



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Željka Škunca

**GENSKE, IMUNOHISTOKEMIJSKE I  
MORFOLOŠKE ZNAČAJKE PODGRUPA  
DIFUZNOG B-VELIKOSTANIČNOG  
LIMFOMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Mr.sc. Željka Škunca, dr.med.

**GENSKE, IMUNOHISTOKEMIJSKE I  
MORFOLOŠKE ZNAČAJKE PODGRUPA  
DIFUZNOG B-VELIKOSTANIČNOG  
LIMFOMA**

Doktorski rad  
predložen Biološkom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog stupnja  
doktora prirodnih znanosti biologije

Zagreb, 2013.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Klinici za Internu medicinu Odjelu za Hematologiju, KB “MERKUR“ i Opće Bolnice Zadar, te Kliničkom Odjelu za Patologiju i citologiju, KB “MERKUR” u Zagrebu, pod vodstvom Prof.dr.sc. Ana Planinc-Peraica, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu“.

## ZAHVALA

Zahvaljujem Prof.dr.sc. Branimiru Jakšiću, kojem dugujem sve.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Ani Planinc-Peraica, mentoru bez čijeg iznimnog zalaganja i podrške, usmjeravanja zajedničkog istraživanja i rasprava problema ne bi bilo ovog rada.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Mariji Dominis, na trudu i na korisnim savjetima pri izradi rada.

Zahvaljujem dr.sc.Tamari Poljičanin, koja je radila statističku analizu podataka.

Na kraju rada, smatram da je uz zalaganje pojedinaca ovakav rad ogledalo organiziranosti i dobre suradnje cijelog Odjela za Patologiju KB "MERKUR" i Odjela za Hematologiju KB "MERKUR" i Odjela za Hematologiju OB Zadar, te zahvaljujem svim suradnicima.

**GENSKE, IMUNOHISTOKEMIJSKE I MORFOLOŠKE ZNAČAJKE  
PODGRUPA DIFUZNOG B-VELIKOSTANIČNOG LIMFOMA**

Mr.sc. Željka Škunca, dr.med.  
Opća bolnica Zadar,

Difuzni B velikostanični limfom (engl. diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) je najučestaliji tip limfoma u bolesnika odrasle životne dobi. Zbog tako visoke zastupljenosti mi smo odlučili kod naših bolesnika ispitati prisutnost VEGFR2 i NF- $\kappa$ B, te ocijeniti njihov utjecaj na ishod kod bolesnika s DLBCL. Mi smo kod 99 bolesnika ispitali prisutnost tih tumorskih biljega, te abnormalnosti gena *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC* kod iste grupe bolesnika. Rezultati su pokazali da je kod imunohistokemijski određenih tumorskih biljega VEGFR2 i NF- $\kappa$ B koji se nalaze u citoplazmi i jezgri nađeno da samo NF- $\kappa$ B, koji je prisutan u citoplazmi ukazuje na značajno lošije preživljenje ( $p=0,037$ ). Metodom FISH analize *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC* nije nađena značajna razlika u preživljenju među podgrupama DLBCL ( $p=0,714$ ).

(120 stranica/ 15 slika/ 17 tablica/ 276 literaturna navoda/ jezik izvornika-hrvatski jezik

Rad je pohranjen u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici, Zagreb

**Ključne riječi: difuzni B-velikostanični limfomi, tumorski biljezi,**

Mentor: Prof.dr.sc. Ana Planinc-Peraica, dr.med.

Ocjenjivači: Doc.dr.sc. Nada Lang, dr.med.

Prof.dr.sc. Ana Planinc-Peraica, dr.med.

Prof.dr.sc. Nada Oršolić

**GENETIC, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF  
SUBGROUPS IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA**

Mr.sc. Željka Škunca, dr.med.  
General Hospital Zadar

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common type of lymphoma in patient's elderly population. With such a high representation we decided our patients asses the pressence of VEGFR2 and NF-κB and assess their impact on outcome in patients with DLBCL. We investigated in 99 patients the presence of tumor markers and abnormalities of genes *BCL2*, *BCL6* and *c-MYC* in the same group of patients. The results showed that in immunohistochemical markers of tumor VEGFR2 and NF-κB which are located in the cytoplasm and in the nucleus was found that only NF-κB, which is present in the cytoplasm indicates a singnificantly worse survival ( $p=0.037$ ). FISH analaysis of *BCL2*, *BCL6* and *c-MYC* was not found significant differences in survival among subgroups of DLBCL ( $p=0.714$ ).

(120 pages / 15 illustrations/ 17 tables/ 276 references/ original language Croatian language

Thesis deposited in National University Library, Zagreb

Key words: Diffuse large B-cell lymphoma, tumor markers,

Supervisor: Prof.dr.sc. Ana Planinc-Peraica, dr.med.

Reviewers: Doc. dr.sc. Nada Lang, dr.med.

Prof dr.sc. Ana Planinc-Peraica, dr.med.

Prof dr.sc. Nada Oršolić

## SADRŽAJ

<b>SAŽETAK</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>3</b>
2.1 Morfološka klasifikacija difuznog B velikostaničnog limfoma (DLBCL).....	5
2.2 Genotipska i fenotipska klasifikacija DLBCL .....	8
2.3 Proteinska ekspresija diferencijacijskih gena DLBCL i klasifikacija VEGF-receptor 2 i NF- $\kappa$ B .....	11
2.4 Dvostruka/trostruka translokacija kod DLBCL .....	25
2.5 Drugi algoritmi koji definiraju porijeklo stanica .....	25
2.6 Kliničke karakteristike DLBCL .....	28
2.6.1 Mjesta zahvaćenosti .....	30
2.6.2 Klinički prognostički čimbenici DLBCL .....	30
2.6.3 Međunarodni prognostički indeks (MPI) .....	32
2.7 Terapijski pristup DLBCL .....	35
<b>3. BOLESNICI I METODE</b> .....	<b>37</b>
3.1 Kliničke i morfološke karakteristike ispitivane grupe bolesnika.....	37
3.2 Interfazna fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) .....	39
3.3 Klinički podaci i pretrage u bolesnika s DLBCL .....	40
3.4 Statistička obrada podataka .....	46
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>47</b>
4.1 Univarijatne analize .....	47
4.2 Klasifikacija DLBCL prema Hansu i sur. u podgrupu GBC, ABC i tip 3 te karakteristike biljega VEGFR-2 i NF- $\kappa$ B, .....	51
4.3 Abnormalnosti <i>BCL2</i> , <i>BCL6</i> i <i>c-MYC</i> gena, krajnji ishod liječenja i preživljenje u podgrupama DLBCL prema Hansu i sur (2004). .....	54
4.4 Laboratorijski hematološki parametri .....	61
4.5 Laboratorijski biokemijski parametri.....	62

4.6	Prognostičke analize prema Međunarodnom prognostičkom indeksu (MPI) u pojedinim podgrupama bolesnika sa DLBCL prema Hansu i sur. ....	69
4.7	Usporedba utjecaja fenotipskih karakteristika na preživljenje bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. ....	75
4.8	Analiza preživljenja bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. i obzirom na terapiju .....	76
4.9	Multivarijatne analize .....	77
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>100</b>
	<b>POPIS KRATICA .....</b>	<b>1</b>
	<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	



## 1. UVOD

Tumorski biljezi imaju sve značajniju ulogu u postavljanju dijagnoze ne-Hodgkinovih limfoma. Danas nije moguće postaviti patohistološku dijagnozu limfoma bez analize tumorskih biljega, koji su za svaki podtip limfoma karakteristični, i smatra se da na neki način određuju preživljenje i prognozu kod bolesnika, te da njihova prisutnost ili odsutnost može odlučiti o odabiru liječenja kod navedene grupe bolesnika. Mnogi autori ističu ulogu i značaj tumorskih biljega (Hamda i sur. 2000, Dias i sur. 2001, Davis i sur. 2001, Le Gouill i sur. 2004, Feuerhake i sur. 2005, Frelin i sur. 2005, Gratzinger i sur. 2008, Swerdlow i sur. 2008, Nyman i sur. 2008, Nyman i sur. 2009, Cury i sur. 2009, Gratzinger i sur. 2010, Campo i sur. 2011)

Na temelju ekspresije gena *CD10*, *BCL6*, *MUM1/IRF4* Hans i sur. (2004) su definirali podgrupu GCB, ABC i tip 3 i dokazali da je preživljenje kod GCB podgrupe znatno bolje. Mi smo u ovom radu sve bolesnike grupirali u te tri podgrupe, kako je učinila Hans i sur (2004). Analizirali smo još dodatne tumorske biljege, a to su VEGFR-2 i NF- $\kappa$ B, da bi ustanovili njihovu prognostičku značajnost kod ove ispitivane grupe bolesnika. Te analize su također rađene imunohistokemijskom metodom. Navedene tumorske biljege smo analizirali u citoplazmi i u jezgri, a zatim usporedili s rezultatima analiza koji su dobiveni podjelom po Hans i sur (2004).

U ovom istraživanju biti će analizirana i prisutnost gena *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC* FISH metodom (molekularna analiza kojom se određuju kromozomske aberacije). Te dobivene rezultate smo usporedili s već gore navedenom podjelom da bi ustanovili imaju li te promjene utjecaj na preživljenje kod bolesnika s DLBCL. Zatim smo analizirali bolesnike s dvostrukom/trostrukom translokacijom. Radi se o maloj grupi bolesnika s vrlo lošim ishodom. Dvostruka/trostruka translokacija kod DLBCL u dosadašnjim klasifikacijama nije izdvojena kao zaseban entitet, ali zbog vrlo lošeg kliničkog tijeka i loše prognoze kod bolesnika koji imaju takve translokacije moguće je da će u budućim klasifikacijama biti izdvojena kao zaseban entitet (Iros i sur. 2007, Savage i sur. 2009, Jonson i sur. 2009, Snuderl i sur. 2010).

U dostupnoj literaturi (Medline, Pubmed, Imedex, Medscape), nisam pronašla istraživanje u kojem se analiziraju prisutnost VEGFR2 i NF- $\kappa$ B i podgrupe DLBCL prema Hans i sur. (2004).

## **Svrha i cilj rada**

Svrha ovog istraživanja je bila utvrditi postoji li povezanost između tumorskih biljega VEGFR-2 i NF- $\kappa$ B i prognostičke značajnosti kod bolesnika s podgrupama DLBCL:

*Cilj* istraživanja je odrediti prisutnost VEGFR2 i NF- $\kappa$ B u citoplazmi i u jezgri i analizirati njihovu prisutnost u podgrupama DLBCL, te prisutnost gena *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC* u navedenoj grupi ispitanika. Pored toga, cilj je utvrditi kliničke karakteristike, laboratorijske (hematološke i biokemiske) i prognostičke analize prema Međunarodnom Prognostičkom indeksu u pojedinim podgrupama bolesnika s DLBCL.

## **Hipoteze istraživanja su:**

- Utvrditi morfološka, imunohistokemijska i genska obilježja bolesnika s difuznim B velikostaničnim limfomom u trenutku postavljanja dijagnoze.
- Razvrstati bolesnike s DLBCL uz pomoć diferencijacijskih biljega CD10, *BCL6*, *MUM1/IRF4*, u podgrupe- limfoma B germinalnog centra, limfom aktiviranih B stanica i tip 3 podgrupu.
- Analizirali smo prisutnost dodatnih tumorskih biljega VEGFR-2 i NF-  $\kappa$ B, da bi ustanovili njihovu prognostičku značajnost kod ove ispitane grupe bolesnika
- Metodom FISH utvrditi poremećaje gena *BCL2*, *BCL6* i *C-MYC* u stanicama difuznog B velikostaničnog limfoma.
- Pretpostavlja se da ishod liječenja ovisi o podtipovima limfoma DLBCL te da se ishod liječenja može predvidjeti na temelju nekih genskih, imunohistokemijskih i morfoloških obilježja u trenutku postavljanja dijagnoze.

## 2. LITERATURNI PREGLED

Difuzni B velikostanični limfom (DLBCL, engl. diffuse large B-cell lymphoma) je najučestaliji tip limfoma u bolesnika odrasle dobi u zapadnim zemljama. Bolest se očituje različitom prezentacijom bolesti, različitim kliničkim tijekom, morfološkim i biološkim osobinama, te iz toga proizlazi i različita prognoza (Swerdlow i sur. 2008, Campo i sur. 2011).

Nezadovoljavajuća histopatološka reproducibilnost morfoloških tipova centroblastičnog i imunoblastičnog limfoma prepoznatih u prethodnim klasifikacijama, te agresivan klinički tijek i sličan način liječenja rezultirali su definiranjem novog histološkog tipa limfoma - difuzni B velikostanični (DLBCL) u novoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) 2008. godine (Swerdlow i sur. 2008).

Na temelju genske ekspresije otkrivene su tri velike podskupine DLBCL i to su: limfom B-stanica germinalnog centra podgrupa (GCB), limfom aktiviranih B-stanica podgrupa (ABC) i primarni medijastinalni B stanični limfom podgrupa (PMBCL ili tip 3) (Hans i sur. 2004).

Kako je tehnički jednostavnije odrediti stanično porijeklo na temelju imunohistokemijskih analiza, nego metodom genske ekspresije, otkriven je algoritam pomoću kojeg se imunohistokemijskim metodama mogu grupirati podtipovi ovog limfoma u one germinalnog centra i one ne-germinalnog centra. Prema najčešće korištenom algoritmu tzv. Hans i sur., koristi se imunohistokemijsko bojenje za CD10, *BCL-6* i *MUM1/IRF4* (Hans i sur. 2004).

Međutim, postoje suprotna saznanja o prediktivnoj vrijednosti ove klasifikacije u kojoj su limfomi imunohistokemijski definirani.

GCB fenotip odgovara profilu genske ekspresije i stupnju diferencijacije normalnih B stanica germinativnog centra; te ostaje otvoreno pitanje staničnog porijekla ABC fenotipa. Mali broj B stanica neneoplastičnog germinativnog centra - kasni centroцити, eksprimiraju biljeg *MUM1/IRF4*, dok su *BCL6* negativni. Tumorske B stanice koje odgovaraju navedenom stupnju diferencijacije kasnih centroцита izražavaju istovremeno oba biljega *MUM1/IRF4* i *BCL6*. Isto tako, nakon antigene stimulacije, moguća je diferencijacija B stanica u kratko živuće plazmablaste izvan mikrookoliša germinativnog centra. Prema Shaffer i sur. (2002) navedena dva tipa B stanica predstavljaju moguće ishodište limfoma ABC fenotipa.

Kromosomske translokacije, amplifikacije i delecije, kao i mutacije gena, koje se pojavljuju u DLBCL remete normalnu B staničnu homeostazu, na tri načina: 1. poticanjem staničnog rasta i proliferacije, 2. blokiranjem programirane stanične smrti i 3. zaustavljanjem diferencijacije stanica (Shaffer i sur. 2002).

Najčešća citogenetska abnormalnost DLBCL je translokacija ili mutacija *BCL6* gena, transkripcijskog represorskog gena uključenog u regulaciju diferencijacije i proliferacije B stanica germinativnog centra (Shaffer 2002). Ekspresija *BCL6* je najjača u stanicama neneoplastičnog germinativnog centra, a gubi se u tijeku terminalne diferencijacije B limfocita u plazma stanice. U slučajevima kada se javlja poremećena regulacija *BCL6* gena, *Bcl6* ekspresija se javlja u tumorskim stanicama izvan normalnog diferencijacijskog limita stanica germinativnog centra. *BCL6* gen postaje manje osjetljiv na fiziološke regulacijske utjecaje blokirajući time diferencijaciju u plazma stanice (Shaffer i sur. 2002). S druge strane blokirajući terminalnu diferencijaciju *BCL6* može utjecati na proliferaciju B limfocita u germinativnom centru i na taj način omogućuje nekontroliranu diobu stanica u germinativnom centru (Shaffer i sur. 2002).

*BCL6* gen se uglavnom nalazi u GCB DLBCL (Alizadeh i sur. 2000, Rosenwald i sur. 2002, Wright i sur. 2003) i statistički je značajno povezan s nepovoljnim utjecajem na preživljenje (Bergman i sur. 2009). *MUM1/IRF4* i *BCL6* su značajno povezani s kraćim 5-god. preživljenjem pri čemu je *BCL6* neovisan faktor rizika o dobi prilagođenom MPI u multivarijantnoj analizi (Bergman i sur. 2009).

Aktivnost NF- $\kappa$ B je povećana nakon *BCL6* supresije pomoću RNA kod DLBCL. Kada je *BCL6* prisutan on potiskuje NF- $\kappa$ B aktivnost. Mehanizam koji uključuje međureakciju između *BCL6* i NF- $\kappa$ B se nalazi *in vitro* i *in vivo*. Analize govore o negativnoj povezanosti između ekspresije NF- $\kappa$ B ciljanih gena i *BCL6*. NF- $\kappa$ B je regulator B stanica. Translokacija NF- $\kappa$ B u jezgru nastaje kada izvanstanični podražaji aktiviraju I $\kappa$ B kinazu (IKK) kompleks, koji fosforilacijom I $\kappa$ B proteina dovede do raspada proteasoma i pojave dimera (Perez-Rosado 2008). Izvanstanični podražaji aktiviraju NF- $\kappa$ B koji uključuje LPS, TNF, anti-CD40 i anti-IgM, koji predstavljaju okidač signalnih puteva uključenih u B-staničnu proliferaciju i reguliranje apoptoze. Aktivacija NF- $\kappa$ B je vrlo niska kod *BCL6* pozitivnih stanica (Perez-Rosado i sur. 2008).

Značajan klinički prognostički model kao što je Međunarodni prognostički indeks (MPI može izdvojiti bolesnike u kojih je manja vjerojatnost da će povoljno odgovoriti na standardnu terapiju (Shipp i sur. 2003). No, kod ove kliničke klasifikacije ne uzima se u obzir biologija tumorske stanice, kao niti učinkovitost novih lijekova. U više kliničkih istraživanja nađeno je

da različite podgrupe DLBCL imaju različiti klinički tijek i različito preživljenje (Guillermo i sur. 2005, Nyman i sur. 2009).

## **2.1 Morfološka klasifikacija difuznog B velikostaničnog limfoma (DLBCL)**

Četvrto izdanje klasifikacije SZO uzelo je u obzir nove informacije o bazičnim i kliničkim istraživanjima limfoma kao što su novodefinirani kriteriji za neke oblike limfoma i nove entitete od kojih su neki definirani genetski, a drugi kombinacijom morfoloških, imunofenotipskih i kliničkih značajki (Swerdlow i sur. 2008).

DLBCL je najčešće zastupljen tip limfoma kod odraslih i obuhvaća od 25% do 30% svih limfoma. Približno, oko 54.000 novih slučajeva limfoma se dijagnosticira u SAD-u svake godine, a to je oko 4% svih malignih oboljenja (Morton i sur. 2006).

Prema procjeni Nacionalnog instituta za rak (engl. National Cancer Institut) pojavnost ovog tipa limfoma iznosi 19,1 novih slučajeva na 100.000 stanovnika godišnje. Opaža se stalni porast učestalosti NHL-a, uključujući i DLBCL, koji se stalno povećavaju. Češće se javlja kod muškaraca (23,6 na 100.000) nego kod žena (15,4 na 100.000). Porast broja oboljelih je veći u pripadnika bijele nego kod crne rase. Oko 40% je viša zastupljenost u urbanim sredinama, nego u seoskoj sredini. Zadnjih godina je zabilježen nagli porast učestalosti limfoma u ruralnim sredinama. U zemljama Zapadne Evrope, Sjeverne Amerike i Australije učestalost limfoma je veća, nego u Južnoj Americi i Aziji, neovisno o infekciji HIV-om kao faktorom rizika nastanka limfoma. Medijan dobi tih bolesnika je 7. decenija života, mada se taj tumor može naći i kod djece (Baris i sur. 2000, Morton i sur. 2006)

DLBCL je najčešći limfom iz skupine agresivnih NHL-a. Poboljšane statističke analize za rak, osjetljivije dijagnostičke tehnike posebno za granične lezije, promjene u klasifikaciji limfoproliferativnih bolesti, i posebice, povećana pojava bolesnika s AIDS-om vjerojatno pridonose većem broju bolesnika s tim oblikom limfoma. Međutim, također je u stalnom porastu broj bolesnika koji boluju od NHL-a, a istovremeno nemaju AIDS (Gormley i sur. 2005, Chiu i sur. 2007).

Etiologija DLBCL je nepoznata kod većine bolesnika. Čimbenici koji mogu povećati rizik nastanka limfoma su: imunosupresija (uključujući AIDS i autoimune bolesti) i jatrogeno izazvana imunosupresija (kod transplantacije organa), ultraljubičasto zračenje, pesticidi, boje za kosu i redukcijske dijete. Podskupina DLBCL, koja uključuje imunoblastični limfom i

primarni limfom CNS-a povezuje se s infekcijom EBV virusom (Hoffmann i sur. 2005, Chiu i sur. 2007).

DLBCL je difuzna proliferacija velikih neoplastičnih B limfoidnih stanica sa jezgrom jednake veličine ili do dva puta veće od jezgre normalnog limfocita ili izuzetno velikom jezgrom kao kod makrofaga. Porijeklo tih stanica su B stanice germinativnog centra i postgerminativnih stanica. Iako je taj limfom definiran kao zaseban entitet u klasifikaciji SZO, uočena je heterogenost bolesti prema kliničkim, morfološkim, imunofenotipskim i genetičkim obilježjima (Gormley i sur. 2005, Ghesquieres i sur. 2006, De Jong i sur. 2007).

DLBCL se može pojaviti u obliku nodalne i ektranodalne bolesti. Ekstranodalna lokalizacija bolesti ima svoje osobitosti s obzirom na klinička obilježja i patogenetske mehanizme i razlikujemo: medijastinalni, intravaskularni, primarni efuzijski DLBCL (Gormley i sur. 2005).

Tumorska stanica je B veliki transformirani limfocit, no morfološka slika DLBCL je šarolika i prema prevladavajućem morfološkom tipu stanica može se razlikovati šest podtipova DLBCL: centroblastični, imunoblastični, bogat T limfocitima/histiocitima, anaplastični, plazmablastični i DLBCL sa stanicama sličnim Reed-Sternbergovim stanicama i ekspresijom ALK proteina. Prema definiciji bolesti tumorske stanice su pozitivne na pan-B biljege CD19, CD20, CD22, CD79a, a pozitivnost unutarцитoplazmatskih odnosno površinskih imunoglobulinskih (Ig) biljega je različito izražena, kao i CD5, CD10, CD30 i CD45 biljega (Swerdlow i sur. 2008). Kod DLBCL otkrivene su brojne kromosomske abnormalnosti.

**Tablica 1.** Difuzni B velikostanični limfom: varijante, podgrupe i podtipovi/entiteti prema klasifikaciji SZO 2008 (Swerdlow i sur. 2008).

**Difuzni B velikostanični limfom; nespecificiran drugačije (NOS)**

Uobičajene morfološke varijante

- Centroblastični
- Imunoblastični
- Anaplastični

Rijetke morfološke varijante

Molekularne podgrupe

- Limfom B stanica germinalnog centra (GCB)
- Limfom aktiviranih B-stanica (ABC)

Imunohistokemijske podgrupe

- CD5 pozitivan DLBCL
- Limfom B-stanica germinalnog centra (GCB)
- Limfom B-stanica ne-germinalnog centra (ne-GCB)

**Difuzni B velikostanični limfom podtipovi**

- T stanični/histiocitima bogat B velikostanični limfom
- Primarni DLBCL centralnog nervnog sistema
- Primarni kožni DLBCL, nožni tip
- EBV + DLBCL kod starijih

**Drugi limfomi velikih B stanica**

- Primarni medijastinalni/timični/B velikostanični limfom
- Intravaskularni B velikostanični limfom
- DLBCL povezan sa kroničnom upalom
- Limfomatoidna granulomatoza
- ALK pozitivan LBCL
- Plazmablastični limfom
- B velikostanični limfom povezan sa HHV8 multicentričnom Castlemanovom bolesti
- Primarni efuzijski limfom

**Granični slučajevi**

- B stanični limfom, neklasificiran, sa karakteristikama između DLBCL i Burkitt limfoma
- B stanični limfom, neklasificiran, sa karakteristikama između DLBCL i klasičnog Hodgkinovog limfoma

## 2.2 Genotipska i fenotipska klasifikacija DLBCL

Jedan od važnih kriterija u klasifikaciji i dijagnozi limfoma je prisutnost citogenetskih i molekularnih abnormalnosti povezanih s različitim tipovima limfoma. Citogenetskim analizama nisu nađene pojedinačne promjene koje bi imale dijagnostičko i prognostičko značenje, a time niti klinički jasne uzroke biološke heterogenosti DLBCL (Jerkeman i sur. 2002, Bea i sur. 2005). Analizom genske ekspresije DLBCL utvrđena je molekularna heterogenost tumora osobito gena uključenih u proliferaciju, aktivaciju i stupanj diferencijacije tumorskih stanica, te odgovor netumorskih stanica limfnog čvora.

Alizadeh i sur. (2000) su klasificirali dva molekularno jasno definirana oblika DLBCL, koji imaju uzorak genske ekspresije bitan za različite stadije B-stanične diferencijacije. Jedan tip ekspresije gena je karakterističan za germinalni centar B-stanica, dok je drugi tip karakterističan za ekspresiju gena normalno induciran u vrijeme *in vitro* aktivacije B stanica u perifernoj krvi. To su aktivirane B stanice DLBCL. Hans i sur. (2004) su kod 152 bolesnika s DLBCL upotrebom DNA microarray tehnike definirali tri podgrupe DLBCL. To su podgrupa GCB, ABC i tip 3. Isti autori su učinili analize na imunohistokemijski priređenim preparatima, te upotrebom ekspresije CD10, *BCL6* i *MUM1/IRF4* analizirali njihovu prognostičku vrijednost. Na temelju ekspresije gena CD10, *BCL6*, i *MUM1/IRF4* definirali su podgrupu GCB, a sve ostale su uvrstili u grupu ne-GCB (ABC). *BCL2* je prognostički loš čimbenik kod ABC grupe. U multivarijantnoj analizi visok MPI i ABC fenotip predstavljaju prognostički neovisan loš čimbenik za preživljenje.

Prema uzorku genske ekspresije B stanica germinativnog centra definirali su tri skupine DLBCL. Ekspresija gena CD10, *BCL6* i *MUM1/IRF4* se uzima za razvrstavanje podtipa limfoma GCB, ABC i tip 3 (Hans i sur 2004).

1. Skupinu GCB - s prisutnom ekspresijom gena B stanica germinativnog centra.
2. Skupinu ABC - s niskom ekspresijom gena B stanica germinativnog centra i prisutnom ekspresijom gena normalno induciranih tijekom *in vitro* aktivacije B stanica periferne krvi. Ta grupa ima profil aktiviranih perifernih B-stanica i nedostaje joj ekspresija gena GC.
3. Skupina tip 3 - primarni medijastinalni B stanični limfom (PMBCL) može se izvesti iz timusnih stanica i ima amplifikaciju kromosoma 9p i 2p (Hans i sur. 2004, Bea i sur. 2005).

GCB i ABC skupina genske ekspresije DLBCL statistički se značajno razlikuju u petogodišnjem preživljenju, 76% u GCB odnosno 36% u ABC skupini (Alizadeh i sur. 2000).



Ista skupina autora potvrdila je rezultat DNA *microarray* metode nalazom mutacija gena varijabilne regije teškog lanca imunoglobulina (IGHV) u uzorcima DLBCL klasificiranih kao GCB, a odsutnost tih mutacija u ABC skupini (Lossos i sur. 2005). Početna istraživanja Alizadeh i sur. potvrdili su Rosenwald i sur. (2002) i Wright i sur. (2003). Na osnovi analize ekspresije manjeg broja gena, uz GCB i ABC skupinu DLBCL, izdvojili su i treću skupinu karakteriziranu potpunim odsustvom ekspresije navedenih gena.

Sjo i sur. (2007) su analizirali četiri biljega, dva povezana s GC (*CD10* i *BCL6*) i *MUM1* povezan sa postgerminalnim centrom i jedan bitan za apoptozu (*BCL2*). Rezultati pokazuju da su *CD10* i *BCL6* povoljni prognostički pokazatelji za razliku od *BCL2*, što je nepovoljan biljeg. Koristeći algoritme koji razlikuju grupu s niskim i visokim rizikom za bolesnike, koje su predložili Hans i sur. (2004) i Muris i sur. (2006) došlo se do zaključka da su oba korisna za predviđanje ishoda u bolesnika s DLBCL. Međutim, u ovom izvješću algoritam Hans i sur. je bio superiorniji u odnosu na Muris algoritam. Ovi rezultati potvrđuju da treba proširiti analize na druga istraživanja koja će pokazati da različite prognostičke podgrupe DLBCL mogu biti odvojene jednostavnim imunohistokemijskim metodama sa ograničenim brojem biljega. Nalaz različitog molekularnog fenotipa, razlika u kliničkom odgovoru bolesnika na standardnu terapiju, te moguće izdvajanje bolesnika lošijeg kliničkog ishoda unutar pojedine skupine rizika MPI upućuje nedvojbeno na postojanje molekularno različitih bolesti unutar skupine DLBCL, koje nastaju različitim mehanizmima maligne transformacije (Rosenwald i sur. 2002, Lossos i sur. 2004, Monti i sur. 2005).

Razlikovanje podgrupe GCB i ABC i njihov utjecaj na preživljenje neovisni su o bilo kojoj kliničkoj značajki bolesti. Ti nalazi su potvrđeni u drugim retrospektivnim serijama na bolesnicima liječenih kemoterapijom (Alizadeh i sur. 2002, Rosenwald i sur. 2002, Hans i sur. 2004, Basquiera i sur. 2005, Mitchel i sur. 2008, Copie-Bergman i sur. 2009, Nyman i sur. 2009, Seki i sur. 2009). Međutim, kod drugih autora nije nađena značajna razlika u preživljenju u navedenim podgrupama (Colomo i sur. 2003, Jerkeman i sur. 2004, Moskowitz i sur. 2005, Imhoff i sur. 2006, Veelken i sur. 2007).

Podgrupe su povezane raznim kromosomskim aberacijama. Translokacija t(14;18) remeti regulaciju *BCL2* gena kod 45% bolesnika. C-REL lokus na kromosomu 2p se javlja kod 16% bolesnika i pojavljuje se najčešće kod GCB fenotipa, iako ne i isključivo (Monti i sur. 2005).

ABC-podgrupa je karakterizirana transkripcijskom ekspresijom *BCL2* gena kromosomskim amplifikacijama u 3q, 18q21-q22 i gubitkom 6q21-q22 (Basquiera i sur. 2005). Aktivacija anti-apoptotičkog NF-κB signalnog puta pojavljuje se kod ABC i tip 3, ali ne i kod GCB podgrupe (Choi i sur. 2009, Meli i sur. 2003).

Ekstranodalni limfomi također imaju varijacije u ekspresiji tih gena. Gastrični i intestinalni DLBCL se obično javljaju kod podgrupe GCB (Lopez-Guilermo i sur. 2005). Podgrupa ABC se obično vidi kod primarnog CNS limfoma (Feuerhake i sur. 2005) i limfoma testisa (Belgrund i sur. 2005). Profil genske ekspresije također je otkrio primarni medijastinalni B velikostanični limfom (PMBCL) kao rijetku podvrstu DLBCL (Moskowitz i sur. 2005).

Imunoblastična i centroblastična varijanta slučajeva s polimorfnim stanicama poput centroblasta i/ili visoki postotak imunoblasta su uobičajeni za ABC-podgrupu, ali su opaženi i u GCB podgrupi (De Paepe i sur. 2005).

Neoplastične stanice imaju ekspresiju pan B-staničnih biljega kao što su CD19, CD20, CD22, CD79a. Površni i/ili citoplazmatski imunoglobulin (IgM>IgG>IgA) može biti prisutan kod 50% do 75% slučajeva. Rijetko, u 10% slučajeva neoplastične stanice ispoljavaju i CD5 biljeg. Te CD5+ stanice predstavljaju *de novo* DLBCL i samo rijetko su posljedica transformacije CLL/SLL u velikostanični B-NHL. CD5 pozitivni DLBCL se može razlikovati od blastoidne varijante limfoma mantle stanica pomoću odsutnosti ciklin D1 ekspresije (Bosh i sur. 1998).

Prisutnost CD10, *BCL6* i *MUM1/IRF4* varira. Ekspresija CD10 se nalazi u 30 do 60% slučajeva, *BCL6* kod 60 do 90%. *MUM1/IRF4* se nalazi kod 35 do 65% slučajeva i predstavlja biljeg za post-GCB fenotip (Jerkeman 2004, Cheson i sur 2007). Visoka ekspresija FOXP1 se nalazi kod DLBCL, koji imaju fenotip limfoma ABC i ekspresiju MUM1/IRF4 i BCL6 u odsutnosti t(14;18).

Proliferacijski indeks se izražava pomoću Ki67 i obično je visok (obično viši od 40%), a može biti i do 90% u nekih slučajeva, p53 je prisutan u 20% do 60% slučajeva (Meli i sur. 2003).

GCB i ABC mogu se razdvojiti u različite grupe upotrebom kombinacija antitijela CD10, *BCL6* i *MUM1/IRF4*. Slučajevi s CD10 ekspresijom sa >30% pozitivnih stanica se smatraju GCB tip kao i slučajevi koji su CD10-, *BCL6*+, *MUM1/IRF4*-. Svi drugi slučajevi su ABC tip (Meli i sur. 2003).

