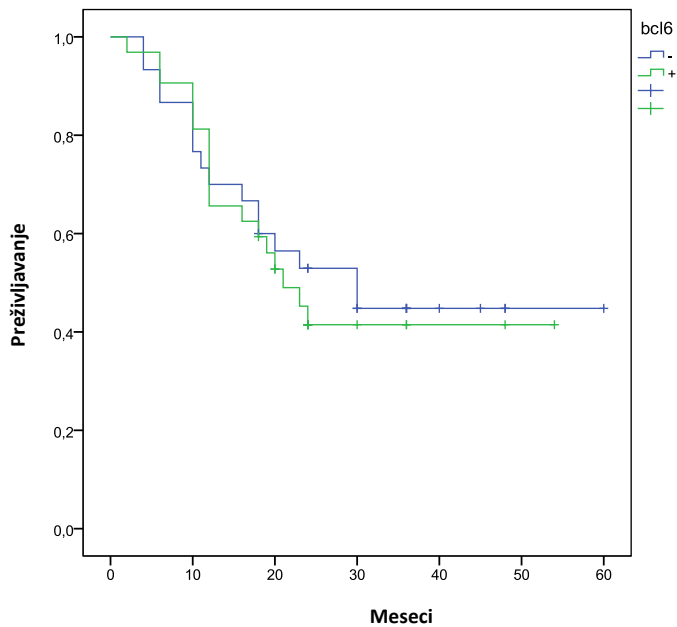
U odnosu na pozitivnu i negativnu ekspresiju Bcl-2 kod obolelih od DLBCL nije bilo značajne razlike u prosečnom preživljavanju ( $p=0,353$ ) iako je dominantna bila pozitivnost Bcl-2 ekspresije (73,53%). Prosečno preživljavanje je  $20,54 \pm 15,05$  za Bcl-2 negativne i  $22,62 \pm 12,91$  za Bcl-2 pozitivne bolesnike . Ukupno preživljavanje obolelih od DLBCL po metodi Kaplan- Maiera-a se takođe statistički nije razlikovalo (log rank  $p=0,480$ ) (grafikon 22).



**Grafikon 22.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na ekspresiju Bcl-2. Log rank (Mantel-Cox) 0,480

### ***Bcl-6***

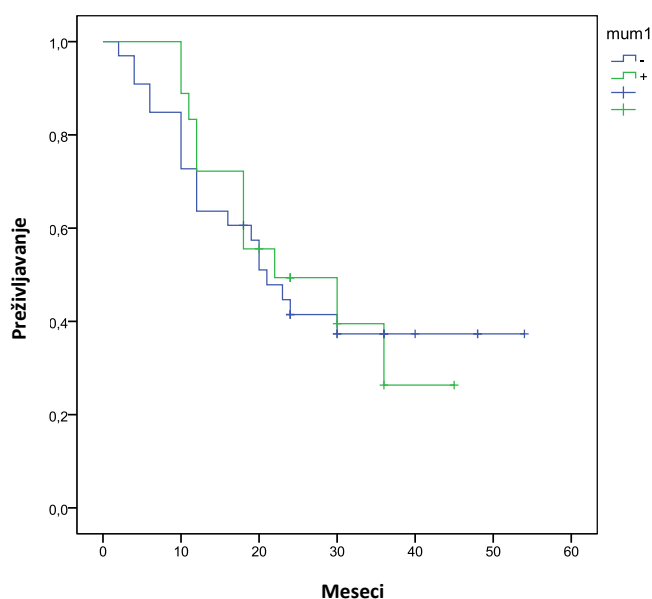
Prosečno preživljavanje obolelih od DLBCL u odnosu na ekspresiju BCL6 nije bilo značajno različito ( $p=0,347$ ). Distribucija Bcl-6 +/- je bila približno jednaka između obolelih sa DLBCL. Bcl-6 negativni DLBCL oboleli imali su prosečno preživljavanje  $24,63 \pm 14,85$  meseci, a Bcl-6 pozitivni DLBCL oboleli  $20,34 \pm 11,40$  meseci. Log rank je takođe bez statistički značajne razlike u odnosu na ekspresiju Bcl-6 +/- kod obolelih od DLBCL ( $p=0,710$ ) (grafikon 23).



**Grafikon 23.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na ekspresiju Bcl-6. Long rank (Mantel-Cox) 0,710.

### *MUM1*

Oboleli od DLBCL sa negativnom ekspresijom MUM1 imali su prosečno preživljavanje od  $21,79 \pm 13,69$  meseci, a MUM1 pozitivni  $22,22 \pm 10,06$  meseci. Približno jednaka je bila distribucija MUM1-/+ ekspresija kod obolelih od DLBCL. Nije bilo statistički značajne razlike u dužini prosečnog preživljavanja u odnosu na ekspresiju ovog markera ( $p=0,714$ ). Log rank takođe nije pokazao statistički značajnu razliku u ukupnom preživljavanju, prema ekspresiji MUM1 ( $p=0,839$ ) (grafikon 24).



**Grafikon 24.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na ekspresiju MUM1. Log rank (Mantel-Cox) 0,839.

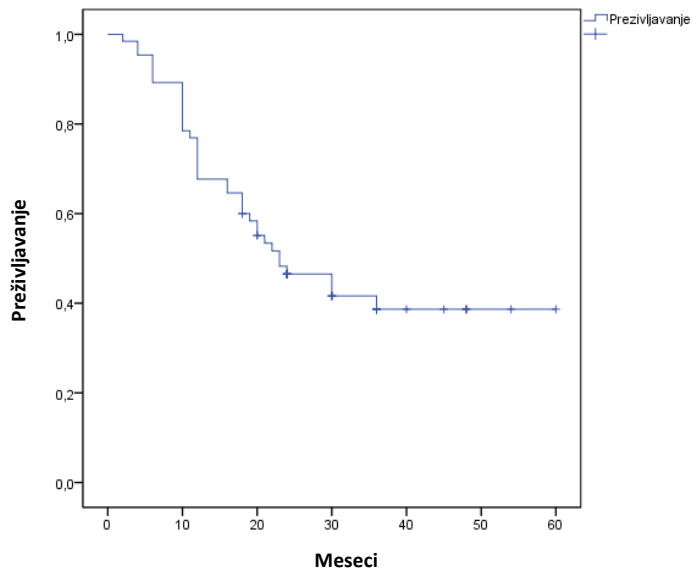
Pozitivna ili negativna ekspresija markera: Bcl-2, Bcl-6, CD10 i Ki- 67 i eventualni uticaj na dužinu prosečnog preživljavanja, njihove udruženosti ili odsustva, nije pokazao značajnu statističku razliku kod obolelih od DLBCL (tabela 19).

**Tabela 19.** Uticaj sadejstva IHH markera na prosečno preživljavanje DLBCL obolelih

marker	Broj bolesnika	Prosečno preživljavanje	Standardna devijacija	p
CD10 <sup>+</sup>	10	24,30	15,33	0.856
CD5 <sup>+</sup>	2	14,00	5,66	
Bcl-2 <sup>+</sup>	50	22,62	12,91	0.432
Ki-67 <sup>&gt;</sup>	27	21,19	15,02	
CD10 <sup>-</sup>	36	23,08	13,49	0.552
Bcl-2 <sup>-</sup>	13	20,54	15,05	
Bcl-2 <sup>+</sup>	50	22,62	12,91	0.357
CD10 <sup>+</sup>	10	24,30	15,33	
Bcl-2 <sup>+</sup>	50	22,62	12,91	0.158
CD10 <sup>-</sup>	36	23,08	13,49	

### ***Analiza dužine preživljavanja u odnosu na primenjeni terapijski protokol u lečenju obolelih od DLBCL***

Medijana ukupnog preživljavanja kod obolelih od DLBCL bez obzira na primenjeni terapijski protokol u lečenju, obuhvaćenih ovim istraživanjem je 23 meseca (grafikon 25)



**Grafikon 25.** Kaplan-Meier kriva ukupnog preživljavanja svih ispitanika sa DLBCL

Terapijski protokoli korišćeni u lečenju obolelih od DLBCL opisani su u delu metodologija. Najbrojnija grupa bolesnika lečena je R- CHOP protokolom i oni su činili I grupu (75%). Oboleli od DLBCL lečeni svim ostalim terapijskim modalitetima (navedeno u delu metodologija) činili su grupu II: nonR-CHOP grupu (17.65%) i to je grupa sa agresivnijim formama bolesti. Grupu III (7,35%) su činili oboleli od DLBCL sa relapsom bolesti, kod kojih je ordinirana i druga terapijska linija u lečenju. Oni su izdvojeni kao posebna grupa iako su lečeni R-CHOP protokolom i u malom su broju, sa ciljem da se analizom kliničkih, biohemijskih i imunohistohemijskih parametara, verifikuju faktori ranog relapsa bolesti.

Prosečno preživljavanje u grupi I:  $24,33 \pm 13,98$  meseci; u grupi II;  $15,50 \pm 9,02$  meseci; u grupi III:  $20,80 \pm 7,05$  meseci. Ukupna značajnost sa Kruskal Wallis testom nije dokazana

zbog malobrojnosti grupe III ( $p=0,089$ ) (tabela 20). Bolesnici svrstani u treću grupu u odnosu na terapijski protokol su bolesnici sa relapsom bolesti i bilo ih je ukupno 5, pa rezultati u tom delu nisu dovoljno ilustrativni.

Druga terapijska grupa ima statistički značajno manje prosečno preživljavanje u odnosu na grupu I ( $p=0,033$ ). Između I i III nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju ( $p=0,703$ ), što je vrlo paradoksalno, ali je razlog u malom broju ispitanika u grupi III, što je potvrdio i Kruskal Wallis test. Isti rezultat je dobijen i upoređivanjem II i III grupe ( $p=0,152$ ) (Tabela 21).

**Tabela 20.** Prosečno preživljavanje obolelih od DLBCL u odnosu na terapijski protokol.

Terapijska grupa	Prosečno preživljavanje (meseći)	Standardna devijacija	Standardna greška	Min. preživljavanje (meseći)	Max. preživljavanje (meseći)
1	24,33	13,98	2,02	2	60
2	15,50	9,02	2,60	6	36
3	20,80	7,05	3,15	11	30

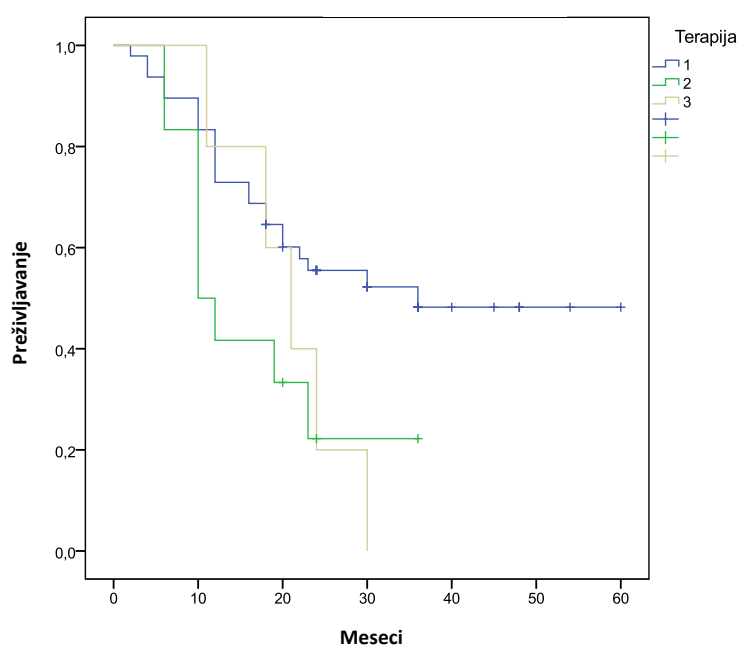
	Preživljavanje
Chi-Square test	4,832
Kruskal Wallis Test	0,089

**Tabela 21.** Poređenje prosečnog preživljavanja između terapijskih grupa

	Terapijske grupe		
	I : II	I : III	II : III
Mann-Whitney U test	173,000	107,500	16,500
Z	-2,134	-0,382	-1,434
p	0,033	0,703	0,152



Po metodi Kaplan Maier-a postoji statistička značajnost u ukupnom preživljavanju obolelih od DLBCL u odnosu na primenjeni terapijski protokol (Log rank  $p=0,038$ ) u korist obolelih od DLBCL koji su lečeni R-CHOP protokolom (grafikon 26).



**Grafikon 26.** Kaplan-Meier kriva preživljavanja obolelih od DLBCL u odnosu na primenjeni terapijski protokol u lečenju. Log rank (Mantel- Cox) 0,038

### ***Relaps bolesti***

Relaps bolesti nastao je u periodu od 9-24 meseca od postavljanja dijagnoze kod 5 bolesnika ženskog pola sa DLBCL (2 bolesnice mlađe od 60 godina). Bolesnice su bile dobi 24-78 godina, ECOG 1-2, IPI 1-4. R- IPI 2-3, sa "B" simptomatologijom (5/5), bez EN manifestacija (4/5), u drugom kliničkom stadijumu bolesti u 60% slučajeva, GCB tip DLBCL 40%, neGCB tip 60%. Vrednosti hemoglobina u kategoriji manje od 120 g/l u 80%, sedimentacija Erythrocyte sedimentation rate (ESR) niža od 60 mm/h u 60%, a viša od 60 mm/h u 40% slučajeva. Broj trombocita u referentnim granicama (5/5), a vrednosti albumina u serumu snižene ispod 30 g/l kod 80% bolesnica, uz povišene vrednosti LDH. Vrednosti B2MG, CRP nisu prisutne kod bolesnica u retrospektivnom delu studije, kao ni ekspresija CD5, CD10 i Ki-

67. Od imunohistochemijskih markera: Bcl-2 pozitivna ekspresija 100%, Bcl-6 ekspresija negativna u 60% slučajeva, MUM1 pozitivna ekspresija u 60% slučajeva. Genski polimorfizam za Myd88 L265P mutaciju- normalan "wild" tip. Sve bolesnice sa relapsom bolesti egzistirale su u periodu 11-30 meseci od postavljanja dijagnoze. Sve su bile inicijalno lečene R-CHOP protokolom, a posle relapsa, ESHAP i DHAP protokolom (tabela 22).