### 2.3 Proteinska ekspresija diferencijacijskih gena DLBCL i klasifikacija VEGF-receptor 2 i NF- $\kappa$ B

Definiranje podtipova DLBCL dokazivanjem proteinske ekspresije imunohistokemijskim metodama daje mogućnost razlikovanja podtipova DLBCL različitih kliničkih karakteristika. Analize proteinske ekspresije DLBCL s ciljem izdvajanja GCB i ABC podtipova nemaju isto značenje (Colomo i sur. 2003, Linderoth i sur. 2003, Poulsen i sur. 2005). Pojedini radovi navode stupanj B stanične diferencijacije kao mogući pokazatelj ishoda DLBCL (Barrans i sur. 2003, Tzankov i sur. 2003, Hans i sur. 2004, Chang i sur. 2004, Berglund i sur. 2005), dok drugi ne potvrđuju povoljan prognostički utjecaj GCB fenotipa (Colomo i sur. 2003, Moskowitz i sur. 2005, de Paepe i sur. 2005). Slučajevi DLBCL se mogu podijeliti temeljem prisutne ekspresije ograničenog broja biljega, najčešće *BCL6*, CD10, *MUM1/IRF4* i CD138.

Hans i sur. (2004) su slučajeve DLBCL klasificirali u GCB skupinu ako je prisutna ekspresija samo CD10 ili CD10 i *BCL6* biljega. Negativna ekspresija biljega CD10 i *BCL6* označavala je ABC skupinu. U slučajevima odsutne ekspresije CD10 i prisutne ekspresije *BCL6*, skupinu je određivala ekspresija *MUM1/IRF4* biljega: ako je *MUM1/IRF4* biljeg negativan, slučaj je klasificiran u GCB skupinu, odnosno ako je pozitivan u ABC skupinu. Podjela DLBCL temeljem proteinske ekspresije biljega pokazala se točnija u predviđanju prognoze analiziranih slučajeva. Navedeni rezultat ukazuje da u slučajevima s povišenom genskom ekspresijom ne dolazi uvijek do translacije mRNA i stvaranja proteina. Također navode GCB fenotip kao povoljan prognostički pokazatelj unutar grupe niskog i visokog rizika MPI (Hans i sur. 2004).

Različito od prethodnih autora, Chang i sur. (2004) ne uzimajući ekspresiju biljega *MUM1/IRF4* kao isključivo postgerminativni biljeg diferencijacije, definiraju tri fenotipske skupine DLBCL. Izdvojeni GC B fenotip, često nazvan pravi GCB podgrupa, koji je definiran isključivo ekspresijom CD10 i/ili *BCL6*, pokazao se kao nezavisan povoljan prognostički pokazatelj i nađena je razlika u preživljenju fenotipskih skupina GCB i ABC. Uz GCB fenotip utvrđen je kao nezavisan prognostički pokazatelj i vrijednost MPI. Nije pronađena korelacija između fenotipskih skupina i vrijednosti MPI, te je prognostički značaj fenotipa neovisan o vrijednosti MPI.

Koristeći isti pristup određivanja fenotipskih skupina kod DLBCL Zinzani i sur. (2005.) kao Chang i sur. (2004) su također potvrdili prognostički značaj navedene tri fenotipske skupine.

Berglund i sur. (2005) koristeći oba navedena pristupa u određivanju fenotipskih skupina DLBCL potvrđuje povoljan prognostički značaj ekspresija *BCL6* ili *CD10*, dok je *MUM1/IRF4* ekspresija povezana s lošijim preživljenjem.

Tzankov i sur. (2003) potvrđuju GCB fenotip DLBCL kao nezavisan prognostički značajan pokazatelj. Također navode pozitivnu ekspresiju *CD44v6* u ABC skupini DLBCL i povezanost s lošijim preživljenjem.

Linderoth i sur. (2003) u određivanju podtipova DLBCL različitog histogenetskog porijekla, koriste *CD23* kao biljeg pregerminativnog i ranog germinativnog centra, kao biljege germinativnog centra *BCL6*, *CD10* i *CD40* i *CD138* kao biljeg postgerminativnih stanica. Izdvajaju ekspresiju *CD23* i *CD40* kao prognostički povoljne, dok ekspresija *CD10* i *BCL6* nije pokazala značajnu povezanost s prognozom.

## **Vaskularni endotelijalni faktor rasta-receptor 2 (VEGF-receptor 2)**

VEGF je glikoprotein uključen u proliferaciju i migraciju vaskularnih endotelijalnih stanica. On je ključni regulator fiziologije i patologije angiogeneze i vaskulogeneze, regulira rast, preživljenje i kretanje leukemijskih stanica, te inhibira sazrijevanje dendritičkih stanica i povećava resorbirajuću aktivnost osteoklasta u kosti, kao i kemotaksiju osteoklasta. Njegova aktivnost je ograničena na stanice endotela krvnih žila. Nalazi se u citoplazmi kod limfomskih i endotelijalnih stanica. Pripada porodici faktora rasta, specifičniji od trombocitnog faktora rasta. On je značajni signalni protein uključen u vaskulogenezu (stvaranje *de novo* formacija od embrionih cirkulatornih stanica) i angiogenezu (rast krvnih žila od ranije postojećih krvnih žila) (Lee i sur. 2004, Haarer i sur. 2006, Andrew i sur. 2011).

Obitelj vaskularnih endotelijalnih čimbenika rasta (VEGF) trenutno uključuje VEGF-A, B, C, D, E i placentalni faktor rasta (PIGF). Proteini VEGF obitelji se vežu na tri strukturno srodna receptora tirozin kinaze, koji se očituju kao VEGF receptor-1, -2 i -3. Svi članovi obitelji VEGF stimuliraju stanične odgovore vežući receptore za tirozin-kinazu na površini stanica. VEGF-A veže VEGF receptor-1 (VEGFR-1) (Flt-1) i VEGF receptor-2 (VEGFR-2) (KDR/Flk-1). VEGFR-2 je protein tirozin kinaze obitelji koji posreduje u gotovo svim poznatim staničnim odgovorima na VEGF. Funkcija VEGFR-1 je manje dobro definirana, iako se mislilo da modulira VEGFR-2 signalizaciju (Grazinger i sur. 2008). VEGF-A stimulira vaskularne endotelijalne stanice pomoću VEGFR-1 i VEGFR-2, ali je uloga VEGFR-1 i VEGFR-2 različita (Hamada i sur. 2008).

Neutrofili i integrini mogu poslužiti kao koreceptori za određene, ali ne sve VEGF proteine. Inaktivacijom gena koji kodira VEGFR-1 dolazi do povećanja broja endotelnih stanica VEGFR-1 ima negativne regulatorni učinak na VEGF-2, barem tijekom embriogeneze (Matsumoto 2001). Ozbiljni podaci upućuju na pozitivnu regulatornu ulogu VEGFR-1 u patološkoj angiogenezi. VEGF proteini su općenito loši mitogeni agensi, ali vezivanjem VEGF-A za VEGFR-2, vodi ka preživljenju, migraciji i deferencijaciji endotelnih stanica i posredovanju vaskularne propusnosti (Matsumoto i sur. 2001).

VEGFR-1 je dominantni VEGF receptor na monocitima i odgovoran je za kemotaksiju i aktivaciju tkivnog faktora. Igra značajnu ulogu u signalizaciji matičnih stanica i endotelijalnih stanica sam ili u kombinaciji s drugim VEGF receptorima. VEGFR-1 je bitan za diferencijaciju žila. VEGFR-2 je član receptor tirozin kinaze obitelji. Igra važnu ulogu u velikom broju bioloških procesa kao što su razvojni procesi, migraciji, diferencijaciji i staničnoj proliferaciji. VEGF/VEGFR-2 signalini put je kritičan za tumorsku angiogenezu i stoga rast solidnih tumora. VEGFR-2 je glavni receptor u mitogenoj signalizaciji za vaskularne endotelijalne stanice, a to očigledno sugerira da igra važnu ulogu u davanju signala za vaskularnu propusnost. VEGFR-2 aktivacija je ključni put u nizu patoloških stanja, uključujući karcinom, gdje taj receptor nadgleda rast krvnih žila. VEGFR-2 se pojavljuje kao posrednik kod gotovo svih znanih staničnih odgovora na VEGF. VEGFR-2 se nalazi na endotelijalnim stanicama različitih normalnih tkiva kao primjerice na stanicama pankreatičnog kanala, progenitorske stanice retine, megakariocitima i hematopoetskim stanicama (Grazinger i sur. 2010). VEGFR-2 je pronađen i na malignim stanicama, te postoji sumnja da VEGF/VEGFR-2 regulira ne samo tumorsku angiogenezu nego i sam rast tumora. Limfomi imaju jače izraženu ekspresiju fosforiliranog VEGFR-2 nego što se nalazi kod reaktivne limfadenopatije. VEGFR-2 pozitivne leukemijske stanice rezultiraju receptorskom fosforilacijom, dolazi do stanične migracije, i proliferacije, te je indikativno da postoje u autokrinom poveznici. Patogeneza limfoma govori o poremećenoj regulaciji staničnog ciklusa i/ili apoptozi. DLBCL ima jako izraženu ekspresiju fosforiliranog VEGFR-2 u usporedbi s folikularnim limfomom, limfomom mantle stanica, i kroničnom limfocitnom leukemijom. To govori o posebnoj ulozi VEGF/VEGFR-2 u evoluciji DLBCL.

VEGFR-3 je veliki receptor za limfatičke endotelijalne stanice i prisutan je zajedno s VEGFR-1 i VEGFR-2, ali kasnije tijekom razvoja njegov utjecaj je ograničen na diferentne endotelne progenitorske stanice. VEGFR-3 kontrolira razvoj i rast limfatičkog sistema i često se nalazi na limfatičkom endotelu. VEGF receptori su prisutni na endotelnim stanicama kod

odraslih i tu upotrijebe svoj proangiogeni učinak na putu parakrinih mehanizama (Bairey 2004).

VEGF ima dvije ključne uloge kod DLBCL: utjecaj na angiogenezu i utjecaj na proliferaciju stanica limfoma i/ili preživljenje potaknuto preko autokrinog (endotelijalno neovisnog) receptora VEGFR. On inducira angiogenezu, vaskulogenezu, vazodilataciju i porast vaskularne propusnosti. Povećava gustoću malih krvnih žila u koštanoj srži, ima značajnu ulogu posrednika tumorske progresije (Dias 2001, Ebeid 2003, Bairey 2004, Lee 2004, Halin 2007, Grazinger 2009). Povezan je s lošijim preživljenjem i neovisan je parametar o MPI (Ebeid i sur. 2003, Halin i sur. 2007, Grazinger i sur. 2009).

Mnoga istraživanja govore o uskoj povezanosti VEGF kod limfomogeneze. VEGF je povezan sa lošijom prognozom kod većine solidnih tumora i hematoloških malignih bolesti. VEGF protein i mRNA su otkriveni kod Hodgkinove bolesti, DLBCL, limfoma "mantle" stanica, limfoma virusne etiologije. Kod indolentnih limfoma, porast VEGF je povezan s transformacijom u agresivni DLBCL. Prisutna ektranodalna lokalizacija bolesti, infiltracija koštane srži, infiltracija centralnog nervnog sistema i prisutnost pleuralnog izljeva je povezana s povišenom genskom ekspresijom VEGF i ide s klinički agresivnim ABC podtipom. Visoka ekspresija VEGF povezana je s negativnim ishodom kod DLBCL bolesnika liječenih kemoterapijom (Le Gouill i sur. 2004, Kadowaki i sur. 2005, Grazinger i sur. 2009) i imunokemoterapijom (Grazinger i sur. 2010).

Upalne stanice, osim neutrofila, također imaju VEGF mRNA. VEGF inducira STAT3, koji inducira translokaciju u jezgru kod endotelinih stanica, a to nastaje posredstvom VEGFR (Bartol i sur. 2003).

Ha i sur. (2008) su otkrili da histon deacetilaza 7 fosforilacijom i citoplazmatskom akumulacijom dovodi do stimulacije VEGFR-2 posredovanjem VEGF. Stanični mehanizmi koji potiču prijepis mRNA, srastanje, mRNA izvoz i prijevod tih adaptivnih gena vjerovatno su selektivni. Tijekom staničnog stresa VEGF mRNA izražava ekspresiju gena VEGF koji prevladava u citoplazmi. Prisutnost VEGF u jezgri može biti povezana s premiještanjem iz citoplazme. Imunohistokemijskim bojenjem normalnog i tumorskog tkiva vidljivo je ograničena lokalizacija u jezgri tumorskih stanica, koja je u korelaciji s citoplazmatskom lokalizacijom VEGF (Rosenbaum-Dekel i sur. 2005).

## Nuklearni faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B predstavlja skupinu srodnih homodimernih i heterodimernih transkripcijskih čimbenika koji mogu aktivirati različite skupine ciljnih gena uključenih u stanično preživljenje, proliferaciju i imunološki odgovor. Među molekulama koje induciraju NF- $\kappa$ B su citokini, kemokini i efektorske molekule imunosne reakcije. NF- $\kappa$ B sudjeluje u odgovoru na upalne signale kroz T receptore, TNF receptore i IL-1 receptore (Chen i sur. 2000, Ichikawa i sur. 2005, Juvekar i sur. 2011).

NF- $\kappa$ B predstavlja grupu strukturno povezanih proteina koju sačinjavaju 5 članova, to su:

RelA (p65), RelB, cRel, NF- $\kappa$ B1 (p50; p105), i NF- $\kappa$ B2 (p52; p100) koji dolaze u raznim homodimernim i heterodimernim oblicima (Nishikori 2005). RelA, c-Rel i RelB imaju transaktivacijsku domenu C- terminalnog dijela. NF- $\kappa$ B1/p105 i NF- $\kappa$ B2/p100 su inaktivni prekursori p50 i p52 proteina i smješteni su u citoplazmi. Proteolitički proces pomiče C-terminalnu inhibitornu domenu, što dovodi do pomicanja proteina u jezgru. P50 i p52 dolaze obično u formi homodimera ili heterodimera, s jednim od tri proteina, koji imaju transaktivacijsku domenu. RelA i p50 postoje u divljem obliku staničnog tipa, dok je c-Rel ekspresija ograničena na hematopoetske stanice i limfocite. Ekspresija RelB je ograničena na visoko specifična mjesta kao što su timus, limfni čvorovi i Peyerove pločice. NF- $\kappa$ B je izražen u citoplazmi kod gotovo svih vrsta stanica, gdje je njegovo djelovanje pod kontrolom obitelji regulatornih proteina koji se zovu inhibitori NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B). I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  i Bcl-3, su članovi obitelji I $\kappa$ B, koji obično imaju 6-7 ankirin ponavljajuća mjesta, koji imaju niz od 33 aminokiseline koje posreduju vezujući se za NF- $\kappa$ B dimere (Nishikori 2005).

Aktivnost NF- $\kappa$ B je regulirana pomoću međureakcije sa inhibitornim I $\kappa$ B proteinima. Mnogi I $\kappa$ B proteini kao npr. I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  i *Drosophila* Cactus imaju različiti afinitet za individualne NF- $\kappa$ B dimere. U većini stanica NF- $\kappa$ B je prisutan u latentnom, inaktivnom I $\kappa$ B vezanom kompleksu i smješten je u citoplazmi. Postoje dva ili tri puta aktivacije NF- $\kappa$ B, koji se zovu kanonski (klasični) i nekanonski (alterativni) put. Uobičajeni korak kod oba ta puta je aktivacija I $\kappa$ B kinaze (IKK) kompleksa, koji se sastoji od katalitičkih podjedinica kinaze (IKK $\alpha$  i ili IKK $\beta$ ) i niza proteina zvanih NF- $\kappa$ B esencijalni modulatori (NEMO). Aktivacija NF- $\kappa$ B dimera nastaje posredovanjem IKK, a to je fosforilacijom inducirana degradacija I $\kappa$ B inhibitora (Gilmore 2006).

U kanonskom (klasičnom) putu aktivacija NF- $\kappa$ B se odvija preko dimera kao što su RelA/p50 koji se zadržavaju u citoplazmi međureakcijom sa samostalnim I $\kappa$ B molekulama, često je to

I $\kappa$ B $\alpha$ . U mnogim slučajevima, vezanje liganda za receptor na površini stanice (npr. TNF receptora) ili T staničnih sličnih receptora dovodi do stvaranja prilagođenih molekula kao npr. TRAF i RIP smještenih na citoplazmatskoj domeni receptora. Ovakve prilagođene molekule mogu aktivirati jedan IKK kompleks (koji sadrži  $\alpha$  i  $\beta$  katalitičke podjedinice i dvije molekule regulatornog modulatora NEMO) koji se veže direktno na citoplazmatski prilagođenim receptorima (kao npr. K63 vezana aktivnost na NEMO). Ovo grupiranje molekula na receptoru aktivira IKK kompleks. IKK zatim fosforilacijom podijeli I $\kappa$ B na dva serinska ostatka, što dovodi do razgradnje K48 na proteazome. NF- $\kappa$ B zatim ulazi u jezgru okrenut ciljnim genima (Gilmore 2006).

Nekanonski (alternativni) put ide preko aktivacije p100/RelB kompleksa tijekom B i T staničnog razvoja. Ovaj put se razlikuje od kanonskog puta po tome što samo određeni signali receptora kao npr. Lymphotoxin B //LT $\beta$ /, B stanični aktivirani faktor /BAFF, CD40 aktiviraju taj put. Taj se proces dalje nastavlja kroz IKK kompleks koji sadrži dvije podjedinice IKK $\alpha$  (ali ne i NEMO). U nekanonskom putu, vezivanje receptora dovodi do aktiviranja NF- $\kappa$ B inducirane kinaze NIK koja fosforilacijom aktivira IKK $\alpha$  kompleks, koji pak fosforilira dva serinska ostatka koji se nalaze u blizini ankyrin ponovljene C terminalne I $\kappa$ B domene p100, što dovodi do djelomične proteolize i oslobađanja od p52/RelB kompleksa.

NF- $\kappa$ B dimeri su sastavljeni od pet različitih genskih produkata, od kojih svi imaju regiju nazvanu Rel homologna regija. C- terminalna domena ove regije je odgovorna za dimerizaciju I- $\kappa$ B veze, gdje je N- terminalna domena primarno odgovorna za DNA specifičnosti (Gilmore 2006).

Postoje i drugi različiti putevi aktivacije NF- $\kappa$ B. Kod trećeg puta, P50 (ili P52) homodimeri ulaze u jezgru, gdje postanu transkripcijski aktivatori na temelju međureakcije s I $\kappa$ B sličnim koaktivatorom Bcl-3 (ili I $\kappa$ B). Kako je točno reguliran put 3, ne zna se. U sva tri puta, razne posttranslacijske promjene (npr. fosforilacija, acetilacija i prolil izomerizacija) kod NF- $\kappa$ B podjedinica mogu dovesti do transkripcijske aktivnosti (Gilmore 2006).

P50-P50 dimer je transkripcijski represor više nego aktivator porodice. Protein se sastoji od obitelji strukturno povezanih čimbenika koji kontroliraju transkripciju DNA, a nalazi se u jezgri i uključeni su u kontrolu velikog broja normalnih staničnih procesa, kao što su upalni i imunosni odgovor, stanični rast i apoptoza. Ovi faktori djeluju kod više različitih bolesti, uključujući karcinom, artritis, kronične upale, astmu, neurodegenerativne bolesti, te bolesti srca. NF- $\kappa$ B regulira gene koji kontroliraju staničnu proliferaciju i karcinogenezu i dovode do stanične smrti (Chen i sur. 2000).



Povezanost između NF- $\kappa$ B i tumorske geneze je komplicirana. Kemoterapijski lijekovi, citokini i zračenje potiču stvaranje NF- $\kappa$ B signala. Kod bolesnika koji imaju maligno oboljenje, NF- $\kappa$ B potiče rast metastaza, ako je prisutna kronična upala i ako postoji potreba za kirurškim zahvatom, dok kod akutne upale inhibira rast karcinomskih stanica. Taj paradoksalan učinak NF- $\kappa$ B nije dobro razjašnjen (Nishikori 2005).

NF- $\kappa$ B pogađa mnoge gene koji omogućuju dalje tumorsku progresiju, upalu, stanično preživljenje, angiogenezu, proliferaciju i pojavu metastaza. Geni koji su pod kontrolom NF- $\kappa$ B su: upalni citokini su TNF, IL-1, IL-6, IL-12, limfotoksin  $\alpha/\beta$ , GM-CSF, IFN- $\beta$ .

Bitni kemokini pod kontrolom NF- $\kappa$ B su: IL-8, MIP-1a (makrofagni inflamatorni protein 1a), MCP (monocitni kemotaktični protein), eotaksin. Adhezijske molekule su: ICAM-1 (unutarstanične adhezijske molekule-1), VCAM-1 (vaskularne adhezijske molekule-1), E-selektin. Imune efektorske molekule su: FasL, iNOS (inducibilna dušik oksid sintaza), COX-2 (ciklooksigenazu-2). Geni bitni za stanično preživljenje pod kontrolom NF- $\kappa$ B su: BCL-XL, A1, c-IAP, XIAP1, c FLIP. Geni bitni za angiogenezu i pod kontrolom NF- $\kappa$ B su VEGF, TNF, IL-1, IL-8. Tumorska proliferacija pod kontrolom NF- $\kappa$ B je povezana s TNF, IL-1, IL-8, ciklin D1 i c-Myc, dok je tumorska prisutnost pod kontrolom NF- $\kappa$ B povezana s COX2 i iNOS, MMP-8 (metaloproteinaza-8), uPA (urokinaza plazminogen aktivator). Metastaze su pod kontrolom ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 (endotelijalne-leukocitne adhezijske molekule - 1) (Nishikori 2005).

NF- $\kappa$ B igra glavnu ulogu u reguliranju ekspresije gena bitnih za stvaranje urođenog i adaptivnog imunološkog odgovora. BCL-3 je prvi put izdvojen kao gen koji je uključen u rekurentnu translokaciju kod određenih slučajeva B-CLL-a. Opisan je i kod izražene ekspresije t(2;5) ALCL. BCL-3 gen dovodi do splenomegalije i nakupljanja zrelih B stanica u limfnim čvorovima, koštanoj srži i peritonealnoj šupljini, ali sam nije dovoljan da dovede do malignosti. Bcl-3 je uključen u prevenciji aktivacijom induciranih stanica smrti kod T stanica. Translokacija t(2;5) osigurava nukleofosmin (NPM) gen kod anaplastičnog limfoma kinaze (ALK) gena, vodeći ka produkciji NPM/ALK fuzijskog proteina s aberantnom aktivnosti tirozin kinaze. Ekspresija Bcl-3 proteina lokaliziranog u jezgri gdje se veže na p50 homodimer predstavlja jedno nestimulirano stanje. Stimulacija na površini CD30 kod t(2;5) ALCL rezultira u daljnjem nadgledanju Bcl-3 i hiperfosforilaciji proteina. Stimulacija CD30 aktivira alternativni NF- $\kappa$ B put vodeći u stvaranje trojnog kompleksa između Bcl-3 proteina i p52 homodimera. Iako njegova uloga u onkogenezi ostaje nejasna, Bcl-3 utječe na klasični i

alternativni put kod ALCL. Stimulacija CD30 stanica uzrokuje apoptozu kod ALCL, ali ne i kod Hodgkinove bolesti (Nishikori 2005).

NF- $\kappa$ B2/p100 gen se nalazi kod 1-2% B-NHL-a, kod B-CLL-a, i multiplih mijeloma, te kod zrelih T-staničnih NHL (14%), kao što su limfomi (lat. *mycosis fungoides* i *Sezary sindrom*). C-REL amplifikacija je povratna genetska abnormalnost kod limfoma (Nishikori 2005). Amplifikacija C-REL lokusa može se vidjeti kod svih podgrupa DLBCL, broj C-REL kopija nije povezan s akumulacijom aktivnog c-Rel, a to sugerira da C-REL nema za posljedicu funkcionalnu amplifikaciju 2p12-16. Smatra se da je trajna aktivacija NF- $\kappa$ B ključna za razvoj bolesti i za patogenezu ABC podgrupe DLBCL-a. Genska amplifikacija C-REL često ide s GCB podtipom DLBCL (Davis i sur. 2001, Nishikori 2005).

Urođeni i adaptivni imunitet su glavni obrambeni mehanizmi viših organizama protiv inherentnih i ekoloških prijetnji. Urođena imunost je prisutna već kod jednostaničnih organizama, ali evolucijom su nastali novi adaptivni mehanizmi bitni za imunološku obranu. Tijekom starenja adaptivni imunitet značajno opada. Signalni mehanizmi koji su uključeni u prirodenu imunost su konzervirani tijekom evolucije. Prirodna imunost je aktivirana karakterističnim pro- upalnim profilom. Glavni regulator prirodene imunosti je NF- $\kappa$ B sustav (Salminen i sur. 2007).

Limfociti imaju konstitutivnu NF- $\kappa$ B aktivnost vezanu za jezgru, dok druge humane stanice imaju latentnu NF- $\kappa$ B aktivnost u citoplazmi. Mitogena aktivacija dovodi do oslobađanja NF- $\kappa$ B dimera od inhibitora i nastaje posljedično nuklearna translokacija. Nuklearni NF- $\kappa$ B je sposoban aktivirati transkripciju ciljanih gena kod ne- B stanica, kao i kod B stanica. NF- $\kappa$ B aktivacija je značajna komponenta T-stanične aktivacije i prirodnog imunog odgovora. U klasičnom NF- $\kappa$ B dimeru NF- $\kappa$ B1/p50 i RelA/p65, su zadržani u citoplazmi vezani na inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ . Oni blokiraju efektivno nuklearnu translokaciju NF- $\kappa$ B i pošalju nuklearni NF- $\kappa$ B dimere nazad u citoplazmu. Nuklearna akumulacija i aktivacija ciljanih gena je rezultat degradacije proteasoma I $\kappa$ B $\alpha$ . Fosforilacija I $\kappa$ B $\alpha$  se obavlja pomoću I $\kappa$ B kompleksa (IKK). Regulacija IKK aktivnosti i veliki broj signalnih događanja je ključno zbivanje za aktivaciju NF- $\kappa$ B. Aktivirani poticaji uključuju signale T i B staničnih receptora, prirodene imunosne receptore i receptore za razne citokine i faktore rasta (Rabson i sur. 2005).

Dobro je poznato da klasični NF- $\kappa$ B baziran na I $\kappa$ B razgradnji ovisnoj o IKK $\beta$  predstavlja ključan proces za prirodenu imunost. Nedostatak RelA i IKK $\beta$  rezultira u porastu osjetljivosti na infekcije. Aktivacija i nuklearna translokacija klasičnih NF- $\kappa$ B dimera (najčešće RelA/p50) je povezana s porastom genske transkripcije kodiranjem kemokina, citokina, adhezijskih

molekula/unutarstaničnih adhezijskih molekula-1 (ICAM-1) vaskularnih adhezijskih molekula-1 (VCAM-1) i endotelijalne-leukocitne adhezijske molekule -1 (ELAM). Te molekule su značajne komponente prirodene imunosti kod invazije mikroorganizama i potrebne su za migraciju upalnih i fagocitnih stanica u tkiva gdje je NF- $\kappa$ B aktiviran u odgovoru na infekciju. Veliki broj bakterija i bakterijskih produkata aktivira NF- $\kappa$ B u makrofagima i drugim tipovima stanica. Invazivne bakterije mogu aktivirati NF- $\kappa$ B kod intestinalnih epitelnih stanica, a proces tada vodi u produkciju upalnih medijatora uključujući kemokine / (MCP-1, IL-8/, te TNF, ICAM i ciklooksigenazu-2 (COX-2). Aktivirani fagociti ubijaju stanice i fagocitiraju ih. Prisutne bakterijske antigene pomiču u sekundarne limfoidne organe. IKK $\beta$  i RelA su potrebni kod limfoidnih stanica za supresiju apoptoze kod odgovora na TNF $\alpha$  (Bonizzi i sur. 2004).

U adaptivnoj imunosti je bitan razvoj limfoidnih organa koji nastaje alternativnim putem aktivacije NF- $\kappa$ B. U bijeloj pulpi slezene područje B stanica sadrži primarne B folikle, koji su vrlo dobro odvojeni od T-stanične zone. Imunizacijom nastaju germinalni centri sa sekundarnim B-staničnim foliklima, koji se nalaze na mjestu intenzivne B-stanične proliferacije, selekcije, sazrijevanja i smrti za vrijeme odgovora na antitijela (Bonizzi i sur. 2004). Germinal centar sadrži folikularne dendritične stanice, koji su ključni za održavanje imunološke memorije. RelA i RelB su ključni za razvoj Peyerovih otočića i limfnih čvorova (Bonizzi i sur. 2004).

Aktivacija NF- $\kappa$ B može rezultirati aktiviranjem raznih citokina, faktora rasta, i tirozin kinaza. Receptori za epidermalni faktor rasta, inzulinski faktor rasta i TNF receptor mogu biti odgovorni za aktivaciju NF- $\kappa$ B. U klasičnom NF- $\kappa$ B putu dimeri sadrže ili RelA ili c-Rel zajedno s p50. Dimeri se održavaju inaktivni u citoplazmi pomoću međureakcije sa I $\kappa$ B proteinima. Taj put je tipični okidač za proupalne citokine i virusne infekcije (Dolcet i sur. 2005).

Aktivacija NF- $\kappa$ B je rezultat mnogih signalnih puteva koji mogu spajati razna mjesta signalnih procesa. Protuupalni lijekovi mogu inhibirati NF- $\kappa$ B ometanjem IKK aktivnosti. Drugi način NF- $\kappa$ B inhibicije je proces razgradnje proteazoma. Proteazomski inhibitori preveniraju NF- $\kappa$ B aktivaciju blokirajući I $\kappa$ Bs, NF- $\kappa$ B1/p105 ili NF- $\kappa$ B2/p100. Inhibicija proteazoma se vidi u blokadi I $\kappa$ B. Proteazomi su konstitutivno uključeni u mikrookoliš. NF- $\kappa$ B je okidač za diferencijaciju i aktiviranje osteoklasta i njihovih prethodnika kojim može komunicirati s RANK ligandom na BMSC i stvoriti prepoznatljive osteolitičke lezije,

inhibirajući translokaciju NF- $\kappa$ B u jezgru. Aktivnost NF- $\kappa$ B se može inhibirati pomoću inhibitora proteazoma poput bortezomiba (Dolcet 2005, Juvekar 2011).

Mnogi modeli na životinjama imaju dokaze o ulozi NF- $\kappa$ B kod zloćudnih bolesti. V-Rel je virusni homolog c-Rel otkriven kao transformirani gen ptičjeg retrovirusa, koji je visoko onkogen i uzrokuje agresivni limfom i leukemiju kod kokoši. Neki virusni onkoproteini mogu biti u međureakciji s IKK kompleksom i uzrokovati NF- $\kappa$ B aktivaciju. Tax onkoprotein pronađen kod HTLV-1 inducira aktivnost NF- $\kappa$ B i njegova aktivacija je potrebna za transformaciju fibroblasta ka HTLV-1 tax proteinu. Amplifikacija c-Rel na kromosomu 2p14-15 rezultira u porastu genske ekspresije kod ekstranodalnih DLBCL i nodalnih limfoma (Dolcet i sur. 2005).

Zrele B stanice odgovaraju na dvije skupine antigena, tzv. timus neovisni i timus ovisni antigeni. Polivalentni antigeni mogu aktivirati B stanice bez pomoći T stanica. Zrele B stanice izražavaju različite oblike NF- $\kappa$ B. U mirovanju stanica, NF- $\kappa$ B1/c-Rel heterodimeri i NF- $\kappa$ B1 homodimeri dominiraju s RelA (NF- $\kappa$ B1/RelA, c-Rel/RelA,) i NF- $\kappa$ B2 (NF- $\kappa$ B2/RelB, NF- $\kappa$ B2 homodimeri), ali s nižim razinama. Niža ekspresija NF- $\kappa$ B u jezgri kod klasičnog i alternativnog puta je značajka neaktiviranih B stanica i služe za preživljenje (Gerondakis i sur. 2010).

Funkcionalni i razvojni ishod za B stanice, koji uključuje proliferaciju, diferencijaciju i opstanak se vidi kod kvalitativne i kvantitativne prirode NF- $\kappa$ B odgovora, a proizlaze iz pojedine vrste aktivacije signala. BCR, CD40 i TLR receptori su uključeni u B staničnu diferencijaciju (Gerondakis i sur. 2010).

Uloge NF- $\kappa$ B u B-staničnoj diobi. Nakon stimulacije kroz BCR, CD40, ili TLR4/TL R9, zrele mirne B stanice u G0 ulaze u G1 i NF- $\kappa$ B prolazi fazu ovisan o faktoru rasta. B-stanični rast nastavlja do kasne G1 faze i u tom trenutku NF- $\kappa$ B je potreban za ulazak u S-fazi. Naknadni koraci u B-staničnom ciklusu dovode do neovisnog NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B regulira preživljenje pomoću signala povezanih s B-staničnom aktivacijom (Gerondakis i sur. 2010).

Kod DLBCL aktivacija NF- $\kappa$ B nastaje posredstvom klasičnog puta i fosforilacijom p65 koji je povezan s povoljnom prognozom (Espinosa i sur. 2008). Aktivacija NF- $\kappa$ B kod DLBCL je složen proces, jer se temelji na genetskim lezijama nekoliko gena. NF- $\kappa$ B –I $\kappa$ B $\alpha$  je kompleks koji neprekidno cirkulira između jezgre i citoplazme, ali je njegova brzina izlaska iz jezgre veća od ulaska u jezgru, a time je i veći udio kompleksa u citoplazmi. U većine stanica, u citoplazmi je prisutan u inaktivnom obliku u I $\kappa$ B vezanom kompleksu. Kada stanica primi

neki od izvanstaničnih signala, NF- $\kappa$ B brzo ulazi u jezgru i aktivira ekspresiju gena. Nekoliko limfoidnih neoplazmi ima mutacije gena i amplifikacije koje dovode do aktivacije NF- $\kappa$ B.