**Tabela 22.** Karakteristike obolelih od DLBCL sa relapsom bolesti

Pol	ženski	ženski	ženski	ženski	ženski
God.starosti	69	47	24	78	60
IPI	4	3	1	3	3
R- IPI	3	3	2	3	3
ECOG	2	2	0	1	1
E N manif.	ne	da	ne	ne	ne
SE Er	>60/h	>60/h	<60/h	<60/h	<60/h
CRP	>20mg/l	>20mg/l		>20mg/l	<20mg/l
Beta 2 MG	>3,5mg/l		<3,5mg/l		>3,5mg/l
Kl.stad.	3	4	2	2	2
B simpt.	da	da	da	da	da
Hgb	<120g/l	<120g/l	>120g/l	<120g/l	<120g/l
Tr	>100 000/l	>100 000/l	>100 000/l	>100 000/l	>100 000/l
Albumini	<30g/l	<30g/l	<30g/l	<30g/l	>30g/l
LDH	>460U/L	>460U/L	>460U/L	>460U/L	>460U/L
Ki-67%	>50%	>50%		<50%	>50%
CD5		Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
CD10		Neg.	Neg.		
Bcl-2	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
Bcl-6	Poz.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.
MUM1	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
Myd88L265P	Wild type	Wild type	Wild type	Wild type	Wild type
Preziviljav.	21 mesec	11 meseci	24 meseca	18 meseci	30 meseci
Tip DLBCL	GCB	neGCB	GCB	neGCB	neGCB
Terapija	RCHOP/ DHAP	RCHOP/ DHAP	RCHOP/ ESHAP	RCHOP/ DHAP	RCHOP/ DHAP
Vreme do progresije bolesti (PFS)	10 meseci	9 meseci	12 meseci	12 meseci	24 meseca

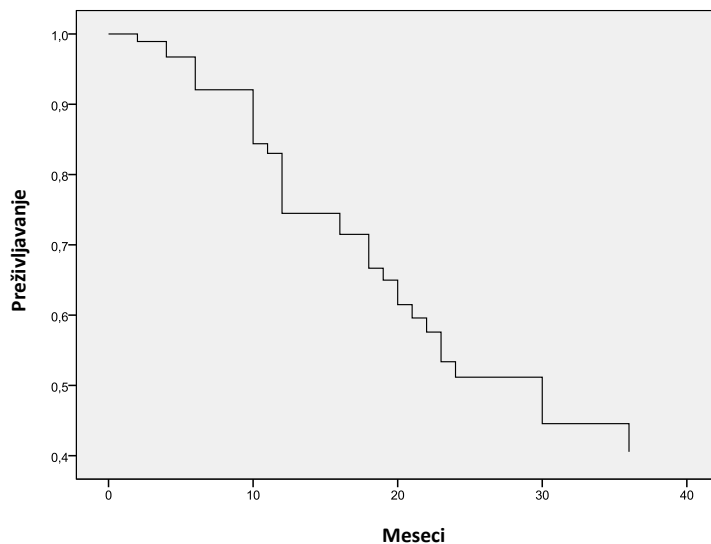
### *Prediktorni uticaj pojedinih varijabli na preživljavanje obolelih od DLBCL*

Za ispitivanje prediktornog uticaja pojedinih varijabli na preživljavanje uradjena su tri modela, metodom Cox regresije.

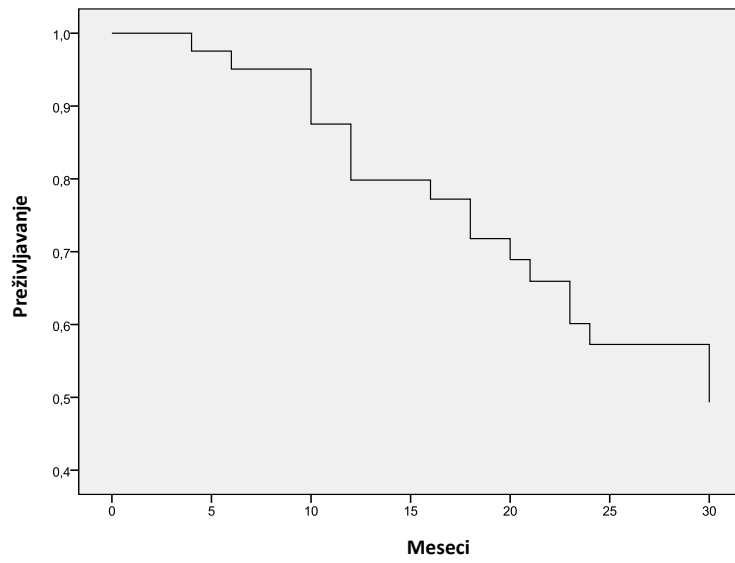
**Prvi model** je obuhvatao biohemijske parametre (LDH, hemoglobin, albumin) i jedini značajan prediktorni uticaj je utvrđen za vrednosti albumina u serumu (Wald=18.864  $p<0.0001$ , grafikon 27): Overall (score) Chi- square 26,983 ( $p=0,000$ ). Niže vrednosti albumina u serumu imaju negativni prediktorni uticaj kod obolelih od DLBCL.

**Drugi model** je ispitivao prediktorni uticaj EN manifestacija i B simptomatologije i ustanovio da nisu značajni prediktori preživljavanja (grafikon 28). Overall (score) Chi- square 2,399 ( $p=0,301$ ).

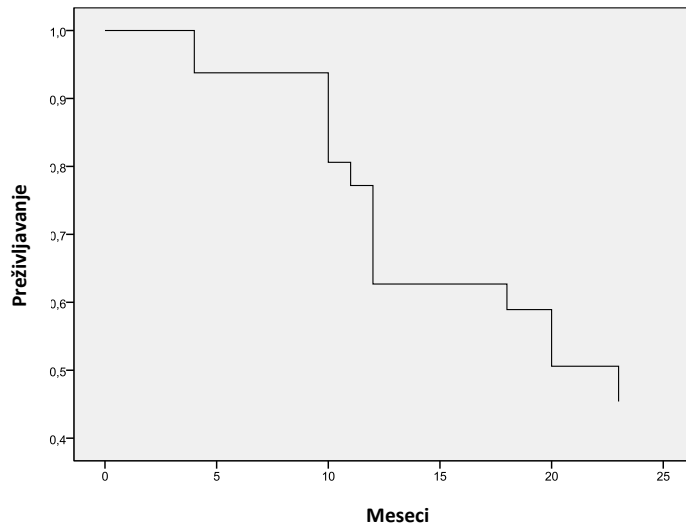
**Treci model** ispitivao je prediktorni uticaj imunohistohemijskih marker varijabli (Ki67, CD5, CD10, Bcl-2, Bcl-6, MUM1) i ustanovio da takodje nijedna od njih nije značajan prediktor preživljavanja (grafikon 29). Overall (score) Chi- square 5,031 ( $p=0,412$ ).



**Grafikon 27.** Prediktorni značaj biohemijskih parametara na preživljavanje (Wald=18.864  $p<0.0001$  za vrednosti albumina u serumu).



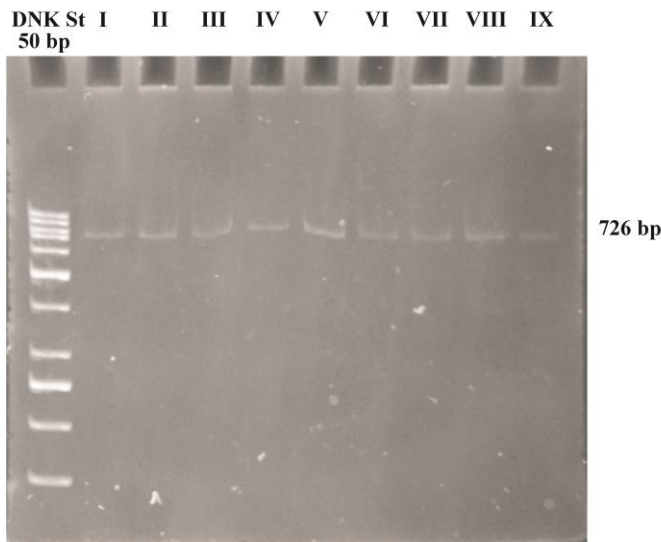
**Grafikon 28.** Prediktorni značaj EN manifestacija i B simptomatologije na preživljavanje ( $p=0.301$ ).



**Grafikon 29.** Prediktorni značaj imunohistohemijskih parametara na preživljavanje ( $p=0,412$ ).

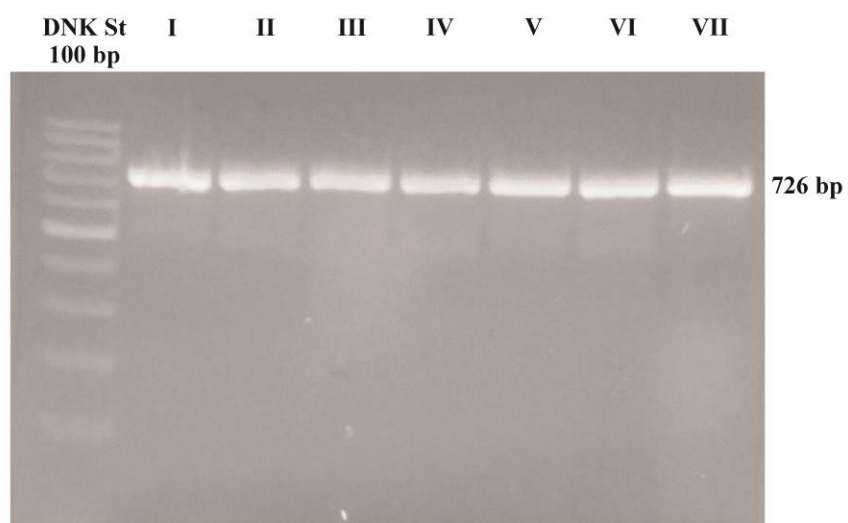
### ***Ispitivanje genskog polimorfizma za Myd88 L265P***

U ispitivanju genskog polimorfizma za Myd88 L265P za ispitivanu grupu dobijeni su sledeći rezultati: analizom dužine restrikcionih fragmenata dobijenih PCR-RFLP metodom, utvrđen je genotip za ispitivani polimorfizam. Dobijeni rezultat je homozigotni, normalni (divlji, engl. *wild type*) genotip TT koji je predstavljen prisustvom jednog fragmenta veličine 726bp (slika 20). Kod svih 68 (100%) ispitivanih genomskih DNK izolovanih iz tkiva fiksiranog u parafinu pacijenata obolelih od DLBCL, eksperimentalnim radom dobijen je homozigotni, normalni genotip TT, koji je predstavljen prisustvom jednog fragmenta veličine 726bp.



**Slika 20.** Poliakrilamidna gel elektroforeza za MYD88 L265P polimorfizam *rs387907272*.

U našoj ispitivanoj grupi nije bilo CC (448bp i 278bp) i TC (726bp, 448bp i 278bp) genotipa. Uspešnost PCR amplifikacije proveravana je metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu (slika 21).



**Slika 21** . Agarozna elektroforeza za proveru PCR reakcije za MYD88 L265P

---

## ***DISKUSIJA***

Ovom retrospektivno - prospektivnim studijom prezentovane su demografske, biohemijske, kliničke, prognostičke skor/indeks i imunohistohemijske karakteristike 68 bolesnika sa dijagnozom de novo DLBCL.

### ***Prediktorni značaj godina starosti u DLBCL***

Naše istraživanje pokazalo je da godine života značajno utiču na dužinu preživljavanja, pa su stariji od 60 godina (54,4%) imali kraće preživljavanje, u odnosu na mlađe.<sup>198</sup> Starenjem se akumuliraju i nadgrađuju stečena genetska oštećenja koja dovode do neregulisane aktivacije neželjenih grupa onkogeni. Starenje je praćeno opštim padom fizioloških funkcija. Uloga apoptoze u procesu starenja i kako starenje može modifikovati regulaciju apoptoze još uvek nije u potpunosti razjašnjeno.<sup>237</sup> U celini, starenje je praćeno disregulacijom imunog sistema u vidu promene broja i imunološke kompetentnosti limfocita i citokina koje oni stvaraju, menja se antigeni repertoar limfocita i regulacija funkcije monocito-makrofagnog sistema što remeti funkcionisanje imunološkog nadzora važnog za ostvarivanje antitumorske zaštite.<sup>131</sup>

*Pfreundschuh et al. (2006,2011)* u svojim radovima su upoređivali terapijske rezultate kod bolesnika starosti 18-60 godina lečenih po terapijskom protokolu sa rituksimabom i dokazali značajan porast dužine preživljavanja kod mlađih od 60 godina.<sup>164,165</sup>

*Coiffier (2007)* u svom istraživanju, dokazuje benefit od terapije rituksimabom i kod obolelih od DLBCL starosti 60-80 godina.<sup>35</sup> Postoji više indikatora bioloških različitosti između mlađih i starijih DLBCL obolelih, što uzrokuje razliku u dužini preživljavanja, sa lošijom prognozom za starije.<sup>17,78,108,135,192,203,204,215</sup>

*Maartense et al.(2000)* u svom radu, u kategoriju "stariji", svrstavaju obolele od DLBCL preko 65 godina i zaključuju da je prognoza bolesti za te bolesnike lošija.<sup>130</sup>

U našem istraživanju, iako je dokazano statistički značajno duže ukupno preživljavanje kod mlađih od 60 godina, analizom dužine prosečnog preživljavanja po starosnim grupama, do 60 godina i preko 60 godina, nije dokazano postojanje značajne razlike. Kako je u ovoj studiji terapijski protokol R-CHOP ordiniran kod 70% bolesnika, svakako su ovi rezultati, između ostalog, i posledica lečenja imunohemoterapijom.

Bolesnici stariji od 60 godina značajno manje imaju prognostički indeks R- IPI 1, a mlađi od 60 godina značajno manje imaju prognostički indeks R- IPI 3. Prognostički indeks R- IPI je u ovoj studiji vrlo koristan prediktor ishoda. Stariji od 60 godina češće imaju IPI 4. Prognostički indeks IPI se pokazao kao koristan u predikciji ishoda kod starijih obolelih od DLBCL sa visokim rizikom. *Shipp et al. (1993)* u svojoj studiji zaključuju, da IPI ima veći prediktivni značaj, ukoliko su u istraživanje uključeni bolesnici svih životnih doba, a ukoliko su ciljna grupa oboleli do 60 godina, korisnije podatke u smislu predikcije ima AA- IPI.<sup>185</sup> *Advani et al. (2010)*, analizuju koji od prognostičkih indeksa može imati najveći prediktivni značaj kod starijih bolesnika lečenih imunohemoterapijom, upoređujući IPI, AA- IPI (age adjusted IPI), E- IPI (elderly IPI za starije od 60 godina, sa cut off 70 godina starosti) , R- IPI (revised IPI), i zaključuju da IPI i AA- IPI kod starijih od 60 godina obolelih od DLBCL koji su lečeni ritiksimumabom, daju korisne podatke za predikciju ishoda. IPI, AA- IPI i E- IPI praktično identifikuju nepovoljne, visokorizične grupe, kod kojih je šansa za 3-godišnje preživljavanje manja od 50%. U istom istraživanju R- IPI nije uspeo da identifikuje grupe sa veoma niskim rizikom, što je smanjilo korisnost ovog prognostičkog indeksa za stariju populaciju.<sup>4</sup>

### ***Prediktorni značaj polnih grupa u DLBCL***

Kod 68 DLBCL bolesnika u ispitivanoj grupi, polna distribucija bila je vrlo neujednačena, te je bilo 67,6% žena i 32,4% muškaraca. U ovom istraživanju, prosečno preživljavanje u odnosu na pol, ne pokazuje statistički značajnu razliku. Ali po metodi Kaplan- Maier-a postoji značajna razlika u ukupnom preživljavanju u korist obolelih od DLBCL ženskog pola. Oboleli od DLBCL muškog pola češće imaju EN manifestacije bolesti i niže vrednosti albumina u serumu. U meta analizi *Yıldırım et al. (2014)* na 5635 bolesnika iz 20 studija, zaključeno je da je da oboleli od DLBCL muškog pola, lečeni



imunohemoterapijom, imaju lošiju prognozu bolesti u odnosu na ženski pol.<sup>229</sup> Mehanizam, koji stoji u osnovi ovakvih rezultata, nije sasvim jasan, ali činjenica je, da je kod muškaraca verifikovan niži nivo rituksimaba u serumu u odnosu na žene, kao i niži klirens ovog leka kod ženskog pola, posebno starije životne dobi<sup>143,166,167,168,192</sup>, pa muškarce obolele od DLBCL treba tretirati sa većom dozom rituksimaba. *Advani et al. (2013)* predlažu da se u E- IPI indeks (Elderly IPI, age cut off 70 godina) uračunava i muški pol čime bi se postigla bolja stratifikacija rizika. U njihovim analizama muški pol je bio značajan nezavisni prediktorni faktor preživljavanja.<sup>5</sup> *Jaeger et al. (2015)* svojim istraživanjem saopštavaju da oboleli od DLBCL muškog pola lečeni imunohemoterapijom imaju benefit od terapije u smislu dužeg preživljavanja, naročito muškarci sa IPI  $\leq 1$ , dok kod žena to nije bio slučaj.<sup>94</sup> Po drugima polna pripadnost obolelih od DLBCL, nema prediktorni značaj.<sup>192,194</sup> Žene imaju više neželjenih efekata terapije u toku lečenja.<sup>197</sup>