NF- $\kappa$ B signalni put igra važnu ulogu u reguliranju preživljenja normalnih i malignih B stanica kontrolirajući mnoge regulatorne puteve za smrt stanice. NF- $\kappa$ B može poboljšati preživljenje stanica moduliranjem TNF $\alpha$  signala inhibiranjem apoptoze posredstvom FAS i ograničavanjem aktivnosti *BCL2*. Neki autori navode da aktivacija NF- $\kappa$ B pridonosi onkogenom učinku kod ABC fenotipa (Davis i sur. 2001, Rosenwald i sur. 2003). C-REL amplifikacije su podjedinice REL/NF- $\kappa$ B porodice, i češće se nalaze kod GBC fenotipa. C-REL amplifikacija nije često povezana s aktivacijom NF- $\kappa$ B (Houldsworth i sur. 2004).

Aktivacija NF- $\kappa$ B kod B-staničnih limfoma može biti određena nuklearnom lokalizacijom NF- $\kappa$ B podjedinica kao što je c-REL. U inaktivnoj fazi, NF- $\kappa$ B heterodimer (c-REL ili REL homolog A i NF- $\kappa$ B1) borave u citoplazmi vežući se na inhibitor kappa B signala (I- $\kappa$ B). Tijekom aktivacije NF- $\kappa$ B, I-kappa kinaza (I- $\kappa$ K) fosforilira I- $\kappa$ B što dovodi do razgradnje inhibitora citoplazmatskih NF- $\kappa$ B heterodimera, što uključuje c-REL pomaknut u jezgru gdje započinje transkripciju NF- $\kappa$ B ciljanih gena (Curry i sur. 2009).

Podgrupa ABC DLBCL ima visoku NF- $\kappa$ B aktivnost u jezgri, aktivnost I $\kappa$ B kinaze i nagli pad I $\kappa$ B $\alpha$  koji se nalazi kod GCB podgrupe (Davis i sur. 2001).

### ***BCL2* gen i njegov proteinski produkt**

*BCL2* (B cell lymphoma 2) je protoonkogen smješten u regiji 18q21. Otkriven je kloniranjem t(14;18)(q32;q21)/IgH-BCL2 u folikularnog limfoma. On promiče B stanično preživljenje inhibirajući apoptozu (Wei i sur. 2004).

Bcl2 obitelj uključuje antiapoptotičke i proapoptotičke molekule. Slijedeći signale smrti stanice, proapoptotički homodimeri mijenjaju membranski potencijal mitohondrija i oslobađaju citokrom C, koji aktivira proteolitički enzim kaspazu 9, te tako potiče apoptozu. Povećana razina antiapoptotičkih proteina dovodi do stvaranja antiapoptotički/proapoptotičkih heterodimera ograničavajući utjecaj signala smrti stanice na membranski potencijal mitohondrija. Bcl2 protein je antiapoptotički protein, njegova povećana ekspresija štiti stanice od procesa programirane stanične smrti, a posljedično nakupljanje stanica čini osnovu nastanka limfoma. Povećana ekspresija Bcl2 je također odgovorna za kemoterapijsku rezistenciju (Wei i sur. 2004).

Pojačana ekspresija Bcl2 zabilježena je u oko 50% DLBCL. Od toga, samo 15% ima t(14;18), te to ukazuje da drugi mehanizam regulira ekspresiju proteina (Barans i sur. 2003, Igbal i sur. 2004). Poremećena regulacija *BCL2* je prisutna kod svih podtipova DLBCL (Alizadeh i sur. 2000). U GCB podtipu *BCL2* je povezan s t(14;18), dok je u ABC podtipu viši nivo Bcl2 posljedica amplifikacije *BCL2* gena ili aktivacije NF-κB (Rosenwald i sur. 2002, Igbal i sur. 2004, Kusumoto i sur. 2005). Osim toga, GCB limfomi pokazuju visoku ekspresiju pro-apoptotičkih proteina Bax, Bak i Bid, i nisku ekspresiju anti-apoptotičkih Bcl-xL proteina (Bai i sur. 2004).

Anti-apoptotička uloga Bcl2 je bitna za opstanak limfomskih stanica (Kramer i sur.1998). Prognostička vrijednost ekspresije Bcl2 proteina je nerazjašnjena. Neka istraživanja su pokazala negativan utjecaj ekspresije Bcl2 na preživljenje (Barrans i sur. 2002, Colomo i sur. 2003, Lossos i sur. 2004, Berglund i sur. 2005, Amen i sur. 2007, Seki i sur. 2009), dok drugi autori smatraju da nema utjecaj na preživljenje (Hirose i sur. 2005, Wilson i sur. 2007, Winter i sur. 2008). Ekspresija Bcl2 proteina i aberacije *BCL2* gena imaju loš ishod samo u ABC podskupini (Igbal i sur. 2006, Oberman i sur. 2009).

### ***BCL6* gen i njegov proteinski produkt**

Transkripcijski represor Bcl6 protein posreduje kod preživljenja, proliferacije i diferencijacije B-stanica, koje reguliraju razvoj germinativnog centra. Promjena regulacije *BCL6* gena nastaje kao posljedica kromosomskih translokacija, mikrodelecija, točkastih mutacija i hipermutacija. Pojačana ekspresija *BCL6* gena dovodi do zastoja u sazrijevanju i proliferaciji B stanica, te smanjuje p53 apoptotički odgovor na oštećenje DNA tijekom transformacije stanica germinativnog centra potičući nastale maligne klonove (Cerchietti i sur. 2000, Carbone i sur. 2001, Hoefnagel i sur. 2003, Bai i sur. 2003, Cattoretti i sur. 2005,).

Proto-onkogen *BCL6* je uključen u kromosomalnu translokaciju regije 3q27, dovodeći *BCL6* gen pod kontrolu lokusa gena imunoglobulinskih lanaca (Xu 2000). *BCL6* je jako izražen u GC B i T limfocita, i kod limfoma koji su porijeklom od GC. Učestalost *BCL6* translokacije i pregradnja je veća u ABC podskupini nego u GCB podskupini (Carbone i sur. 2001, Igbal i sur. 2007). Bcl6 protein sam ili u kombinaciji s drugim markerima germinalnog centra predviđa povoljnije preživljenje kod bolesnika s DLBCL. Drugi autori sugeriraju da prisutnost *BCL6* gena ili mutacije nemaju nikakvog utjecaja na ishod bolesnika sa DLBCL (Capello i sur. 2000, Jerkeman i sur. 2002).

Visoki nivo *BCL6* mRNA ili Bcl6 ekspresija u limfomskim stanicama je povezana s značajno boljim preživljenjem (Pasqualucci i sur. 2003, Losos i sur. 2004, Rosenwald i sur. 2002, Hans

i sur. 2004, Bai i sur. 2005, Igbal i sur. 2007, Saito i sur. 2007, Seki i sur. 2009), dok drugi ne nalaze prognostički značaj (Kawasaki i sur. 2001, Colomo i sur. 2003,) ili navode nepovoljan ishod u tih bolesnika (Wright i sur. 2003, Basquiera i sur. 2005,). Osim toga, Winter i sur. napominju da dodatak rituksimaba CHOP-u mijenja prognostičku vrijednost *BCL6*. Ozbiljna istraživanja govore da je *BCL6* pozitivnost povezana sa boljim preživljenjem nakon primjene imunokemoterapije (Winter i sur. 2006, Seki i sur. 2006).

### ***C-MYC* gen i njegov proteinski produkt**

*C-MYC* gen je lociran na 8q24 i povezan je s translokacijom t(8;14)(q24;q32). To je bila prva ponavljajuća kromosomska abnormalnost ikada objavljena u limfoproliferativnih oboljenja. Postavljanje *c-MYC* na mjesto pored IGH, rezultira ekspresijom c-Myc proteina, a to je ključni transkripcijski faktor koji potiče stanični ciklus i tumorsku proliferaciju. 8q24/*c-MYC* preuređenje se nalazi u 7% do 15% limfoma ABC podgrupe DLBCL i izviješća su pretežno povezana s ektranodalnom lokalizacijom (Le Gouill i sur. 2007, Iros i sur. 2007, Niitsu i sur. 2009).

*C-MYC* translokacija je karakteristična za Burkittov limfom, gdje se nalazi u 80% do 90% slučajeva (Iros i sur. 2007).

*C-MYC* kod DLBCL je uključen u koegzistenciju s translokacijom t(8;14)(q24;q32). Rjeđe se nalaze translokacije t(2;8)(p12;q24) i t(8;22)(q24;q11). Ove translokacije nisu specifične. Učestalost 8q24/*MYC* translokacije je veća kod limfoidnih neoplazmi s morfološkim i imunofenotipskim značajkama između BL i DLBCL, i kod slučajeva DLBCL s visokom stupnjem proliferacije (> 80%) (Iros i sur. 2007). Aktivnost c-Myc ovisi o povezanosti s Max proteinom. Regulacija c-Myc proteina je obično posljedica kromosomske translokacije. Povećana ekspresija *c-MYC* dovodi do proliferacije i ekspresije drugih gena uključenih u stanični rast (Iros i sur. 2007, Niitsu i sur. 2009).

*C-MYC* aktivira gene koji promoviraju apoptozu stanica i takvi aktivirani geni promiču progresiju staničnog ciklusa i s druge strane suprimiraju inhibitorne proteine slične p21CIP1 i p27KIP1.

Paradoksalno, *c-MYC* potiče apoptozu putem p19ARF-p53 apoptotičkog puta. Čini se da je češće prisutan u DLBCL s ektranodalnom zahvaćenom bolesti i povezan je s agresivnijim kliničkim tijekom, te lošijim petogodišnjim preživljenjem i općenitim preživljenjem (Chang i sur. 2003, Le Gouill i sur. 2007, Zhao i sur. 2008, Niitsu i sur. 2009, Savage i sur. 2010). Visoko rizični bolesnici imaju dobar odgovor na terapiju, koja uključuje rituksimab (Lin i sur. 2007, Iros i sur. 2007, Niitsu i sur. 2009, Jonson i sur. 2009, Smuderl i sur. 2010).



## 2.4 Dvostruka/trostruka translokacija kod DLBCL

B stanični limfom s *BCL2* i *MYC* ili dvostrukom translokacijom na imunoglobulinu (Ig) genu poznat kao “dual hit“ limfom (DHL) je vrlo rijetko oboljenje s vrlo lošim kliničkim tijekom, kompleksnim kariotipom, uz cijeli niz patoloških značajki koje se preklapaju s Burkittovim limfomom (BL), DLBCL i B-limfoblastičnim limfomom/ leukemijom (B-LBL).

Translokacija *BCL2* gena na kromosomu 18q21.3 dovodi do ekspresije proteina Bcl2 i inhibicije apoptoze. *BCL2* je obično pomaknut u područje gena imunoglobulina (*IGH*) teškog lanca i poznat je kao t(14;18)(q32;q21.3). *MYC* gen je na 8q24 i ubrzava staničnu proliferaciju (Tomito i sur. 2010).

Ovo je translokacijski znak klasičnih Burkittovih limfoma (BL), ali je također pronađen visok postotak slučajeva prethodno poznat kao atipični Burkitt/sličan Burkitt limfom (BLL) i nalazi se kod 41% do 80% bolesnika s tim tipom limfoma. Kod podgrupe DLBCL se nalazi u 5% do 8% bolesnika. *BCL2* i *MYC* translokacije se mogu naći istodobno u istom uzorku, to je takozvani “dvostruki udarac“, koji se može predstaviti promjenjivom morfologijom, uključujući i akutnu limfoblastičnu leukemiju/limfom (ALL), DLBCL i rijetko folikularni limfom (Le Gouill i sur. 2007, Iros i sur. 2007).

Agresivno ponašanje i klinička kombinacija genetskih abnormalnosti u tim slučajevima mogu zahtijevati kategorizaciju kao zaseban entitet u budućih klasifikacija i poziv za agresivniji terapijski pristup (Jonson i sur. 2009, Snuderl i sur. 2010, Tomito i sur. 2011).

Trostruka translokacija (“triple hit“ lymphm) je rijetki entitet. Geni imunoglobulina teškog lanca (*IGH*) i preuređenje limfoma je prisutno uz istovremeno preuređenje *MYC*, *BCL6* i *BCL2* lokusa. Ovaj entitet se grupira s limfomom dvostruke translokacije (“double hit“ limfomom) u SZO klasifikaciji, s karakteristikama između DLBCL i BL. Imunohistokemijskom analizom se nalaze srednje veliki limfociti koji su pozitivni na *BCL2* i *BCL6*. Proliferativni indeks K67 je bio 90%. Diseminacija u koštanu srž je rani događaj, a često se nalazi i leukemična slika već kod dijagnoze.

## 2.5 Drugi algoritmi koji definiraju porijeklo stanica

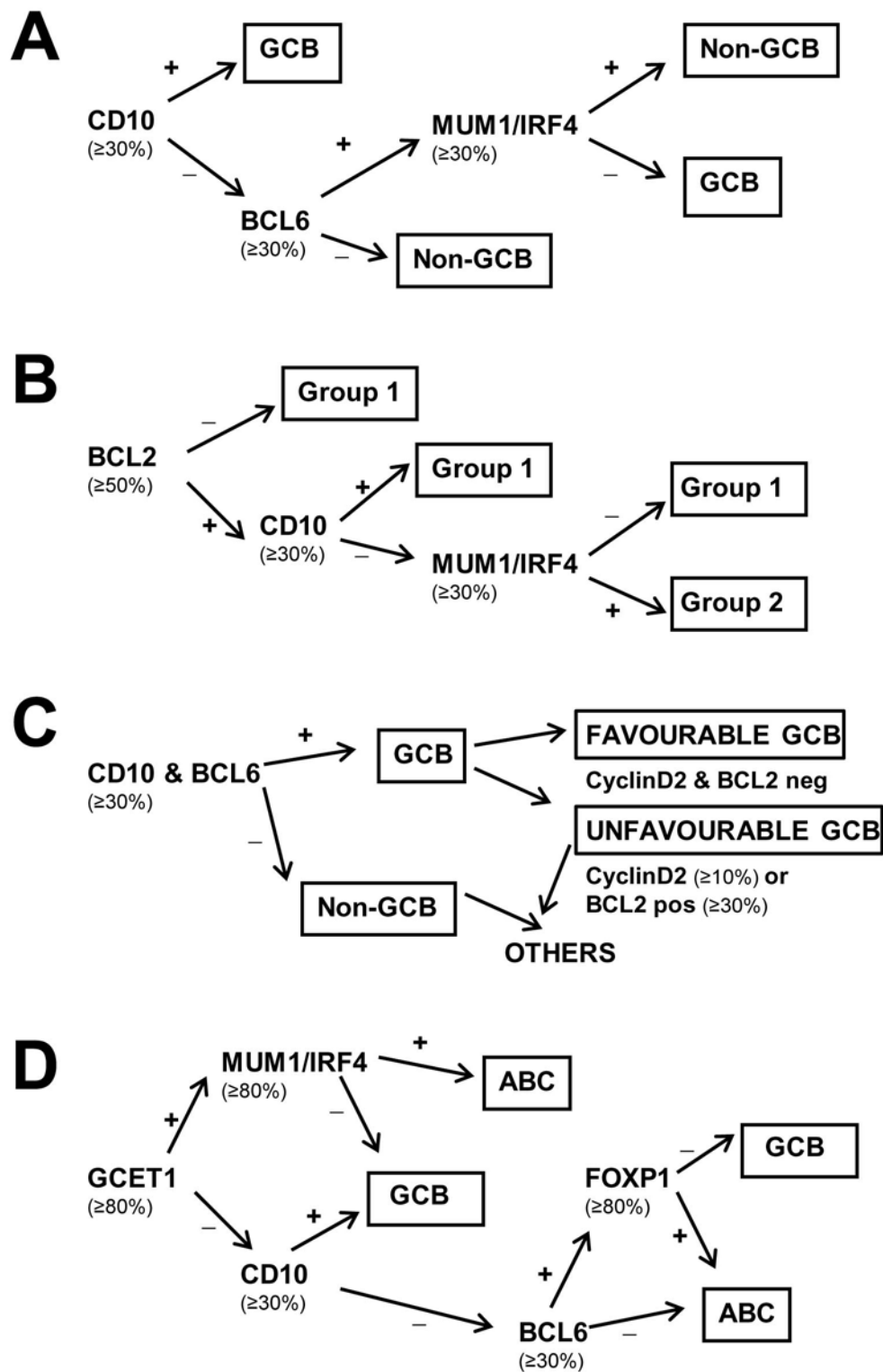
Za daljnje definiranje fenotipskih značajki DLBCL, Muris i sur. (2006) su razvili algoritam koji se temelji na anti-apoptotičkom proteinu Bcl2. Bolesnici su bili definirani kao GCB ili ABC fenotip izostavljanjem *BCL6* iz algoritma i ta podjela definira podtipove prema prisutnosti CD10 i *MUM1/IRF4*. Ako su CD10+ ili CD10- i *MUM1/IRF4*- to se smatralo GCB fenotipom. Ako je imao CD10- i *MUM1/IRF4*+ ekspresiju, to je smatrano kao ABC

podgrupa, ali ishod je bio sličan za oba algoritma. *BCL2* i *CD10* su uočeni kao neovisni prognostički biljezi. Muris algoritam predstavlja daljne modificiranje DLBCL u povoljnu (skupina 1) i nepovoljnu (skupina 2) podgrupu. Skupina 2 se sastoji od *BCL2+*, *CD10-* i *MUM1/IRF4+* slučajeva, dok ostali fenotipovi pripadaju skupini 1. Povoljne i nepovoljne podgrupe pokazuju značajne razlike u preživljenju. Prognostički utjecaj algoritma je neovisan o stupnju rizika za smrtni ishod koji predviđa MPI (Muris i sur. 2006) (Slika 1 B).

Sjö i sur. (2007) su potvrdili prognostičku vrijednost podjele na skupinu 1 i 2, ali je ustanovljeno da Hans algoritam ima bolju prognostičku vrijednost od Muris algoritma.

Dodatni pokušaj za poboljšanje klasifikacije DLBCL je nastao na temelju algoritma koji se sastoji od *CD10*, *BCL6*, *Cyklin D2* i *BCL2* (Amen i sur. 2007). Pozitivni slučajevi *CD10* i *BCL6* predstavljaju GCB fenotip, dok *CD10* i *BCL6* negativni slučajevi pripadaju ABC fenotipu. GCB podgrupa je dalje podijeljena u slučajevima s povoljnom prognozom (*BCL2* i *Cyklin D2* negativni) i nepovoljnom prognozom (*Cyklin D2*  $\geq 10\%$  pozitivnih stanica ili *BCL2*  $\geq 30\%$  stanica) (Slika 1 C)

Choi i sur. (2009) su uzeli za podjelu na GCB i ne-GCB DLBCL novi algoritam u kojem su analizirali: *GCET1*, *CD10*, *BCL6*, *MUM1/IRF4* i *FOXP1*. Novi algoritam je potvrdio valjanost podjele DLBCL i primjenu kod bolesnika koji su dobivali kemoterapiju i imunokemoterapiju. Novi algoritam predviđa trogodišnje preživljenje kod bolesnika s GCB podgrupom 87% i kod ABC podgrupe preživljenje je 44% (Slika 1 D).



**Slika 1.** Klasifikacije DLBCL-imunohistokemijski algoritmi.

A: Algoritam Hans i sur. (2004). B: Algoritam Muris i sur. (2006). C: Algoritam Amen i sur. (2007). D: Algoritam Choi i sur. (2009)

## 2.6

### 2.7 Kliničke karakteristike DLBCL

Kliničke manifestacije bolesti mogu imati nodalni ili ekstrapnodalni oblik. Bolest se očituje pojavom bezbolnih limfnih čvorova koji se postepeno povećavaju. Bolesnici obično imaju limfne čvorove manje veličine u trenutku postavljanja dijagnoze, ali su zato prisutni opći simptomi. U oko četvrtine broja bolesnika prisutne tegobe su posljedica ekstrapnodalne limfomske infiltracije, kao što su grlobolja, smetnje gutanja, krvarenje iz probavnog sustava ili simptomi i znakovi opstrukcije u probavnom sustavu, infiltracije kosti, kože, pluća, središnjeg živčanog sustava. U dijela bolesnika izraženi su opći simptomi - povišena tjelesna temperatura, noćno znojenje ili gubitak tjelesne težine, svrbež kože. U trenutku postavljanja dijagnoze najčešći fizikalni nalaz su povećani limfni čvorovi, hepatomegalija i splenomegalija. Bez adekvatne terapije do letalnog ishoda dovodi brza progresija bolesti i naglo povećanje tumorske mase (Dyer i sur. 2000).

Mnogi klinički parametri imaju kod tog tipa limfoma prognostičku značajnost. To uključuje životnu dob, stadij bolesti po Ann Arbor klasifikaciji, prisutnost općih simptoma, veličinu tumorske mase, prisutnost ekstrapnodalno zahvaćene bolesti, opće stanje bolesnika, aktivnost serumske laktat dehidrogenaze. Svi ti parametri su uključeni u MPI, i predstavljaju kliničke karakteristike bolesnika prije početka terapije (Shipp i sur. 1993).

U 11% do 23% slučajeva DLBCL s uznapredovalim kliničkim stadijem bolesti otkriveno je devet regija kromosomskih amplifikacija i izdvojeni su amplificirani geni s mogućom ulogom u nastanku limfoma. Klinički značaj svake pojedinačne promjene nije utvrđen, ali su pojedine promjene povezane s uznapredovalim kliničkim stadijem ili lošijim odgovorom na terapiju. Navedene kromosomske abnormalnosti uglavnom se ne nalaze kao pojedinačne promjene. Nakupljanje većeg broja abnormalnosti ukazuje na progresiju genetičkih promjena, što ima važnu ulogu u patogenezi DLBCL (Bea i sur. 2005).

MPI je prognostički model koji se je pokazao prognostički korisnim za indolentne i agresivne limfome. Temelji se na kliničkim značajkama bolesnika prije početka liječenja. Međutim, uvidjelo se da je koristan i kod bolesnika s agresivnim oblikom bolesti (Ship i sur. 1993, Uherova i sur. 2001).

Nasuprot tome, biološki biljezi (imunofenotip i genske promjene) nisu pouzdani za predviđanje ishoda u bolesnika s DLBCL. Pokušalo se povezati određene imunofenotipske i genske karakteristike s različitim kliničkim ishodom i to je dalo kontroverzne rezultate.

Bcl6 protein sam ili u kombinaciji s drugim biljezima germinativnog centra predviđa povoljniji ishod kod bolesnika s DLBCL (Saito i sur. 2007). Bolesnici s *BCL6* preuređenjem imaju različitu prognozu, te pojedina istraživanja navode povoljan prognostički značaj (Pasqualucci i sur. 2003, Hans i sur. 2004, Lossos i sur. 2005, Bai i sur. 2005), dok drugi autori ne nalaze prognostički značaj (Kawasaki i sur. 2001, Colomo i sur. 2003,) ili navode nepovoljan ishod (Wright i sur. 2003, Basquiera i sur. 2005,).

Prognostička značajnost CD10+ stanica nije jasna. U nekim istraživanjima duže preživljenje je objašnjeno prisutnošću CD10 (Bea i sur. 2003, Hans i sur. 2004, Biasoli i sur. 2005, Muris i sur. 2006, Oh i sur. 2006, Seki i sur. 2009), dok drugi autori nisu primjetili nikakvu razliku u preživljenju bolesnika sa DLBCL-om koji je bio CD10 pozitivan i CD10 negativan (Hojo i sur. 2001, Lossos i sur. 2004, Amen i sur. 2007, Anderson i sur. 2009). Neki autori sugeriraju da prisutnost CD10 u kombinaciji s kliničkim parametrima može odrediti prognozu kod bolesnika sa DLBCL.

MUM1/IRF4 je povezan s ABC podtipom, prediktivna vrijednost proteina često je ocijenjena kao dio algoritama. Kada se Mum1/IRF4 protein individualno ocjenjuje, pozitivna ekspresija je povezana s nepovoljnim preživljenjem kod bolesnika liječenih kemoterapijom (Imhof i sur. 2006, Blenk i sur. 2007, Amen i sur. 2007). Nasuprot tome, drugi autori su izvijestili da nema prognostičku vrijednost (Berglund i sur. 2005, Sjo i sur. 2007).

Povišena VEGF ekspresija je povezana s klinički agresivnim ABC podtipom koji ide s lošijom prognozom uključujući zahvaćenost ektranodalnog mjesta bolesti, infiltraciju koštane srži, infiltraciju centralnog nervnog sustava i pleuralni izljev. Visoka ekspresija VEGF povezana je s negativnim ishodom kod DLBCL bolesnika liječenih kemoterapijom (Le Gouil i sur. 2004, Kadowaki i sur. 2005, Grazinger i sur. 2009) i imunokemoterapijom (Grazinger i sur. 2010). Abnormalna angiogeneza je u porastu s progresijom stadija bolesti (Grazinger i sur. 2007, Grazinger i sur. 2010).

Prisutnost NF- $\kappa$ B kod GCB podgrupe je povezana s dobrom prognozom, dok je kod ABC podgrupe povezan s lošom prognozom. Aktivacija NF- $\kappa$ B nije specifična za ABC podgrupu DLBCL (Espinosa i sur. 2008). Prognostička vrijednost Bcl2 je nejasna. Neka istraživanja su pokazala negativan utjecaj Bcl2 ekspresije na preživljenje (Bea i sur. 2004, Amen i sur. 2007, Choi i sur. 2007, Iros i sur. 2007), dok su drugi primijetili da Bcl2 nema prediktivnu vrijednost (Rosenwald i sur. 2002). *C-MYC* je češće prisutan u DLBCL s ektranodalnim zahvaćanjem bolesti i povezan je s agresivnijim kliničkim tijekom, te lošijim preživljenjem (Lin i sur. 2007, Iros i sur. 2007, Niitsu i sur. 2009).

## Mjesta zahvaćenosti

Bolesnici se obično javljaju sa naglo nastalom tumorskom masom na jednom ili na više mjesta s nodalnom i ekstranodalnom zahvaćenošću. Jedna trećina do jedna četvrtina otpada na primarno ekstranodalnu lokalizaciju bolesti (Lopez-Guillermo i sur. 2005), dok neki autori navode da je ekstranodalna lokalizacija prisutna kod 40% bolesnika (Swerdlow i sur. 2008). Ekstranodalna lokalizacija je u stalnom porastu više nego nodalna (Lopez-Guillermo i sur. 2005).

Svaka ekstranodalna lokalizacija može biti primarno mjesto bolesti. Najčešće ekstranodalno mjesto je gastrointestinalni sustav (želudac ili ileocekalna regija) (Yeh i sur. 2005, Yang i sur. 2008), ali se može pojaviti u koži, CNS-u (Lin i sur. 2006), kostima, na testisu (Booman i sur. 2006), žlijezdama slinovnicama, genitalnom sustavu, plućima, bubrezima, jetri, tonzili, i slezeni. Zahvaćenost kosti kao primarnog sijela pojavljuje se u oko 11% do 27% slučajeva. Primarna prisutnost u kosti sa/ili bez zahvaćenosti periferne krvi je rijetka (Jerkeman i sur. 2004).

### ***2.7.1 Klinički prognostički čimbenici DLBCL***

DLBCL karakterizira vrlo brzo umnažanje stanica s posljedično uvećanim limfnim čvorovima. Prisutnost ekstranodalne infiltracije može napraviti zbrku u kliničkoj slici. Klinički stadij po Ann Arbor klasifikaciji, koji se temelji na širenju bolesti na susjedne limfne čvorove, prvotno je nastao za bolesnike za Hodgkinovu bolest (Carbone i sur. 1971). Kod oko 30% bolesnika limfom je lokaliziran u jednoj regiji limfnih čvorova (stadij I) ili zahvaća više regija limfnih čvorova ograničenih na jednoj strani dijafragme (stadij II). Bolesnici s više rasprostranjenom bolesti imaju zahvaćene čvorove s obje strane dijafragme (stadij III). U slučaju zahvaćenosti jednog ili više ekstranodalnih mjesta stadij je označen oznakom E (Harris i sur. 1994).

U trenutku postavljanja dijagnoze oko jedne trećine bolesnika imat će prisutne B simptome, uključujući gubitak tjelesne težine, noćno znojenje, temperaturu i svrbež kože. Zbog brzog napredovanja limfoma većina tumora s promjerom preko 10 cm se nalazi kod oko 30% bolesnika. Zahvaćenost ekstranodalnih mjesta i nekoliko limfnih čvorova u toj regiji se smatra negativnim čimbenikom za preživljenje (Yang i sur. 2008). Velika tumorska masa je također povezana s lošom prognozom (Pfreundschuh i sur. 2008).

Korištenjem pozitron emisijske tomografije sa fluor-18 fluorodeoksiglukoze ( $^{18}\text{F}$ FDG-PET) u kliničkoj praksi, a posebno u procjeni stadija bolesti i odgovora na terapiju dovela je do

revizije kriterija terapijskog odgovora.  $^{18}\text{F}$ FDG-PET definira proširenost bolesti, dok negativni  $^{18}\text{F}$ FDG-PET definira metaboličku remisiju (Cheson i sur. 2007).

Važno je otkriti bolesnike s visokim rizikom smrtnosti koji su potencijalno izlječivi ukoliko se podvrgnu adekvatnom liječenju. Bolesnicima s malim rizikom smrtnosti biti će dobro i nakon liječenja standardnim terapijskim shemama bez izlaganja mogućim ozbiljnim toksičnim učincima agresivne terapije.

Prognostički faktori koji karakteriziraju bolest mogu pomoći u planiranju, te analizi kliničkih ispitivanja. S obzirom na svaki karakterističan individualan pristup i korištenjem regresijske analize utvrđeno je da starija životna dob (Shipp i sur. 1993, Nikolandes i sur. 1998, Zucca i sur. 2000, Sehn i sur. 2007, Fenske i sur. 2009, Yi i sur. 2010), muški spol (Yi i sur. 2010, Nyman i sur. 2011), splenomegalija (Cornet i sur. 2009, Yi i sur. 2010), velika tumorska masa (Coiffier i sur. 1991, Panwalkar i sur. 2006, Yi i sur. 2010), stadij bolesti III i IV (Sehn i sur. 2006), B simptomi (Yang i sur. 2008, Yi i sur. 2010) i loše opće stanje bolesnika (Haberman i sur. 2006, Sehn i sur. 2006) predstavljaju loše prognostičke čimbenike. Visoki stupanj mitotske aktivnosti, infiltracija jetre (Sato i sur. 2007, Yi i sur. 2010), infiltracija slezene (Cornet 2009), infiltracija koštane srži (Coiffier i sur. 1991, Dumontet i sur. 1999, Yi i sur. 2010) su povezani s lošijom prognozom u bolesnika s DLBCL.

Bolesnici s anemijom (Lim i sur. 2000, Yi i sur. 2010), leukocitozom (Yi i sur. 2010), nižim brojem limfocita (Parker i sur. 1994, Planinc-Peraica i sur. 1999), trombocitopenijom (Planinc-Peraica i sur. 1999, Cox i sur. 2008), abnormalnim jetrenim testovima (Moralli i sur. 2001), povišenom aktivnosti laktat dehidrogenaze (Coiffier i sur. 1991, Shipp i sur. 1993, Dumontet i sur. 1999, Federico i sur. 2000, Zucca i sur. 2000, Sehn i sur. 2006, Yi i sur. 2010), hiperkalcemijom (Daroszewska i sur. 1999, Solimando i sur. 2001), hipoalbuminemijom (Bosly i sur. 1992, Dhaliwal i sur. 1993), hiponatrijemijom (Thieblemont i sur. 2008), te oni koji ne postižu kompletnu remisiju na provedenu terapiju (Conde i sur. 1994, Pasquini i sur. 1994) imaju lošiju prognozu. Kod DLBCL povišena razina interleukina-6 u serumu povezana je s lošijom prognozom (Sevmour i sur. 1995), dok je preuređenje gena *BCL6* prognostički biljeg za dobru prognozu (Offit i sur. 1994, Nyman i sur. 2007).

Prisutnost Bcl2 proteina je povezana sa nepovoljnom ishodom kod bolesnika obrađenih kemoterapijom (Blenk i sur. 2007).

*BCL6* je povezan s boljim ukupnim preživljenjem neovisno o MPI. Razlika u GCB i ACB se temelji na ekspresiji proteina Bcl6, CD10, i Mum i nije neovisna prognostička vrijednost (Wilken i sur. 2007).

U bolesnika s agresivnim NHL-om postoji povezanost intenziteta primljene relativne doze lijeka i preživljenja. Nađeno je i da postoji interakcija između Bcl2 i IL-10, koja omogućuje prevladavanje kemoterapijske rezistencije kod bolesnika s DLBCL (Park i sur. 2009).

Na temelju prediktivne vrijednosti pojedinih parametara, te njihovom kombinacijom i analizom prognostičkih čimbenika istovremeno je predloženo više prediktivnih modela. Na temelju multivarijantnih analiza bolesnici su grupirani u one s malim i one s velikim rizikom za smrtni ishod, dakle prognostički u dvije kategorije. Predloženi su i prognostički modeli s tri prognostičke grupe, gdje je osim navedenih bila i grupa sa srednjim rizikom.

Kod multivarijantne regresijske analize GELA istraživanje je pronašlo da je povišena razina beta-2-mikroglobulina više od 3 mg/L, te prisutnost više od jednog ekstanodalnog mjesta zahvaćenog bolešću može biti negativan prognostički čimbenik (Sehn i sur. 2006).

Veličina tumorske mase određuje mogućnost da bolesnik uđe u kompletnu remisiju. Kod velike tumorske mase mogućnost je 23% u usporedbi sa 64% kod bolesnika koji nemaju veliku tumorsku masu. Ta karakteristika je bitan parametar u predviđanju odgovora na terapiju (Sehn i sur. 2006).

Prethodna terapija je varijabla koja je označena kao druga vrlo bitna u predviđanju odgovora. Bolesnici koji su primali neki oblik kemoterapije ili radioterapije, kod ponovne primjene druge linije kod samo 36% bolesnika ostvaruje se kompletna remisija, dok bolesnici koji prethodno nisu primali terapiju imaju 70% vjerojatnost da će ući u kompletnu remisiju.

Broj limfocita je varijabla vrlo bitna u predviđanju odgovora na terapiju (Bari i sur. 2010).

Vrijednosti hemoglobina je varijabla koja je povezana s tumorskom masom i pri tome je značajna neovisna varijabla (Lim i sur. 2000).

Faktori bitni za predviđanje preživljenja su veličina tumorske mase, prethodna terapija i vrijednosti hemoglobina.

### ***2.7.2 Međunarodni prognostički indeks (MPI)***

Brojna istraživanja bolesnika s agresivnim ne-Hodgkinovim limfomima liječenih raznim kemoterapijskim shemama dokazale su prognostičku vrijednost raznih kliničkih i laboratorijskih parametara. Na temelju analiza takvih čimbenika predložen je prognostički model nazvan "Međunarodni prognostički indeks" (Shipp i sur. 1993). Prema tom prognostičkom modelu bolesnici se na temelju broja negativnih prognostičkih čimbenika prisutnih u vrijeme postavljanja dijagnoze svrstavaju u četiri grupe koje se razlikuju po



preživljenju. Definirano je pet kliničkih čimbenika: dob iznad 60 godina, stadij bolesti III ili IV, povišena aktivnost serumske laktat dehidrogenaze, više od jednog zahvaćenog ektranodalnog mjesta i opće stanje bolesnika 2 ili 3 ocijenjeno prema Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). Ovakva podjela otkriva rizične grupe s različitim razdobljem preživljenja. Petogodišnje preživljenje je promatrano za niski rizik (ni jedan ili jedan čimbenik), niski intermedijarni (dva čimbenika), visoki intermedijarni rizik (tri čimbenika) i visoki rizik (četiri ili pet čimbenika) i bilo je 73%, 51%, 43% i 26%. U kliničkoj praksi MPI predstavlja procjenu rizika za relaps ili smrt kod bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze.

Kako se međutim pokazalo da mlađi i stariji bolesnici imaju značajno različito preživljenje, a bolesnici mlađi od 60 godina su kandidati za intenzivniju kemoterapiju, učinjena je analiza prilagođena dobi za bolesnike mlađe od 60 godina. Kod starijih bolesnika, kod kojih je prisutan komorbiditet može se odrediti izbor liječenja prilagođen dobi bolesnika. U toj analizi su 4 grupe bolesnika i preživljenje iznosi 83%, 69%, 46% i 32% (Shipp i sur. 1993).

MPI prilagođen dobi bolesnika (aa-IPI) temelji se na parametrima: stadiju bolesti, LDH u serumu i opće stanje bolesnika. Bolesnici starije životne dobi s rizičnim faktorom 0 imaju povoljan ishod, dok bolesnici s rizičnim faktorom od 1, 2 ili 3 imaju srednje i lošu prognozu, što je značajno (Friedberg i sur. 2008).

DLBCL je heterogena bolest s širokim rasponom rezultata. Dodatak rituksimaba kemoterapiji po shemi CHOP doveo je do znatnog poboljšanja u preživljenju bolesnika i doveo je u pitanje značaj prethodno priznatih prognostičkih biljega.

Procjena rizika prema MPI prihvaćena je u kliničkoj praksi prije primjene imunokemoterapije, te se je koristio pri odabiru terapije u bolesnika sa DLBCL. Sehn i sur. (2007) su izvijestili o retrospektivnoj analizi prognostičke vrijednosti MPI-a u razdoblju nakon pojave lijeka rituksimab-a. U skupini od 365 bolesnika liječenih R-CHOP-om sa DLBCL-om, upotrebljiva vrijednost MPI-a je ostala, ali umjesto prvotno opisane četiri grupe autori revidiraju MPI klasifikaciju (R-IPI) u tri odvojene grupe s vrlo dobrim rizičnim čimbenikom (0), dobrim (1-2) ili lošim (3-5) ishodom: skupina s **vrlo dobrim** posljedicama (4 godišnje preživljenje bez progresije je 94%, općenito preživljenje je 94%), **dobrim** (4 godišnje preživljenje bez progresije je 80%, općenito preživljenje je 79%) i **loše** (4 godišnje preživljenje bez progresije je 53%, općenito preživljenje je 55%). MPI ili R-MPI više ne razlikuje rizične skupine s manje od 50% šanse za preživljenje. R-MPI je klinički koristan prognostički indeks koji može pomoći u planiranju liječenja i tumačenju kliničkih ispitivanja (Sehn i sur. 2007).

U slučaju relapsa bolesti sekundarni MPI i dobi prilagođen MPI se određuje prije druge linije kemoterapije. Kombinirani sa ASCT mogu otkriti bolesnike s povoljnom ili nepovoljnom prognozom.

MPI je nastao kako bi se utvrdili prognostički izgledi za osobe s limfomom koji brzo progredira. To se je kasnije pokazalo korisno i za većinu ostalih limfoma.

GELA istraživanje je također koristila MPI. Bolesnici s niskim rizikom žive duže od 5 godina u 75% slučajeva, dok oni s visokim rizikom za smrtni ishod samo oko 30% bolesnika živi duže od 5 god.

MPI omogućuje liječnicima da prilagode plan liječenja bolje nego što su to mogli samo na temelju kliničkih karakteristika i stadija limfoma. Također daje podatke o očekivanom preživljenju i razdoblju bez progresije bolesti i ostaje i dalje značajan u predviđanju tijeka bolesti. Preraspodjela čimbenika iz MPI u revidirani MPI pruža više klinički korisnih informacija za predviđanja ishoda bolesnika.

## 2.8 Terapijski pristup DLBCL

Liječenje i prognoza bolesnika s DLBCL određena je histološkim karakteristikama, kliničkim stadijem bolesti (Ann Arbor klasifikacija) i kliničkim prognostičkim pokazateljima obuhvaćenim Međunarodnim prognostičkim indeksom (MPI) (Shipp 1993). Određivanje kliničkog stadija bolesti prema kriterijima Ann Arbor klasifikacije obuhvaća četiri klinička stadija bolesti unutar kojih se razlikuje prisutnost ili odsutnost kliničkih B simptoma. MPI obuhvaća dob bolesnika, opći status bolesnika, aktivnost laktat dehidrogenaze, klinički stadij bolesti i zahvaćenost ekстранodalnih mjesta.

DLBCL je biološki agresivan limfom i kod neliječenih bolesnika medijan preživljenja iznosi 1 do 2 godine. Gotovo tri decenije CHOP terapija ostala je vodeća terapijska shema diljem svijeta i učinjeni su mnogi pokušaji da se poboljša učinkovitost terapije, te produlji bolesnikovo preživljenje.

Iako SZO klasifikacija DLBCL definira kao zaseban kliničko-morfološki entitet, različit odgovor na terapiju ukazuje na biološku heterogenost tumora.

Standardna terapija za stadij I A je kombinirana terapijska shema s kemoterapijom od 3 ili 4 ciklusa R CHOP-a, a zatim slijedi zračenje. Standardna doza radioterapije je 35 do 45 Gy, jer su manje doze od toga nedovoljne (Coiffier i sur. 2002).

Coiffier i sur. (2007) su započeli randomizirano istraživanje kod starijih bolesnika u stadiju II do IV DLBCL komparirajući 8 ciklusa CHOP-a sa 8 ciklusa rituksimaba + CHOP u razmaku od svaka 3 tjedna. Bolesnici liječeni s R-CHOP-om su imali signifikantno bolje preživljenje bez progresije. Istraživanja koja su slijedila uzimala su za analizu dva neovisna randomizirana pokusa s CHOP ili CHOP sličnim protokolima kroz 6 ciklusa kod mlađih bolesnika (Coiffier i sur. 2007).

Pfreundschuh i sur. (2008) iz Njemačke grupe za limfome visokog stupnja malignosti uspoređivali su učinak liječenja davajući CHOP svakih 14 dana /CHOP 14/ s rituksimabom + CHOP-14. Terapija s rituksimabom je superiornija u poboljšanju preživljenja bez znakova aktivnosti bolesti i općenitog preživljenja. Petogodišnje preživljenje bez znakova bolesti je 54% kod bolesnika koji su dobivali R-CHOP u usporedbi s bolesnicima koji su liječeni CHOP i preživljenje bez znakova bolesti je bilo 30%. Dalje, R-CHOP-14 je superiorniji od R-CHOP-21 i odgovor na to je dala GELA grupa (Pfreundschuh i sur. 2008).

Približno 40% bolesnika se ne može izliječiti sa prvom terapijskom linijom, i oni zahtijevaju dodatnu obradu. CORAL istraživanje sugerira da bolesnik koji ima relaps DLBCL nakon dobivanja rituksimaba i terapije prve linije, ima loš odgovor na standardnu salvage terapiju s

platinom. Podaci govore da je potrebna nova terapijska strategija bazirana na razumijevanju biologije bolesti (Mounier i sur. 2003, Coiffier i sur. 2005).

Veliki broj terapijskih shema druge generacije je u upotrebi, ali samo se jedno veliko randomizirano istraživanje bavilo usporedbom takvih terapijskih shema. Ona je pokazala da je primjena R-ICE i R-DHAP uglavnom dala slične rezultate. Uobičajena je praksa da se doda rituksimab u drugoj liniji liječenja. Brojna istraživanja govore da je u takvim slučajevima preporučena transplatacija, ako bolesnik ima odgovor na salvage terapiju. Odgovor se definira sa kliničkim i CT kriterijima. Sa PET/CT, koji je danas dostupan, čini se da je transplatacija velika korist samo u onih bolesnika bez metabolički aktivne bolesti (Hoppe i sur. 2009, Gisselbrecht i sur. 2010).

### 3. BOLESNICI I METODE

#### 3.1 Kliničke i morfološke karakteristike ispitivane grupe bolesnika

Retrospektivno su sakupljeni podaci iz povijesti bolesti 99 odraslih prethodno neliječnih bolesnika s DLBCL u Klinici za unutarnje bolesti Kliničke bolnice "Mercur" u Zagrebu, i Općoj bolnici Zadar tijekom devetogodišnjeg razdoblja, tj. u istraživanju su uključeni bolesnici kojima je bolest bila dijagnosticirana 1. siječnja 2000. do 31. prosinca 2009. god., a praćeni su u tom razdoblju do 31. 04. 2011.

Istraživanjem su obuhvaćeni svi konsekutivni bolesnici kojima je u tom razdoblju dijagnosticiran DLBCL. Istraživanjem nisu obuhvaćeni prethodno lijećeni bolesnici, bolesnici kojima nije postavljena dijagnoza u tim dvijema ustanovama, pa nije bilo moguće revidirati dijagnozu, te bolesnici u kojih je dijagnoza postavljena samo na osnovi citološkog nalaza limfnog ćvora ili drugog materijala. Klinička obilježja bolesnika s DLBCL prikazana su na Tablici 2.

**Tablica 2.** Kliničke i morfološke znaćajke u 99 bolesnika s DLBCL.

Znaćajka	Grupe		%
Dob	Raspon	24-87	
	Medijan	59.3	
Spol	M	46	46%
	Ź	53	54%
DLBCL po Hans i sur.	GCB	25	25%
	ABC	54	55%
	tip 3	20	20%
Stupanj proširenosti prema Ann Arbor	I	25	25%
	II	30	30%
	III	34	35%
	IV	10	10%
Opći simptomi	A	46	46%
	B	53	54%

Povećanje limfnih ćvorova, slezene i jetre utvrćeno je palpacijom i izraženo u centimetrima. Za velićinu limfnog ćvora uzet je promjer najvećeg palpabilnog limfnog ćvora izraćen u centimetrima.

Na temelju rasporeda nalaza palpabilnih limfnih čvorova bolesnici su grupirani u tri kategorije prema distribuciji limfnih čvorova: oni s limfnim čvorovima iznad ošita, ispod ošita i istodobno iznad i ispod ošita.

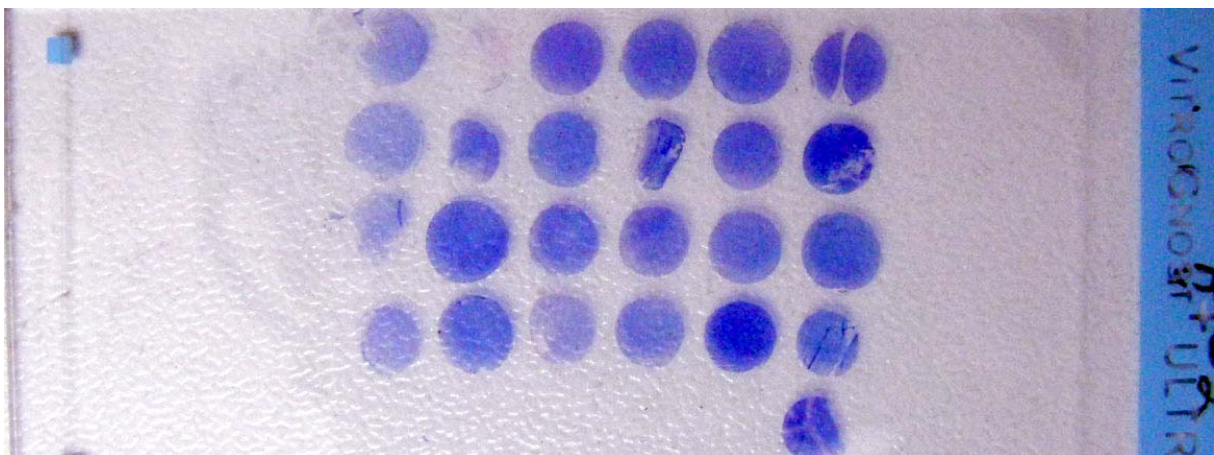
Veličina jetre i slezene utvrđena je palpacijom tako da je udaljenost od medioklavikularne linije do najdonje točke palpabilnog organa izražena u centimetrima.

Vrijeme pojave limfnog čvora prije postavljanja dijagnoze utvrđeno je anamnestički i izraženo u mjesecima.

Bioptička tkiva fiksirana su formalinom, B-5 fiksativima, zatim uklapana u parafin.

Dijagnoza DLBCL postavljena je na osnovi patohistološkog nalaza limfnog čvora, slezene ili nekog drugog tkiva. Sve slučajeve je dijagnosticirao hematopatolog kao CD20-pozitivne DLBCL Svi histološki preparati su klasificirani prema klasifikaciji SZO (Swerdlow 2008). Sve dijagnoze su grupirane u GCB, ABC i tip 3 limfome prema algoritmu Hans i sur. (2004).

“Tissue microarray” (Slika 2) od 99 limfnih čvorova, nakon deparafiniranja i rehidriranja obojen je standardnim metodama za limfne čvorove, tj. HE i Giemsa. Za imunohistokemijsku obradu kao i FISH rezovi su također deparafinirani, rehidrirani pretretirani visokom temperaturom u puferu visokog pH te obojeni kitom za imunohistokemijsko bojenje FLEX, high pH kit (Dako Glostrup, Danska). Korištena antitijela bila su anti- BCL2 (kat. br M0887), anti-BCL6 (kat.br. M7211), i anti-CD10 (kat. br. IS648), anti-VEGF Receptor-2 (Abcam-Engleska kat. br. ab 3956), te anti-NFκB (Santa Cruz, USA kat. br. sc8008), a završno kontrastiranje učinjeno je hematoksilinom (Envision FLEX hematoxylin, Dako, Glostrup, Danska).



Slika 2. Prikaz rada pomoću tehnike tkivni microarray

Ekspresija proteina u stanicama se smatra pozitivnom ako je >30% stanica obojeno pozitivno na odgovarajućim mjestima.

### 3.2 Interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

FISH metodom analizirali smo promjene gena *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC*.

Vysis BCL2 Break aparat FISH Probe Kit je najmanji za otkrivanje kromosomske pregradnje na *BCL2* mjestu na kromosomu 18q21 pomoću interfazne fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) tehnike (Willis 2000).

LSI-*BCL2* (engl. dual color, break apart rearrangement probe) omogućava detekciju lomova na kromosomu 18q21 koje uključuje *BCL2* gen u regiji t(14;18)(q32;q21) premještanjem IGH lokusa. U jezgri s t(14;18)(q32;q21) najčešći signal je jedan narančasti koji se nalazi na približno 608 kb i jedan zeleni signal, na oko 854 kb. U jezgri normalne stanice u interfazi se proizvode dva para, koja se preklapaju ili gotovo preklapaju i imaju narančasti i žuti signal. Kod bolesne stanice u kromosomu 18 točka prijeloma je praznina između dvije ciljne točke i nastaje jedan narančasti, jedan zeleni i jedan fuzijski signal.

LSI *BCL6* (engl. dual color, break apart rearrangement probe) omogućava detekciju lomova kromosoma povezanih s različitim translokacijama koje uključuju *BCL6* gen u regiji 3q27. Proba sadrži 300 kb 5' LSI *BCL6* probu obilježenu sa SpectrumOrange i 600 kb 3' LSI *BCL6* probu obilježenu sa SpectrumGreen. Navedene probe su odvojene lokusom veličine 42 kb koji sadrži cijeli *BCL6* gen, uključujući i regiju loma *BCL6* gena. U normalnoj stanici hibridiziranoj s *BCL6* probom očekivani uzorak signala su dva narančasto/zelena fuzijska signala (2F). U stanici s translokacijom koja uključuje mjesto loma *BCL6* lokusa između 5' i 3' mjesta hibridizacije *BCL6* probe nalaze se jedan narančast, jedan zeleni i jedan fuzijski signal (1O1G1F). U nekim normalnim jezgrama može se vidjeti blaga odvojenost narančastog i zelenog signala zbog neobilježenog *BCL6* lokusa između mjesta hibridizacije dva dijela probe (Sanchez-Izquierdo 2001, Roumier 2000).

Vysis LSI (engl. MYC Dual Color Break Apart probe) omogućava detekciju lomova kromosoma povezanih s različitim translokacijama koje uključuju *c-MYC* gen u regiji 8q24, a

i za varijante t(8;22)(q24f;q11.2) GL-MYC i t(2;8)(q11.2;q24.1) GK-MYC-q24.13. Proba sadrži 120 kb Vysis LSI MYC probu obilježenu s SpectrumOrange. (Deming 2000).

Normalna jezgra u hibridu sa LSI MYC (engl. Dual Color Break Apart ) probom proizvodi dva narančasto/zelena (žuta) fuzijska signala (1Q1G1F) koji se očekuju kod t(2;8) ili kod t(8;14).

### 3.3 Klinički podaci i pretrage u bolesnika s DLBCL

Brzina sedimentacije eritrocita (SE) je izražena u milimetrima i određena visinom stupca sedimentiranih eritrocita u Westergrenovoj cjevčici u prvom satu (Westergren 1926).

Koncentracija hemoglobina (Hb) određena je na hematološkom analizatoru C "Coulter counter" model "S plus". Blagi stupanj anemije definiran je sniženjem hemoglobina ispod 120 g/L, a izražena anemija sniženjem hemoglobina ispod 100 g/L.

Broj leukocita (L) određen je na hematološkom analizatoru Coulter counter model "S plus". Leukopenija je definirana apsolutnim brojem leukocita manjim od  $3,8 \times 10^9/L$ , a leukocitoza je definirana apsolutnim brojem leukocita većim od  $10 \times 10^9/L$ . Limfocitoza je definirana brojem limfocita većim od  $4,7 \times 10^9/L$ , a limfopenija je definirana brojem limfocita manjim od  $2,0 \times 10^9/L$ .

Broj trombocita (Tr) određen je na hematološkom analizatoru "Coulter counter" model "S plus". Trombocitopenija je definirana brojem trombocita manjim od  $150 \times 10^9/L$ , standardnom metodom sa modificiranom Drabkinovim reagensom, kao cijanmethemoglobin, a trombocitoza je definirana brojem trombocita većim od  $450 \times 10^9/L$ .

Aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) određena je UV kinetičkom metodom prema Njemačkom društvu za kliničku kemiju na temperaturi od 30°C. Normalne vrijednosti iznose do 240 U/L.

Koncentracija bakra (Cu) u serumu određena je atomskim spektroapsorbometrom, model "SP9 computer". Normalne koncentracije bakra iznose 17 do 23  $\mu\text{mol/L}$ .

Koncentracija sveukupnog bilirubina (Bil) u serumu određena je dijazoreakcijom pomoću reagensa diazotirane sulfanilne kiseline metodom po Jendrassik-Grofu. Mjerenjem intenziteta nastale boje na fotometru LKB na valnoj duljini 630 nm može se odrediti koncentracija bilirubina u serumu. Normalne koncentracije iznose 5 do 20  $\mu\text{mol/L}$ .

Aktivnost aspartat-transaminaze (AST) u serumu je određena standardnom metodom po IFCC-u na 30 C. Normalne vrijednosti iznose do 25 U/L.



Aktivnost alanin-transaminaze (ALT) u serumu je određena standardnom metodom po IFCC-u na 30 C. Normalne vrijednosti iznose do 27 U/L.

Aktivnost serumske alkalne fosfataze (AP) određena je standardnom metodom pomoću pufera DEA, te supstrata Na-p-nitrofenil fosfatom na 30°C. Normalne vrijednosti iznose od 64 do 140 U/L.

Koncentracija ureje u serumu određena je Berthelot-ureaza-obojenom reakcijom, a intenzitet boje koji je proporcionalan koncentraciji ureje mjeran je na valnoj dužini od 547 nm na LKB fotometru. Normalne koncentracije iznose 4,1 do 6,1 mmol/L.

Koncentracija kreatinina u serumu određena je pomoću alkalnog pikrata reakcijom po Jaffeu. Nakon razvijanja boje očitavana je apsorbancija na 520 nm na LKB fotometru. Normalne vrijednosti iznose 72 do 127  $\mu$ mol/L.

Koncentracija urične kiseline u serumu određena je kolor-enzimskom metodom pomoću reagensa TR-1095 (Radonja) postupkom Kageyama-urikaza-katalaza reakcijom boje. Kolorimetrijski se određuje na valnoj duljini 505 nm na LKB fotometru. Normalne vrijednosti iznose 208 do 320  $\mu$ mol/L.

Koncentracija serumskog kalcija (Ca) i serumskog fosfora (P) određivane su na Technicon SMA 12/60. Normalne vrijednosti serumskog kalcija su 2,02 do 2,60 mmol/L, a serumskog fosfora 0,79 do 1,40 mmol/L.

Koncentracija ukupnih bjelančevina određena je na Technicon autoanalizatoru SMA 12/60-Biuret. Elektroforeza serumskih bjelančevina rađena je na acetat celulozi-Cellogen, Chemtron. Normalne koncentracije ukupnih bjelančevina iznose 66 do 83 g/L, albumina 53,8 do 65,2 g/L, alfa1-globulina 0,1 do 3,7, alfa2-globulina 8,5 do 14,5, beta-globulini 8,6 do 14,8, a gama-globulini 9,2 do 18,2 g/L.

Koncentracija imunoglobulina G, A i M određene su metodom radijalne imunodifuzije na Tri-Partigen pločama Behringwerke. Normalne koncentracije imunoglobulina G (IgG) iznose 7,0 do 16,0 g/L, imunoglobulina A (IgA) 0,7 do 4,0 g/L, a imunoglobulina M (IgM) 0,4 do 2,3 g/L.

Koncentracija serumskog željeza (Fe) određena je na autoanalizatoru SMA 12/60 modificiranom metodom Giorannello s ferozinom. TIBC je određivan Ramseyevom metodom na istom analitičkom sustavu. UIBC je određivan oduzimanjem vrijednosti Fe od vrijednosti TIBC. Normalne koncentracije za Fe su od 12 do 25  $\mu$ mol/L za muškarce, a 11 do 23  $\mu$ mol/L za žene. Normalne koncentracije UIBC iznose od 32 do 57  $\mu$ mol/L.

Aritmetičke sredine, standardne devijacije, najmanje i najveće vrijednosti, medijan, koeficijenti asimetrije i spljoštenosti promatranih varijabli prikazani su u Tablici 3.

**Tablica 3.** Aritmetičke sredine, standardne devijacije, najmanje i najveće vrijednosti, medijan, koeficijenti asimetrije i spljoštenosti promatranih varijabli u ispitivanoj grupi bolesnika

	N	Aritmetička sredina	Medijan	Min.	Maks.	Donji kvartil	Gornji kvartil	SD
<b>dob</b>	99	59,28	59,30	24,00	91,0	48,00	70,00	14,58
<b>SE</b>	99	40,95	32,00	2,00	140,0	16,00	61,00	32,22
<b>HB</b>	99	124,06	125,00	80,00	169,0	112,00	139,00	20,15
<b>Rtc</b>	96	29,99	21,00	0,60	140,0	8,00	41,00	30,34
<b>FE</b>	99	11,28	11,20	1,35	45,0	7,60	13,00	6,38
<b>UIBC</b>	99	31,79	32,30	12,80	70,0	23,60	38,00	10,07
<b>Cu</b>	70	20,02	18,25	10,50	37,2	14,30	25,90	6,84
<b>Bil</b>	99	13,15	10,00	1,00	121,0	7,50	15,00	12,73
<b>AST</b>	99	31,39	25,00	11,00	269,0	18,00	34,00	29,29
<b>ALT</b>	99	33,85	22,00	5,00	569,0	13,00	37,00	58,10
<b>AP</b>	99	94,41	80,00	36,00	436,0	65,00	100,00	61,62
<b>Urea</b>	99	6,13	5,70	2,70	24,3	4,30	7,10	3,11
<b>Kreatinin</b>	99	86,62	83,00	46,00	229,0	73,00	99,00	24,47
<b>Ac.uric.</b>	99	317,72	310,00	94,00	770,0	236,00	364,00	108,15
<b>Ca</b>	99	2,48	2,32	0,98	15,9	2,20	2,46	1,42
<b>P</b>	99	1,11	1,09	0,70	1,9	1,01	1,20	0,19
<b>Uk.Prot.</b>	99	70,58	71,00	58,00	83,7	65,00	75,20	6,43
<b>ALB</b>	99	53,81	55,40	26,70	65,2	49,90	60,00	8,02
<b>ALFA1</b>	99	3,94	3,70	2,00	7,0	3,30	4,50	1,03
<b>ALFA2</b>	99	10,85	10,80	4,10	18,4	9,20	12,50	2,65
<b>BETA</b>	99	11,63	11,60	5,40	15,7	10,40	12,80	1,98
<b>GAMA</b>	99	17,01	16,00	4,19	44,8	13,40	19,60	6,32
<b>IgG</b>	99	12,57	11,71	4,30	77,0	9,17	13,20	7,80
<b>IgA</b>	99	3,01	2,42	0,60	18,2	1,82	3,50	2,22
<b>IgM</b>	99	1,20	0,80	0,10	4,8	0,50	1,63	1,03
<b>L</b>	99	6,62	6,10	0,46	17,9	4,52	7,96	2,87
<b>LY</b>	99	25,75	25,00	2,00	86,0	16,00	32,00	13,00
<b>TT</b>	99	53,36	48,00	2,00	168,0	28,00	72,00	35,79
<b>Tr</b>	99	256,46	230,00	34,00	579,0	182,00	320,00	112,73
<b>LDH</b>	99	430,86	302,00	112,00	4378,0	186,00	435,00	505,22

Legenda: SE:- sedimentacija eritrocita u prvom satu, Hb - hemoglobin, Rtc - retikulociti, Fe - željezo, UIBC - nevezana sposobnost vezanja željeza, Cu - bakar, Bil - bilirubin, AST - aspartat transaminaza, ALT - alanin transaminaza, Ca - kalcij, P - fosfor, Alb - albumini, - ALFA1- alfa1-globulini, ALFA2 -alfa2 globulini, BETA-beta-globulini, GAMA-gama globulini, IgG - imunoglobulin G, IgA - imunoglobulin A, IgM - imunoglobulin M, L - Leukociti, LY - limfociti, Tr - trombociti, LDH - laktat dehidrogenaza

## **Određivanje stadija bolesnika**

Stupanj proširenosti bolesti određivan je prema Ann Arbor klasifikaciji (Carbone i sur. 1971). Bolesnici su bili podvrgnuti ultrazvučnom pregledu abdomena, CT-u abdomena, ponekad biopsiji jetre, a u rijetkim slučajevima i staging laparotomiji. Staging laparotomija izvedena je u bolesnika, koji nisu imali palpabilnih ili drugih uvećanih limfnih čvorova, a klinička slika je ukazivala na limfom.

Kod svih bolesnika učinjena je citološka punkcija koštane srži i biopsija kosti krste ilijake posterior.

Proširenost bolesti u medijastinumu procjenjivana je na osnovi nalaza povećanih limfnih čvorova u hilusu ili traheobronhalnih ili pak nalaza policiklične sjene u medijastinumu na rendgenogramu toraksa ili na snimci CT toraksa.

Prisutnost općih simptoma (gubitak na tjelesnoj težini više od 10% tijekom zadnjih 6 mjeseci, temperatura viša od 39°C, noćno znojenje i svrbež kože) definirana je kao "B" simptomi, a asimptomatski bolesnici označeni su kao "A".

Bolesnici su bili grupirani u četiri grupe prema Ann Arbor klasifikaciji, a u dvije grupe prema prisutstvu ili odsustvu općih simptoma.

## **Opće stanje bolesnika**

Opće stanje bolesnika ocijenjivano je prema ocijenskoj ljestvici općeg stanja ECOG (engl. Eastern Cooperative Oncology Group) (Miller i sur. 1981). Bolesnici su grupirani u četiri grupe ovisno o općem stanju bolesnika. U Tablici 4 prikazani su kriteriji za pojedinu grupu bolesnika obzirom na opće stanje bolesnika prema ljestvici ECOG.

Kod nas se upotrebljava ocijenska ljestvica općeg stanja bolesnika prema Karnofskom (Karnofsky i sur. 1948). Bolesnici sa stupnjem aktivnosti općeg stanja  $\geq 80$  ocijenskoj ljestvici općeg stanja prema Karnofskom imali su stupanj općeg stanja 0 ili 1 prema ocijenskoj ljestvici općeg stanja prema ECOG. Stupanj  $\leq 70$  prema Karnofskom odgovarao bi stupnju aktivnosti 2, 3 ili 4 prema ljestvici ECOG. Bolesnike smo razvrstali u četiri grupe prema ljestvici općeg stanja prema ECOG- grupa 1 sa stupnjem aktivnosti 0 i 1 prema ECOG, to je 100, 90 i 80 prema Karnofskom, grupa 2 sa stupnjem aktivnosti 2 prema ECOG odgovara 70 i 60 prema Karnofskom, te grupa 3 sa stupnjem aktivnosti 3 i grupa 4 prema ECOG što odgovara 50 i manje od 50 prema Karnofskom.

**Tablica 4.** Kriteriji za pojedine grupe bolesnika s NHL s obzirom na opće stanje bolesnika prema ocijenskoj ljestvici općeg stanja ECOG

Grupe bolesnika prema ocijenskoj ljestvici ECOG	Kriteriji za pojedinu grupu
0	Bez simptoma
1	Ima simptome, pokretan je
2	Bolesnik je u krevetu manje od pola dana dnevno
3	Bolesnik je vezan za krevet pola dana ili dulje
4	Bolesnik je stalno u krevetu, potrebna mu je pomoć za dnevne potrebe

### **Duljina života bolesnika**

Prognostička analiza duljine života bolesnika izražena je u mjesecima od dana postavljanja dijagnoze do smrti. Bolesnici kojima se gubi trag duljina života se izačunava do dana zadnje kontrole ili saznanja o njima, a za žive bolesnike do dana završetka praćenja tj. do 31.3.2011. Od 99 bolesnika koji su praćeni 28 bolesnika je umrlo, 71 bolesnik je živ, a jednom bolesniku se gubi trag.

### **Međunarodni prognostički indeks**

Mnoga klinička obilježja identificirana su kao nezavisni prognostički čimbenici u bolesnika s limfomom visokog stupnja malignosti (npr. životna dob bolesnika, opći simptomi, opće stanje bolesnika po ECOG ili po nekoj drugoj skali, LDH, broj regija sa bolešću zahvaćenim limfnim čvorovima ili ektranodalnim limfomom, velika tumorska masa i uznapredovali stadij bolesti). Čimbenici koji su zadržali značajnost u multivarijatnoj analizi uključeni su u prediktivni model rizika kakav je MPI.

Na Tablici 5 prikazano je kako su bodovani bolesnici prema navedenim parametrima.

U prognostičkom modelu prema MPI relativni rizik za smrtni ishod za svakog pojedinog bolesnika određuje se zbrajanjem broja nepovoljnih prognostičkih čimbenika u trenutku postavljanja dijagnoze. Nepovoljni prognostički čimbenici su životna dob veća od 60 godina, opće stanje bolesnika veće od 1 prema skali ECOG, aktivnost laktat dehidrogenaze iznad granica referentnih vrijednosti, stadij bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji veći od 2 i više od jednog ektranodalnog mjesta zahvaćenog bolešću. Analizom je nađeno da su navedenih pet parametara prognostički nezavisni čimbenici. Budući da su relativni rizici povezani sa svakim od nezavisnih rizičnih faktora komparabilni, relativni rizik za smrtni ishod dobije se zbrajanjem broja rizičnih čimbenika prisutnih u trenutku dijagnoze. Rizične grupe su definirane uspoređivanjem relativnog rizika za smrtni ishod u bolesnika sa svakim posebnim brojem rizičnih čimbenika (0, 1, 2, 3, 4 ili 5) i kombiniranjem kategorija sa sličnim relativnim

rizikom (npr. 0 sa 1 ili 4 sa 5). Bolesnici su razvrstani u jednu od četiri rizične grupe na temelju broja rizičnih čimbenika kod dijagnoze i ukupnog broja bodova: niski rizik - broj rizičnih čimbenika 0 ili 1, niski intermedijarni rizik - broj rizičnih čimbenika 2, visoki intermedijarni rizik - broj rizičnih čimbenika 3, visoki rizik - broj rizičnih čimbenika 4 ili 5.