### ***Karakteristike relapsa bolesti u DLBCL***

Relaps bolesti zabeležen je kod 5 bolesnika sa DLBCL od koji su 2 bolesnice bile mlađe od 60 godina, ECOG performas statusom (1-2), IPI 1-4. R- IPI 2-3, sa "B" simptomatologijom, bez EN manifestacija u 80% slučajeva, u limitiranom kliničkom stadijumu bolesti u 60% slučajeva, GCB tip DLBCL 40%, bez anemijskog sindroma, sa vrednostima albumina u serumu ispod 30 g/l kod 80% bolesnika, uz povišene vrednosti LDH. Sve DLBCL bolesnice sa relapsom bolesti egzistirale su u periodu 11-30 meseci od postavljanja dijagnoze. Sve su bile lečene R-CHOP protokolom, a posle relapsa, ESHAP i DHAP protokolom. Uglavnom se relapsi DLBCL javljaju u okviru 2-3 godine od završetka lečenja. Kasni relapsi DLBCL su oni koji se javljaju posle 5 ili više godina od završetka lečenja. Javljaju se češće kod starijih, visokorizičnih obolelih od DLBCL.<sup>15,98</sup>

*Raut et al. (2014)* u svom istraživanju navode da je traganje za prediktorima relapsa DLBCL u toku i da se na tome neprekidno radi. Kao mogući prediktori relapsa navode se: IPI 3/4, visok nivo LDH u serumu. Zaključuju da je relaps bolesti unutar prve godine od završetka lečenja, loš prognostički faktor. Kao prediktorni faktori relapsa bolesti pominju se i CNS prezentacija bolesti, apsolutna monocitoza i limfocitoza. Subtip

DLBCL, nije imao prediktorni značaj. *Friedberg et al. (2011)* u svom radu ističu, da iako je postignut veliki napredak u lečenju obolelih od DLBCL, i dalje oko trećina obolelih ima relaps bolesti što je glavni razlog mortaliteta.<sup>56</sup> *Nagle et al (2013)*, takođe, kao moguće prediktorne faktore za relaps bolesti, navode IPI sa većim brojem faktora rizika i povišen nivo LDH u serumu.<sup>145</sup> *Larouche et al. (2010)* u studiji na 54 bolesnika sa relapsom DLBCL prikazuju sledeće rezultate: prosečna starost 66 godina, sa predominacijom bolesnika muškog pola, klinički stadijum bolesti 1-4, IPI 0-2, sa EN manifestacijama, bez B simptomatologije. ECOG 1-2, LDH vrednosti u serumu povišene. Osim ekspresije Bcl-2 84%, nije bilo značajnije razlike u ekspresiji ostalih imunohistohemijskih markera. Zastupljenost GCB i neGCB tipa DLBCL nije pokazivala značajnu razliku kod obolelih od DLBCL sa relapsom bolesti. Pojava relapsa bolesti je dobro opisana, ali je biologija relapsa uglavnom nepoznata. Većina bolesnika ima početnu bolest u ranoj fazi, EN manifestacije bolesti i povoljan IPI skor.<sup>117</sup>

U našem radu, analiza bolesnika sa relapsom DLBCL, pokazuje rezultate koji se u nekim delovima poklapaju, a u nekim potpuno razlikuju od rezultata u svetu. Obzirom na to, da se još uvek, ne poznaje suštinski etiologija relapsa DLBCL, ovo istraživanje, sa svojim rezultatima, sa svoje strane, daje doprinos, daljem radu na ovom polju, naročito za teritoriju Srbije.

### ***Prediktorni značaj kliničkog stadijuma bolesti u DLBCL***

U našem istraživanju, oboleli od DLBCL sa kliničkim stadijumom III i IV statistički značajno češće imaju R- IPI 3. Veći klinički stadijum korelira sa R- IPI 3. Kod bolesnika u III i IV kliničkom stadijumu statistički značajno je češći performans status ECOG 2, 3 i 4. Značajno više obolelih od DLBCL ima „B“ simptome ako su u III i IV kliničkom stadijumu. Prisustvo ekstranodalnih manifestacija je statistički značajno češće u kliničkom stadijumu III i IV. Pacijenti sa objedinjenim I i II kliničkim stadijumom („limitirani DLBCL“) su imali bolje preživljavanje od obolelih u odmaklom kliničkom stadijumu bolesti („uznapredovali DLBCL“). *Cowan et al. (1989)* u svojoj studiji na 260 bolesnika ističu prediktorni značaj kliničkog stadijuma bolesti. U kliničku remisiju bolesti ušlo je 65% bolesnika, a kod preostalih 35% to nije bio slučaj. Neuspeh je

povezan sa odmaklom fazom bolesti (III i IV klinički stadijum bolesti), godinama starosti, niskim nivoom albumina u serumu i prisustvom „bulk” oblika bolesti.<sup>38</sup> *Abdelhamid et al. (2010)* u studiji na 224 DLBCL obolelih lečenih CHOP protokolom, dokazuju snažnu povezanost ukupnog preživljavanja, „bulk” oblika bolesti i kliničkog stadijuma bolesti.<sup>2</sup>

### ***Prediktorni značaj vrednosti albumina u serumu u DLBCL***

Najniže vrednosti albumina zabeležene su kod obolelih od DLBCL sa R- IPI 3, te vrednosti albumina u serumu jako koreliraju sa R- IPI. Značajno je duže prosečno i ukupno preživljavanje kod bolesnika sa vrednostima albumina u serumu preko 30 g/l. Oboleli od DLBCL sa nižim vrednostima albumina u serumu imali su značajno kraće preživljavanje. U odnosu na vrednost albumina u serumu i polnu pripadnost postoji granična statistički značajna korelacija sa nižim vrednostima albumina kod muškaraca. Kod obolelih od DLBCL sa relapsom bolesti, u našem istraživanju, 80% je imalo vrednosti albumina manje od 30g/l. Cox regresionom analizom je utvrđen značajni prediktivni uticaj vrednosti albumina u serumu. Poznato je da niske vrednosti albumina imaju negativni prognostički uticaj kod obolelih od DLBCL.<sup>151</sup> U radu *Eatrides et al. (2014)*, takođe je potvrđeno da je nivo albumina u serumu kod obolelih od DLBCL, snažan prediktor rizika. U tom istraživanju sa cut off vrednošću albumina od 37g/l, albumini su označeni kao prediktori ukupnog preživljavanja kod obolelih od DLBCL koji su lečeni R-CHOP protokolom i koji u sklopu sa ostalim kliničkim parametrima mogu biti od velike pomoći u identifikaciji bolesnika sa visokim rizikom od relapsa bolesti.<sup>47</sup> *Dalia et al. (2014)* u svom istraživanju, takođe, navode da je koncentracija albumina u serumu kod obolelih od DLBCL, lečenih R-CHOP protokolom, važan prediktor rizika. Cut off vrednost za serumski albumin je 37 g/l, te su vrednosti ispod navedene povezane sa lošijom prognozom. Oni takođe predlažu da se u prognostički indeks R-IPI, kao jedan od rizik faktora uključi i vrednost albumina u serumu. Mehanizam kojim nizak nivo serumskih albumina ima negativni prediktorni značaj u odnosu na preživljavanje obolelih od DLBCL još uvek nije dovoljno jasan. Postoje teorije da su niske vrednosti serum albumina povezane sa povećanim inflamatornim

odgovorom na tumorsku masu uz slabiji nutritivni status, kao i povećano oslobađanje citokina. Nizak nivo serum albumina može biti uzrokovan i sniženom produkcijom u hepatocitima zbog oslobađanja citokina iz tumora kao što je IL-6, koji blokira produkciju albumina u hepatocitima. Povećan nivo TNF $\alpha$  takođe može biti udružen sa niskom nivoom serum albumina.<sup>40</sup> Niski serum albumin, takođe, mogu biti i zbog jakog inflamatornog odgovora uzrokovanog prisustvom tumorske mase. Loš nutritivni status, po pravilu prati bolesnike sa malignitetima, koji uz loš performans status i prateće komorbiditete, može biti i razlog za nemogućnost primene hemoterapije u adekvatnim terapijskim dozama.<sup>40</sup> *Cowan et al. (1989)* takođe ističu značaj koncentracije albumina u serumu u predikciji rizika obolelih od DLBCL.<sup>38</sup> *Alici et al.(2003)*, takođe ističu značaj hipoalbuminemije kao negativnog prognostičkog faktora kod NHL obolelih.<sup>9</sup>

### ***Prediktorni značaj vrednosti LDH u serumu u DLBCL***

U ovom istraživanju, statistički značajno više vrednosti LDH evidentiraju se kod obolelih sa R- IPI 2 i R- IPI 3, kao i kod starijih od 60 godina. Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju u odnosu na vrednost LDH u serumu kod obolelih od DLBCL. Obzirom da je vrednost LDH u serumu, jedan od parametara- rizik faktora u okviru IPI, sa svoje strane značajno utiče, što nezavisno, što u sklopu IPI, na predikciju rizika kod DLBCL obolelih.<sup>33,38</sup> *William et al.(2013)* objavljuju podatke svojih istraživanja, u kojima se 1,5 puta povišena vrednost LDH može smatrati specifičnim markerom za predikciju relapsa bolesti, i da je LDH nespecifičan marker, koji se ne može koristiti za praćenje bolesnika sa DLBCL koji su u remisiji.<sup>219</sup> *El-Sharkawi et al. (2012)* u svom radu, smatraju da su podaci o prediktornom značaju LDH za relaps bolesti, oskudni, ali se slažu sa rezultatima u drugim studijama, da povišene vrednosti LDH, kod pacijenata u remisiji, nemaju prediktorni značaj.<sup>49</sup>

### ***Prediktorni značaj IPI i R- IPI u DLBCL***

Iako je Internacionalni prognostički indeks (IPI) prvobitno kreiran za prognostičku stratifikaciju agresivnih neoplazmi, zbog njegove jednostavnosti je došlo do širenja upotrebe i u situacijama koje prevazilaze prvobitnu namenu. U tim novim okolnostima IPI nije uvek mogao da adekvatno stratifikuje rizične grupe. U našem istraživanju prosečno preživljavanje prema IPI skoru ne pokazuje statistički značajnu razliku, a jedina statistička razlika uočena je između obolelih sa skorom IPI 2 i IPI 3. IPI se pokazao kao nedovoljno precizan da označi razlike u preživljavanjima prema rizičnim grupama. Nije bilo razlike u dužini ukupnog preživljavanja između pacijenata sa IPI 1 i IPI 4, što u ovoj studiji pokazuje da IPI nema sposobnost precizne identifikacije visoko rizičnih bolesnika i ne može da adekvatno stratifikuje rizične grupe u eri imunohemoterapije.

R- IPI, koji je nastao redistribucijom originalnih IPI rizik faktora i koji prisutvo rizik faktora (RF) klasifikuje u 3 prognostičke grupe (0 RF= *very good*; 1- 2 RF= *good*; 3- 5 RF= *poor*), u mnogim studijama se pokazao kao korisniji prognostički indeks, posebno, u rituksimab eri. Preživljavanje u ovom istraživanju odnosu na R- IPI skor pokazuje značajnu statističku razliku u smislu kraćeg preživljavanja kod bolesnika sa R- IPI 3.

R- IPI je u ovoj studiji dao korisnije podatke i ima veći prediktorni značaj u odnosu na standardni IPI.

*Ziepert et al (2010)* u radu na 1206 obolelih, lečenih R- CHOP protokolom, koji su bili uključeni u MabThera International Trial [MiNT], zaključuju, da IPI ustanovljen kao prognostički indeks 1993. godine za CHOP i CHOP like terapijske protokole, ostaje na snazi i u eri rituksimaba. Međutim, IPI skor, u slučajevima sa više od jedne EN manifestacije bolesti, nije se pokazao kao prognostički relevantan. Razlog za to je nepoznat, ali deo obješnjenja je u razlici u brojanju EN manifestacija, jer je za neke EN manifestacije to nedovoljno definisano npr. koža ili meka tkiva. Autori rada, takođe, smatraju, da će napuštanje stratifikacije prema IPI skoru, otežati ili čak poništiti rezultate svih onih studija i istraživanja koji su svoje rezultate bazirali na IPI scoring sistemu.<sup>242</sup>

*Huang et al. (2012)* su imali cilj da preispitaju ulogu IPI skora u Kineskoj populaciji, kod obolelih lečenih CHOP i R-CHOP protokolom. Rezultat ove studije je pokazao da je

IPI i dalje koristan u predikciji lečenih CHOP protokolom, ali kada su u pitanju bolesnici lečeni R-CHOP protokolom, IPI skor nije imao prediktivni značaj i na osnovu njega nije mogla da se napravi razlika između različitih prognostičkih kategorija. Istraživanje je pokazalo da je R- IPI jednostavniji i klinički relevantniji prediktor bolesti u odnosu na standardni IPI, kod obolelih od DLBCL u eri rituksimaba.<sup>86</sup> *Bari et al. (2010)*, takođe u svom radu zaključuju, da je standardni IPI, u rituksimab eri izgubio svoj diskriminatorski značaj, a da R- IPI može biti korišćen u kliničkim istraživanjima, kao prognostički indeks, sa tim da ima nedostatak u tome što identifikuje veliki broj obolelih sa “poor” prognozom. Za rešenje tog problema, predlažu dalja istraživanja na većem broju bolesnika, kao i formiranje prognostičkih skorova na molekularnoj osnovi.<sup>14</sup> *Shipp et al. (1993)*, objavili su rezultate u kojima se IPI indeks, može koristiti u identifikaciji rizičnih grupa i pri upoređivanju različitih terapijskih modaliteta, a 2002 godine isti autor potvrđuje da kod obolelih od DLBCL i lečenih CHOP protokolom, IPI indeks efikasno odvaja bolesnike po kategorijama rizika.<sup>184,185</sup> *Yoo et al. (2010)*, zaključuju da je prediktivna snaga IPI faktora redukovana kod DLBCL obolelih lečenih R-CHOP protokolom.<sup>232</sup> *Sehn et al. (2007)* navode da redistribucija IPI prognostičkih faktora u R- IPI pruža više korisnih prediktornih podataka. Ali ni IPI, ni R- IPI ne identifikuju rizične grupe sa manje od 50% šansi za preživljavanje. Neki molekularni prognostički markeri identifikovani kod DLBCL obolelih, moraju biti reevaluirani (Bcl-2, Bcl-6), jer nemaju prediktorni značaj koji su imali u prerituksimab periodu.<sup>180</sup> *Salles et al. (2011)*, razmatrajući prediktivni značaj IPI zaključuju da IPI može i dalje imati svoj značaj u rituksimab eri, ako se koristi u sadejstvu sa ekspresijom Bcl-2 i Ki- 67.<sup>177</sup> Međutim, u kliničkoj praksi, prognostički faktori, tipa IPI, moraju se kombinovati sa histopatološkim i imunohistohemijskim parametrima radi odgovarajuće odluke o daljem lečenju.<sup>185,199</sup>

---

### ***Prediktorni značaj prisustva „B“ simptomatologije u DLBCL***

Nije dokazana statistički značajna razlika u dužini ukupnog preživljavanja u odnosu na prisustvo „B“ simptomatologije u našem istraživanju iako je 86,8% obolelih od DLBCL imalo „B“ simptome bolesti. Zbog subjektivnosti „B“ simptomatologije kao kliničkog znaka, mnogi autori nerado uključuju ovaj prognostički faktor u svoje scoring sisteme. Subjektivnost je moguće objašnjenje za odsustvo prognostičke statističke značajnosti „B“ simptomatologije i u našem istraživanju. Ove tegobe se mogu smatrati indirektnom merom reakcije organizma na malignitet jer su delimično posledica pojačane sekrecije TNF i drugih proinflamatornih citokina.<sup>151</sup> Nasuprot tome, slabost malaksalost i gubitak težine mogu biti asocirani i sa pridruženim bolestima i poremećajima koji ne predstavljaju odraz molekularne borbe sa tumorom.<sup>64</sup> Székely *et al.* (2012) prisustvo „B“ simptomatologije kod DLBCL obolelih smatraju negativnim prognostičkim faktorom. Prisustvo „B“ simptomatologije u Cox modelu sa IPI, nema prognostički značaj.<sup>192</sup>

### ***Prediktorni značaj ECOG- performans statusa u DLBCL***

Vrednost ECOG- performans statusa bolesnika u našem istraživanju nije imala uticaja na njihovo prosečno preživljavanje. Nema ni korelacije između ECOG i preživljavanja obolelih od DLBCL ukoliko se upoređuju kategorije ECOG od 0-4. Prekategorisanjem ECOG 0-4 u ECOG I (0-2) i ECOG II (3-4), postoji statistički značajna razlika u preživljavanju u korist bolesnika sa ECOG  $\leq 2$ . Kriterijumi performans statusa, takođe poseduju u opisu svojih kategorija subjektivnost, koju je nemoguće izbeći, jer se radi zapravo o opisu sposobnosti bolesnika da funkcioniše samostalno, da obavlja svakodnevne aktivnosti, (koliko može da hoda, da radi, da sedi). Te aktivnosti, svakako, pacijenti mogu da opisuju vrlo lično, sve u zavisnosti od načina na koji doživljavaju sebe u bolesti u kojoj se nalaze.<sup>151</sup> Njegova izražena subjektivnost leži u visokoj korelaciji sa godinama starosti, pridruženim bolestima i psihičkim statusom koji se tiče kvaliteta života i motivacije malignog bolesnika.<sup>198,136</sup> Ipak u našem istraživanju, godine starosti ne koreliraju sa performans statusom. Ali, obzirom da je ECOG deo prognostičkih scoring indeksa, bez obzira na subjektivnost, i dalje ima važan prediktivni značaj kod obolelih od



DLBCL<sup>236</sup>, naročito ECOG  $\geq 2$ <sup>151</sup>, pa je u našem istraživanju, loš performans status korelirao sa slabijim ukupnim preživljavanjem u kategoriji ECOG 3-4.