**Tablica 5.** Bodovanje bolesnika prema Međunarodnom prognostičkom indeksu (MPI).

Parametar	Vrijednost	Broj bodova
Dob bolesnika	≤60g	0
	>60g	1
Ekstranodalna lokalizacija (broj mjesta zahvaćenih bolešću izvan limfnih čvorova)	0,1	0
	> 1	1
Stadij bolesti (Ann Arbor)	I, II	0
	III, IV	1
Opće stanje bolesnika prema ECOG	0,1	0
	> 1	1
LDH	≤ 240 mmol /L	0
	> 240 mmol/L	1

### Liječenje

Naši bolesnici liječeni su standardnim kemoterapijskim shemama, kao što su CHOP i njemu slični protokoli (CNOP i sl.) i imunoterapijom, gdje je kemoterapijskoj shemi pridodan rituksimab, dakle R-CHOP. Protokol se ponavlja svakih 21 dan, i primili su 8 ciklusa kemoterapije.

### 3.4 Statistička obrada podataka

Statistička obrada i analiza podataka izvršena je licenciranim programom STATISTICA 6.1 StatSoft inc. 1983-2003 (Serial number AGA304B211928E61). Korišteni su sljedeći moduli tog programa Basic Statistika/Tables (Descriptive Statistika, t-test, Frequency tables, Tables and banners), Nonparametrics, ANOVA (One-way ANOVA), Advanced Linear/Nonlinear Models (Survival Analysis). Detaljni podaci o programu STATISTICA mogu se naći na web stranici <http://www.statsoft.com/#>.

Sve o validaciji programa STATISTICA nalazi se na stranici

<http://www.statsoft.com/services/validation-services/>

Elektronički priručnik u kojem su opisane sve statističke metode koje se koriste u različitim modulima programa STATISTICA nalazi se na stranici <http://www.statsoft.com/textbook/>

Rezultati dobiveni statističkom obradom prikazani su grafički i numerički (tabelarno).

Statističko testiranje provedeno je na razini značajnosti od 95% ( $\alpha=0,05$ ).

## 4. REZULTATI

### 4.1 Univarijatne analize

Univarijatnim analizama ispitivane grupe od 99 bolesnika nađeno je da spol nije prognostički značajan čimbenik.

Varijabla dob također nije značajan prognostički čimbenik. Medijan dobi naših bolesnika za cijeli uzorak je iznosio 59,3 godine, medijan dobi muškaraca je iznosio 58 godina, dok je medijan dobi za žene iznosio 62,5 godina, što nije statistički značajna razlika. Bolesnike smo grupirali u dvije grupe; one do 60 godina i mlađe dobi i one starije od 60 godina. Kad se bolesnici razvrstaju prema spolu u obje grupe, u grupi muških i ženskih, dob i dalje u našim rezultatima nije statistički značajan prognostički čimbenik. Omjer broja ženskih bolesnika prema muškim je 1,15/1.

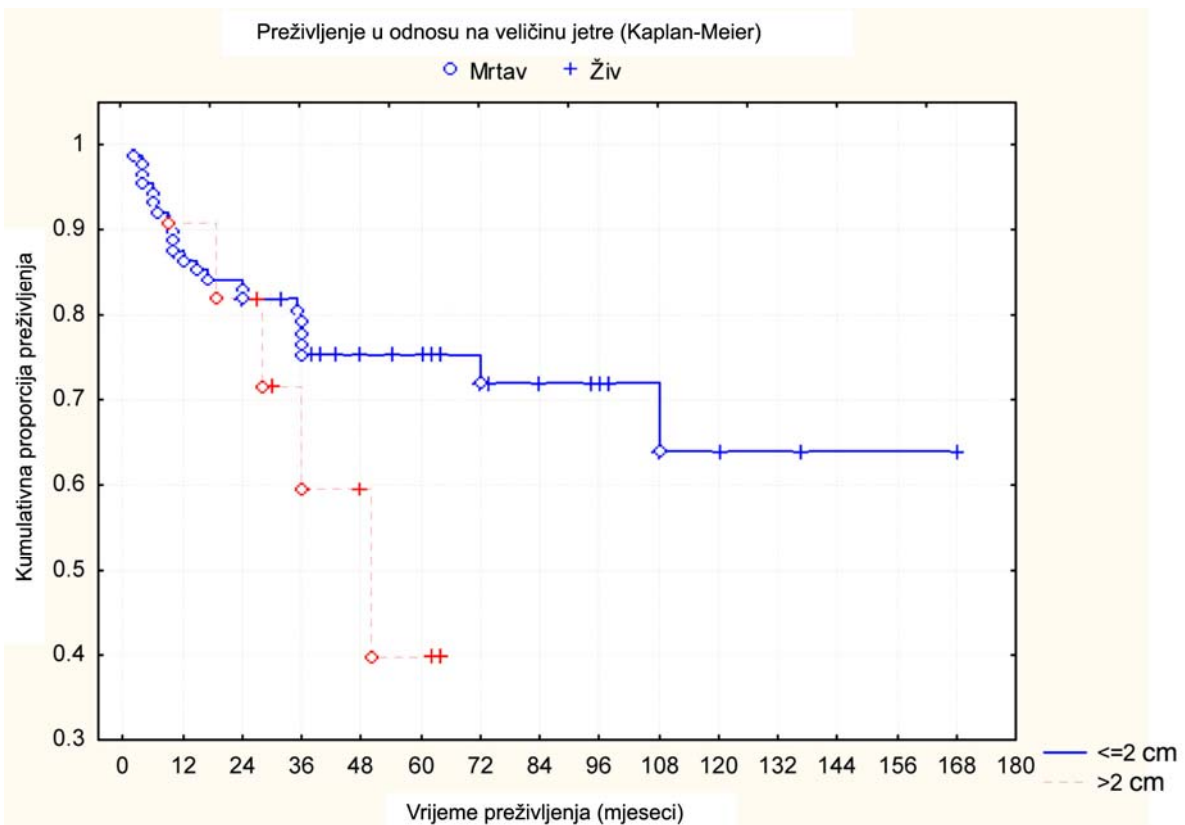
Kad se bolesnici razvrstaju prema podgrupama DLBCL-a, dob također nije statistički značajna.

U skupini bolesnika s infiltracijom koštane srži limfomskim stanicama životna dob bolesnika nije prognostički značajan čimbenik.

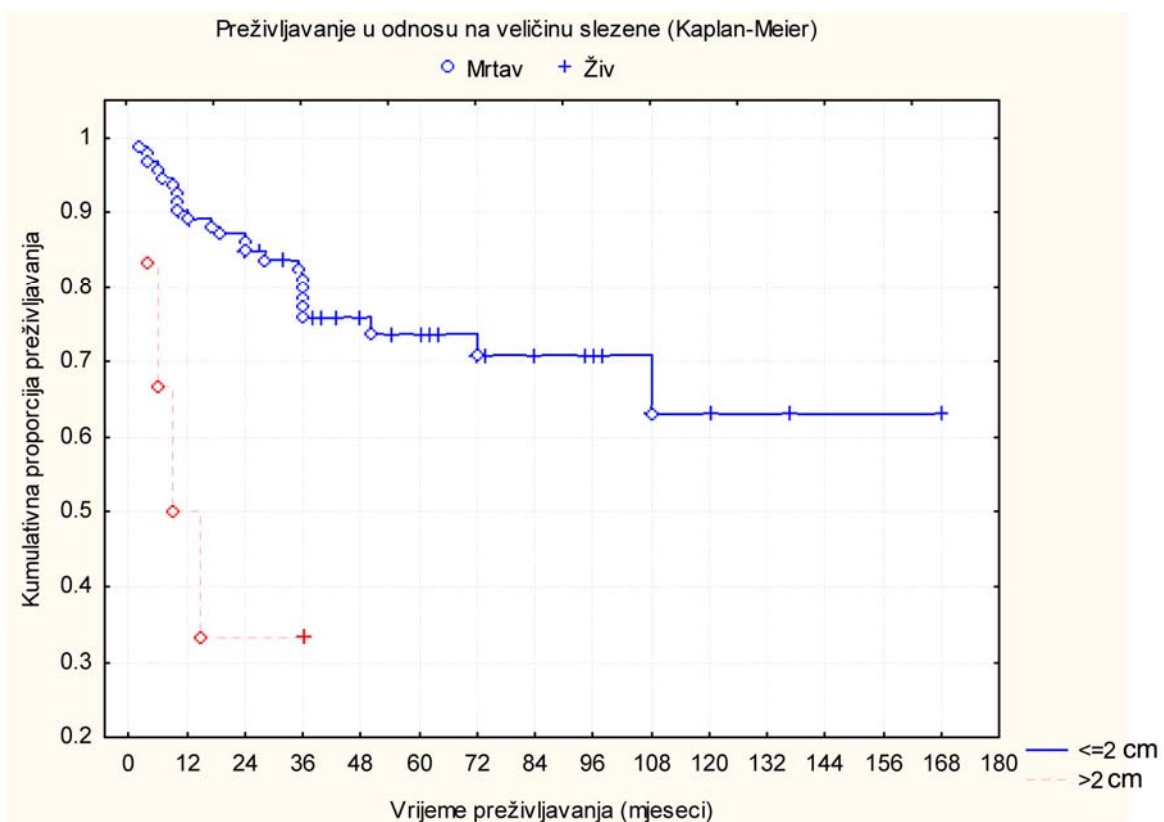
Analizirali smo dalje trajanje limfadenopatije prije postavljanja dijagnoze, veličinu limfnog čvora, veličinu palpabilne jetre i slezene.

Veličina palpabilne jetre u trenutku postavljanja dijagnoze je prognostički značajan čimbenik ( $p=0,05$ ). U našim analizama 11 bolesnika ima palpabilnu jetru veći od 2 cm u trenutku postavljanja dijagnoze. Bolesnici s hepatomegalijom za više od 2 cm imaju lošiju prognozu nego oni koji imaju jetru palpabilnu za 2 cm ili manje ( $p=0,05$ ) (Slika 3).

Veličina palpabilne slezene prognostički je značajan čimbenik. U našim analizama 8 bolesnika ima palpabilnu slezenu više od 2 cm u trenutku postavljanja dijagnoze. Bolesnici koji imaju veliku palpabilnu slezenu više od 2 cm imaju lošiju prognozu zbog velike tumorske mase u trenutku postavljanja dijagnoze, nego oni koji imaju slezenu palpabilnu do 2 cm i manje i to je statistički značajno ( $p=0,004$ ). Postoji statistički značajna razlika u preživljenju u bolesnika u odnosu na veličinu slezene ( $p=0,004$ ) (Slika 4).



Slika 3. Preživljenje bolesnika s DLBCL obzirom na veličinu palpabilne jetre (p=0,05)



Slika 4. Preživljenje bolesnika s DLBCL obzirom na veličinu palpabilne slezene (p=0,004)



Stupanj proširenosti bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji u našim rezultatima nije prognostički značajan čimbenik ( $p=0,261$ ). Bolesnici sa stupnjem I proširenosti bolesti imaju najbolje očekivano preživljenje, mada rezultati nisu statistički značajni. Nešto lošije je očekivano preživljenje u bolesnika sa proširenom bolesti stupnja II i III. Najlošije očekivano preživljenje je u bolesnika sa proširenom bolesti stupnja IV prema Ann Arbor klasifikaciji (Tablica 6).

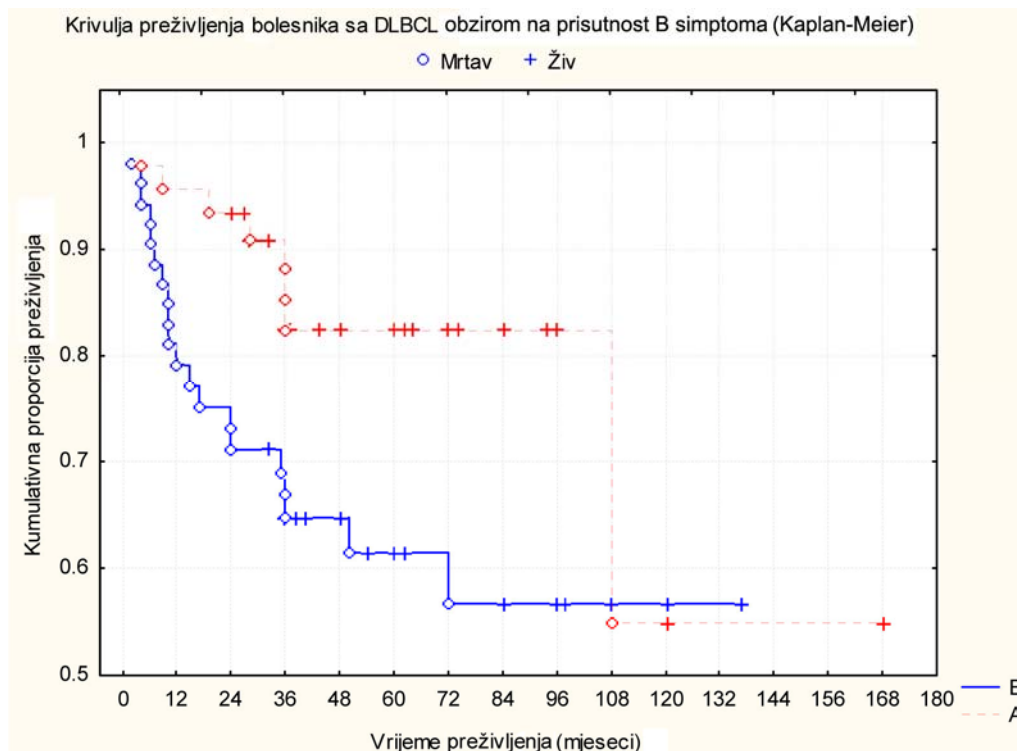
Analizirali smo prognostičku značajnost sve tri podgrupe DLBCL i nije nađena statistički značajna razlika između podgrupa limfoma. Bolesnici s ABC i tip 3 podgrupom DLBCL imaju lošije očekivano preživljenje, nego bolesnici s GCB podgrupom, mada rezultati nisu značajni (Tablica 6).

Nađena je statistički značajna razlika u preživljenju kod bolesnika koji imaju prisutne B simptome u trenutku postavljanja dijagnoze ( $p=0,014$ ) (Slika 5) (Tablica 6).

Opće stanje bolesnika ocijenjeno prema ECOG prognostički nije značajan čimbenik u univarijantnim analizama. Bolesnici s dobrim općim stanjem imaju bolje očekivano preživljenje nego bolesnici s lošijim općim stanjem u trenutku postavljanja dijagnoze, ali naši rezultati nisu značajni (Tablica 6).

**Tablica 6.** Rezultati univarijantnih prognostičkih analiza kliničkih parametara kod ispitivane grupe bolesnika sa DLBCL u trenutku postavljanja dijagnoze

Prognostički čimbenik	Grupe	Br. Bolesnika (%)	P
Stupanj proširenosti bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji	I	25 (25)	0,261
	II	30 (30)	
	III	34 (35)	
	IV	10 (10)	
Podgrupe DLBCL	GCB	25 (25)	0,082
	ABC	54 (55)	
	Tip 3	20 (20)	
Opći simptomi	A	46 (46)	<b>0,014</b>
	B	53 (54)	
Opće stanje (ECOG)	0	76 (77)	0,816
	1,2	17 (17)	
	3,4	6 (6)	



**Slika 5.** Preživljenje bolesnika u odnosu na prisutnost B simptoma ( $p=0,014$ )

Analizirana je prognostička vrijednost infiltracije koštane srži u trenutku postavljanja dijagnoze kod bolesnika sa DLBCL. Kod postavljanja dijagnoze 23 bolesnika imaju infiltriranu srž. Bolesnici s infiltracijom koštane srži imaju lošije očekivano preživljenje nego oni bez nje. U našim analizama je u prvih 36 mjeseci bolje preživljenje kod bolesnika bez infiltracije srži, a zatim se u kasnijem toku gubi prognostička značajnost, te nema razlike u očekivanom preživljenju kod bolesnika koji imaju i oni koji nemaju infiltriranu koštanu srž u trenutku postavljanja dijagnoze ( $p=0,743$ ).

U skupini bolesnika sa GCB infiltracija koštane srži nije statistički značajna, ali je preživljenje kod bolesnika koji nemaju infiltraciju znatno bolje nego kod onih koji imaju. To je također prisutno u prvih 36 mjeseci, a zatim se gubi prognostička značajnost infiltracije koštane srži, te nema razlike u očekivanom preživljenju između onih koji imaju i onih koji nemaju infiltraciju koštane srži ( $p=0,941$ ).

Kod ABC rezultati su gotovo identični ( $p=0,827$ ), dok je kod tip 3 limfoma znatno bolje preživljenje kod bolesnika koji nemaju infiltriranu srž, mada nije statistički značajno ( $p=0,450$ ).

#### 4.2 Klasifikacija DLBCL prema Hansu i sur (2004) u podgrupu GBC, ABC i tip 3 te karakteristike biljega VEGFR-2 i NF- $\kappa$ B,

Imunohistokemijska analiza ekspresije biljega CD10, *BCL6*, i *MUM1/IRF4* učinjena je na uzorcima svih 99 bolesnika. Na temelju ekspresije pojedinih biljega ispitana grupa je klasificirana u: GBC - 25 bolesnika, ABC (ne-GCB) - 54 bolesnika i tip 3 - 20 bolesnika (Tablica 7).

Ekspresija VEGFR-2 u citoplazmi i u jezgri je u podjednakom omjeru i nije nađena značajnost među navedenim grupama ( $p=0,781$ ,  $p=0,266$ ). U uzorcima jednog bolesnika nije bilo moguće učiniti imunohistokemijsku analizu VEGFR-2 u citoplazmi. U uzorcima 4 bolesnika nije bilo moguće učiniti imunohistokemijsku analizu VEGFR-2 u jezgri.

Preživljenje kod bolesnika koji imaju prisutan VEGFR-2 u citoplazmi i jezgri također nije dalo značajne rezultate. Uspoređivali smo preživljenje kod bolesnika koji su imali prisutan VEGFR-2 u citoplazmi i nije nađena značajnost među navedenim skupinama ( $p=0,850$ ).

Uspoređivali smo preživljenje kod bolesnika koji su imali prisutan VEGFR-2 u jezgri s bolesnicima koji nisu imali i nije nađena značajnost ( $p=0,801$ ).

Prisutnost NF- $\kappa$ B u citoplazmi se pokazala statistički značajno različitom između bolesnika GCB, ABC i tip 3 skupine ( $p=0,017$ ) (Tablica 8). Kod GCB podgrupe DLBCL prema Hansu i sur. NF- $\kappa$ B u citoplazmi se nalazi kod 24/25 (96%) bolesnika pozitivan, kod ABC podgrupe u 35/54 (65%) bolesnika, a kod tip 3 podgrupe kod 18/20 (90%) bolesnika (Tablica 8).

Preživljenje kod bolesnika koji nemaju prisutan NF- $\kappa$ B u citoplazmi je statistički značajno bolje ( $p=0,037$ ), u usporedbi s bolesnicima kod kojih je NF- $\kappa$ B prisutan (Slika 6).

U jezgri NF- $\kappa$ B se nalazi kod 5/25 (22%) pozitivan kod GBC, u ABC podskupini je prisutan kod 15/54 (65%) bolesnika, a kod tip 3 je pozitivan kod 3/20 bolesnika (13%) te nije značajno ( $p=0,465$ ).

**Tablica 7.** Klasifikacija i opisane grupe bolesnika s DLBCL-om u GCB, ABC i tip 3 podskupine (Hans i sur. 2004)

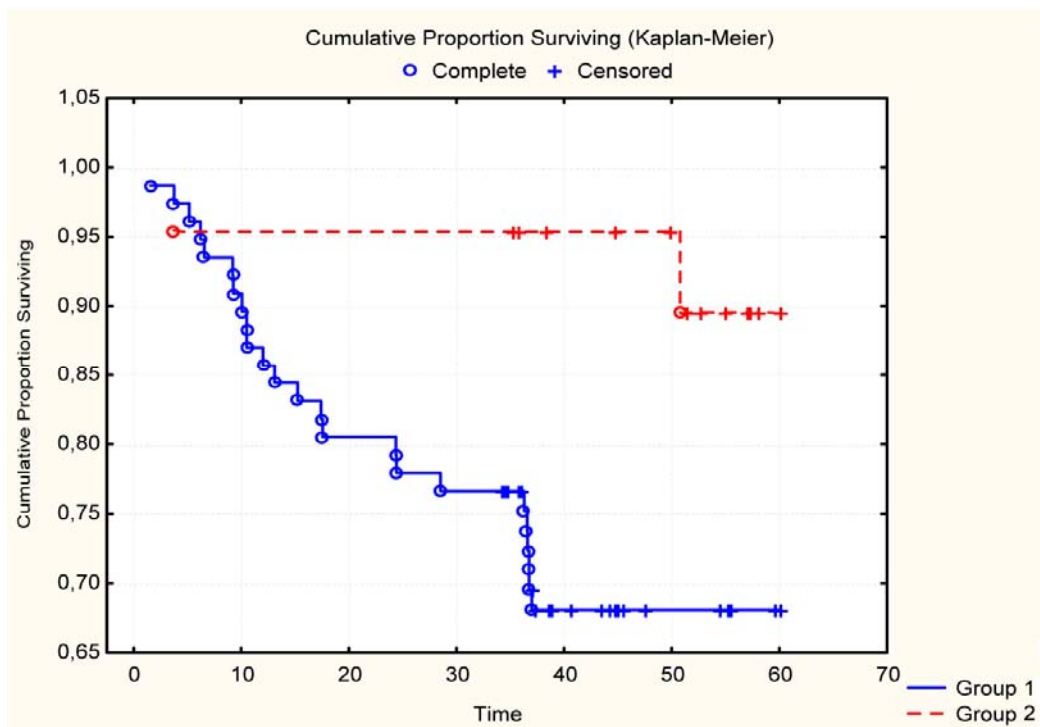
Imunofenotipska skupina po Hansu i sur.	Bolesnici (%)
GCB	25 (25%)
ABC	54 (55%)
Tip 3	20 (20%)

Legenda: GCB - limfom germinalnog centra B stanica, ABC:- aktivirani B stanični limfom, tip 3- primarni medijastinalni B-stanični limfom

**Tablica 8.** Podjela NF- $\kappa$ B biljega u citoplazmi dobivenih imunohistokemijskom analizom kod podgrupa DLBCL prema Hansu i sur. (2004).

PHD/Hans	NF- $\kappa$ B citoplazma		Sve grupe	P
	Poz	Neg		
<b>GCB</b>	24 (31%)	1 (5%)	25	<b>0,017</b>
<b>ABC</b>	35 (46%)	19 (86%)	54	
<b>Tip 3</b>	18 (23%)	2 (9%)	20	
<b>Ukupno</b>	<b>77</b>	<b>22</b>	<b>99</b>	

Legenda: GCB- limfom germinalnog centra B stanica, ABC- aktivirani B stanični limfom, tip 3 - primarni medijastinalni B-stanični limfom  
 $\chi^2=12,1$ ,  $p=0,017$



**Slika 6.** Preživljenje bolnika s prisutnošću NF-κB u citoplazmi  
 Legenda: grupa 1: - NF-κB poz, Grupa 2: - NF-κB neg.  
 $\chi^2=2,076$ ,  $p=0,037$

#### **4.3 Abnormalnosti *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC* gena, krajnji ishod liječenja i preživljenje u podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. (2004)**

Analizirani slučajevi DLBCL nisu se razlikovali niti u jednoj opisanoj skupini citogenetskih promjena *BCL2* gena. U jednom slučaju nije bila moguća adekvatna analiza FISH signala. U analiziranim slučajevima nije nađena statistički značajna razlika u podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. obzirom na navedene citogenetske promjene *BCL2* gena ( $p=0,263$ ).

Učinjene su analize abnormalnosti *BCL6* gena regije 3q27 u DLBCL i njegovih podgrupa. U jednom slučaju nije bila moguća adekvatna analiza FISH signala. U analiziranim slučajevima podgrupa DLBCL prema Hansu i sur. nije nađena statistički značajna razlika obzirom na navedene citogenetske promjene *BCL6* gena ( $p=0,354$ ).

Učinjene su analize abnormalnosti *c-MYC* gena regije 8q24 u DLBCL i njegovih podgrupa. U jednom slučaju nije bilo moguće adekvatno analizirati FISH signale. U analiziranim slučajevima nije nađena statistički značajna razlika u podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. obzirom na navedene citogenetske promjene *c-MYC* gena ( $p=0,439$ ).

Radili smo analize krajnjeg ishoda liječenja i podgrupe DLBCL prema Hansu i sur. neovisno o analizi *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC* gena. U analiziranim slučajevima nije nađena statistički značajna razlika obzirom na krajnji ishod kod bolesnika i podgrupe DLBCL ( $p=0,506$ ).

Učinjene su analize krajnjeg ishoda liječenja kod bolesnika s podgrupama DLBCL i prisutnost translokacije *BCL2* gena. Krajnji ishod liječenja kod bolesnika nije pokazao statistički značajnu razliku u ishodu kod bolesnika s podgrupama DLBCL kojima je rađena analiza *BCL2* gena FISH tehnikom ( $p=0,314$ ).

Učinjene su analize krajnjeg ishoda liječenja kod bolesnika s podgrupama DLBCL i prisutnost translokacija i amplifikacija *BCL6* gena. Krajnji ishod liječenja i prisutne translokacije i amplifikacije *BCL6* gena kod bolesnika u odnosu na FISH analize nije pokazao statistički značajnu razliku u podgrupama DLBCL ( $p=0,279$ ).

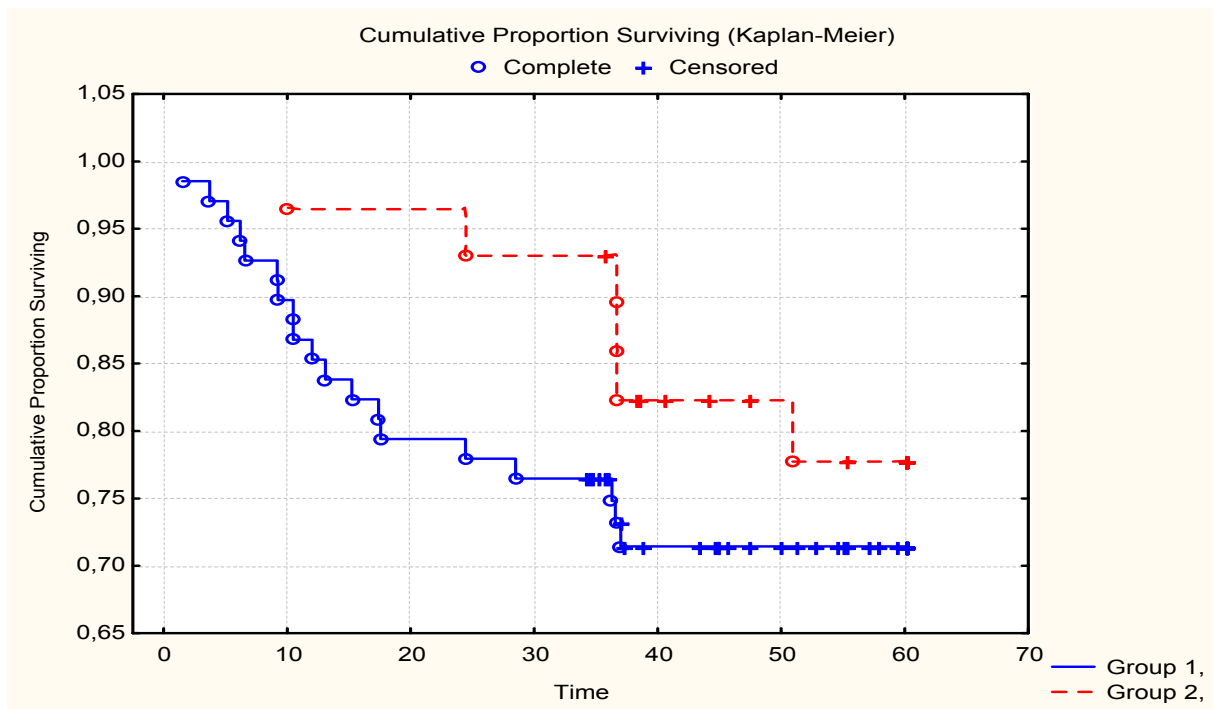
Učinjene su analize krajnjeg ishoda liječenja kod bolesnika s podgrupama DLBCL i prisutnost translokacija i amplifikacija *c-MYC* gena. Krajnji ishod liječenja i prisutne

translokacije i amplifikacije *c-MYC* gena kod bolesnika u odnosu na FISH analize nije pokazao statistički značajnu razliku u podgrupama DLBCL ( $p=0,922$ ).

Analizom preživljenja skupine bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. i prisutne translokacije i amplifikacije *BCL2* gena nije nađena statistički značajna razlika među navedenim podgrupama ( $p=0,315$ ) (Slika 7).

Analizom preživljenja bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. i prisutne translokacije i amplifikacije *BCL6* gena nije nađena statistički značajna razlika među navedenim podgrupama ( $p=0,299$ ) (Slika 8.).

Analizom preživljenja bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. i prisutne translokacije i amplifikacije *c-MYC* gena nije nađena statistički značajna razlika među navedenim podgrupama ( $p=0,862$ ) (Slika 9).

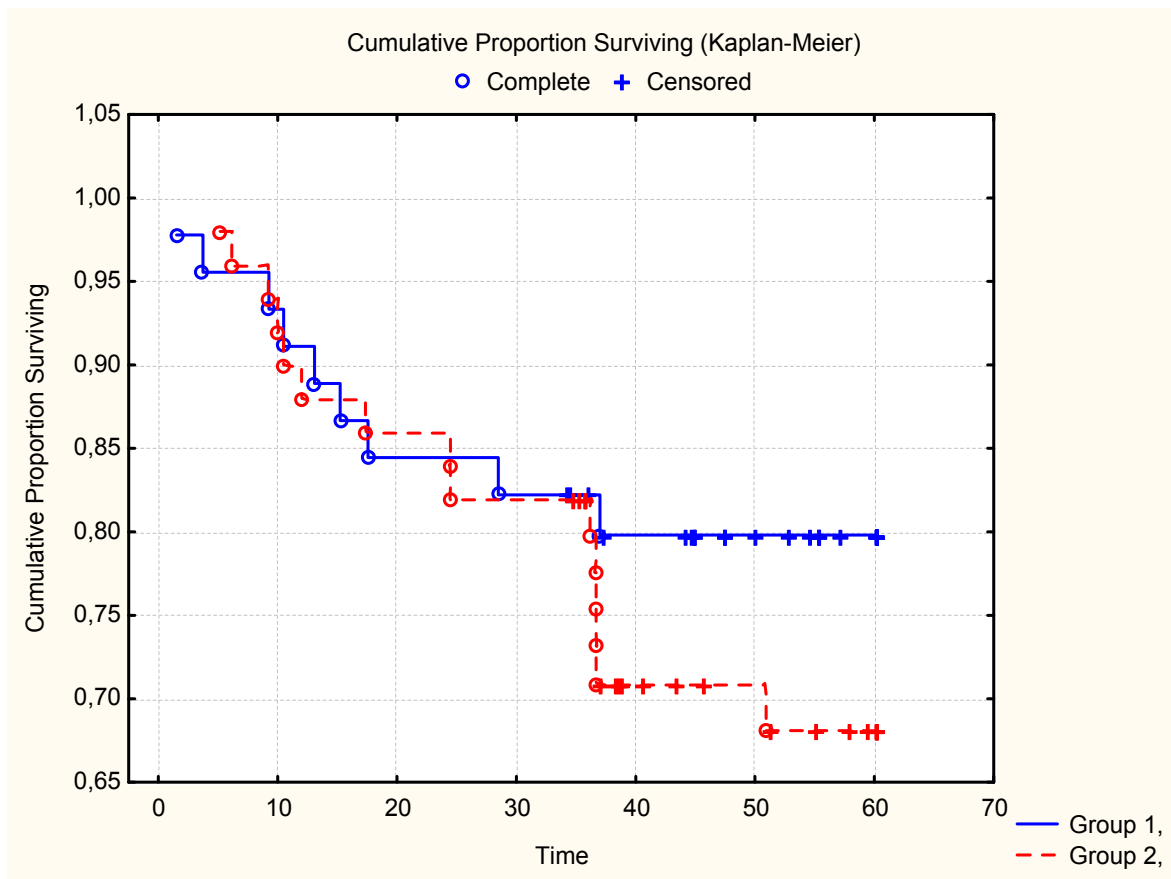


**Slika 7.** Analiza preživljenja bolesnika s podgrupama DLBCL po Hansu i sur. (2004) i *BCL2* translokacijom i amplifikacijom

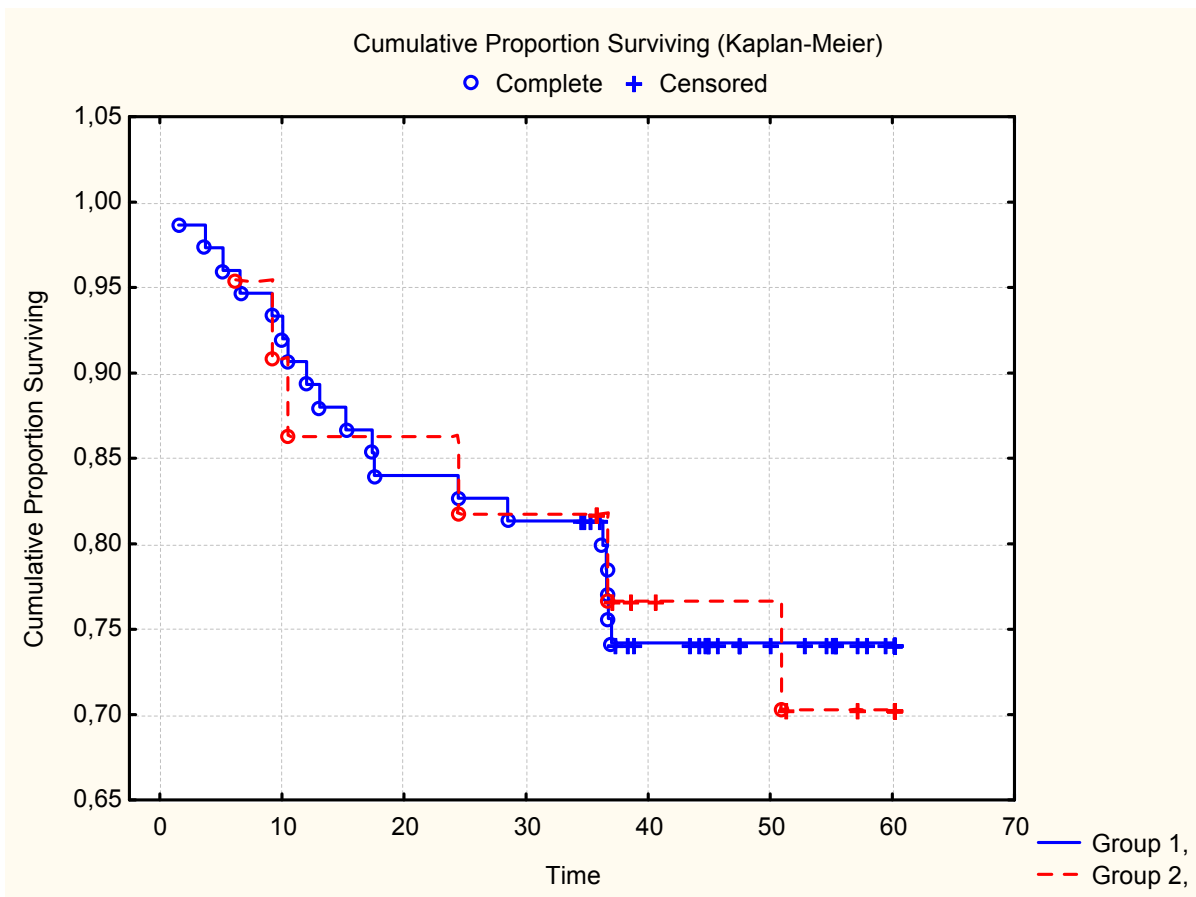
Legenda: Grupa 1 - *BCL2* poz, Grupa 2 - *BCL2* neg

$\chi^2=1,005$ ,  $p=0,315$





**Slika 8.** Analiza preživljenja bolesnika s podgrupama DLBCL po Hansu i sur .(2004) i prisutnom translokacijom i amplifikacijom gena *BCL6*  
 Legenda: Grupa 1 - *BCL6* neg, Grupa 2 - *BCL6* poz,  
 $\chi^2=0,038$ ,  $p=0,299$



**Slika 9.** Analiza preživljenja bolesnika s podgrupama DLBCL po Hansu i sur. (2004) i *c-Myc* translokacijom i amplifikacijom  
 Legenda: Grupa 1- *c-MYC* neg , Grupa 2 - *c-MYC* poz  
 $\chi^2=0,172$ ,  $p=0,862$

## **Dvostruka/trostruka translokacija kod DLBCL limfoma**

Analizirali smo istovremenu prisutnost translokacija t(14;18) i 8q24/c-*MYC* koji se u literaturi spominju kao "Dual hit" limfomi. "Triple hit" limfomi se nazivaju limfomi kod kojih su prisutne tri translokacije *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC*. U ispitivanoj grupi DLBCL dokazane su te promjene u 15 bolesnika, tako da ih nije bilo moguće statistički obraditi (Tablica 9).