### ***Prediktorni značaj postojanja ektranodalnih manifestacija u DLBCL***

Prema postojanju ektranodalnih manifestacija, u našem istraživanju, ne postoji statistički značajna razlika u dužini prosečnog i ukupnog preživljavanja, iako su prisutne kod 57,35% obolelih, značajno češće kod muškog pola, u III i IV kliničkom stadijumu bolesti, sa skorom R- IPI 2-3. U literaturi, približno jedna trećina obolelih od DLBCL prezentuje se ektranodalnom lokalizacijom bolesti. *Castillo et al.(2014)* u svojoj studiji na 25992 obolela opisuju kliničke i epidemiološke karakteristike DLBCL sa ektranodalnom lokalizacijom i upoređuju njihovu prognozu i dužinu preživljavanja u eri rituksimaba. Bolesnici sa primarnom CNS lokalizacijom DLBCL i primarnim medijastinalnim B krupnoćelijskim NHL, su bili isključeni iz studije. Rezultati su pokazali da EN lokalizacije DLBCL u plućima, jetri, pankreasu i gastrointestinalnom traktu imaju značajnije lošije preživljavanje u odnosu na DLBCL obolele sa nodalnom prezentacijom bolesti.<sup>26</sup> *Zang et al.(2005)* u svojoj studiji prisutvo EN manifestacija označavaju kao negativan prognostički faktor, i za lečenje obolelih sa EN manifestacijama bolesti predlažu kombinaciju hemo i radioterapije.<sup>236</sup> *Hui et al.(2010)* u studiji sa 513 obolela od DLBCL lečenih imunohemoterapijom, od kojih su 133 pacijenta imala EN lokalizaciju bolesti, nisu pronašli statistički značajnu razliku u dužini ukupnog preživljavanja kod obolelih sa nodalnom i EN lokalizacijom bolesti. Ali prisustvo ektranodalne manifestacije bolesti ( $\geq 1$ ) u sklopu nodalne lokalizacije bolesti utiče na značajno smanjenje dužine preživljavanja. Oni zaključuju da kod pacijenata sa DLBCL lečenih R- CHOP protokolom, sa EN prisustvom bolesti koje nije primarno, ima prognostički značaj, dok kod primarne EN lokalizacije DLBCL to nije slučaj.<sup>88</sup> *Yoo et al.(2010)* u svojoj studiji revidiraju IPI u E-IPI (Extranodal site-modified IPI) koji već postojeću kategorizaciju EN manifestacija u okviru IPI, povećavaju na  $\geq 3$ , i po novom kriterijumu, saopštavaju da je to negativan prognostički faktor i u eri rituksimaba.<sup>232</sup> Po istim autorima, prednost E- IPI je što identifikuje rizične grupe obolelih od DLBCL lečenih R-CHOP protokolom sa manje od 50% šansi za preživljavanjem.<sup>232</sup> Prisustvo EN



manifestacije u koštanoj srži i mokraćnoj bešici je negativna prognostički faktor, dok u potkožnom tkivu, tiroidei, želucu i testisima to nije slučaj.<sup>192</sup> U našem istraživanju, oboleli kod kojih je EN lokalizacija bolesti primarna (2,94% od ukupnog broja obolelih u istraživanju, sa CNS lokalizacijom), nisu analizirani kao poseban entitet odnosno morfološka varijanta DLBCL, već u sklopu ostalih ispitanika sa DLBCL. Analizirano je prisustvo ili odsustvo EN manifestacije bolesti u okviru primarne nodalne lokalizacije bolesti i uticaj na preživljavanje obolelih od DLBCL. Kako je broj DLBCL obolelih sa primarnom EN lokalizacijom bolesti nizak, to može biti jedan od razloga rezultata istraživanja, ali je svakako razlog i lečenje imunohemoterapijom, koje je značajno unapredilo preživljavanje i kod DLBCL obolelih sa EN manifestacijama.

### ***Prediktorni značaj anemijskog sindroma u DLBCL***

Iako je anemija kod malignih bolesnika faktor koji značajno utiče na performans status jer izaziva zamor, remeti kvalitet života, uzrokuje kognitivne disfunkcije itd.<sup>95</sup>, u našem istraživanju, vrednost hemoglobina sa cut off vrednošću 120 g/l nije imao prediktornu važnost i nije uticao na dužinu prosečnog i ukupnog preživljavanja kod obolelih od DLBCL. Uzrok anemije može biti infiltracija koštane srži malignim elementima, poremećaj hematopoeze usled hemioterapije i posledica inhibitornog efekta TNF-a koji se naročito u nehoćkinskim limfomima proizvodi u velikim količinama. *Hong et al. (2014)* u svom radu koji je obuhvatao 157 bolesnika lečenih R-CHOP protokolom, prikazali su da je vrednost hemoglobina manja od 100 g/l pre započetog lečenja, nezavistan prognostički faktor. Rizik od relapsa bolesti je značajno veći za pacijente koji i nakon 6 meseci od završetka lečenja imaju anemijski sindrom.<sup>83</sup> *Gallagher et al. (2010)* anemiju definišu, kao vrednost hemoglobina manja od 110 g/l. Bolesnici sa anemijskim sindromom imali su kraće prosečno preživljavanje. Eritropoetin se kod ove grupe bolesnika pokazao kao benefit, pod uslovom da su imali adekvatan terapijski odgovor.<sup>59</sup> *Adams et al. (2015)* u istraživanju na 104 bolesnika, lečenih R-CHOP protokolom, zaključuju, da anemijski sindrom prisutan pre početka lečenja i 6 meseci posle terapije, kao i povišen nivo CRP u serumu koreliraju sa lošijom prognozom bolesti, ali nemaju dodatni prognostički značaj u proceni rizika obolelih od DLBCL.<sup>3</sup> *Tropan et al. (2015)*,

navode, da je anemija, u trenutku postavljanja dijagnoze, nezavistan prediktor preživljavanja obolelih od DLBCL. Razmatranje značaja nivoa hemoglobina, u okviru već ustanovljenih prognostičkih markera, može povećati njihovu preciznost predikcije.<sup>206</sup> *Tisi et al.(2014)* istraživali su značaj vrednosti eritropoetina, hepcidina i IL 6 u plazmi obolelih od DLBCL sa anemijskim sindromom. Nivo eritropoetina u plazmi je bio snižen, nivo hepcidina povišen. Hepcidin je korelirao je sa feritinom, vrlo slabo sa koncentracijom IL 6, ali ne i sa nivoom hemoglobina. IL 6 je u obrnutom odnosu sa vrednošću hemoglobina. U zaključku ove studije je da su povišeni nivoi hepcidina i neadekvatan odgovor na eritropoetin vrlo česti kod obolelih od DLBCL, ali da povišeni nivo IL 6 ima glavnu ulogu u razvoju anemijskog sindroma.<sup>205</sup>

### ***Prediktorni značaj vrednosti sedimentacije eritrocita u DLBCL***

U našem istraživanju vrednost sedimentacije eritrocita korelira sa godinama starosti gde stariji od 60 godina značajno češće imaju veće vrednosti sedimentacije eritrocita u prvom satu. U kliničkom stadijumu III i IV statistički značajno su više vrednosti sedimentacije eritrocita. Ali sedimentacija eritrocita, nije imala uticaja na dužinu ukupnog preživljavanja, iako je vrednost u prvom satu bila preko 60 mm čak kod 78,8% pacijenata sa DLBCL, što je rezultatima potvrđeno i drugim istraživanjima kod nas i u svetu.<sup>9,136</sup> *Zang et al. (2005)* u svom istraživanju na 138 bolesnika, zaključuju, da vrednost sedimentacije eritrocita ne korelira sa dužinom ukupnog preživljavanja.<sup>236</sup>

### ***Prediktorni značaj Beta 2 mikroglobulina u serumu u DLBCL***

U ovom istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u dužini ukupnog preživljavanja u odnosu na vrednost beta 2 mikroglobulina (B2MG) u serumu, za šta objašnjenje delom može biti i u tome što su rezultati ove varijable bili dostupni kod 40/68 DLBCL bolesnika. *Seo et al.(2014)* u svom radu ističu da su vrednosti serumskog B2MG potencijalni prognostički faktori kod obolelih od DLBCL. Međutim u eri rituksimaba, taj

prognostički značaj nije tako pouzdan i još uvek dovoljno proučen. Rezultati njihove studije pokazuju da povišeni nivo B2MG značajno korelira sa ukupnim preživljavanjem u svim IPI grupama, da je nezavisni prognostički faktor kod obolelih od DLBCL koji su lečeni imunohemoterapijom.<sup>182</sup> *Conconi et al. (2010)*, razmatraju mogućnost unapređenja IPI prognostičkog indeksa uključujući u analizu i B2MG. Rezultati dobijeni istraživanjem na 111 DLBCL obolelih, lečenih CHOP protokolom, pokazali su da dodatak B2MG prognostičkom indeksu IPI, značajno doprinosi selekciji pacijenata sa visokim rizikom i lošom prognozom, kao i u predikciji pacijenata sa većim rizikom za neuspeh u lečenju.<sup>37</sup> *Miyashita et al. (2015)* zaključuju da su kod bolesnika sa DLBCL, lečenih R-CHOP protokolom, B2MG koristan prognostički faktor.<sup>141</sup> *Avilés et al. (1993)* ističu da povišena vrednost serumskog B2MG i LDH u budućim istraživanjima mogu biti razmatrani kao mogući prediktori ranog relapsa bolesti.<sup>12</sup> *Yoo et al. (2014)* upoređujući rezultet mnogih studija, zaključuju da je nivo B2MG prognostički važan, i da zaslužuje dalje istraživanje.<sup>233</sup> *Alici et al. (2003)* u svom istraživanju, nisu pronašli razliku u dužini ukupnog preživljavanja u odnosu na vrednost B2MG u serumu kod obolelih od DLBCL.

### ***Prediktorni značaj broja trombocita u DLBCL***

Broj trombocita ispod  $100 \times 10^9/l$  u ovom istraživanju, nije statistički značajno uticao na dužinu ukupnog preživljavanja kod obolelih od DLBCL, kao ni na dužinu prosečnog preživljavanja. U svom radu, *Chen et al. (2012)*, istraživali su značaj broja trombocita u predikciji rizika obolelih od DLBCL i lečenih R-CEOP protokolom. Pokazalo se, da je trombocitopenija, nezavistan faktor loše prognoze.<sup>30</sup> *Yamauchi et al. (2015)* u svom radu zaključuju, da kod obolelih od DLBCL, lečenih R-CHOP protokolom, broj trombocita ne korelira sa prognozom bolesti, kao ni sa incidencom ranog relapsa bolesti.<sup>226</sup>

---

***Prediktorni značaj vrednosti CRP u serumu u DLBCL***

Vrednost C-reaktivnog proteina u serumu kod obolelih od DLBCL, u našem istraživanju, nije imala značaja u odnosu na ukupno preživljavanje, za šta objašnjenje delom može biti i u tome što su rezultati ove varijable bili dostupni kod 63/68 DLBCL obolelih. U svom istraživanju na 94 obolela od DLBCL, *Cao et al.(2012)* zaključuju, da je CRP kao reaktant akutne faze, koristan biomarker u predikciji kod obolelih od DLBCL.<sup>21</sup> *Adams et al.(2015)* objavljuju, da povišene vrednosti CRP kod obolelih od DLBCL u serumu koreliraju sa lošijom prognozom bolesti, ali da nemaju dodatnu prognostički značaj u proceni rizika. *Suzuki et al.(2013)*, takođe ističu da su povišene vrednosti CRP, LDH i prisustvo anemijskog sindroma udruženi sa lošijom prognozom bolesti.<sup>189</sup> *Yoh et al (2013)* ističu značaj sistemskih inflamatornih faktora (CRP, Beta 2 mikroglobulina i feritina) i njihovu udruženost, odnosno uticaj na ukupno preživljavanje obolelih od DLBCL lečenih R-CHOP protokolom.<sup>231</sup>

***Prediktorni značaj u odnosu na GCB i ne GCB DLBCL***

U odnosu na subtipove DLBCL po Hansu, rezultati našeg istraživanja pokazuju da nema statistički značajne razlike u dužini ukupnog preživljavanja obolelih, u odnosu na subtip DLBCL. U literaturi se subtip DLBCL neGCB opisuje kao lošiji prognostički.<sup>10,73,82,121</sup> *Fu et al. (2008)*, na osnovu rezultata svoje studije objavili su da rituksimab značajno unapređuje preživljavanje kod obolelih od DLBCL, ali da subtip GCB DLBCL i dalje ima bolju prognozu u odnosu na neGCB DLBCL, i u rituksimab eri.<sup>57</sup> Međutim, primena rituksimaba, menja postojeća saznanja, kao i prognozu obolelih.<sup>45,54,89</sup> *Jablonska et al. (2008)*, u svom radu sugerišu da je primena rituksimaba izmenila terapijski odgovor i uticala na poboljšanje preživljavanja kod obolelih sa ne GCB DLBCL, i da je bolja prognoza za GCB DLBCL uglavnom u prerituksimab eri. *Salles et al.(2011)* koristeći algoritam zasnovan na ekspresiji CD10, MUM1 i Bcl-6 pri klasifikaciji DLBCL na podtipove GCB i neGCB, zaključuju da to više ne daje dovoljno prognostičkih informacija u rituksimab eri.<sup>177</sup>

### ***Prediktorni značaj imunohistohemijskih markera u DLBCL***

U odnosu na ekspresiju imunohistohemijskih markera nije bilo značajne statističke razlike u preživljavanju. U ovom istraživanju, ekspresija Ki-67, CD5, CD10, Bcl-2, Bcl-6 i MUM1 nije imala uticaja na dužinu preživljavanja obolelih od DLBCL. Nijedan od ispitivanih biomarkera samostalno nije se izdvojio kao nezavisni prognostički faktor. Pozitivna ili negativna ekspresija markera: Bcl-2, Bcl-6, CD10 i Ki-67 i eventualni uticaj njihovog sinergizma na dužinu preživljavanja, nije pokazao značajnu statističku razliku u prosečnom preživljavanju obolelih od DLBCL. Cox regresionom analizom ispitivan je prediktorni uticaj imunohistohemijskih marker varijabli (Ki-67, CD5, CD10, Bcl-2, Bcl-6, MUM1) i ustanovljeno da nijedana od varijabli nije značajan prediktor preživljavanja u našem istraživanju. Ovakav nalaz samo donekle može se tumačiti činjenicom da se bodovanje ekspresije biomarkera vrši semikvantitativnom imunohistohemijskom metodologijom, koja je bar jednim delom zavisna od subjektivne procene patologa. Drugo viđenje problema je što su brojne publikovane studije, koje su ukazivale na činjenicu da imunohistohemijski biomarkeri mogu imati uticaja na ishod lečenja, koristile različite „cut off” vrednosti za tumačenje ekspresije imunohistohemijskih biomarkera. Iz tih razloga, u literaturi postoje vrlo različiti i često kontradiktorni rezultati, o prognostičkom značaju ekspresije biomarkera.

Imunohistohemijski biomarkeri i iz njih izvedeni algoritmi predstavljaju, ipak samo, surogat markere. *Gutieres-Garcia et al.(2011)* u svom radu saopštavaju, da se imunohistohemijski algoritmi koriste sa velikom oprežnošću, jer često ne odražavaju pravo stanje genskog ekspresionog profila. U eri rituksimaba (R-CHOP terapije), imunohistohemijski algoritmi, mogu da izdvoje one bolesnike sa evidentno lošim prognostičkim profilom, ali ne mogu predvideti biološko ponašanje i ishod lečenja obolelih od DLBCL.<sup>129</sup>

### ***Prediktorni značaj Bcl-2 u DLBCL***

Bcl-2 protein, kao antiapoptotski protein je u mnogim istraživanjima i radovima identifikovan kao negativan prognostički faktor kod obolelih od DLBCL.<sup>79,210</sup> U studiji *Gascoyne et al.(1997)* na 136 de novo DLBCL bolesnika upotreba tissue microarray-a kod 99 slučajeva je pronašla >20% Bcl-2<sup>+</sup> ćelija. Hiperekspresija Bcl-2 je bila asocirana sa slabijom prognozom.<sup>62</sup> *Iqbal et al. (2004)*, ulogu Bcl-2 kao prognostičkog faktora smatraju kontroverznom. U našem istraživanju, kod obolelih od DLBCL, nije bilo statistički značajne razlike u preživljavanju u odnosu na Bcl-2 +/- ekspresiju. Odsustvo Bcl-2 ekspresije je češće kod mlađih od 60 godina, a Bcl-2<sup>+</sup> ekspresija je značajnije češća u IV kliničkom stadijumu bolesti. To je u skladu sa rezultatima studije *Sehn et al.(2007)*, koja je rađena na velikom broju pacijenata, gde ekspresija Bcl-2 proteina kod lečenih R-CHOP protokolom, nije imala prognostički značaj u smislu kraćeg preživljavanja, čime se ekspresija Bcl-2 proteina zapravo dovodi u pitanje, kao prognostički značajna kod obolelih od DLBCL lečenih imunohemoterapijom.<sup>180</sup> Isti rezultati zabeleženi su i u studiji *Fu et al.(2008)* i *Wilson et al.(2007)* koji zaključuju da dodatak rituksimaba terapijskom protokolu CHOP poništava negativni prognostički uticaj pozitivne ekspresije Bcl-2 proteina na preživljavanje obolelih od DLBCL.<sup>57,220</sup>

### ***Prediktorni značaj Bcl-6 u DLBCL***

U našem istraživanju, nije bilo značajne razlike u dužini ukupnog preživljavanja u odnosu na ekspresiju Bcl-6 proteina. Bcl-6 protein je obeležen kao pozitivan prognostički faktor kod obolelih od DLBCL.<sup>16,127,180,241</sup> Druge studije ne nalaze razliku u preživljavanju između Bcl-6 +/- DLBCL.<sup>36,46,154,180</sup>. Studija *Winter et al. (2006)* objavljuje značajno povećanje ukupnog preživljavanja kod Bcl-6 + DLBCL, ali samo onih koji su lečeni CHOP protokolom, dok kod lečenih R-CHOP protokolom, to nije imalo značaja.<sup>221</sup>

*Seki et al.(2009)* Bcl-6 razmatraju u novom svetlu nezavisnog prediktornog faktora kod obolelih od DLBCL, iako je u njihovim rezultatima pokazana korelacija Bcl-6 pozitivne

ekspresije i dužeg preživljavanja kod obolelih od DLBCL koji su lečeni R- CHOP protokolom.<sup>180</sup>

### ***Prediktorni značaj MUM1 u DLBCL***

Rezultati dobijeni u našem istraživanju, pokazali su da u analizi ekspresije biomarkera MUM1 (MUM1+ vs MUM1-), kao samostalne varijable, nema statistički značajne razlike u u dužini ukupnog preživljavanja kod obolelih od DLBCL. Odsustvo ekspresije MUM1 je značajnije češće kod muškaraca. MUM1 je tradicionalno obeležen kao marker negativne prognoze kod obolelih od DLBCL<sup>82,126,127,147</sup> Da nema značajne korelacije između pozitivne ekspresije MUM1 i preživljavanja, potvrđuju rezultati u studijama *Seki et al.(2009)*,<sup>181</sup> *He et al.(2014)*,<sup>76</sup> *Salles et al. (2011)*.<sup>177</sup>

### ***Prediktorni značaj Ki- 67 u DLBCL***

Ki-67 kao nuklearni protein, uključen u regulaciju ćelijske proliferacije, uglavnom se koristi kao marker za procenu proliferativne aktivnosti limfoma i obeležen je kao negativan prognostički faktor kod obolelih od DLBCL U našem istraživanju, nije bilo statistički značajne razlike u dužini ukupnog preživljavanja u odnosu na ekspresiju Ki- 67 (cut off 50%). U meta-analizi *He et al.(2014)* koja analizira 27 studija na 3902 bolesnika, potvrđuje se da je Ki- 67 snažan prediktor rizika kod obolelih od DLBCL, ali da je njegov značaj zavistan od tipa DLBCL i da ne koreliše sa ostalim kliničko- patološkim faktorima prognoze, kao ni sa IPI skorom.<sup>76</sup> U radovima *Koh et al.(2015)* i *Yoon et al.(2010)* objavljuju da je preživljavanje kod bolesnika sa visokom ekspresijom Ki- 67 (> 85%) lečenih R- CHOP protokolom, bilo statistički značajno kraće u odnosu na bolesnike sa niskom ekspresijom Ki- 67. Ovakav rezultat se može objasniti cut off vrednošću Ki - 67 od 85%, koja se značajno razlikuje od cut off vrednosti Ki- 67 u našem istraživanju. *Li et al. (2012)* istražuju uticaj ekspresije Ki-67 na preživljavanje DLBCL obolelih tipa neGCB koji su lečeni R-CHOP protokolom i zaključuju da je benefit imunohemoterapije na preživljavanje u ovom slučaju limitiran.<sup>110,234</sup> *Li et al.(2012)* svojim rezultatima



saopštavaju da je kod DLBCL obolelih tipa neGCB sa visokom ekspresijom Ki-67, benefit R- CHOP terapije ograničen.<sup>124</sup>

### ***Prediktorni značaj CD5 u DLBCL***

Prisustvo CD5 antigena definiše subpopulaciju prekursornih germinativno-centarskih B limfocita koji čine prosečno 15% svih B limfocita periferne krvi. U izvesnim podvarijantama DLBCL, CD5<sup>+</sup> definiše podtipove čija je prognoza nepovoljnija.<sup>235</sup> Naši rezultati su pokazali da ekspresija odnosno prisustvo CD5 antigena nije uticalo na ukupno preživljavanje obolelih od DLBCL, kao ni na vreme prosečnog preživljavanja. *Ennishi et al.(2008)* u svom istraživanju na 121 obolelom od DLBCL, koji su lečeni R- CHOP protokolom, zaključuju da pozitivna ekspresija CD5 utiče na lošiju prognozu bolesti i ima negativni prediktivni značaj. Zaključak je donesen na bazi pozitivnosti CD5 kod 11 bolesnika (tehnikom flow citometrije), od koji je samo 7 bilo pozitivno imunohistohemijski.<sup>51</sup> Zbog niske CD5 IHH senzitivnosti u DLBCL, de *Jong et al.(2007)* razmatraju mogućnost unapređenja imunohistohemijskih tehnika u smislu veće senzitivnosti za CD5 antigen.<sup>42</sup>

*Gascoyne et al. (2003)*, u svom radu saopštavaju da ekspresija CD5 antigena ne utiče na značajnu razliku u preživljavanju.<sup>61</sup> *Yamaguchi et al. (2002)* u studiji na 109 DLBCL bolesnika, zaključuju da pozitivna CD5 ekspresija utiče na lošiju prognozu bolesti i predlažu da CD5+ DLBCL budu posebna podgrupa u okviru DLBCL. CD5<sup>+</sup> ekspresiju povezuju sa IPI, jer je 36% obolelih od DLBCL koji su bili CD5<sup>+</sup> imalo IPI u visoko rizičnoj grupi.<sup>225</sup> *Niitsu et al. (2010)* u svom radu zaključuju da dodatak rituksimaba obolelima od DLBCL koji su CD5<sup>+</sup> DLBCL značajno poboljšava vreme do progresije bolesti (PFS), ali ne utiče na ukupno preživljavanje.<sup>153</sup> *Hyo et al. (2009)* u svojoj studiji takođe prate uticaj CD5<sup>+</sup> ekspresije na preživljavanje obolelih od DLBCL, koji su lečeni R- CHOP protokolom, upoređujući sa rezultatima obolelih koji su lečeni CHOP protokolom. Najpre zaključuju, da dodatak rituksimaba poboljšava ukupno preživljavanje obolelih od DLBCL. Zatim, značajno se poboljšava preživljavanje kod CD5 negativnih DLBCL pacijenata, koji su lečeni dodatkom rituksimaba u odnosu na one koji su lečeni bez rituksimaba. Za CD5<sup>+</sup> DLBCL, prognoza bolesti se ne razlikuje u odnosu na to da li



su tretirani rituksimabom.<sup>90</sup> *Salles et al.(2011)* u svom istraživanju na 347 DLBCL obolela, lečenih R-CHOP protokolom, zaključuju da je ekspresija CD5 zadržala svoj prediktivni značaj.<sup>177</sup> *Enishi et al. (2008)* objavljuju, da ukoliko su parametri koji određuju IPI skor slični između bolesnika sa CD5<sup>+</sup> i CD5<sup>-</sup> ekspresijom na imunohemoterapijskom protokolu, onda je CD5<sup>+</sup> ekspresija marker negativne prognoze.<sup>51</sup> *Tzankov et al. (2003)* saopštavaju da ekspresija CD5 može imati prognostički značaj, nezavisno od kliničkog stadijuma bolesti, IPI i početnog terapijskog odgovora.<sup>208</sup> *Zheng et al.(2012)* su objavili da je ukupno preživljavanje kod obolelih od DLBCL starijih od 60 godina, u niskorizičnim grupama sa CD5<sup>+</sup> ekspresijom, je značajno kraće, dok u visokorizičnim IPI grupama to nema značaja.<sup>238</sup>

### ***Prediktorni značaj CD10 u DLBCL***

U našem istraživanju nije bilo značajne razlike u ukupnom preživljavanju između obolelih od DLBCL sa CD10+/- ekspresijom, kao ni u prosečnom preživljavanju.

Više studija je objavilo da ekspresija CD10 antigena nema prognostički značaj kod obolelih od DLBCL:

- *Colomo et al. (2003)*, CD10 negativna ekspresija je značajno češća kod uznapredovalih kliničkih stadijuma bolesti, i postavlja se pitanje da li u takvim slučajevima ekspresija CD10 ima uopšte bilo kakav prediktivni značaj.<sup>36</sup>
- *Fabiani et al.(2004)*: ekspresija CD10 nema uticaja na preživljavanje kod obolelih od DLBCL koji su lečeni po CHOP protokolu.<sup>53</sup>
- *Oh and Park (2006)*: pozitivna ekspresija CD10 udružena je sa granično značajno boljim preživljavanjem kod obolelih od DLBCL.<sup>157</sup>
- *Liu et al.(2008)*: CD10 pozitivna ekspresija češća je kod GCB subtipa DLBCL, nižeg kliničkog stadijuma i nižeg IPI skora, ali nema uticaja na prognozu bolesti.<sup>125</sup>

U drugim studijama, dobijeni rezultati ekspresiju CD10<sup>+</sup> kod obolelih od DLBCL povezuju sa boljom prognozom bolesti:

- *Oshima et al. (2001)*: CD10<sup>+</sup> ekspresija korelira sa poboljšanjem ukupnog preživljavanja. U nisko rizičnim grupama sa IPI 1-2, CD10<sup>+</sup> ekspresija korelira sa boljim ukupnim preživljavanjem, dok u visokorizičnim grupama to nije imalo značaja.<sup>159</sup>
- *Chang et al. (2002)*: nizak IPI skor i CD10<sup>+</sup> ekspresija su povezani sa boljim ukupnim preživljavanjem.<sup>28</sup>
- *Chang et al. (2004)*: CD10<sup>+</sup> ekspresija u okviru subtipa DLBCL- GCB korelira sa boljim ukupnim preživljavanjem.<sup>27</sup>
- *Hans et al. (2004)*: CD10<sup>+</sup> ekspresija je prediktor boljeg ukupnog preživljavanja kod obolelih od DLBCL.<sup>73</sup>

*Uherova et al. (2001)* pozitivnu ekspresiju CD10 dovode u vezu sa lošijom prognozom bolesti<sup>209</sup>, a po drugima je pozitivna ekspresija CD10 negativan prognostički faktor ako je u sadejstvu sa Bcl-2<sup>+</sup> ekspresijom.<sup>223</sup> U našem istraživanju povezanost CD10<sup>+</sup> ekspresije i Bcl-2<sup>+</sup> ekspresije nije rezultovala značajnom razlikom u preživljavanju kod obolelih od DLBCL (p=0,357).

### ***Značaj terapijskog modaliteta u lečenju DLBCL***

U odnosu na primenjeni terapijski protokol, u našem istraživanju postoji statistički značajna razlika u preživljavanju, u smislu dužeg preživljavanja, kod bolesnika lečenih R-CHOP protokolom. U internacionalnoj studiji The MabThera International Trial (MInT) Group, evaluiran je uticaj terapije na preživljavanje kod obolelih od DLBCL mlađih od 61 godine, sa IPI skorom 0-1, koji su bili na CHOP protokolu i R-CHOP protokolu. Značajno bolje preživljavanje je bilo u grupi na R-CHOP protokolu. Studija US intergrupe je takođe upoređivala uticaj terapijskog protokola na preživljavanje obolelih od DLBCA, ali starijih od 60 godina i rezultati koje su dobili takođe ukazuju na benefit R-CHOP terapijskog protokola.<sup>164,217</sup>

Habermann *et al.*(2006) u svom radu ističu benefit rituksimaba u terapiji, naročito kod bolesnika životne dobi preko 60 godina.<sup>68</sup> Seki *et al.*(2009), takođe ističu benefit od terapije rituksimabom uz zaključak da je neophodno preispitati relevantnost ranije označenih prognostičkih faktora u eri rituksimaba.