U našim analizama nije nađeno da je prisutna predominacija pojavljivanja prema spolu, te ekstrapodalna zahvaćenost bolešću. Kod većine bolesnika je prisutan uznapredovali stadij, pojačana aktivnost serumske LDH, MPI s više čimbenika rizika, infiltracija koštane srži, prisutni B simptomi, prisutna velika tumorska masa, primjenjena je kemoterapija s rituksimabom. Kod većine bolesnika je postignuta kompletna remisija. U ovoj seriji bolesnika je gotovo jednak broj živih bolesnika i onih koji su umrli.

**Tablica 9.** Rezultati FISH analize kod bolesnika s DH/Triple hit DLBCL po Hansu i sur. (2004)

		Double /Triple hit
Broj		15
Spol	Muški	6
	Ženski	9
Dob	≤60	4
	>60	11
LDH	Normalna	5
	Povišena	10
Opće stanje bolesnika prema ECOG skali	0-1	14
	2-4	1
Klinički stadij po Ann Arbor klasifikaciji	I-II	4
	III-IV	11
Ekstranodalna zahvaćenost	Da	8
	Ne	7
MPI	0-1	4
	≥2	11
Infiltracija koštane srži	Da	12
	Ne	3
B simptomi	Prisutni	9
	Odsutni	6
Velika tm. masa	Prisutna	12
	Odsutna	3
Terapija	CHOP	2
	R-CHOP	13
Ishod	Mrtav	9
	Živ	6
Odgovor na terapiju	CR	9
	PR	3
	NR	3
PHD/Hans i sur.	GCB	5
	ABC	10

Legenda: LDH: laktat dehidrogenaza, MPI: Međunarodni prognostički indeks, CR: kompletna remisija, PR: parcijalna remisija, NR: bez odgovora na terapiju, CHOP kemoterapijska shema (ciklofosfamid, adriamicin, vinkristin, prednison), R-CHOP: rituksimab + (ciklofosfamid, adriamicin, vinkristin, prednison)

#### 4.4 Laboratorijski hematološki parametri

Rezultati univarijatnih prognostičkih analiza na laboratorijskim hematološkim parametrima nisu u našim analizama statistički značajni. Brzina sedimentacije eritrocita u prvom satu, koncentracija hemoglobina, odnosno prisustvo ili odsustvo anemije, broj leukocita i trombocita u trenutku postavljanja dijagnoze nisu značajni prognostički parametri u univarijatnoj analizi.

Bolesnici s ubrzanom SE u prvom satu u trenutku postavljanja dijagnoze imaju lošije očekivano preživljenje nego oni s nižim vrijednostima SE. Bolesnici su prema brzini SE u prvom satu podijeljeni u tri grupe-u prvu grupu sa SE do 40 mm Hg u prvom satu, u drugu grupu oni sa SE od 40 do 80 mm Hg u prvom satu, i treća grupa su bolesnici sa SE većom od 80 mm Hg u prvom satu. SE je prognostički značajan čimbenik, mada u našim analizama nije značajna ( $p=0,526$ ).

Koncentracija hemoglobina u krvi, odnosno prisustvo anemije u trenutku postavljanja dijagnoze nije se pokazalo u univarijatnoj analizi prognostički značajnim čimbenikom ( $p=0,138$ ). Bolesnici sa anemijom imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s koncentracijom hemoglobina u granicama referentnih vrijednosti u trenutku postavljanja dijagnoze. Budući da anemija može biti posljedica infiltracije koštane srži limfomskim stanicama analizirali smo posebno podatke bolesnika sa infiltracijom koštane srži i podatke bolesnika bez infiltracije koštane srži. U našim analizama nije nađeno da je hemoglobin prognostički značajan čimbenik.

Nalaz broja leukocita u univarijatnoj analizi nije prognostički značajan čimbenik u našim analizama.

Nalaz broja limfocita u perifernoj krvi u trenutku postavljanja dijagnoze nije se pokazao značajnim čimbenikom.

Broj trombocita u našim analizama nije prognostički značajan čimbenik. Bolesnici s brojem trombocita u granicama normalnih vrijednosti u trenutku postavljanja dijagnoze imaju najbolje očekivano preživljenje, mada naši rezultati nisu značajni.

#### 4.5 Laboratorijski biokemijski parametri

Tablica 10. prikazuje rezultate univarijatnih prognostičkih analiza na biokemijskim parametrima. Statistički su značajni parametri LDH, bakar, željezo, kalcij, alfa1-globulini i imunoglobulini G.

Aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) prognostički je značajan čimbenik. Bolesnike smo razvrstali s granicom LDH od 240 mmol/L, a to je granica referentnih laboratorijskih vrijednosti. LDH je u našim analizama prognostički značajan čimbenik (**p=0,044**) (Tablica 10). Krivulje očekivanog preživljenja bolesnika oboljelih od DLBCL obzirom na aktivnost LDH u trenutku postavljanja dijagnoze prikazane su na Slici 10.

Serumski bakar (Cu) je također statistički značajan čimbenik u univarijatnoj analizi. Bolesnici s povišenom vrijednosti serumskog bakra u trenutku postavljanja dijagnoze imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s vrijednostima serumskog bakra koja je u granicama referentnih vrijednosti (**p=0,0009**) (Slika 11) (Tablica 10).

Bolesnici sa vrijednostima AST, ALT, bilirubinom, AP, UIBC, urea, kreatinin, uratna kiselina, te fosfor u našim analizama nisu imali značajnu razliku u trenutku postavljanja dijagnoze kod bolesnika sa DLBCL.

Serumsko željezo (Fe) prognostički je značajan čimbenik u univarijatnim analizama. Kad se bolesnici podijele u dvije grupe s granicom serumskog željeza od 12  $\mu\text{mol/L}$ , oni s manjim vrijednostima serumskog željeza imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s većim vrijednostima serumskog željeza u krvi (**p=0,011**) (Tablica 10).

Povišena koncentracija serumskog kalcija u trenutku postavljanja dijagnoze u bolesnika s DLBCL ima prognostičku vrijednost. Univarijatnom prognostičkom analizom nađeno je da bolesnici s hipokalcemijom u trenutku postavljanja dijagnoze imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici sa serumskom kalcijem koji je u granicama referentnih vrijednosti i s povišenim vrijednostima. Podijelili smo bolesnike obzirom na koncentraciju serumskog kalcija u tri grupe, u grupu bolesnika s hipokalcemijom (serumski kalcij  $\leq 2,1$  mmol/L) i drugu grupu koja je obuhvaćala bolesnike s normalnim vrijednostima serumskog kalcija (serumski kalcij s granicom od 2,2 i 2,5 mmol/L). Treća grupa je obuhvaćala bolesnike s povišenim vrijednostima serumskog kalcija (serumski kalcij  $\geq 2,5$  mmol/L). Nađeno je da bolesnici s serumskim kalcijem većim od 2.5 mmol/L imaju najlošije očekivano preživljenje, a najbolje oni sa serumskim kalcijem u granicama referentnih vrijednosti. Razlika u očekivanom preživljenju je prognostički značajna (**p=0,030**) (Tablica 10).

Prognostičkom univarijatnom analizom serumskih bjelančevina nađeno je da bolesnici koji imaju ukupne bjelančevine u granicama referentnih vrijednosti od 60 do 75 g/L imaju najbolje očekivano preživljenje. U našim analizama nije dokazana značajnost (Tablica 10).

Albumini u našim analizama nisu prognostički značajni. Bolesnici s nižim vrijednostima albumina imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s koncentracijom albumina u granicama referentnih vrijednosti. Naši rezultati nisu značajni (Tablica 10).

Bolesnici s većom koncentracijom alfa1-globulina imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s manjom koncentracijom alfa1-globulina i rezultati su značajni ( $p=0,006$ ) (Tablica 10).

Gama-globulini nisu prognostički značajni. Bolesnici s koncentracijom gama-globulina većom od 20 g/L imaju bolje očekivano preživljenje nego bolesnici s nižim vrijednostima koncentracije gama-globulina. Bolesnici s koncentracijom gama-globulina u granicama normalnih vrijednosti (od 9,1 do 18 g/L) imaju najbolje očekivano preživljenje. U našim analizama rezultati nisu značajni (Tablica 10).

Imunoglobulini G imaju prognostičko značenje u univarijatnim analizama. Bolesnici s najnižim koncentracijama imunoglobulina G u trenutku postavljanja dijagnoze imaju lošije očekivano preživljenje, oni sa srednjim i povišenim vrijednostima koncentracije imunoglobulina imaju najbolje očekivano preživljenje. Razlika u očekivanom preživljenju između grupa bolesnika je značajna ( $p=0,001$ ) (Tablica 10).

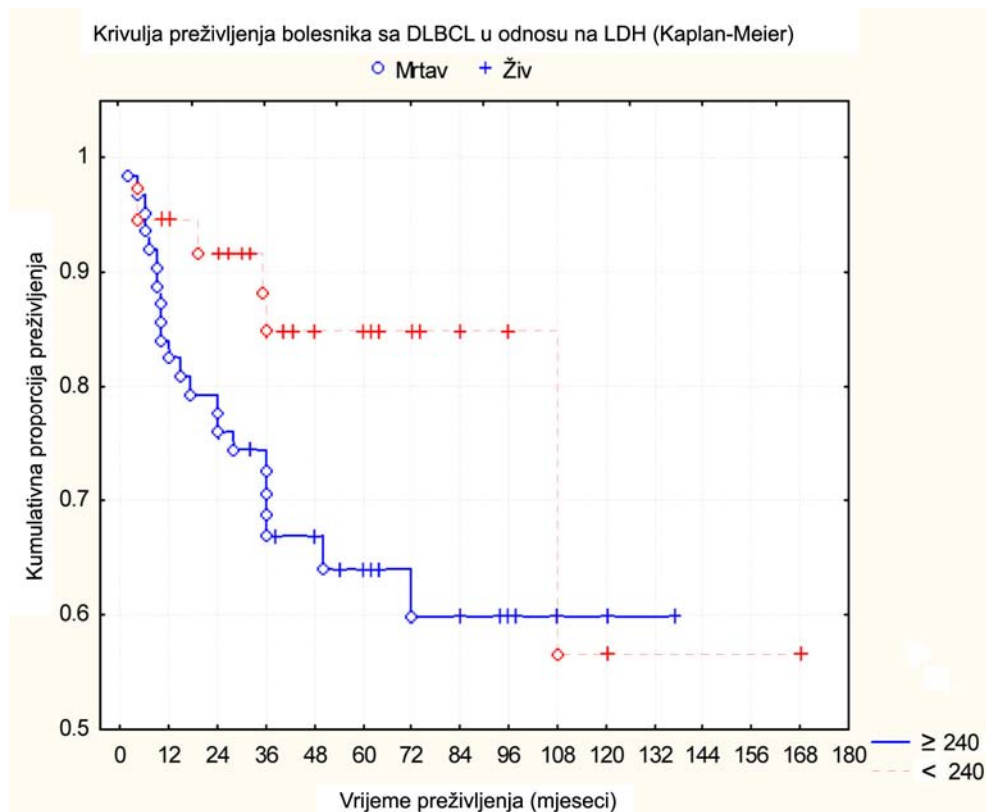
U našim analizama nije nađena značajna razlika u preživljenju kod bolesnika sa DLBCL obzirom na vrijednosti ukupnih proteina, albumina, alfa2-globulina, beta-globulina, gama-globulina, te, imunoglobulina A i imunoglobulina M (Tablica 10).

**Tablica 10.** Rezultati univarijatnih prognostičkih analiza na biokemijskim parametrima kod dijagnoze bolesnika sa DLBCL

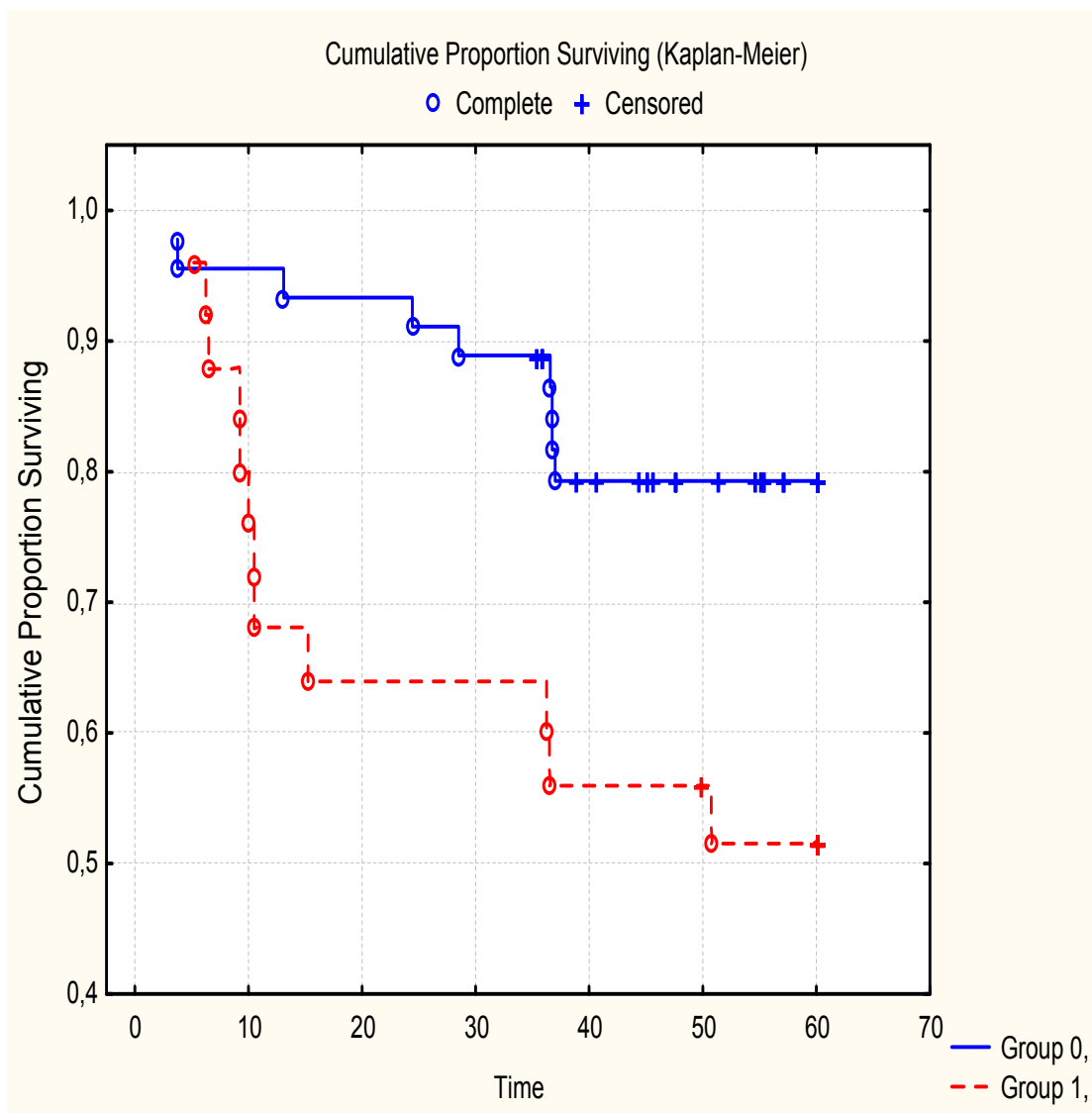
Prognostički čimbenik	Grupa	Broj bolesnika (%)	P
LDH	≤240	36 (36)	0,044
	>240	63 (64)	
Cu	≤23	61 (76)	0,0009
	>23	19 (24)	
Fe	≤12	63 (64)	0,011
	>12	36 (36)	
Ca	≤2,1	13 (13)	0,030
	2.2-2,5	70 (71)	
	>2,5	16 (16)	
Ukupni proteini	<60	27 (27)	0,115
	60-75	53 (54)	
	>75	19 (19)	
Albumini	≤53	34 (34)	0,644
	>53	65 (66)	
Alfa1-globulini	≤3,7	58 (59)	0,006
	>3,7	41 (41)	
Alfa2-globulini	≤8,5	14 (14)	0,433
	>8,5	85 (86)	
Beta-globulini	≤8,6	17 (17)	0,162
	>8,6	82 (83)	
Gama-globulini	≤9,0	18 (18)	0,062
	9,1-18	44 (45)	
	>18	37 (37)	
IgG	≤7	29 (29)	0,001
	>7,0	70 (71)	
IgA	≤0,7	34 (34)	0,112
	0,8-4	46 (47)	
	>4	19 (19)	
IgM	≤2,3	89 (90)	0,922
	>2,3	10 (10)	

Legenda: LDH - laktat dehidrogenaza, Cu - bakar, Fe - željezo, Ca - kalcij, IgG: - imunoglobulin G, IgA: - imunoglobulin A, IgM: - imunoglobulin M.





**Slika 10.** Preživljenje bolesnika sa DLBCL obzirom na LDH u trenutku postavljanja dijagnoze  
 $\chi^2 = 2,046$ ,  $p = 0,044$



**Slika 11.** Preživljenje bolesnika s DLBCL obzirom na Cu u trenutku postavljanja dijagnoze  
 Legenda: Grupa 0 – Cu ≤ 23 μmol/L, Grupa 1 - Cu > 23 μmol/L  
 $\chi^2=11,02083$ ,  $p=0,0009$

Analizirano je niz parametara, a bolesnici su grupirani prema spolu (Tablica 11).

Neke varijable zadržavaju prognostičku značajnost samo u jednoj od navedenih grupa, dok u drugoj grupi bolesnika više nisu prognostički značajne.

Ni jedna varijabla ne zadržava prognostičku efikasnost u grupi muških i u grupi ženskih bolesnika. Varijable AST, uratna kiselina, kalcij, željezo, ukupni proteini, alfa1-globulini i IgG su prognostički značajni samo u grupi muških bolesnika, dok ni jedna navedena varijabla nije prognostički značajna u grupi ženskih bolesnika. Varijable hemoglobin, LDH, AP, ALT, urea, kreatinin, P, UIBC, albumini, alfa2-globulini, beta-globulini, i gama-globulini nisu prognostički značajni niti u jednoj grupi bolesnika.

Vrijednosti serumske AST je statistički značajan parametar kod muških bolesnika, te bolesnici s normalnim nalazima imaju bolje očekivano preživljenje ( $p=0,047$ ) (Tablica 11).

U grupi muških bolesnika mokraćna kiselina je statistički značajan parametar. Bolesnici s povišenom koncentracijom mokraćne kiseline u krvi imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s nalazom u granicama normalnih vrijednosti ( $p=0,017$ ) (Tablica 11).

Serumski kalcij je u muških bolesnika prognostički značajan kao i u čitavoj grupi bolesnika s DLBCL. Bolesnici s višim vrijednostima serumskog kalcija imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s nižim vrijednostima serumskog kalcija ( $p=0,006$ ) (Tablica 11).

Serumsko željezo je prognostički značajan čimbenik u univarijantnim analizama kod muških bolesnika. Bolesnici s vrijednostima od 12  $\mu\text{mol/L}$  i manjim imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s većim vrijednostima serumskog željeza u krvi ( $p=0,011$ ) (Tablica 11).

Ukupne bjelančevine su prognostički značajne kod muških bolesnika. Grupa bolesnika sa hipoproteinemijom ima lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s ukupnim bjelančevinama u krvi koje su u granicama normalnih vrijednosti ( $p=0,006$ ) (Tablica 11).

Alfa1-globulini su u muških bolesnika prognostički značajni. Bolesnici s većom koncentracijom imaju lošije preživljenje ( $p= 0,0008$ ) (Tablica 11).

Imunoglobulini G imaju prognostičko značenje u univarijantnim analizama kod muških bolesnika. Bolesnici s nižim koncentracijama imunoglobulina G u trenutku postavljanja dijagnoze imaju lošije očekivano preživljenje, dok oni sa referentnim vrijednostima imaju najbolje očekivano preživljenje. Razlika u očekivanom preživljenju između grupa bolesnika je značajna ( $p=0,00005$ ) (Tablica 11).

**Tablica 11.** Rezultati univarijatne prognostičke analize obzirom na spol bolesnika s DLBCL u trenutku postavljanja dijagnoze

Prognostički čimbenik	Granice	Muškarci		Žene	
		Br. bolesnika 46 (%)	P	Br. bolesnika 53 (%)	P
Hb	≤120	16 (35)	0,484	24 (45)	0,168
	>120	30 (65)		29 (55)	
LDH	≤240	18 (39)	0,227	17 (32)	0,134
	>240	28 (61)		36 (68)	
AP	≤180	30 (65)	0,087	38 (72)	0,141
	>180	16 (35)		15 (28)	
AST	≤22	20 (43)	0,047	23 (43)	0,959
	>22	26 (57)		30 (57)	
ALT	≤22	14 (30)	0,071	32 (60)	0,947
	>22	32 (70)		21 (40)	
Urea	≤8	36 (78)	0,238	37 (70)	0,596
	>8	10 (22)		16 (30)	
Kreatinin	≤100	30 (65)	0,953	37 (70)	0,125
	>100	16 (35)		16 (30)	
Uratna kiselina	≤240	16 (35)	0,017	18 (34)	0,534
	>240	30 (65)		35 (66)	
Ca	≤2,1	14 (30)	0,006	16 (30)	0,417
	>2,1	32 (70)		37 (70)	
P	≤1,4	35 (76)	0,215	39 (74)	0,227
	>1,4	11 (24)		14 (26)	
Fe	≤12	29 (63)	0,011	39 (74)	0,209
	>12	17 (37)		14 (26)	
UIBC	≤32	22 (48)	0,404	26 (49)	0,115
	>32	24 (52)		27 (51)	
Ukupni proteini	≤66	11 (24)	0,006	14 (26)	0,087
	>66	35 (76)		39 (74)	
Albumini	≤53	13 (28)	0,507	21 (40)	0,639
	>53	33 (72)		32 (60)	
Alfa1-globulini	≤3,5	14 (30)	0,0008	23 (43)	0,596
	>3,5	32 (70)		30 (57)	
Alfa2-globulini	≤8,5	16 (35)	0,827	16 (30)	0,194
	>8,5	30 (65)		37 (70)	
Beta-globulini	≤8,6	16 (35)	0,113	16 (30)	0,169
	>8,6	30 (65)		37 (70)	
Gama-globulini	≤9	13 (28)	0,188	16 (30)	0,245
	>9	33 (72)		37 (70)	
IgG	≤16	33 (72)	0,00005	39 (74)	0,563
	>16	13 (28)		14 (26)	

Legenda: Hb - hemoglobin, LDH - laktat dehidrogenaza, AP - alkalna fosfataza, AST - aspartat transaminaza, ALT - alanin transaminaza, Ca - kalcij, P - fosfor, Fe - željezo, UIBC - nevezana sposobnost vezanja željeza, IgG - imunoglobulin G.

#### **4.6 Prognoštičke analize prema Međunarodnom prognoštičkom indeksu (MPI) u pojedinim podgrupama bolesnika sa DLBCL prema Hansu i sur (2004).**

Univarijantnim prognoštičkim analizama kod bolesnika sa DLBCL analizirana je prognoštička snaga MPI-a (Tablica 12). Univarijantnom analizom svih bolesnika sa DLBCL je nađeno da je MPI prognoštički značajan. Bolesnici s malim brojem rizičnih čimbenika (0 i 1) odnosno malim indeksom prema navedenom prognoštičkom modelu imaju dobro očekivano preživljenje, dok oni s većim brojem rizičnih čimbenika (2 i više čimbenika), odnosno s većim brojem bodova imaju lošije očekivano preživljenje (**p=0,040**) (Tablica 12). Krivulje očekivanog preživljenja u bolesnika s DLBCL prema rizičnim čimbenicima prognoštičkog modela MPI prikazane su na Slici 12.

MPI je prognoštički značajan u grupi bolesnika sa GCB. Bolesnici s malim indeksom (0 i 1) prema MPI imaju bolje očekivano preživljenje, nego bolesnici s većim brojem rizičnih čimbenika. Razlika je statistički značajna (**p=0,025**) (Slika 13).

MPI se može primijeniti i kod ABC podgrupe DLBCL. I tu smo bolesnike podijeli u 2 grupe. U prvoj skupini je grupa bolesnika s niskim rizikom, a u drugoj skupini su bolesnici s većim brojem rizičnih faktora od 2. U našim rezultatima nije nađena značajnost ( $p=0,111$ ).

Kod tip 3 podgrupe limfoma bolesnike smo grupirali u 2 grupe. U prvoj grupi su bolesnici koji imaju mali broj rizičnih čimbenika, a u drugoj grupi su oni koji imaju veći broj rizičnih čimbenika od 2. Naši rezultati nisu značajni ( $p=0,058$ ) (Tablica 12).

Spol sam po sebi nije prognoštički značajan u univarijantnoj analizi. U našoj grupi bolesnika najbolje očekivano preživljenje imaju bolesnici ženskog spola s malim indeksom prema MPI (**p=0,032**) (Tablica 12).

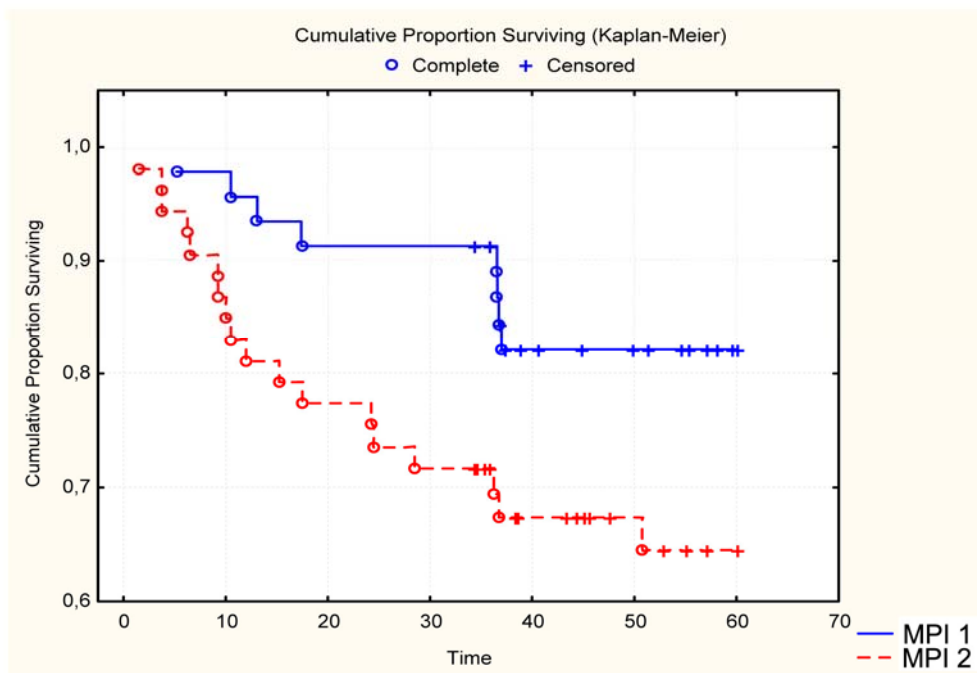
Analizirana je i prognoštička učinkovitost prognoštičkog modela prema MPI kad se bolesnici grupiraju u one sa infiltracijom koštane srži limfomskim stanicama i u one bez infiltracije koštane srži. Bolesnici s infiltracijom koštane srži i niskim indeksom prema MPI, tj. niskim rizikom za smrtni ishod imaju bolje očekivano preživljenje, dok oni s većim indeksom, odnosno većim rizikom smrtnosti imaju lošije očekivano preživljenje. Nađena je značajna povezanost (**p=0,004**) (Tablica 12).

Grupa bolesnika bez infiltracije koštane srži je tri puta veća nego ona sa infiltracijom koštane srži. Grupa bolesnika bez infiltracije koštane srži i niskim indeksom prema MPI ima najbolje očekivano preživljenje, dok oni s većim indeksom, odnosno s višim rizikom smrtnosti imaju lošije očekivano preživljenje. Razlika u preživljenju nije značajna ( $p=0,435$ ) (Tablica 12).

**Tablica 12.** Rezultati univarijatne prognostičke analize u bolesnika s DLBCL po Hansu i sur. (2004) razvrstani prema riziku smrtnosti prema prognostičkom modelu MPI

MPI kod	Rizik prema MPI	Broj bolesnika (%)	P
Svi bolesnici	0-1	46 (46)	0,040
	$\geq 2$	53 (54)	
GCB	0-1	11 (44)	0,025
	$\geq 2$	14 (56)	
ABC	0-1	22 (41)	0,111
	$\geq 2$	32 (59)	
Tip 3	0-1	12 (60)	0,058
	$\geq 2$	8 (40)	
Ženski bolesnici	0-1	24 (45)	0,032
	$\geq 2$	29 (55)	
Muški bolesnici	0-1	22 (48)	0,087
	$\geq 2$	24 (52)	
Infiltracija koštane srži	0-1	10 (43)	0,004
	$\geq 2$	13 (57)	
Bez infiltracije koštane srži	0-1	41 (54)	0,435
	$\geq 2$	35 (46)	

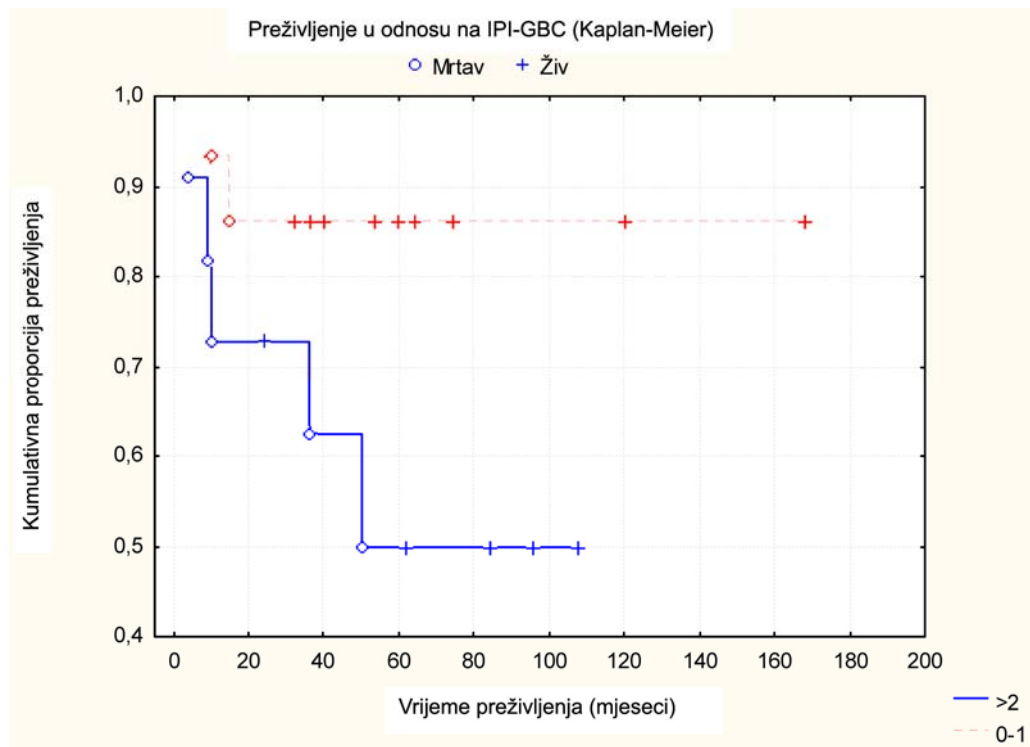
Legenda: GCB: - limfom germinalnog centra B stanica, ABC: - aktivirani B-stanični limfom, tip 3: - primarni medijastinalni B-stanični limfom



**Slika 12.** Preživljenje bolesnika s DLBCL obzirom na rizične grupe prema prognostičkom modelu MPI

Legenda: MPI 1 prisutan 0 i 1 faktor rizika za smrtni ishod, MPI 2 2 i više faktora rizika za smrtni ishod

$$\chi^2 = 2,044, p = 0,040$$



**Slika 13.** Preživljenje bolesnika s obzirom na rizične grupe prema prognostičkom modelu MPI kod GCB-a

Legenda: MPI 1 prisutan 0 i 1 faktor rizika za smrtni ishod, MPI 2  $\geq$  2 faktora rizika za smrtni ishod, GCB - limfom germinalnog centra B stanica  
 $\chi^2=1,568$ ,  $p=0,025$



Analizirani su hematološki parametri i učinkovitost prognostičkog modela prema MPI u pojedinim grupama bolesnika.