Ekspresija CD10, Bcl-6, MUM1 i Bcl-2 proteina je značajna u predikciji obolelih od DLBCL koji su lečeni CHOP protokolom. Naprotiv, u grupi obolelih koji su lečeni R-CHOP protokolom, nema značajne korelacije između ekspresije CD10, Bcl-2 i MUM1 i dužine ukupnog preživljavanja. Ali ekspresija Bcl-6 je udružena sa povoljnom prognozom kod obolelih od DLBCL i predstavlja pozitivan prognostički faktor.<sup>181</sup> Feugier *et al.*(2005) u svom istraživanju na 399 DLBCL bolesnika, u svom zaključku ističu benefit u smislu dužeg preživljavanja kod obolelih koji su lečeni R-CHOP protokolom, naročito u životnom dobu od 60-80 godina.<sup>55</sup> Rodenburg *et al.*(2009) zaključuju takođe da dodatak rituksimaba u standardni CHOP protokol rezultuje značajnije boljom prognozom kod obolelih od DLBCL.<sup>173</sup> Lenz *et al.* (2015) zaključuju da preživljavanje kod obolelih od DLBCL, posle primene terapijskih protokola zavisi od ćelijske diferencijacije, fibroze i angiogeneze unutar tumorske mikrosredine.<sup>121</sup> Jazirehi *et al.*(2005) zaključuju da rituksimab inhibira NF-κB signalni put, i povećava senzitivnost na terapiju kod obolelih i na taj način utiče na poboljšanje preživljavanja.<sup>99</sup> Liu *et al.*(2008) takođe objavljuju da rituksimab inhibira NF-κB signalni put i na taj način utiče povoljno na prognozu obolelih od DLBCL.<sup>125</sup> Saito *et al.*(2007) smatraju i svojim rezultatima podržavaju ideju da su apoptoza i inhibicija ćelijske proliferacije, uključujući i NF-κB put, važne uloge terapeutskog dejstva rituksimaba.<sup>176</sup>

### ***Prediktorni značaj mutacije Myd88 L265P u DLBCL***

U našem istraživanju analizirano je 68 izolovanih genomskih DNK, i genski polimorfizam Myd 88 L 265P nije detektovan. U eksperimentalnom radu na genomskoj DNK izolovanoj iz tkiva fiksiranog u parafinu pacijenata obolelih od DLBC, analizom dužine restrikcionih fragmenata utvrđen je homozigotni, normalni (divlji, engl. *wild type*) genotip TT predstavljen prisustvom jednog fragmenta veličine 726bp za ispitivani

polimorfizam. Analizirajući iskustva i rezultate drugih autora, nailazi se na podatke sa kojima se naši rezultati podudaraju, ali i razlikuju.

U radu *Kraan et al.(2013)* koji analizira 177 bolesnika sa DLBCL, mutacija Myd 88 L 265P detektovana je kod 24,3% bolesnika, u najvećem procentu kod neGCB subtipa DLBCL. Najveća zastupljenost ove mutacije detektovana je u materijalu porekla CNS (75%) i testisa (71%), a najmanja u limfnim nodusima (17%). Analizirana je mutacija Myd 88 L 265P, bez analize ekspresije Myd 88.<sup>114</sup>

U radu *Ngo et al.(2011)* rađenom na uzorku od 328 bioptata, de novo DLBCL obolelih, mutacija Myd 88 L 265P detektovana je kod 29% bolesnika.<sup>148</sup> Kako je ova studija rađena na većem broju bolesnika u odnosu na našu, deo objašnjenja za naš dobijeni rezultat može se tumačiti i time. Ngo i saradnici zaključuju da je sa terapijskog stanovišta, signalni kompleks koordiniran sa Myd88 L265P primamljiv cilj. To može biti korisno, u identifikaciji bolesnika sa procesima zavisnim od Myd88 signalnog puta u njihovom daljem lečenju, terapijom čiji je cilj samo IRAK 4 ili u kombinaciji sa agensima čiji su ciljevi B ćelijski receptori, NFκB ili JAK-STAT3 put.

U studiji *Choi et al.(2013)* rađenoj na 124 de novo DLBCLbolesnika, visoka ekspresija Myd 88 zabeležena je kod 38,7% bolesnika, najviše neGCB subtipu DLBCL, kod bolesnika starije životne dobi ( $p=0,016$ ) i kod relapsa bolesti ( $p=0,007$ ), što je za ishod imalo smanjenje DFS (disease-free survival). Ali mutacija Myd 88 L 265P detektovana je kod samo 6,5% bolesnika odnosno kod 8 bolesnika od ukupno 124 analiziranih, prosečne starosti 64 godina i to 7 bolesnika sa neGCB subtipom DLBCL i 1 bolesnika sa GCB subtipom DLBCL. Prisustvo ove mutacije nije koreliralo sa kliničko- patološkim parametrima DLBCL. Nije bilo statistički značajne razlike u DFS kod bolesnika sa prisustvom mutacije Myd 88 L 265P, u odnosu na one bolesnike koji tu mutaciju nisu imali. Kod dva bolesnika sa prisustvom Myd88 L265P mutacije, registrovana je i visoka ekspresija Myd88, ali značajne korelacije između ekspresije Myd88 i mutacije L265P nije bilo ( $p= 0,415$ ). Ovi rezultati ukazuju da ekspresija Myd 88 jeste negativni prediktorni faktor kod obolelih od DLBCL, ali da ne korelira sa mutacijom Myd 88 L265P, i da ekspresija Myd 88 može imati veliki značaj u predikciji progresije DLBCL, nezavisno od Myd 88 L265P mutacije. Kako nije bilo korelacije između ekspresije

Myd88 i prisustva mutacije Myd88 L265P, zaključak autora je bio da prisustvo mutacije nije uzrok visoke ekspresije Myd88 u DLBCL. Nedostatak ove studije je što su analizom obuhvaćeni oboleli od DLBCL lečeni i R-CHOP i CHOP protokolom i što je period praćenja bio kratak za analizu preživljavanja (17 meseci).<sup>32</sup>

*Caner et al (2015)* u svojoj studiji kojom su analizirali 68 bolesnika sa DLBCL, Myd88 L265P mutaciju pronalaze kod 18,6% DLBCL bolesnika, i zaključuju da prisustvo ove mutacije može biti od pomoći u razumevanju patogeneze DLBCL, ali i da prekomerna ekspresija Myd88, može biti koristan prognostički marker u odmaklim stadijumima DLBCL.<sup>23</sup>

Blokiranje patološke signalizacije Myd88 i mutacije Myd88 L265P, kao i aberantne NFκB aktivnosti je cilj novih modaliteta u lečenju DLBCL obolelih.<sup>7,105,193</sup>

## ZAKLJUČCI

- Godine života i dalje imaju prediktorni značaj kod obolelih od DLBCL. Životna dob < 60 godina, je pozitivan prognostički faktor kod obolelih od DLBCL.
- Oboleli od DLBCL muškog pola, lečeni imunohemoterapijom, imaju lošiju prognozu bolesti u odnosu na ženski pol.
- Relapsi DLBCL češći su kod obolelih ženskog pola.
- IPI prognostički skor u eri imunohemoterapije, nema sposobnost precizne identifikacije visoko rizičnih bolesnika
- R- IPI se pokazao kao vrlo značajan u predikciji rizika u eri imunohemoterapije
- Dodatak rituksimaba standardnom CHOP protokolu, rezultuje poboljšanjem dužine preživljavanja kod obolelih od DLBCL i menja značaj ranije priznatih kliničkih, bioloških i imunohistohemijskih prognostičkih faktora.
- Vrednost albumina u serumu kod obolelih od DLBCL je vrlo značajan prediktivni faktor. Formiranje prognostičkog indeksa koji bi sadržao, kao jedan od parametara i vrednost albumina u serumu, bio bi vrlo koristan u predikciji obolelih od DLBCL u eri imunohemoterapije.
- Postojanje ektranodalnih manifestacija bolesti, B simptomatologije, anemijskog sindroma, visokih vrednosti sedimentacije eritrocita, CRP, LDH, beta 2 mikroglobulini u serumu, visokog procenta pozitivne ekspresije Bcl-2 proteina, CD5, MUM1, nije imalo prediktorni značaj kod obolelih od DLBCL u ovom istraživanju.
- Prekategorisanje kliničkog stadijuma bolesti DLBCL u kategorije: „limitiran“ (I i II klinički stadijum) i „uznapredovali“ (III i IV klinički stadijum), je prediktorno značajnije u odnosu na kategorije kliničkog stadijuma I-IV.
- Prekategorisanje ECOG- performans statusa u dve grupe (0-2 i 3-4), je prediktorno značajnije u odnosu na kategorije 0-4.
- U ispitivanoj populaciji pacijenata sa područja jugoistočne Srbije patološki signalni put koga ostvaruje mutacija Myd 88 L265P, nije odgovoran za razvoj

DLBCL. Bolje poznavanje značaja ekspresije Myd88 i drugih proteina uključenih u Myd 88 signalni put, u studijama sa većim brojem bolesnika, doprinelo bi boljem sagledavanju patogeneze DLBCL i razvoju novih prognostičkih indeksa, kao i ciljanijem i efektivnijem terapijskom pristupu.

- Standardizovana je PCR- RFLP metoda za Myd 88 L265P za DNK uzorke izolovane iz parafinskih kalupova. Po našim saznanjima ne postoje dostupni podaci o istraživanju Myd 88 L265P polimorfizma za populaciju obolelih od DLBCL u Srbiji.
- Dalja istraživanja na većem broju bolesnika će pomoći u preciznijem definisanju bioloških i kliničkih faktora prognoze i stvaranju scoring sistema koji moraju biti prilagođeni svakom entitetu nehoćinskog limfoma u skladu sa njegovim specifičnostima, kao i novim terapijskim protokolima.
- Postavljena radna hipoteza nije potvrđena u svim delovima, što ovom istraživanju daje potpuno realan okvir, shodno specifičnostima u kojima je rađeno, a koje se prvenstveno odnose na geografsko područje sa koga potiču oboleli, koje je u nizu prethodnih godina bilo izloženo turbulencijama, koje su kulminirale 1999. godine agresijom uz bombardovanje osiromašenim uranijumom.
- Formiranje korektivnih faktora postojećih prognostičkih indeksa prema specifičnostima populacije i geografskom području, poboljšalo bi njihovu prediktornu vrednost.

## ***LITERATURA***

1. Abbas AK, Lichtman AH. Osnovna imunologija, funkcije i poremećaji imunskog sistema. 3.izdanje. Beograd: Data status: 2008.
2. Abdelhamid T, Samra M, Ramadan H et al. Clinical prognostic factors of diffuse large B cell non-Hodgkin lymphoma: A retrospective study. Journal of the Egyptian National Cancer Institute 2011; 23: 17–24.
3. Adams HJ, de Klerk JM, Fijnheer R et al. Prognostic Value of Anemia and C-Reactive Protein Levels in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2015 ; 15(11): 671-9.
4. Advani RH, Chen H, Habermann TM et al. Comparison of conventional prognostic indices in patients older than 60 years with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP in the US Intergroup Study (ECOG 4494, CALGB 9793): consideration of age greater than 70 years in an elderly prognostic index (E-IPI). Br J Haematol 2010; 151(2): 143-51.
5. Advani R, Hong F, Habermann TM et al. Improved risk stratification with addition of male sex to the elderly international prognostic index for DLBCL patients > 60 years treated with R-CHOP: an international collaboration of the US Intergroup, German High-grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group and Groupe d'Etude De Lymphome d'Adultes [abstract]. Blood 2013; 122 (21): 3045a.
6. Akamatsu Y, Oettinger M. Distinct Roles of RAG1 and RAG2 in Binding the V(D)J Recombination Signal Sequences. Molecular and Cellular Biology 1998; 18(8): 4670–4678.
7. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. Nature Reviews Immunology 2004; 4: 499-511.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. Molecular Biology of the Cell. 4th Ed. Garland Pub: 2002.



9. Alici S, Bavbek SE, Kaytan et al. . Prognostic factors in localized aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Oncol* 2003; 26(1): 1-5.
10. Alizadeh A, Eisen B, Davis E et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 ; 403(6769): 503–511.
11. Anderson JJ, Fordham S, Overman L et al. Immunophenotyping of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) defines multiple sub-groups of germinal centre-like tumours displaying different survival characteristics. *Int J Oncol* 2009; 35 (5): 961-71.
12. Avilés A, Narváez BR, Díaz-Maqueo JC et al. Value of serum beta 2 microglobulin as an indicator of early relapse in diffuse large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1993; 9(4-5): 377-80.
13. Bai M, Skyrilas A, Agnantis NJ et al. B-cell Differentiation, Apoptosis and Proliferation in Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Anticancer research* 2005; 25: 347-362.
14. Bari A, Marcheselli L, Sacchi S et al. Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a never-ending story. *Annals of Oncology* 2010; 21: 1486–1491.
15. Baumann Kreuziger L, Morrison V. Late Relapses in Diffuse Large B-Cell Lymphoma (Review). *Clinical Advances in Hematology & Oncology* 2011; 9 (9): 709-710.
16. Berglund M, Thunberg U, Amini R et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Modern Pathology* 2005; 18(8): 1113–20.
17. Biasoli I, Morais C, 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.
18. Beinke S, Ley S. Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. *Biochem J* 2004; 382: 393–409

19. Bumbaširević V, Lačković V, Milićević N et al. Histologija, Libri Medicorum, Medicinski fakultet, Beograd, 2005.
20. Bumbaširević V. Ćelijski ciklus. Beograd: Institut za Histologiju i embriologiju; 2004 Available from: <http://wwwold.med.bg.ac.rs/>
21. Cao Y, Shi YX, Chen JO et al. Serum C-reactive protein as an important prognostic variable in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Tumour Biol* 2012; 33(4): 1039-44.
22. Cadera E, Wan F, Amin R et al. NF-κB activity marks cells engaged in receptor editing. *J Exp Med* 2009; 206 (8): 1803-1816.
23. Caner V, Sen Turk N, Baris IC et al. MYD88 expression and L265P mutation in mature B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015 1; 19 (7): 372-8.
24. Carbone A, Gloghini A, Larocca M et al. Expression profile of MUM1/IRF4, BCL-6, and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human immunodeficiency virus-related lymphomas. *Blood* 2001; 97(3): 743-51.
25. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN et al. Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly: What We Know So Far. *The Oncologist* 2011; 16: 87-96.
26. Castillo JJ, Winer ES, Olszewski AJ. Sites of extranodal involvement are prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Am J Hematol* 2014 ; 89 (3): 310-4.
27. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 464-70.
28. Chang CC, Cleveland RP, Perkins SL. CD10 expression and survival [letter]. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 660-661.
29. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
30. Chen LP, Lin SJ, Yu MS. Prognostic value of platelet count in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2012 ; 12 (1): 32-7.

31. 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.
32. Choi JW, Kim Y, Lee JH, Kim YS. MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Human Pathology* 2013; 44: 1375–1381.
33. Chung KM, Chang ST, Huang WT et al. Bcl-6 expression and lactate dehydrogenase level predict prognosis of primary gastric diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of the Formosan Medical Association* 2013; 112 (7): 382-389.
34. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362: 849-52.
35. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 2007; 26: 3603–3613.
36. 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: 78-84.
37. Conconi A, Zucca E, Roggero E et al. Prognostic models for diffuse large b-cell lymphoma. *Hematological Oncology* 2000; 18 (2) : 61–73.
38. Cowan AR, Jones M, Harris M et al. Prognostic factors in high and intermediate grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 1989; 59 (2): 276–282.
39. Cvetkovic RS, Perry CM. Rituximab - a review of its use in Non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2006; 66: 791-820.
40. Dalia S, Chavez J, Little B et al. Serum albumin retains independent prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma in the post-rituximab era. *Ann Hematol* 2014; 93: 1305–1312.
41. Davis E, Ngo V, Lenz G et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010; 463 (7277): 88–92.
42. De Yong D, Rosenwald A, Chhanabhai M et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as prerequisite for broad clinical applications- A study from Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol* 2007; 25 (7): 805-12.

43. Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 846-852.
44. Dong H, Gorczyca W, Liu Z et al. B-cell lymphoma with coexpression of CD5 and CD10. *Am J Clin Pathol* 2013; 119: 218-230.
45. Dunleavy K, Grant C, Wilson WH. Using biologic predictive factors to direct therapy of diffuse large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol* 2013; 4(1): 43–57.
46. Dunleavy K, Davis RE, Landgren O et al. BCL-6 and rituximab in diffuse large B-cell lymphoma: where are we? *Blood* 2007; 109: 843-844.
47. Eatrdes J, Thompson Z, Lee J et al. Serum albumin as a stable predictor of prognosis during initial treatment in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol* 2014 ; 94(2): 357-8.
48. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495- 516.
49. El-Sharkawi D, Basu S, Ocampo C et al. Elevated lactate dehydrogenase levels detected during routine follow-up do not predict relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma who achieve complete remission after primary treatment with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone-like immunochemotherapy. *Leuk Lymphoma* 2012 ; 53(10): 1949-52.
50. Endl E, Gerdes J. Posttranslational modifications of the Ki-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis. *J Cell Physiol* 2000; 182: 371-80.
51. 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: 1921-1926.
52. Ehrlich E. Regulation of BAX mediated apoptosis by BCL2 family members. [homepageontheInternet].<http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/minireview/apoptosis.php>.
53. Fabiani B, Delmer A, Lepage E et al. CD10 expression in diffuse large B-cell lymphomas does not influence survival. *Virchows Arch* 2004; 445: 545–551.

54. Farinha P, Sehn L, Skinnider B et al. Addition of rituximab to CHOP improves survival in the non-GCB subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2006; 108 (11): 2406.
55. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C et al. Long-Term Results of the R-CHOP Study in the Treatment of Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4117-4126
56. Friedberg J.W. Relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011:498-505.
57. Fu K, Weisenburger D, Choi W 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.
58. Fujioka S, Niu J, Schmidt C et al. NF- $\kappa$ B and AP-1 Connection: Mechanism of NF- $\kappa$ B-Dependent Regulation of AP-1 Activity. *Mol Cell Biol* 2004; 24(17): 7806–7819.
59. Gallagher LC, Glinert DK, Kohut FI et al. Anemia in diffuse large B-cell non-Hodgkins lymphoma (DLBCL) patients. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(15): Suppl.
60. Garcia C, Swerdlow S. Best practices in Contemporary Diagnostic immunohistochemistry. Panel Approach to Hematolymphoid Proliferations. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133 (5): 756-65.
61. Gascoyne R.D, Dave S, Zettl A et al. Gene expression microarray analysis of de novo CD5+ diffuse large b-cell lymphoma (LLMPP study): a distinct Entity? *Blood* 2003; 102: 178a
62. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkins lymphoma; *Blood* 1997; 90 (1): 244-51.
63. Geredes J, Lemke H, Baish H et al. Cell Cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133(4): 1710-1715

64. Gobbi PG, Cavalli C, Federico M et al. Hodgkin's disease prognosis: a directly predictive equation. *Lancet* 1988; 331(8587): 675-9.
65. Goodnow CC. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* 2007; 130(1): 25-35.
66. Gualco G, Weiss LM, Bacchi CE. MUM1/ IRF4: A Review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18(4): 301-10.
67. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011; 117: 4836-4843.
68. Habermann MT, Weller AE, Morrison AV et al. Rituximab-CHOP Versus CHOP Alone or With Maintenance Rituximab in Older Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3121-3127.
69. Haldar S, Jena N, Croce MC. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 4507-4511.
70. Hamlin AP, Zelenetz DA, Kewalramani T et al. Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 102: 1989-1996.
71. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100 (1): 57-70.
72. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
73. Hans PC, Weisenburger DD, Greiner CT et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004 ; 103 (1): 275-282.
74. Harada H, Taniguchi T, Tanaka N. The role of interferon regulatory factors in the interferon system and cell growth control. *Biochimie* 1998; 80: 641-650.
75. Hardy R, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 595–621.

76. He X, Chen Z, Tao Fu et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphomasubtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer* 2014; 14: 153.
77. Heise N, De Silva NS, Silva K et al. Germinal center B-cell maintenance and differentiation are controlled by distinct NF-kappaB transcription factor subunits. *J Exp Med* 2014; 211: 2103-2118.
78. Hedström G. Prognostic Markers in Diffuse Large B-cell Lymphoma. How Bad can it be. (Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations) . Uppsala :Faculty of Medicine Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis; 2014.
79. Hermine O, Haioun C, Lepage E et al. Prognostic significance of bcl-2 Protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996; 87(1): 265-72.
80. Herzenberg LA. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev* 2000; 175:9-22.
81. Higgins RA, Blankenship EJ, Kinney CM. Application of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Non-Hodgkin and Hodgkin Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 441-461.
82. Höller S, Horn H, Lohr A et al. A cytomorphological and immunohistochemical profile of aggressive B-cell lymphoma: high clinical impact of a cumulative immunohistochemical outcome predictor score. *J Hematol* 2009; 2(4): 187-94.
83. Hong J, Seon Woo H, Kim H et al. Anemia as a useful biomarker in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP immunochemotherapy. *Cancer Sci* 2014; 105: 1569–1575.
84. Howlader N, Noone AM, Krapcho M et al. SEER Cancer Statistics Review 1975-2012. National Cancer Institute. Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/); 2014.
85. Hristov A. Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Leg Type Diagnostic Considerations. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 876–881.
86. Huang HH, Xiao F, Chen FY et al. Reassessment of the prognostic value of the International Prognostic Index and the revised International Prognostic Index in patients with diffuse large B-cell lymphoma: A multicentre study. *Experimental et therapeutic medicine* 2012; 4: 475-480.

87. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002; 7 (99): 2285-90.
88. Hui D, Proctor B, Donaldson J et al. Prognostic implications of extranodal involvement in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Leuk Lymphoma* 2010; 51(9): 1658-67.
89. Hunt KE, Reichard KK. Diffuse large B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132 (1): 118-124.
90. Hyo R, Tomita N, Takeuchi K et al. The therapeutic effect of rituximab on CD5-positive and CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2010; 28: 27–32.
91. Institut za javno zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanovi Batut” . Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj srbiji 2013. Izveštaj br.15. Beograd:2015.
92. Iqbal F, Sanger WG, Horsman DE et al. BCL2 Translocation Defines a Unique Tumor Subset within the Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *American Journal of Pathology* 2004; 165(1): 160-166.
93. Jabłońska J, Jesionek-Kupnicka D. Usefulness of immunohistochemistry in identification of prognostically important subgroups (GCB and ABC) in a heterogeneous group of diffuse large B-cell lymphomas--a review article. *Pol J Pathol* 2008; 59(3): 121-7.
94. Jaeger U, Trneny M, Melzer H et al. Rituximab maintenance for patients with aggressive B-cell lymphoma in first remission: results of the randomized NHL13 trial. *Haematologica* 2015; 100(7): 955–963.
95. Jacobsen PB, Garland LL, Booth-Jones M et al. Relationship of hemoglobin levels to fatigue and cognitive functioning among cancer patients receiving chemotherapy. *J Pain Symptom Manage* 2004; 28(1): 7-18.
96. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implication for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:523-31.



97. Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al: World Health Organisation Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues, in: IARC WHO Classification of Tumours. Lyon, France, IARC Press; 2001.
98. Jain S, Shah N, Gregory S. Relapsed diffuse large B-cell lymphoma–10 years later. Clin Adv Hematol Oncol 2011; 9: 704-708.
99. Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. Cancer Res 2005; 65: 264–276.
100. Jeelall YS, Horikawa K. Oncogenic MYD88 mutation drives Toll pathway to lymphoma. Immunology and Cell Biology 2011; 89: 659–660.
101. Jing H. Role of NF- $\kappa$ B signaling pathway in cellular senescence and therapy effectiveness (dissertation). Berlin: Faculty of Mathematics and Natural Sciences the Humboldt University of Berlin: 2013.
102. Joza N, Susin SA, Daugas E et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature 2001; 410: 549- 554.
103. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. Annu Rev Immunol 2000; 18: 621-63.
104. Katić V, Tasić- Dimov D, Dimitrijević J et al. Uloga infekcije Helicobacterom pylori u razvoju želučanih neoplazmi. Vojnosanit Pregl 2003; 61(4): 405-411.
105. Kawai T ,Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol 2010; 11: 373- 384 .
106. Kersten MJ, de Jong D, Raemaekers J et al. Beyond the International Prognostic Index: New prognostic factors in follicular lymphoma and diffuse large-cell lymphomaA meeting report of the Second International Lunenburg Lymphoma Workshop: Hematol J 2004; 5: 202-208
107. Kill IR. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. J Cell Sci 1996; 109: 1253-63.

108. Klapper W, Kreuz M, Kohler CW et al. Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2012; 119(8): 1882-7.
109. Klein U, Heise N. Unexpected functions of nuclear factor-kappaB during germinal center B-cell development: implications for lymphomagenesis. *Curr Opin Hematol* 2015; 22: 379-387.
110. Koh YW, Hwang HS, Park CS et al. Prognostic effect of Ki-67 expression in rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone-treated diffuse large B-cell lymphoma is limited to non-germinal center B cell-like subtype in late-elderly patients. *Leuc Lymphoma* 2015; 56(9): 2630-6.
111. Kojima Y, Tsurumi H, Goto N et al. Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome. *Eur J Haematol* 2006; 76 (6): 465-72.
112. Kojima S, Hatano M, Okada S et al. Testicular germ cell apoptosis in Bcl6-deficient mice. *Development* 2001; 128: 57-65.
113. Komarova AE, Gudkov VA. Chemoprotection from p53- dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2001;62:657-67.
114. 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 Journal* 2013; 3(9): e139-.
115. Kumagai T, Miki T, Kikuchi M et al. The proto-oncogene Bcl6 inhibits apoptotic cell death in differentiation-induced mouse myogenic cells. *Oncogene* 1999; 18: 467-475.
116. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. *NJEM* 1999; 11(341): 1520-1529.
117. Larouche J, Berger F, Chassagne-Cle´ment C et al. Lymphoma Recurrence 5 Years or Later Following Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical Characteristics and Outcome. *J Clin Oncol* 2010; 28 (12): 2094-2100.

118. Last KW, Cornelius V, Delves T et al. Presentation serum selenium predicts for overall survival, dose delivery, and first treatment response in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2335–2341.
119. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci* 2000;7: 2- 15.
120. Lenert K, Feller A. *Histopathology of Non Hodgkin's lymphomas.* (ed 2) New York, NY, Springer-Verlag, 1992.
121. Lenz G. Insights into the Molecular Pathogenesis of Activated B-Cell-like Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Its Therapeutic Implications. *Cancers* 2015; 7: 811-822.
122. Lenz G, Staudt L. Aggressive Lymphomas. *N Engl J Med* 2010; 362: 1417-29.
123. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91: 479-89.
124. Li ZM, Huang JJ, Xia Z et al. High Ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtype indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy. *Er J Haematol* 2012; 88(6): 510-517.
125. Liu YH, Xu FP, Zhuang HG et al. Clinicopathologic significance of immunophenotypic profiles related to germinal center and activation B-cell differentiation in diffuse large B-cell lymphoma from Chinese patients. *Hum Pathol* 2008; 39: 875-84
126. Lossos S, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(6): 995-1007.
127. Lossos S, Czervinski K, Alizadeh A et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 2004; 350: 1828-37.
128. Lohr J, Stojanov P, Lawrence M 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.

129. Lu XT, Gong XQ, Wang L et al. Immunohistochemical algorithm alone is not enough for predicting the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8 (1): 275-86.
130. Maartense E, Kluin-Nelemans HC, le Cessie S et al. Different age limits for elderly patients with indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphoma and the role of relative survival with rising age; analysis of a population-based non-Hodgkin's lymphoma registry. *Cancer* 2000; 89: 2667-2676.
131. Maartense E, Hermans J, Kluin-Nelemans JC et al. Elderly patients with non-Hodgkin's lymphoma: Population-based results in the Netherlands. *Annals of Oncology* 1998; 9 : 1219-1227.
132. Mahmoud HM, El-Sakhawy YN. Significance of Bcl-2 and Bcl-6 immunostaining in B-Non Hodgkin's lymphoma. *Hematology Reports* 2011; 3: 80-85.
133. Maeshima MA, Taniguchi H, Fukuhara S et al. Bcl-2, Bcl-6, and the International Prognostic Index are prognostic indicators in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-containing chemotherapy. *Cancer Sci* 2012; 103: 1898-1904.
134. Manzari V, Gismondi A, Barillari G et al. HTLV-V. New human retrovirus isolated in Tac-negative T-cell lymphoma/leukemia. *Science* 1987; 238(4833): 1581-1583.
135. Mareschal S, Lanic H, Ruminy P et al.. The proportion of activated B-cell like subtype among de novo diffuse large B-cell lymphoma increases with age. *Haematologica* 2011; 96(12): 1888-90.
136. Marjanovic G. Klinički i biološki faktori preživljavanja bolesnika sa "B Non Hodgkins" limfomima (disertacija). Niš: Medicinski fakultet Univerzitet u Nišu; 2005.
137. Marjanović G, Milenović M, Mačukanović-Golubović L et al. Preživljavanje i prognostički faktori Non hodgkin's lifoma sopstvena iskustva. *Acta Fac Med Naiss* 1998; 15(2): 88-95.
138. Marjanović G, Dojčinov S. Tissue microarray - a valuable method in diagnosis and prognosis of hematological malignances. *Arch Oncol* 2005; 13(3-4): 131-5.

139. Martinvalent D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005; 22: 355-370.
140. Medzhitov R. MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. *Molecular Cell* 1998; 2: 253–258.
141. Miyashita K, Tomita N, Tagun M et al. Beta-2 microglobulin is a strong prognostic factor in patients with DLBCL receiving R-CHOP therapy. *Leukemia research* 2015; 39 (11): 1187-1191.
142. 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: 4279-4284.
143. Müller C, Murawski N, Wiesen MH 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.
144. Muris J, Meijer J, Vos W et al. Immunohistochemical profiling based on bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B-cell lymphoma. *J Pathol* 2006; 208(5): 714-23.
145. Nagle S, Woo K, Schuster S et al. Outcomes of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma with progression of lymphoma after autologous stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol* 2013; 88: 890–894
146. Nakamura N, Kuze T, Hashimoto Y et al. CD5-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma Presenting in Bone Marrow without Lymphadenopathy. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 2001; 41 (1): 73-80.
147. Naz E, Mirza T, Danish F. Clinicopathologic Evaluation of Subgroups of Diffuse Large B Cell Lymphoma by Immunohistochemistry. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2011; 12: 3335-3339.
148. Ngo V, Young R, Schmitz R et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011; 470(7332): 115-9.
149. Nelson G, Paraoan L, Spiller DG et al. Multi-parameter analysis of the kinetics of NF- $\kappa$ B signalling and transcription in single living cells. *Journal of Cell Science* 2002; 115: 1137-1148 .