Bolesnici su obzirom na brzinu SE u prvom satu podijeljeni u one sa SE manjom i one s SE od 40 mm i većom u prvom satu. U grupi bolesnika sa SE manjom od 40 mm u prvom satu i niskim rizikom smrtnog ishoda, odnosno sa indeksom 0 i 1 prema prognostičkom modelu MPI imaju najbolje očekivano preživljenje. Bolesnici sa SE u prvom satu manjom od 40 mm razlikuju se obzirom na očekivano preživljenje prema stupnju rizika prema prognostičkom modelu MPI. I ovdje bolesnici s malim indeksom prema MPI imaju najbolje očekivano preživljenje. Razlika između pojedinih grupa prema MPI je značajna (**p=0,025**) (Tablica 13). Bolesnici s SE od 40 mm i višom i većim indeksom imaju sve lošije očekivano preživljenje. Razlika u očekivanom preživljenju među pojedinim grupama bolesnika prema riziku smrtnog ishoda je značajna (**p=0,019**).

Bolesnike smo razvrstali prema koncentraciji hemoglobina u krvi. U grupi bolesnika koji nemaju anemiju u trenutku postavljanja dijagnoze i niski rizik smrtnog ishoda imaju najbolje očekivano preživljenje. Razlika između pojedinih grupa u našim rezultatima nije značajna (**p=0,105**) (Tablica 13).

Bolesnike sa serumskim željezom od 10 µg/L i s manjim koncentracijama serumskog željeza grupirali smo u dvije grupe sa niskim smrtnim rizikom i ona grupa koja ima više od 2 rizična faktora. Univarijatnom prognostičkom analizom nađeno je da vrijednosti MPI i serumsko željezo nisu statistički značajni, odnosno njegova značajnost je granična (**p=0,058**) (Tablica 13).

Bolesnike s ukupnim bjelančevinama od 60 g/L i većim smo grupirali u dvije grupe s niskim smrtnim rizikom i ona grupa koja ima više od 2 rizična faktora. Nađeno je da je MPI prognostički značajan kod bolesnika sa niskim smrtnim rizikom (**p=0,004**) (Tablica 13).

Albumini su se pokazali statistički značajni. Podijelili smo bolesnike s granicom serumskih albumina od 53 g/L. U grupi bolesnika sa albumina od 53 g/L i nižim vrijednostima nađeno je da je MPI prognostički značajan. Bolesnici razvrstani prema riziku smrtnosti obzirom na broj rizičnih čimbenika imaju statistički značajno bolje preživljenje u grupi s nižom koncentracijom serumskih albumina (**p=0,006**), ali i u grupi s povišenim serumskim albuminima (**p=0,012**) (Tablica 13).

U bolesnika sa bilirubinom većim od 18 µmol/L prognostička analiza je pokazala da MPI nije prognostički značajan.

U bolesnika s AST od 23 U/L i većim prognostička analiza pokazala je da je MPI prognostički značajan čimbenik (**p=0,019**) (Tablica 13).

U grupi bolesnika s povišenom aktivnosti alkalne fosfataze (AP) MPI se nije pokazao prognostički značajnim ( $p=0,531$ ).

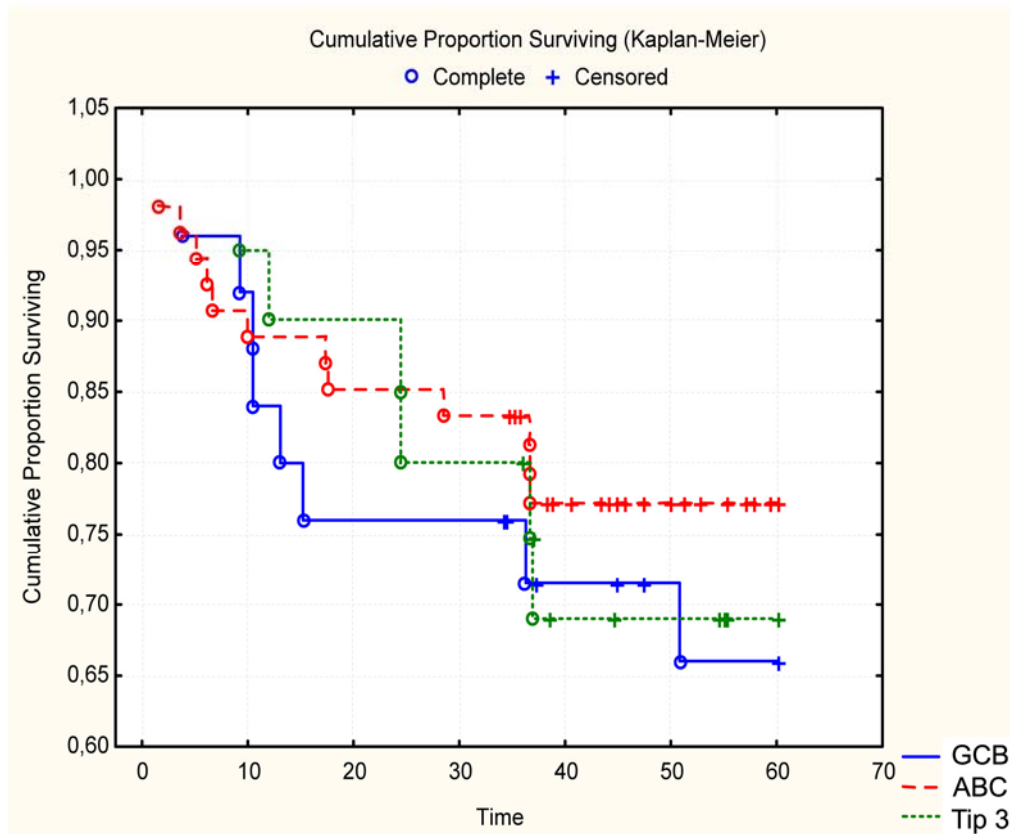
**Tablica 13.** Rezultati univarijatne prognostičke analize na hematološkim i biokemijskim parametarima u bolesnika s DLBCL razvrstanih prema riziku smrtnosti prema prognostičkom modelu Međunarodni prognostički indeks (MPI)

MPI kod	Stupanj rizika kod MPI	Broj bolesnika (%)	P
SE <40 (mm/1.h)	0-1	30 (48)	0,025
	$\geq 2$	33 (52)	
SE $\geq 40$ (mm/1.h)	0-1	16 (44)	0,019
	$\geq 2$	20 (56)	
Fe $\leq 10$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	0-1	18 (40)	0,058
	$\geq 2$	27 (60)	
Fe >10 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0-1	28 (52)	0,472
	$\geq 2$	26 (48)	
Ukupni proteini $\geq 60$	0-1	33 (45)	0,004
	$\geq 2$	40 (65)	
Albumini $\leq 53$ (g/L)	0-1	13 (38)	0,006
	$\geq 2$	21 (62)	
Albumini >53 (g/L)	0-1	33 (51)	0,012
	$\geq 2$	32 (49)	
AST $\geq 23$ (U/L)	0-1	20 (40)	0,019
	$\geq 2$	30 (60)	

Legenda: SE: - brzina sedimentacije eritrocita u 1 satu, Hb: - koncentracija hemoglobina u krvi, Fe: - željezo u serumu, AST: - aspartat transaminaza,

#### 4.7 Usporedba utjecaja fenotipskih karakteristika na preživljenje bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. (2004)

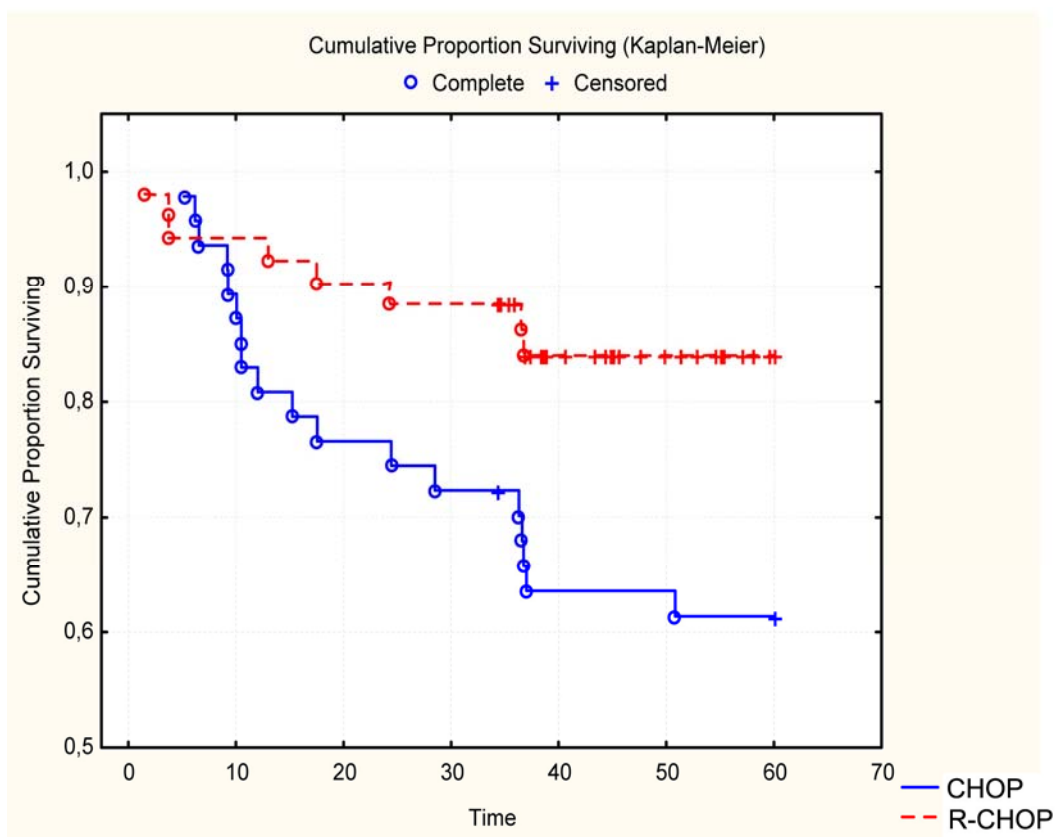
Analizirali smo preživljenje bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hans i sur. klasifikaciji. U ispitivanoj grupi bolesnika s DLBCL-om nije nađena značajna razlika u preživljenju među podgrupama DLBCL-a klasificiranim prema Hans i sur. ( $p=0,714$ ) (Slika 14).



**Slika 14.** Očekivano preživljenje bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. (2004)  
Legenda: GCB - limfom B stanica germinalnog centra, ABC – limfom aktiviranih zrelih B staniča, tip 3 - primarni medijastinalni B-stanični limfom  
 $\chi^2=0,872988$ ,  $p=0,714$

#### 4.8 Analiza preživljenja bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. (2004) i obzirom na terapiju

Analizirali smo preživljenje bolesnika obzirom na primijenjenu terapiju. Bolesnici su bili razvrstani u skupinu liječenih po shemi rituksimab-CHOP i skupinu koja je liječena kemoterapijom po shemi CHOP. Bolesnici liječeni po shemi rituksimab-CHOP imaju statistički značajno duže preživljenje ( $p=0,017$ ). Rezultati su prikazani na Slici 15.



**Slika 15.** Očekivano preživljenje bolesnika s podgrupama DLBCL prema Hansu i sur. (2004) i prema primijenjenoj terapiji

Legenda: CHOP: ciklofosfamid, adriamicin, vinkristin, prednison, R-CHOP: rituksimab-ciklofosfamid, adriamicin, vinkristin, prednison

$\chi^2 = 2,382$ ,  $p = 0,017$

## 4.9 Multivarijatne analize

Multivarijatnom prognostičkom analizom obuhvaćene su 33 varijable u trenutku postavljanja dijagnoze kod 99 bolesnika s DLBCL. Analizirane varijable su: životna dob, infiltracija koštane srži, duljina trajanja limfadenopatije prije postavljanja dijagnoze, veličina najvećeg palpabilnog limfnog čvora, veličina palpabilne jetre, veličina palpabilne slezene, MPI, brzina sedimentacije eritrocita u prvom satu, koncentracija hemoglobina u krvi, broj leukocita, limfocita i trombocita, serumski bilirubin, AST, ALT, AP, LDH, Fe, UIBC, urea, kreatinin, uratna kiselina, Ca, P, ukupne bjelančevine, albumini, alfa1-globulini, alfa2-globulini, beta-globulini, gama-globulini, imunoglobulini G, A, i M u elektroforezi serumskih bjelančevina.

Multivarijatnom analizom koja je učinjena na spomenutim parametrima u bolesnika s DLBCL u trenutku postavljanja dijagnoze nađeno je da su nezavisni prognostički čimbenici: životna dob, prisutnost uvećanih limfnih čvorova, veličina jetre, stadij III i IV, infiltracija koštane srži, SE, AP, AST, UIBC, kreatinin, beta-globulin i gama-globulin.

Multivarijatna analiza koja je uključivala ishod kod bolesnika i prognostičke čimbenike za koje je analiza preživljenja pokazala da imaju statistički značajan utjecaj na preživljenje pokazala je da su uz kategoriju ishoda bolesti vezane kategorije: da je bolesnik postigao kompletnu remisiju, terapijska shema R-CHOP, MPI 0-1, stadij bolesti I i II i odsutnost B simptoma. Loš prognostički ishod za bolesnike su imale ove varijable: prisutnost infiltracije koštane srži, terapija po shemi CHOP,  $MPI \geq 2$ , stadiji bolesti III i IV, prisutnost B simptoma, ABC podgrupa po Hansu i sur., prisutnost *BCL2* translokacije, te *c-MYC* translokacije.

Analiza preživljenja učinjena na zavisnim varijablama je dala rezultate koji su navedeni u Tablici 14. Cox-ova regresija pokazuje da najveći utjecaj na preživljenje imaju alfa1-globulin, veličina palpabilne jetre i Fe.

**Tablica 14.** Regresijska analiza preživljenja kod zavisnih varijabli

Cox-ova regresija						
Zavisna varijabla: Preživljenje (mjeseci), Chi2 = 36,422 df = 13 p = ,00051						
Prognostički čimbenik	Beta	Standardna pogreška	t	Exponent beta	Wald Statist.	P
<b>Dob</b>	0,016	0,018	0,926	1,016	0,858	0,354
<b>LDH</b>	0,001	0,000	1,496	1,001	2,237	0,135
<b>Duljina trajanja simptoma</b>	-0,052	0,060	-0,872	0,949	0,760	0,383
<b>Veličina jetre</b>	0,371	0,135	2,754	1,450	7,583	<b>0,006</b>
<b>SE</b>	-0,006	0,007	-0,876	0,994	0,768	0,381
<b>AP</b>	-0,000	0,003	-0,010	1,000	0,000	0,992
<b>AST</b>	0,022	0,016	1,356	1,022	1,840	0,75
<b>Fe</b>	-0,107	0,051	-2,109	0,899	4,448	<b>0,035</b>
<b>UIBC</b>	-0,016	0,022	-0,720	0,984	0,519	0,471
<b>Kreatinin</b>	-0,011	0,008	-1,335	0,989	1,782	0,182
<b>Alfa 1 globulin</b>	0,964	0,303	3,183	2,621	10,130	<b>0,001</b>
<b>Beta globulin</b>	0,033	0,103	0,316	1,033	0,100	0,752
<b>Gama globulin</b>	-0,051	0,040	-1,267	0,951	1,605	0,205

Analizirali smo zatim posebno grupu bolesnika s GBC podgrupom DLBCL, a zatim one s ABC podgrupom i tip 3 podgrupom.

U grupi bolesnika s GCB podgrupom nezavisni prognostički čimbenici nađeni multivarijatnom analizom su prisutnost veličine tumorske mase (**p=0,008**), aktivnost alkalne fosfataze (**p=0,044**) i vrijednosti gama globulina (**p=0,005**). Budući da je ova multivarijatna analiza učinjena samo u jednoj grupi bolesnika prema imunohistokemijskom nalazu, varijabla stupanj malignosti nije uključena u analizu (Tablica 15).

**Tablica 15.** Rezultati stupnjevite multivarijatne analize kod bolesnika sa GCB podgrupom DLBCL prema Hansu i sur. (2004)

Stupanj	Varijabla	Multiple R	Multiple R <sup>2</sup>	Poboljšanje	F	P
1	Gama globulin	0,529	0,280	0,280	9,344	<b>0,005</b>
2	AP	0,631	0,399	0,118	4,529	<b>0,044</b>
3	Veličina tm. mase	0,751	0,564	0,166	8,377	<b>0,008</b>

U grupi bolesnika s ABC skupinom najjači nezavisni prognostički čimbenik je varijabla koja se i u dosadašnjim analizama pokazala kao nezavisni prognostički čimbenik a to je AST ( $p=0,010$ ) i gama globulini ( $p=0,018$ ) (Tablica 16).

**Tablica 16.** Rezultati stupnjevite multivarijatne analize kod bolesnika sa ABC podgrupom DLBCL prema Hansu i sur. (2004)

Stupanj	Varijabla	Multiple R	Multiple R <sup>2</sup>	Poboljšanje	F	P
1	Gama globulin	0,233	0,054	0,054	2,814	0,010
2	AST	0,323	0,104	0,050	2,687	0,018

U grupi bolesnika s tip 3 podgrupom najjači nezavisni prognostički čimbenik je varijabla koja se i u dosadašnjim analizama pokazala kao nezavisni prognostički čimbenik, a to je životna dob bolesnika ( $p=0,011$ ), vrijednosti AST ( $p=0,003$ ), vrijednosti gama-globulina ( $p=0,037$ ), veličina palpabilne jetre ( $p=0,075$ ), vrijednosti UIBC ( $p=0,256$ ) u trenutku postavljanja djagnoze (Tablica 17).

**Tablica 17.** Rezultati stupnjevite multivarijatne analize kod bolesnika sa tip 3 podgrupom DLBCL prema Hansu i sur. (2004)

Stupanj	Varijabla	Multiple R	Multiple R <sup>2</sup>	Poboljšanje	F	P
1	Dob	0,528	0,279	0,279	7,746	0,011
2	AST	0,745	0,554	0,275	11,741	0,003
3	Gama globulin	0,808	0,653	0,098	5,096	0,037
4	Veličina jetre	0,845	0,713	0,061	3,599	0,075
5	UIBC	0,858	0,736	0,023	1,391	0,256

## 5. RASPRAVA

DLBCL je najčešći ne-Hodgkinov limfom i čini 30 do 40% svih novo dijagnosticiranih limfoma. DLBCL je klinički i morfološki heterogeni limfom. Bez obzira na primjenjenu, (najčešće antraciklinsku) terapiju dugotrajne remisije se postižu u 40% do 50% bolesnika s DLBCL-om.

S kliničkog je stajališta važno omogućiti preciznije razvrstavanje bolesnika zbog pouzdanijeg planiranja terapije. Zbog toga je cilj ovog rada bio utvrditi karakteristike naših bolesnika obzirom na klinička obilježja, hematološke i biokemijske parametre, imunohistokemijske i FISH analize i ustanoviti prognostičku značajnost svakog od tih parametara kako bi se otkrili oni bolesnici kojima je potrebna ili agresivnija ili eksperimentalna terapija. Prognoza DLBCL-a se danas postavlja koristeći kliničke parametre Međunarodnog prognostičkog indeksa (MPI). Temeljem MPI bolesnici s DLBCL-om se mogu svrstati u dvije skupine, oni s niskim i oni s visokim rizikom.

Klinički parametri MPI su mješavina mogućih prisutnih bioloških i/ili gubitak promjena kod tih bolesnika. Iz tih razloga smo u našoj grupi bolesnika pokušali objasniti i iznaći one prisutne promjene, koje bi imale prediktivnu vrijednost.

Univarijantnim je analizama otkriven čitav niz prognostičkih čimbenika koji su statistički značajni u našoj grupi bolesnika s DLBCL. Analizirali smo slijedeće parametre:

- klinički parametri: životna dob bolesnika, spol, trajanje limfadenopatije prije dijagnoze, veličinu limfnog čvora, veličinu palpabilne jetre i slezene, proširenost bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji, prisutnost općih simptoma, te opće stanje bolesnika. Od svih navedenih parametara prognostički su značajni veličina palpabilne jetre i slezene i prisutnost općih simptoma.
- morfološki parametri: analizirana je infiltracija koštane srži u bolesnika s DLBCL u trenutku postavljanja dijagnoze. Bolesnici su podijeljeni u tri grupe po klasifikaciji Hans i sur., analizirani su imunohistokemijskim analizama prisutnost VEGF i NF- $\kappa$ B u citoplazmi i jezgri, te promjene gena *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC*.
- laboratorijski parametri –  
hematološki parametri: brzina SE u prvom satu, koncentracija hemoglobina u krvi, broj leukocita, limfocita, trombocita. Brzina SE u prvom satu je bila statistički značajna razvrstana prema prognostičkom modelu MPI, dok ostali parametri nisu značajni.



biokemijski parametri: serumski LDH, bakar, AP, AST, ALT, bilirubin, serumsko željezo, UIBC, mokraćna kiselina, kalcij, fosfor, ukupni proteini, albumini u krvi, alfa1-globulini, beta globulini, gama-globulini, imunoglobulin G, A i M u elektroforezi serumskih bjelančevina. Rezultati LDH, Cu, Fe, Ca, alfa1-globulini i imunoglobulini G su u našim analizama statistički značajni. Rađene su analize s obzirom na spol bolesnika, i analize su pokazale da su AST, uratna kiselina, kalcij, željezo, ukupni proteini, alfa1-globulini, te imunoglobulini G prognostički značajan čimbenik. Pema prognostičkom modelu MPI prognostički su značajni svi bolesnici, bolesnici s GCB podgrupom, ženski bolesnici, s prisutnom infiltracijom koštane srži, s  $SE < 40 \text{ mm/1 h}$ , ali i  $\geq 40 \text{ mm/1 h}$ , te ukupni proteini, albumini i AST.

U našoj grupi ispitanika, bolesnici su bili starije životne dobi ( $>60$ ) i nismo našli da je varijabla dob prognostički značajan čimbenik. U mnogim analiziranim grupama bolesnika nalazi se da su bolesnici s dijagnosticiranom bolešću srednje i starije životne dobi (Nicolandes i sur. 1998, Zucca i sur. 2000, Veelken i sur. 2007). Međutim, ni drugi autori ne nalaze da je varijabla dobi prognostički značajan čimbenik (Bea i sur. 2004, Nakamura i sur. 2008, Hoppe i sur. 2009). Dob sama za sebe nije apsolutni čimbenik za preživljenje. Analizirali smo dalje da li je životna dob prognostički čimbenik ako se bolesnici podijele u grupe prema spolu. Kad smo podijelili bolesnike obzirom na spol bolesnika životna dob i dalje nije prognostički čimbenik.

Drugi autori nalaze da je dob značajan prognostički čimbenik, nalazi se uključena u MPI i prisutan jedan čimbenik već umanjuje petogodišnje preživljenje bolesnika (Planinc-Peraica i sur. 1999, Freidgerg i sur. 2008).

Općenito više oboljevaju muškarci nego žene, mada ima autora koji imaju podjednaki broj bolesnika podijeljenih po spolu (Winter i sur. 2006, Veelken i sur. 2007, Zinzani i sur. 2008). U našem radu ima više bolesnika ženskog spola nego muškog. Manji broj autora ipak navodi veći broj žena nego muškaraca (Federico i sur. 2000, Zucca i sur. 2000, Hiyama i sur. 2001, Yamaguchi i sur. 2002, Nyman i sur. 2009, Curry i sur. 2009, Hong i sur. 2010). U našim analizama nismo našli da je spol prognostički značajan čimbenik. I drugi autori ne nalaze da je varijabla spol prognostički značajna (Bea i sur. 2004, Nakamura i sur. 2008, Curry i sur. 2009, Hoppe i sur. 2009, Fenske i sur. 2009).

Duljina trajanja simptoma odnosno limfadenopatije prije postavljanja dijagnoze u univarijantnim analizama je prognostički značajan čimbenik. Bolesnici kojima je limfadenopatija prije postavljanja dijagnoze trajala kraće od 3 mjeseca imaju bolje očekivano

preživljenje nego bolesnici s duljim trajanjem limfadenopatije. Naši rezultati nisu prognostički značajni, ali se vidi bolje preživljenje u bolesnika kod kojih duljina trajanja limfadenopatije traje manje od 3 mjeseca (Planinc-Peraica i sur. 1999).

Velicina najvećeg palpabilnog limfnog čvora nije se u univarijatnim analizama pokazala značajnim prognostičkim čimbenikom. U mnogim radovima analizira se prognostička vrijednost tzv. velikog limfnog čvora, limfnog čvora većeg od 7 ili 10 cm. Savage i sur. opisuje u svom radu na 153 bolesnika 75% ima veliku tumorsku masu. Općenito petogodišnje preživljenje i razdoblje bez progresije bolesti je 75% i 69%. U usporedbi s grupom bolesnika od 1273 bolesnika s DLBCL općenito 5-godišnje preživljenje i razdoblje bez progresije je bolje kod bolesnika s primarnim medijastinalnim limfomom velikih B stanica (Savage 2006). Univarijatnom prognostičkom analizom 717 bolesnika s agresivnim NHL Coiffier također nalazi prognostičku značajnost veličine limfnog čvora. Čak u 42% bolesnika registrira se limfni čvor od 10 cm ili još i većih dimenzija. Bolesnici s limfnim čvorovima većim od 10 cm imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s manjim limfnim čvorovima (Coiffier 1991). Kod jedne četvrtine naših bolesnika nađeni su veliki palpabilni limfni čvorovi veći od 5 cm. I drugi autori opisuju da oko 30% bolesnika ima veliku tumorsku masu (Zinzani 2008). Velika tumorska masa u našim rezultatima nije statistički značajna. Ni drugi autori ne nalaze značajnost velike tumorske mase (Velasquez i sur. 1989).

Sva nodalna i ekstanodalna mjesta mogu biti zahvaćena bolešću. Kod većine autora velika tumorska masa se smatra većom od 7 cm mjerenjem najdužeg dijametra, mada neki autori uzimaju 10 cm kao mjerilo za veliku tumorsku masu. U našem radu, mi smo uzeli najduži dijametar 5 cm kao mjeru za koju smo smatrali da predstavlja veliku tumorsku masu.

Velika tumorska masa nije uključena u MPI zbog nedostatka jedinstvene dostupnosti podataka. To je važan prognostički čimbenik neovisan za preživljenje bolesnika s DLBCL. U kombinaciji sa MPI ne dovodi do poboljšanja predviđanja preživljenja. Nije jasno je li to zbog nedostatka snage ili zbog mogućih međusobnih odnosa veličine tumorske mase, LDH i MPI. Veća prospektivna istraživanja bi mogla dati jasniju sliku o veličini tumorske mase i MPI (Panwalkar i sur. 2006).

Kod jedne četvrtine naših bolesnika velicina palpabilne jetre je prognostički značajna. Mi nismo radili biopsiju jetre i ne zna se što je uzrok hepatomegalije, da li diseminacija limfoma ili primarna bolest jetre. S obzirom na povišene vrijednosti AST moguće je da se radilo o primarnoj bolesti jetre. Prisutnost povećane jetre može biti posljedica kroničnog hepatitisa ili neke druge bolesti jetre (ciroze), te stoga nije toliko značajan parametar ni kada je prisutna samo hepatomegalija ili u kombinaciji sa splenomegalijom. Zahvaćenost jetre je često

prisutna kod limfoma niskog stupnja malignosti i to često kod proširene bolesti. U naših bolesnika nađeno je da je veličina jetre prognostički značajan čimbenik. U literaturi se nalazi da hepatosplenomegalija nije prognostički značajan čimbenik u bolesnika s DLBCL (Sato 2007, Yi 2010), mada ima autora koji navode da hepatomegalija povezana s infiltracijom osnovnom bolesti ima loš ishod (Moralli i sur. 2001).

Veličina palpabilne slezene u našim analizama je prognostički značajan čimbenik bez obzira na veličinu palpabilne slezene. Dok jedni autori također nalaze da slezena nije prognostički značajna (Yi 2010), drugi smatraju i na svojim bolesnicima dokazuju da je veličina palpabilne slezene prognostički značajna. Kod nekih autora slezena se palpira i u 10% bolesnika. Bolesnici s splenomegalijom kod postavljanja dijagnoze imaju lošiju prognozu nego bolesnici bez splenomegalije ( $p=0,004$ ) (Cornet i sur. 2009).

Podjela proširenosti bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji u stadije u početku se koristila za određivanje proširenosti bolesti kod Hodgkinove bolesti, međutim se uvidjelo da je podjelu proširenosti bolesti moguće primijeniti i kod ne-Hodkinova limfoma, te se stoga koristi i u klasifikaciji proširenosti bolesti kod NHL (Carbone 1979). Bolesnici s lokaliziranim oblikom bolesti i nižim stupnjem proširenosti bolesti imaju bolje očekivano preživljenje nego bolesnici s uznapredovalim stadijem bolesti. U našoj grupi bolesnika 55% bolesnika ima stadij I i II. I drugi autori imaju slične rezultate (Dummontet i sur. 1999, Veelken i sur. 2007, Nyman i sur. 2009, Phan i sur. 2010), mada ima autora koji imaju znatno manje bolesnika s stadijem I i II (Ghesquières i sur. 2006, Zinzani i sur. 2008, Nyman i sur. 2009). U ovoj analizi naši rezultati nemaju prognostičku vrijednost, što odgovara rezultatima i drugih autora (Bea i sur. 2004, Veelken i sur. 2007).

Mnogi autori potvrdili su prognostičku značajnost stupnja proširenosti bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji. Bolesnici s više proširenom bolesti imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s nižim stupnjem proširenosti bolesti (Coiffier i sur. 1991, Griffiths i sur. 2001, Igbal i sur. 2006, Niitsu i sur. 2009, Seki i sur. 2009).

U našoj analizi prisutnost B simptoma je značajan parametar ( $p=0,014$ ). Prisutnost B simptoma kod bolesnika znači lošiju prognozu. Drugi autori opisuju veći postotak bolesnika s općim simptomima nego u našem radu (Yi i sur. 2010), mada ima autora koji imaju manji broj bolesnika s prisutnim općim simptomima (Veelken i sur. 2007). Bolesnici s prisutnim B simptomima imaju značajno lošije očekivano preživljenje nego bolesnici bez općih simptoma (Nicolaidis i sur. 1998, Yang i sur. 2008). Bolesnici s gubitkom tjelesne težine više od 10% u zadnjih 6 mjeseci do trenutka postavljanja dijagnoze DLBCL imaju značajno lošije očekivano preživljenje nego bolesnici koji nisu smršavili ili je gubitak tjelesne težine bio neznan

(Coiffier i sur. 1991). Kod bolesnika sa B simptomima potrebno je primijeniti agresivniju terapiju, te postoji statistički značajna razlika u primijenjenoj terapiji i prisutnosti B simptoma.

Opće stanje bolesnika procjenjuje se prema različitim ljestvicama. U našoj analizi nije statistički značajno opće stanje bolesnika procijenjeno prema ocijenskoj ljestvici općeg stanja prema ECOG. Ni drugi autori ne nalaze povezanost između općeg stanja bolesnika i preživljenja (Bea i sur. 2004). Bolesnici s dobrim općim stanjem imaju bolje očekivano preživljenje nego bolesnici s lošim općim stanjem ocijenjenim prema navedenoj ljestvici. I drugi autori imaju većinu bolesnika sa dobrim općim stanjem (Haberman i sur. 2006). Opće stanje bolesnika s  $> 2$  prognostička čimbenika po ECOG skali upućuje na loše toleriranje bolesti i predstavlja loš prognostički čimbenik (Nicolandes i sur. 1998).

Infiltracija koštane srži ima značajnu prognostičku vrijednost. Bolesnici s infiltracijom koštane srži imaju znatno kraće očekivano preživljenje nego bolesnici bez nje. Infiltracija koštane srži kod bolesnika sa DLBCL ima sigurno agresivniji tijek i lošije očekivano preživljenje ako je prisutna u trenutku postavljanja dijagnoze. U našim rezultatima infiltracija koštane srži nije statistički značajna. Ni kod drugih autora nije nađena statistički značajna razlika između infiltracije koštane srži i podgrupe DLBCL (Fabiani i sur. 2004), dok drugi autori navode da je prisutnost infiltracije koštane srži neovisan prognostički čimbenik koji ide s nepovoljnom prognozom (Coiffier i sur. 1991, Chung i sur. 2007, Yi i sur. 2010).