150. Neto HEA, Siqueira SA, Dulley FL et al. Bcl-2 protein frequency in patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. Sao Paulo Med J 2010; 128(1):14-7.
151. Nikolaides C, Dimou S, Pavlidis N. Prognostic Factors in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas. The Oncologist 1998; 3: 189-197.
152. Nishikori M. Classical and Alternative NF- $\kappa$ B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. J Clin Exp Hematopathol 2005; 45(1): 16-24.
153. Niitsu N, Okamoto M, Tamaru J et al. Clinicopathologic characteristics and treatment outcome of the addition of rituximab to chemotherapy for CD5-positive in comparison with CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. Annals of Oncology 2010; 21: 2069–2074.
154. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg M et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. Blood 2007 ; 109: 4930-4935.
155. O'Connell PF, Pinkus LJ, Pinkus SG. CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker; immunohistochemical Profile in Hematopoietic and Nonhematopoietic Neoplasms. Am J Clin Pathol 2004; 121:254-263.
156. Ogura G, Kikuti YY, Kikuchi T et al. Myd88 (L265P) mutation in malignant lymphoma using formalin-fixed paraffin- embedded section. J Cl Exp Hemat 2013; 53(2): 175-176.
157. Oh YH, Park CK. Prognostic evaluation of nodal diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemical profiles with emphasis on CD138 expression as a poor prognostic factor. J Korean Med Sci 2006; 21: 397-405.
158. Oken MM, Creech RH, Tormey DC et al: Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 1982; 5: 649-655.
159. Oshima K, Kawasaki C, Muta H et al.. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. Histopathology 2001; 39(2): 156-162.
160. Otter I, Conus S, Ravn U et al. The binding properties and biological activities of Bcl-2 and Bax in cells exposed to apoptotic stimuli. J Biol Chem 1998; 273(11): 6110-20.

161. Pacham G. The role of NF- $\kappa$ B in lymphoid malignancies. *British Journal of Haematology* 2008; 143: 3–15.
162. Pasqualucci L. The Genetic Basis of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Curr Opin Hematol* 2013 ; 20(4): 336–344.
163. Peruničić-Jovanović M. Difuzni B krupnoćelijski limfom. *Materia medica* 2012; 28(2): 489-93.
164. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B cell lymphoma: A randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 2006; 7 (5): 379-91.
165. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trumper 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: 1013-1022.
166. Pfreundschuh M, Müller C, Zeynalova S et al. Suboptimal dosing of rituximab in male and female patients with DLBCL. *Blood* 2014; 123(5): 640-6.
167. Pfreundschuh MM, Zeynalova S. Male sex is associated with lower rituximab trough serum levels and evolves as a significant prognostic factor in elderly patients with DLBCL treated with R-CHOP: results from 4 prospective trials of the German High-Grade Non-Hodgkin-Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Blood* 2009; 114: 1431.
168. Pfreundschuh M, Held G, Zeynalova S et al. German High-Grad Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). Increased rituximab (R) doses and effect on risk of elderly male patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: results from the SEXIE-R-CHOP-14 trial of the DSHNHL. *J Clin Oncol* 2014; 32: 5s (suppl; abstr 8501).
169. Piris MÁ, Battle-Lopez A, Nuñez J et al. Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma: diagnosis, difficulties and therapeutic options. *Expert Rev Anticancer Ther* 2016; 16 [E pub ahead of print].
170. Qi R, Liu XY. New advance in caspase-independent programmed cell death and its potential in cancer therapy. *I J B S* 2006; 2: 211-6.

171. Raut SL, Chakrabarti PP. Management of relapsed-refractory diffuse large B cell lymphoma. *South Asian J Cancer* 2014; 3(1): 66–70.
172. Reed JC. Bcl-2 and the Regulation of Programmed Cell Death. *The Journal of Cell Biology* 1994; 124 (1, 2) :1-6.
173. Rodenburg ME, Maartense E, Posthuma EFM. Improved survival for patients with large B-cell lymphoma after introduction of rituximab. *The Netherlands Journal of Medicine* 2009; 67 (8): 355-358.
174. Rodriguez J, Cabanillas F, McLaughlin P et al. A proposal for a simple staging system for intermediate grade lymphoma and immunoblastic lymphoma based on the tumor score. *Ann Oncol* 1992; 3 (9): 711-7.
175. Rosenwald A, Wright G, Chan C et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 1937-47.
176. Saito B, Shiozawa E, Usui T et al. Rituximab with chemotherapy improves survival of non-germinal center type untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21: 2563–2566.
177. Salles G, de Jong D, Xie W et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood* 2011; 117: 7070-7078.
178. Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, Piris M.A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas *Blood* 2003; 101 (4): 1220-1235.
179. Sasai M., Linehan MM, Iwasaki A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* 2010; 329: 1530-1534 .
180. Sehn LH, Berry B, Chhanabha 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;109:1857–61.
181. 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; (10): 1842–1847.



182. Seo S, Yoon D, Yoo C et al. Prognostic Significance of Beta-2 Microglobulin in Patients with Diffuse Large B Cell Lymphoma in Rituximab Era. *Blood* 2014; 124 (21): 2982 – 2982.
183. Shaffer AL, Rosenwald A., Staudt LM. Lymphoid malignancies The dark side of B-cell. Differentiation. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 1-13.
184. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68-74.
185. Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR et al. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: a predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-994.
186. Sjö LD, Poulsen CB, Hansen M et al. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. *Eur J Haematol* 2007; 79(6): 501-7.
187. Škunca Z, Planinc-Peraica A. Prognostic role of NF- $\kappa$ B expression in diffuse large B-cell lymphoma subgroups. *Acta Med Croatica* 2015; 69(1): 25-32.
188. Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol* 2005; 87: 163–208.
189. Suzuki K, Terui Y, Nishimura N et al. Prognostic value of C-reactive protein, lactate dehydrogenase and anemia in recurrent or refractory aggressive lymphoma. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43(1): 37-44.
190. Swan F Jr, Velasquez WS, Tucker S et al. A new serologic staging system for large-cell lymphomas based on initial beta 2-microglobulin and lactate dehydrogenase levels *J Clin Oncol* 1989; 7 (10): 1518-27.
191. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, edn 4. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
192. Székely E, Hagberg O, Arnljots K, Jerkeman M. Improvement in survival of diffuse large B-cell lymphoma in relation to age, gender, IPI and extranodal presentation: a population based Swedish Lymphoma Registry study. *Leukemia & lymphoma*, 2013.

193. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* 2004; 16: 3–9.
194. Takahashi H, Tomita N, Kawasaki R et al. Prognostic Impact Of Gender In Diffuse Large B Cell Lymphoma Patients Treated With R-CHOP Therapy. *Blood* 2013; 122 (21): 5079.
195. Tang TT, Dowbenko D, Jackson A , et al. The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J Biol Chem* 2002; 277: 14255-14265.
196. Taniguchi T, Harada H, Lamphier M. Regulation of the interferon system and cell growth by the IRF transcription factors. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121: 516-520.
197. Tangye SG, Liu YJ, Aversa G et al. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* 1998; 188: 1691-1703.
198. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Effect of age on the characteristics and clinical behavior of non-Hodgkin's lymphoma patients. *Ann Oncol* 1997; 8: 973–978.
199. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma *Blood* 1997; 11(89): 3909-3918.
200. Thomas V, Dobson R, Mennel R. Primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2011; 24(4): 350–353.
201. Thompson R, Herscovitch M, Zhao I et al. NF-kB Down-regulates Expression of B-lymphoma Marker CD10 through a miR-155/PU.1 Pathway. *J Biol Chem* 2011; 286: 1675-1682.
202. Thornberry N, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
203. Thunberg U, Enblad G, Berglund M. Classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry demonstrates that elderly patients are more common in the non-GC subgroup and younger patients in the GC subgroup. *Haematologica* 2012; 97(2): e3.

204. Thunberg U, Amini R, Linderoth J et al. BCL2 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma partly reflects normal differences in age distribution. *British journal of haematology* 2009; 146(6): 683-4.
205. Tisi MC, Bozzoli V, Giachelia M et al. Anemia in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma. The role of interleukin-6. Hepcidin and erythropoietin. *Leuk Lymphoma* 2014; 55(2): 270-5.
206. Troppan KT, Melchardt T, Deutsch A et al. The significance of pretreatment anemia in the era of R-IPI and NCCN-IPI prognostic risk assessment tools: a dual-center study in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Eur J Haematol* 2015 ; 95(6): 538-44.
207. Tsuboi K, Iida S, Inagaki H et al. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 2000; 14(3):449-56.
208. Tzankov A, Pehrs AC, 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: 747-52.
209. Uherova P, Ros WC, Schnitzer B et al. The Clinical Significance of CD10 Antigen Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2001;115: 582-588.
210. van Imhoff GW, Boerma EG, van der Holt B et al. Prognostic Impact of Germinal Center–Associated Proteins and Chromosomal Breakpoints in Poor-Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of clinical oncology* 2006; 24 (25): 4135-4142.
211. Visco C, Finotto S. Hepatitis C virus and diffuse large B-cell lymphoma: Pathogenesis, behavior and treatment . *World J Gastroenterol* 2014; 20(32): 11054-11061.
212. Wang Q, Jeelall S, Horikawa K. Emerging targets in human lymphoma: targeting the MYD88 mutation. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy* 2013; 3: 53–61.
213. Wang J, Jeelall S, Laura L. Toll-like receptors and cancer: Myd88 mutation and inflammation. *Frontiers in immunology/Tumor immunity* 2014; 367(5): 1-10.

214. Wang J, Jeelall S, Beutler B et al. Consequences of the recurrent Myd88L265P somatic mutation for B cell tolerance. *J Exp Med* 2014; 211(3): 413-426.
215. Weksler M, Schwab R, Ai-hao D. Aging and the immune system. in: R.R. Rich, T.A. Fleisher B.D. Schwartz W.T. Shearer W. Strober (Eds.) *Clinical Immunology*. Mosby, St. Louis; 1996: 789–795.
216. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W et al. MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. *Immunity* 1997; 7: 837–847.
217. Westin JR, Fayad LE. Beyond R-CHOP and the IPI in large-cell lymphoma: molecular markers as an opportunity for stratification. *Curr Hematol Malig Rep* 2009; 4(4): 218-24.
218. Wilkinson ST, Tome ME, Briehl MM. Mitochondrial Adaptations to Oxidative Stress Confer Resistance to Apoptosis in Lymphoma Cells. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 10212-10228.
219. William MB, Bongu RN, Bast M et al. The utility of lactate dehydrogenase in the follow up of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013; 35(3): 189-91.
220. Wilson K, Sehn L, Berry B et al. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma *Leucemia&Lymphoma* 2007; 48(6): 1102-1109
221. Winter JN, Weller E, 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): 4207-4213.
222. Wong EV. *Cells: Molecules et Mechanisms*. Chapter 15, Cell Cycle. 230-252.
223. Xu Y, McKenna W, Molberg H, Kroft H. Clinicopathologic analysis of CD10+ and CD10- diffuse large B-cell lymphoma. Identification of a high-risk subset with coexpression of CD10 and bcl-2. *Am J Clin Pathol* 2001; 116(2): 183-90.
224. Yamaguchi M, Nakamura N, Suzuki R et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinico pathological review in 120 patients. *Haematologica* 2008; 93(8): 1195-1202.
225. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood* 2002; 99: 815-821.

226. Yamauchi T, Tasaki T, Tai K et al. Prognostic effect of peripheral blood cell counts in advanced diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP-like chemotherapy: A single institution analysis. *Oncology letters* 2015; 9: 851-856.
227. Yang Y, Shaffer A, Tolga Emre N et al. Exploiting Synthetic Lethality for the Therapy of ABC Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* 2012; 21(6): 723-737.
228. Ye BH, Chaganti S, Chang CC et al. Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J* 1995;14: 6209-6217.
229. Yıldırım M, Kaya V, Demirpençe O, Paydaş S. The role of gender in patients with diffuse large B cell lymphoma treated with rituximab-containing regimens: a meta-analysis. *Arch Med Sci* 2015; 4: 708-14.
230. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; 369(6478): 321-3.
231. Yoh Kyung Ah, Ho Sup Lee, Lee Chun Park et al. Prognostic Significance Of Systemic Inflammatory Factors In Patients With Diffuse Large B Cell Lymphoma Treated By R-CHOP. *Blood* 2013; 122 (21): 1802.
232. Yoo C, Kim S, Sohn SB et al. Modified Number of Extranodal Involved Sites as a Prognosticator in R-CHOP-Treated Patients with Disseminated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Korean J Intern Med* 2010; 25: 301-308.
233. Yoo C, Zoon DH, Suh C. Serum beta-2 microglobulin in malignant lymphomas: an old but powerful prognostic factor. *Blood Res* 2014; 49: 148-53.
234. Yoon DH, Choi DR, Ahn HJ et al. Ki-67 expression as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP. *Eur J Haematol* 2010; 85(2): 149-57.
235. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME et al. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1982; 307 (20): 1231-6.
236. Zang BY, Yong WB, Zhu J et al. Clinical characteristics and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Chinese journal of oncology* 2005; 27(3):174-6.

237. Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 245-60.
238. Zheng Y, Ma X, Jiang J, Wang Y. CD5 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B- cell lymphoma. *Chinese journal of pathology* 2012; 41(3): 156-160.
239. Zhou Z, Sehn L, Rademaker A 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): 837-842.
240. Zimmermn KC, Douglas RG. How cells die: Apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immuno* 2001; 108: 99-103.
241. Zinzani PL, Dirnhofer S, Sabbatini E et al. Identification of outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. Immunohistochemical profiling of homogeneously treated de novo tumors with nodal presentation on tissue micro-arrays. *Haematologica* 2005; 90(3): 341-7.
242. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E et al. M. 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: 2373-2380.

## ***Prilog:***

### ***Biografija kandidata***

- Dr Ljiljana Tadić rođena je 03. 03. 1969. godine u Pirotu.
- Osnovnu i srednju školu završila je u Nišu sa odličnim uspehom.
- Medicinski fakultet u Nišu upisala je 1987. godine, a diplomirala 1992. godine sa srednjom ocenom 9,00.
- Specijalizaciju Interne medicine završila je 2006. godine, na Medicinskom fakultetu u Nišu, sa ocenom odličan.
- Upisala je doktorske akademske studije (DAS) 2011. godine.
- Zapošljena je u Vojnoj bolnici u Nišu , na Odelenju za unutrašnje bolesti, gde se trenutno nalazi na mestu načelnika internističkog kabineta.
- Za uspešan rad u struci rešenjem Ministarstva zdravlja Republike Srbije 2013. godine dodeljeno joj je stručno priznanje Primarijusa.
- Član je Srpskog lekarskog društva
- Član je Hematološke sekcije SLD.
- Član stručnog saveta Centra za Kontinuiranu medicinsku edukaciju u Vojnoj bolnici u Nišu.
- Učestvovala u naučno-istraživačkom projektu: „Palpabilna limfadenopatija u kliničkoj praksi“, kao koordinator za Vojnu bolnicu u Nišu.
- Autor i koautor više od 30 stručnih radova.
- Predavač u tri akreditovana predavanja :
  1. Anemije- patofiziologija, diferencijalna dijagnoza i terapija (A-1-944/2012)
  2. Problemi postavljanja etiološke dijagnoze u bolesnika sa limfadenopatijom (A-1-941/2012)

3. Trombocitoza: etiološka dijagnoza i terapija (A-1-22/2013)
  - Služi se engleskim jezikom.
  - Udata je i majka dvojice sinova Nikole i Dimitrija.



### ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:  
"Клинички и имунолошки фактори прогнозе код болесника са Б дифузним  
крупноћелијским неходжинским лимфомом", која је одбрањена на Медицинском  
факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

---

Др Љиљана Љ. Тадић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

"Клинички и имунолошки фактори прогнозе код болесника са Б дифузним  
крупноћелијским неходкинским лимфомом "

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам  
предала за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**,  
истоветан штампаном облику.

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

---

Др Љиљана Љ. Тадић

## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

"Клинички и имунолошки фактори прогнозе код болесника са Б дифузним крупноћелијским неходкинским лимфомом"

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, \_\_\_\_\_.

Потпис аутора дисертације:

---

Др Љиљана Љ. Тадић