Hans i sur. (2004) su usporedili grupu bolesnika s DLBCL na temelju cDNA "microarray" analize i ekspresija individualnih proteina, CD10, *BCL6*, *MUM1/IRF4* pozitivnih u tumorskim stanicama. cDNA analizom, autori su izdvojili tri prognostičke podskupine DLBCL-a, skupinu koja nosi obilježja stanica germinalnog centra - GCB, skupinu koju obilježavaju geni aktiviranih B stanica - ABC grupa i tip 3 - heterogena grupa bez određenih i jasnih karakteristika međutim, prognostički s lošim ishodom slično kao i ABC grupa.

S obzirom na skupoću i nemogućnost rutinske obrade bolesnika metodom cDNA microarrayja, autori su sa tri proteinska biljega, CD10, Bcl6, Mum1/IRF4 evaluirali imunoistokemijskom metodom prediktivnu vrijednost tih biljega u grupiranju DLBCL-a u različite prognostičke podskupine. Na temelju njihova zaključka da se tom tehnikom mogu odrediti grupe GCB i ne-GCB tj. ABC tipovi DLBCL s prediktivnom prognostičkom vrijednosti, podijelili smo našu grupu ispitanika na temelju istih biljega u GCB, ABC i tip 3 skupinu. Nađena učestalost ABC fenotipa analiziranih slučajeva je ista u odnosu na literaturne podatke prema kojima 30 do 65% slučajeva DLBCL predstavlja fenotipsku

ABC skupinu (Shaffer i sur. 2002, Alizadeh i sur. 2000, Rosenwald i sur. 2002, Moskowitz i sur. 2005).

U našoj analizi je prisutno 25 (25%) bolesnika s GCB podgrupom, 54 (55%) s ABC podgrupom, te 20 (20%) bolesnika s tip 3. Prediktivna vrijednost klasifikacije Hans i sur. (2004) se pokazala konstruktivnom, neka su istraživanja pokazala dobru prediktivnu vrijednost (Hans i sur. 2004, Nyman i sur. 2009, Seki i sur. 2009), a drugi to nisu mogli potvrditi (Igbal i sur. 2006, Imhoff i sur. 2006, Choi i sur. 2009, Copie-Bergman i sur. 2009). Tip 3 u našoj grupi ispitanika, (a koji se ne nalazi u originalnoj imunohistokemijskoj klasifikaciji Hans i sur.), su bolesnici u kojih su rezultati imunohistokemijskih analiza bili negativni, što se može tumačiti ili lošom obradom tumorskog tkiva, ili uistinu postoji grupa bolesnika koja se ne uklapa u shemu Hans i sur. (Zinzani i sur. 2005).

Analizirajući proteinsku ekspresiju biljega VEGFR-2 i NF-κB karakterističnih za germinativni odnosno postgerminativni stupanj diferencijacije B stanica, nađena je značajno veća učestalost ekspresije biljega i prisutnost NF-κB u citoplazmi kod ABC podskupine, dok se ekspresija ostalih biljega nije značajno razlikovala u navedenim morfološkim skupinama.

VEGFR-2 je u našim rezultatima pozitivan u citoplazmi kod 22 (41%) bolesnika u ABC podskupini DLBCL, te nije utvrđena značajna razlika. Analizom preživljenja i prisutnosti VEGF nije nađena značajna razlika među podgrupama DLBCL po Hansu i sur (2004).

VEGFR-2 u jezgri je pozitivan kod 28 (52%) bolesnika u ABC podskupini DLBCL i nema utjecaj na preživljenje kod bolesnika i nije nađena značajna razlika. Rezultati drugih grupa koji su proučavali VEGFR-2 u DLBCL su različiti, podaci u literaturi se odnose i na različite uzorke u kojima je promatran VEGFR-2. VEGF prevladava u citoplazmi. Prisutnost VEGF u jezgri može biti povezana s premiještanjem iz citoplazme. Imunohistokemijskim bojenjem normalnog i tumorskog tkiva vidljivo je ograničena lokalizacija u jezgri, koja je u korelaciji s citoplazmatskom lokalizacijom VEGF (Rosenbaum-Dekel 2005). Yared i sur. (2010) su izvijestili da visoka razina VEGF kod dijagnoze je povezana s lošim preživljenjem bez progresije i općim preživljenjem. Visoka razina serumskog VEGF predstavlja štetni prognostički čimbenik za bolesnike mlađe životne dobi s visokim rizikom za nastanak DLBCL. Rezultati upućuju da VEGF nužno ne mora biti prisutan u limfomskom tkivu, ali može predstavljati odgovor domaćina na limfom. Riihijarv i sur. (2011) su izvijestili da bolesnici koji imaju visoki nivo VEGF imaju kraće preživljenje bez prisutnosti relapsa bolesti nego bolesnici s niskim serumskim VEGF. Kod tih bolesnika je rizik od relapsa bio 2,9 puta

veći nego kod bolesnika s niskom razinom serumskog VEGF. Nađena je povezanost između razine serumskog VEGF i ekspresije gena.

Veelken i sur. (2007) su kod 60 bolesnika s DLBCL liječenih terapijom R-CHOP i podijeljenih u podgrupe na GCB i ABC potvrdili da ta podjela ima malu kliničku vrijednost. Gratzinger i sur. (2008, 2010) navode da je u DLBCL porast tumorske vaskularnosti povezana s slabijim preživljenjem. Ekspresija VEGFR-2 je povezana s kraćim ukupnim preživljenjem neovisno o MPI u univarijatnim analizama (Gratzinger i sur. 2010). Kod DLBCL VEGF-A je ovisan o aktivaciji VEGFR-2. VEGF-C posreduje u indukciji ovisnoj o aktivnosti VEGFR-2 i VEGFR-3 (Shin i sur. 2008).

U univarijatnim analizama ekspresija VEGF ima utjecaj na ukupno preživljenje, a u multivarijatnim analizama samo uz povišen LDH kao nezavisni prognostički čimbenik za predviđanje preživljenja (Ribas i sur. 2004).

Analizirajući proteinsku ekspresiju biljega NF-κB, koji su karakteristični za germinativni odnosno postgerminativni stupanj diferencijacije B stanica, nađena je statistički značajno veća učestalost ekspresije biljega, te prisutnost NF-κB u citoplazmi kod ABC podskupine. NF-κB je u citoplazmi pozitivan kod 35 (65%) bolesnika s ABC podgrupom i to je značajno u odnosu na druge podgrupe DLBCL, dok prisutnost NF-κB u jezgri nije statistički značajna. U jezgri je pozitivan kod 5 (22%) bolesnika kod GCB fenotipa. Kod ABC fenotipa NF-κB je pozitivan kod 15 (28%) bolesnika. U našim rezultatima je nađeno da postoji statistički značajna razlika u preživljenju između bolesnika koji su NF-κB pozitivni u citoplazmi i oni koji su negativni. Bolesnici kod kojih nije dokazan NF-κB u citoplazmi imaju značajno duže preživljenje.

Curry i sur. (2009) su objavili da se C-REL nuklearna ekspresija nalazi kod 65% bolesnika i može varirati i od 18 do 44%. GCB fenotip i negativni C-REL mogu imati bolji klinički ishod. C-REL ekspresija ne korelira s GCB ili ABC fenotipom, niti s MPI ili preživljenjem. Kraće preživljenje kod GCB podskupine s C-REL nuklearnom ekspresijom upućuje na to da stanice limfoma s dobrim prognostičkim fenotipom mogu postati otporne na kemoterapiju (Curry 2009). Bolesnici s GCB podgrupom i negativnom c-Rel ekspresijom u jezgri imaju bolje preživljenje nego bolesnici s GCB fenotipom i pozitivnom ekspresijom u jezgri. Ovi rezultati govore da c-REL nuklearna ekspresija može biti prognostički čimbenik kod bolesnika s DLBCL i može procijeniti smanjeni rizik kod bolesnika u kombinaciji s GCB/ABC fenotipom.

Houldworth i sur. (2004) su izvijestili da su REL amplifikacije prisutne kod svih podgrupa DLBCL, ali visok nivo nuklearnog REL je češće prisutan kod ABC fenotipa. Nuklearno

nakupljanje NF- $\kappa$ B nema nikakve statističke značajnosti s kliničkim parametrima. Rezultati govore da 2p12-16 amplifikacija ne dovodi do abnormalne REL aktivacije sugerirajući da REL ne mora biti cilj amplifikacije. Ovo govori da su DLBCL heterogeni s obzirom na NF- $\kappa$ B. ABC i tip 3 podgrupe DLBCL imaju loš ishod u usporedbi s GCB podgrupom.

Uloga NF- $\kappa$ B u različitim podskupinama DLBCL nije dobro razjašnjena, iako neke istraživanje navode da aktivacija NF- $\kappa$ B pridonosi malignosti kod ABC podgrupe DLBCL. C-REL aktivacija se češće nalazi kod GCB podgrupe, no c-REL aktivacija nije često povezana s NF- $\kappa$ B aktivacijom. *BCL6* potiskuje NF- $\kappa$ B aktivnost. Mehanizam koji uključuje interreakciju između *BCL6* i NF- $\kappa$ B se nalazi *in vitro* i *in vivo*. Analize govore o negativnoj povezanosti između ekspresije NF- $\kappa$ B ciljanih gena i *BCL6*, koji je regulator B stanica. Transkolacija u jezgru NF- $\kappa$ B nastaje kada izvanstanični podražaji aktiviraju I $\kappa$ B (IKK) kompleks, koji fosforilacijom I $\kappa$ B proteina dovede do raspada proteasoma i pojave dimera (Perez-Rosado i sur. 2008). NF- $\kappa$ B aktivnosti su češće prisutne u ABC fenotipa nego u drugim podskupinama. Aktivni NF- $\kappa$ B je neophodan za preživljenje ABC stanične linije. DLBCL je heterogena bolest s obzirom na REL i funkcija NF- $\kappa$ B s preciznom ulogom u biologiji limfoma još uvijek nije potpuno razjašnjena (Houldsworth i sur. 2004). Drugi autori navode da kod ABC fenotipa C-REL ekspresija (NF- $\kappa$ B aktivacija) nije povezana s preživljenjem sugerirajući da drugi putevi vode na agresivniji klinički tijek i mogu biti uključeni (Espinosa i sur. 2008).

Davis i sur. (2001) navode da bolesnici s ABC podgrupom imaju jasno lošiju prognozu. Objašnjavaju to retroviralnom transdukcijom u super-represorskom obliku I $\kappa$ B $\alpha$  ili dominantno negativne forme IKK $\beta$  koje su toksične za ABC podgrupu, ali ne i za GCB podgrupu. DNK analiza je pokazala da inhibicija NF- $\kappa$ B uzrokuje smrt stanica i blok u sazrijevanju u G1 fazi. Smatraju da bi to upućivalo da je NF- $\kappa$ B mogući novi cilj za razvoj lijekova i navode da dva podtipa DLBCL koriste različite patogenetske mehanizme.

Analizirajući citogenetske abnormalnosti, analizirane podgrupe DLBCL nisu se razlikovale u promjenama gena *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC*. Nije nađena veća učestalost t(14;18)(q32;q21) u podgrupama DLBCL i naši rezultati nisu statistički značajni. Analizirali smo krajnji ishod liječenja i prisutnost gena *BCL2* i u našim nalazima nije nađena statistički značajna razlika, koji opisuju drugi autori (Barrans i sur. 2002, Colomo i sur. 2003, Lossos i sur. 2004). Analizirali smo prisutnost *BCL2* i preživljenje. Bolesnici

koji nisu imali t(14;18) pokazuju tendenciju boljeg preživljenja nego bolesnici s t(14;18), ali rezultati nisu značajni.

Translokacija t(14;18)(q32;q21) češće je prisutna kod GCB podgrupe i povezana je s Bcl2 ekspresijom proteina, a i češće se nalazi kod nodalnih oblika limfoma. Bolesnici s GCB podgrupom i t(14;18) imaju značajno lošije preživljenje, nego bolesnici s GCB podgrupom koji nemaju t(14;18). Kod bolesnika bez translokacije Bcl2 ekspresija nema utjecaj na preživljenje. Kao kontrast, ekspresija Bcl2 proteina kod ABC podgrupe značajno skraćuje preživljenje bolesnika (Barrans i sur. 2003).

Igbal i sur. (2006) ne nalaze statistički značajnu povezanost između ekspresije Bcl2 proteina i preživljenja u GCB podgrupi. Ekspresija Bcl2 ima značajno lošiji učinak na preživljenje kod ABC podgrupe, ali ne i kod GCB podgrupe. Bolesnici s ABC podgrupom nemaju t(14;18)(q32;q21), ali je češća amplifikacija gena 18q21. Alternativni mehanizmi promiču *BCL2* ekspresiju gena, nevezano o t(14;18). Bcl2 može djelovati kao antiapoptotički faktor kod ABC podgrupe i može biti odgovoran za lošu prognozu. *BCL2* je ciljni gen za NF- $\kappa$ B. Bolesnici koji imaju negativan *BCL2* imaju znatno bolje preživljenje osobito u ABC podskupini (Igbal i sur. 2006).

Međutim, Veelken i sur (2007) potvrđuju povezanost Bcl2 s lošijim preživljenjem bez progresije bolesti, te jači utjecaj na preživljenje bez progresije, nego na općenito preživljenje što daje naslutiti da Bcl2 ima moćnu antiapoptotičku aktivnost, te omogućuje da neke stanice prežive kemoterapiju. Bcl2 može biti povezan s lošijim preživljenjem samo kod ABC podgrupe DLBCL.

Sehn i sur. (2006) su ispitali značajnost *BCL2* ekspresije kod bolesnika tretiranih s R-CHOP u GELA istraživanju. Ekspresija proteina Bcl2 predstavlja negativan čimbenik za ishod kod ABC podgrupe, ali ne i za GCB podgrupu. Rituksimab može poboljšati negativni prognostički utjecaj ekspresije Bcl2 proteina i time eliminirati razliku u ishodu između GCB i ABC podgrupe (Sehn i sur. 2006, Seki i sur. 2009).

Copie-Bergman i sur. (2009) navode da je *BCL6* povezan s GCB podgrupom kako je definirano algoritmom Hans i sur. Međutim, *BCL2* ne predviđa općenito preživljenje, dok je *BCL6* statistički značajno povezan s nepovoljnim utjecajem na preživljenje.

U našim analizama ekspresija *BCL6* je pozitivna kod 53(54%) naših bolesnika s DLBCL. Analizirani slučajevi podgrupa DLBCL prema Hansu i sur. nisu se razlikovali niti u jednoj opisanoj skupini citogenetskih promjena i naši rezultati nisu značajni ( $p=0,354$ ). Analizirali smo krajnji ishod liječenja i prisutnost *BCL6* gena i nije nađena značajna razlika između podskupina. Prisutnost *BCL6* i preživljenje i našim analizama nije statistički značajna.



Ekspresija Bcl6 proteina predviđa povoljan ishod kod bolesnika liječenih CHOP kemoterapijom. Ishod je bolji ako su bolesnici Bcl6 pozitivni. Ishod kod bolesnika liječenih R-CHOP imunokemoterapijom nema utjecaj na *BCL6* status. Dodatak rituksimaba u terapiju CHOP može eliminirati prognostičku značajnost ekspresije Bcl6 proteina u bolesnika s DLBCL (Sehn i sur. 2006).

Bcl6 ekspresija povezana je s boljim općim preživljenjem neovisno o MPI. Niska ekspresija Bcl2 proteina i MUM1 je povezana s boljim preživljenjem bez progresije bolesti. Lošije preživljenje bez progresije je povezano s visokom ekspresijom Bcl2 proteina samo kod ABC podtipa. Razlika u GCB i ABC podgrupama koja se temelji na ekspresiji proteina Bcl6, CD10 i Mum1/IRF4 nije neovisan prognostički čimbenik, i nema utjecaj na općenito preživljenje i preživljenje bez progresije (Veelken 2007). U multivarijanim analizama visoka ekspresija Bcl6 i MPI imaju slično značenje obzirom na opće preživljenje. Ekspresija CD10 ima manje utjecaja na opće preživljenje, dok Bcl2 ne predstavlja samostalnog prognostičkog pokazatelja za preživljenje u univarijantnim analizama (Veelken i sur. 2007).

Seki i sur. (2009) su izvjestili u svom radu da je ekspresija CD10 ili Bcl6 kod GCB podgrupe povezana s boljim preživljenjem, dok je visoka ekspresija Bcl2 ili Mum1 kod ABC podskupine povezana s lošijim preživljenjem kod bolesnika liječenih R-CHOP terapijom.

*C-MYC* je u našem radu imao translokaciju kod 15 (15,15%) bolesnika s DLBCL. Analizirani slučajevi podgrupa DLBCL prema Hansu i sur. nisu se razlikovali niti u jednoj opisanoj skupini citogenetskih promjena. Krajnji ishod liječenja kod bolesnika koji su imali prisutnost *c-MYC* i bolesnici koji nisu imali *c-MYC* u našim analizama nije statistički značajan čimbenik. Uspoređujući preživljenje kod bolesnika koji su imali *c-MYC* translokaciju i bolesnici koji nemaju prisutan *c-MYC* nije nađena statistički značajna razlika.

Savage i sur. (2009) navode da je *c-MYC* prisutan kod 5% do 10% bolesnika i definira malu grupu bolesnika s DLBCL. Niitsu i sur. (2009) navode da je 5-god. preživljenje kod bolesnika s *c-MYC* 43,9%, a kod bolesnika s drugim translokacijama je 67%. Translokacija 8q24 ima statistički značajno lošiju prognozu nego bolesnici s drugim translokacijama.

*C-MYC* gen je povezan s lošijim preživljenjem i predstavlja prognostički čimbenik u ABC podgrupi (Savage i sur. 2009). Limfomske stanice su pozitivne na CD10 i/ili Bcl6 i imaju Bcl2 ekspresiju uz prisutnu *c-MYC* pregradnju (Zhao i sur. 2008).

Bolesnici s Bcl2 i Myc ekspresijom izdvojeni su kao grupa visoko rizičnik bolesnika koji imaju bolju prognozu ako je u terapiju uključen rituksimab (Jonson i sur. 2009).

Barrans i sur. (2010) navode da je prisutnost *c-MYC* gena loš prognostički čimbenik kod bolesnika liječenih s R-CHOP i može se promatrati u kombinaciji s MPI, te točno predviđa ishod bolesnika. *C-MYC* preuređenje se rijetko nalazi zasebno, i loša prognoza bolesnika je posljedica zajedničkog djelovanja uz poremećenu regulaciju gena *BCL6* ili *BCL2*.

Iako u našem radu nije utvrđen prognostički značaj ekspresije pojedinih biljega *BCL6* i *CD10*, u nekim radovima ekspresija navedenih biljega se pokazala kao prognostički značajan pokazatelj (Losos i sur. 2001, Bai i sur. 2003, Uherova i sur. 2001, Biasoli i sur. 2005).

Dvostruka/trostruka translokacija kod DLBCL je u našim rezultatima prisutna kod 11 bolesnika. Kod naših bolesnika su prisutna obilježja agresivne kliničke slike, prisutni B simptomi, povišena aktivnost LDH, bolesnici imaju infiltriranu koštanu srž, stadij III i IV po Ann Arbor klasifikaciji, te  $MPI \geq 2$  rizična čimbenika. Velika tumorska masa je prisutna kod većine bolesnika. Bolesnici su liječeni po shemi CHOP uz rituksimab. Postignuta je kompletna remisija kod većine bolesnika, ali kratkotrajna, te je ishod kod bolesnika bio podjednak. Budući se radi o malom uzorku bolesnika nije moguće raditi statističku analizu. I drugi autori imaju slične rezultate u kojima navode da se *BCL2* i *c-MYC* translokacija nalazi kod 10% do 40% bolesnika s DLBCL. Bolesnici imaju agresivne kliničke i biološke karakteristike, uznapredovali stadij bolesti, povišenu aktivnost serumske laktat dehidrogenaze, visok MPI, te preživljenje koje je bilo nekoliko mjeseci (Le Gouill i sur. 2007, Snuderl i sur. 2010).

### **Laboratorijski parametri - hematološki**

Brzina sedimentacije eritrocita u prvom satu nije značajan prognostički čimbenik u našoj univarijantnoj analizi. Bolesnici s ubrzanom SE iznad 40 mm/h imaju lošije očekivano preživljenje (Nicolaidis i sur. 1998). Kada se usporede vrijednosti SE s rizičnim čimbenicima po MPI rezultati su značajni i kod skupine bolesnika koja ima vrijednosti SE <40 i kod skupine s vrijednostima  $SE \geq 40$  i < 2 čimbenika rizika po MPI.

Koncentracija hemoglobina u krvi, odnosno prisustvo ili odsustvo anemije u trenutku postavljanja dijagnoze bitan je prognostički čimbenik. U našoj grupi bolesnika s infiltracijom koštane srži, kao i u grupi bolesnika bez limfomske infiltracije koštane srži hemoglobin nije prognostički značajan čimbenik. Ovu analizu smo učinili jer se vrlo često anemija javlja u bolesnika s infiltracijom koštane srži. I ostali autori navode da je veća pojavnost anemije kod

infiltracije koštane srži (Lim i sur. 2000). Anemija je povezana s kraćim razdobljem bez relapsa bolesti i preživljenjem i to neovisno o infiltraciji koštane srži limfomskim stanicama (Nicolandes i sur. 1998).

U našim univarijantnim prognostičkim analizama broj leukocita nije prognostički značajan čimbenik. Najveći broj bolesnika ima broj leukocita u granicama normalnih vrijednosti (83%), iako se navodi da bolesnici s leukocitozom imaju lošije očekivano preživljenje (Bosch i sur. 1998, Lim i sur. 2000).

Prognostičkom analizom broja limfocita u perifernoj krvi nismo našli prognostičku značajnost navedenog parametra. Po definiciji bolesti bolesnici nemaju limfocitozu, pa je razumljivo da ni broj limfocita nema prognostičku značajnost. Cox i sur. (2008) navode da su analizirali vrijednosti limfocita u trenutku postavljanja dijagnoze kod 101 bolesnika sa DLBCL i našli su da je jaki neovisni prognostički čimbenik bitan za općenito preživljenje i preživljenje bez znakova bolesti. U multivarijantnoj analizi ostaje neovisan čimbenik o revidiranom MPI. Međutim, nakon primjene kemoimunoterapije nema prognostičku vrijednost.

Bari i sur. (2010) su predložili novi prognostički model koji uključuje apsolutni broj limfocita uz do sada poznate čimbenike MPI. Model je primijenjen na 271 bolesniku. Kao granica za broj limfocita je uzet apsolutni broj  $0,84 \times 10^9/L$  i bolesnici su podijeljeni u tri rizične grupe i uspoređeni su rezultati s MPI i s revidiranim MPI. Niski rizik MPI i broj limfocita  $> 0,84 \times 10^9/L$  ima 3 god. preživljenje 82% bolesnika, dok najlošije preživljenje imaju bolesnici s MPI 4 do 5 rizičnih čimbenika i apsolutni broj limfocita  $< 0,84 \times 10^9/L$  i kod njih je 3 god. preživljenje 15 %. I drugi autori imaju slične rezultate. Bolesnici s nižim brojem limfocita imaju lošiju prognozu, i češće se javlja kod bolesnika s agresivnim limfomom (Parker i sur. 1994, Planinc-Peraica i sur. 1999). Značajna limfocitoza ide sa izuzetno lošom prognozom i predstavlja statistički značajan podatak za preživljenje (Pittaluga i sur. 1996, Lim i sur. 2000). Broj trombocita u našim analizama nije prognostički značajan čimbenik u trenutku postavljanja dijagnoze. Trombocitopenija se vrlo često javlja u bolesnika s infiltracijom koštane srži i u analizama nekih autora predstavlja prognostički značajan čimbenik (Planinc-Peraica i sur. 1999, Cox i sur. 2010).

Aktivnost laktat dehidrogenaze je bitan prognostički faktor kod bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze, a isto tako i kod relapsa bolesti. U našim analizama vrijednosti LDH i preživljenje su značajne. Također, kada se uspoređi vrijednost LDH sa primjenjenom terapijom kod bolesnika dobije se da je LDH značajan parametar.

Analizirajući prognostičke čimbenike Coiffier također potvrđuje da je u 655 bolesnika s agresivnim NHL, LDH predstavlja prognostički značajan čimbenik. Bolesnici s povišenom

aktivnošću LDH imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s LDH u granicama normalnih vrijednosti i ta razlika je značajna (Coiffier 1991). Yang i sur. (2008) su dokazali multivarijatnom analizom da je rizik od smrti kod bolesnika s visokom razinom LDH 2,87 puta veći nego kod bolesnika s razinom LDH u granicama referentnih vrijednosti, što su pokazali i drugi autori (Bosly i sur. 1992, Hickish i sur. 1993, Buzzoni i sur. 1994).

Već davno je uočena povezanost povišene koncentracije serumskog bakra i aktivnosti limfoma. Opaženo je da se u fazi remisije bolesti koncentracija serumskog bakra vraća na normalne vrijednosti, a da je često ponovni porast koncentracije serumskog bakra prvi znak relapsa bolesti. Naše analize potvrđuju da serumski bakar ima prognostičku značajnost, mada drugi autori navode da nema utjecaja na prognozu (Tome i sur. 2011).

I aktivnost alkalne fosfataze (AP) može biti značajan prognostički čimbenik. U naših bolesnika nema značajnih poremećaja aktivnosti alkalne fosfataze. I drugi autori imaju slične rezultate. Povišene vrijednosti serumske alkalne fosfataze imaju bolesnici koji imaju osteolitičke lezije i kod kojih je jetra zahvaćena bolešću. Bolesnici s povišenom aktivnosti AP imaju značajno lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s normalnom aktivnosti AP u trenutku postavljanja dijagnoze (Harris i sur. 1993, Hande i sur. 1993).

Vrlo značajan prognostički čimbenik je AST. U našim analizama ne predstavlja prognostički značajan čimbenik kod ukupnog broja bolesnika, dok je statistički značajan kod muških bolesnika i kod bolesnika s više čimbenika rizika prema MPI. Povišena koncentracija AST može biti posljedica primarne lezije jetre, ili toksični učinak alkohola ili lijekova. I drugi autori imaju slične rezultate (Moralli i sur. 2001).

ALT nije prognostički značajan. I drugi autori ne nalaze prognostičku značajnost parametra ALT, mada ima autora koji navode da može biti posljedica limfomske infiltracije jetre (Moralli i sur. 2001).

Analizirali smo značajnost serumskog bilirubina. Povišena koncentracija serumskog bilirubina je obično posljedica primarne bolesti jetre (hepatitisa ili toksične lezije jetre uzrokovane alkoholom, lijekovima i sl.) što uključuje povišene vrijednosti serumskog bilirubina, alkalne fosfataze i/ili AST. Akutno popuštanje jetre kao posljedica infiltracije jetre limfomskim stanicama vrlo je rijetko i prognoza je kod takvih bolesnika vrlo loša sa brзом progresijom bolesti i smrtnim ishodom (Moralli i sur. 2001). U našim univarijatnim analizama serumski bilirubin nije značajan čimbenik.

U univarijatnoj prognostičkoj analizi kod naših bolesnika nađeno je da je serumsko željezo prognostički značajan čimbenik. I drugi autori nalaze da je serumsko željezo prognostički značajan čimbenik (Planinc-Peraica i sur. 1999).

UIBC u našim prognostičkim univarijatnim analizama nije prognostički značajan čimbenik. Snižen UIBC uz nisko serumsko Fe i anemiju potvrđuje kod bolesnika anemiju kronične bolesti, a uz povišene vrijednosti Fe i anemiju koja se javlja kod neefektivne eritropoeze.

U našim univarijatnim analizama i koncentracija mokraćne kiseline u krvi se pokazala prognostički značajnom, ali samo kod muške populacije. Bolesnici s DLBCL i povišenom mokraćnom kiselinom u krvi imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s mokraćnom kiselinom u granicama normalnih vrijednosti. Mokraćna kiselina produkt je metabolizma purina u organizmu i kod znatne razgradnje stanica mokraćna kiselina u krvi raste. Dakle, kod bolesnika sa velikom tumorskom masom povećana razgradnja stanica može se javiti nakon prvog ciklusa kemoterapije. Mogući rizik za nastanak renalne insuficijencije kod bolesnika s velikom tumorskom masom može objasniti lošije prognostičko značenje povišene mokraćne kiseline u trenutku postavljanja dijagnoze (Patte i sur. 2001).

I serumski kalcij se u našim analizama pokazao prognostički značajnim čimbenikom. Hiperkalcemija se nalazi vrlo rijetko, mada je koncentracija kalcija na gornjoj granici normalnih vrijednosti prisutna kod 16% naših bolesnika. Bolesnici mogu imati porast aktivnosti osteoklasta i osteoblasta i rezultat je zajednički učinak između tih faktora s hiperkalcemijom (Daroszevska i sur. 1999, Solimando i sur. 2001). U literaturi se spominje pojavnost hiperkalcemije od 5% do 10%. Opisuje se da je hiperkalcemija češća u bolesnika s agresivnim NHL-om nego indolentnim, iako se prisutnost osteolitičkih lezija vrlo rijetko nalazi. Univarijatnom prognostičkom analizom nađeno je da bolesnici muškog spola imaju povišene vrijednosti kalcija u trenutku postavljanja dijagnoze i rezultati su značajni. To može biti posljedica osteolitičkih lezija. Bolesnici s velikom tumorskom masom mogu razviti sindrom lize tumora. To je česta komplikacija nakon primjene kemoterapije kod bolesnika s agresivnim limfomima i prisutne velike tumorske mase. Sindrom karakterizira zatajenje bubrega, hiperkalemija, hiperfosfatemija i hipokalcemija (Andrew i sur. 2011).

Kod naših bolesnika vrijednosti fosfora su u granicama normalnih vrijednosti. Ni drugi autori ne nalaze povišene vrijednosti fosfora često. Povišene vrijednosti fosfora se nalaze kod bolesnika kod kojih nastane sindrom lize tumora (Andrew i sur. 2011).

Ukupne bjelančevine u našem radu su prognostički značajan čimbenik kod muške populacije i kad smo usporedili ukupne bjelančevine i čimbenike rizika po MPI. Bolesnici s DLBCL i hipoproteinemijom u trenutku postavljanja dijagnoze imaju lošije očekivano preživljenje nego bolesnici s normalnim i povišenim ukupnim serumskim bjelančevinama. Bolesnici s DLBCL i hipoproteinemijom i  $\geq 2$  rizična čimbenika po MPI imaju u trenutku postavljanja dijagnoze lošije očekivano preživljenje. Univarijatnom analizom s uznapredovalim DLBCL drugi autori

ne nalaze prognostičku značajnost koncentracije ukupnih proteina u krvi, ako se bolesnici podijele u grupe obzirom na koncentraciju ukupnih proteina na one s manje od 60 g/L i one s više od 60 g/L (Coiffier i sur. 1991).

U univarijatnoj analizi mi nismo našli da je hipoalbuminemija loš prognostički čimbenik, mada drugi autori navode drugačije rezultate. U našim analizama niski albumini su značajni u skupini s visokim čimbenicima rizika za MPI, ali i u skupini s visokim albuminima i  $\geq 2$  čimbenika rizika prema prognostičkom modelu MPI. Navodi se da hipoalbuminemija ima značajnu ulogu kod agresivnijih oblika limfoma i ima loš odgovor na terapiju u univarijatnim analizama (Nicolandes 1998). Kod dobi prilagođenog MPI hipoalbuminemija je značajan prognostički čimbenik za preživljenje kod bolesnika starijih od 80 godina bez obzira na histološki podtip (Thieblemont i sur. 2008).

U našim analizama alfa1-globulin je značajan. Kod drugih autora ne nalazimo takve rezultate. U našim analizama gama-globulini su pokazali značajnost. Bolesnici s nižim vrijednostima gama-globulina imaju lošije očekivano preživljenje i skloniji su infektu. U periodu nakon primjene kemoterapije mogu lakše dobiti infekciju, koja ih može životno ugroziti.

U našim univarijatnim prognostičkim analizama mi smo našli da su imunoglobulini G, prognostički značajan čimbenik dok imunoglobulini A, i M nisu prognostički značajni čimbenici. Niski serumski IgG idu sa značajno kraćim preživljenjem (Parker i sur. 1994).

### **Međunarodni prognostički indeks (MPI)**

Prognostički modeli su razvijeni za predviđanje ishoda kod bolesnika na temelju kliničkih karakteristika koje su prisutne prije započinjanja liječenja. Sredinom 90 god. prošlog stoljeća, prediktivni model agresivnog limfoma nazvan MPI je dokazao da je korisniji nego klasifikacija Ann Arbor za razlikovanje bolesnika s različitom prognozom. Bolesnici se grupiraju u rizične grupe na temelju poznatih prognostičkih čimbenika, kliničkih i laboratorijskih parametara. Takve rizične grupe predstavljaju prognostičke modele ili "složene prognostičke klasifikacije" i vrlo su korisne za svakodnevni rad liječnika kliničara. Biološke različitosti kod DLBCL naglašavaju potrebu za specifičnim i genetski različito uvjetovanim pristupom.

Analizom 60 prognostičkih parametara naše skupine bolesnika utvrđeno je da su parametri koje uključuje MPI, prognostički značajni i neovisni o drugim parametrima i dokazali da je MPI prognostički značajan za čitavu grupu bolesnika.

Naša analiza je osim toga pokazala da se naša grupa bolesnika može usporediti s analiziranim grupama bolesnika drugih autora. Budući da su naši podaci komparabilni moguće je bilo učiniti daljnje analize.

Istraživanje pomoću profiliranja genske ekspresije su izdvojile pojedinačne gene koji imaju važan prognostički značaj. Ta su zapažanja korištena za razvoj rizične skupine (Sweetenham i sur. 2005).

Između pojedinih skupina postoji značajna razlika u preživljenju. Bolesnici s 0 do 1 faktorom rizika za smrtni ishod imaju najbolje očekivano preživljenje, dok bolesnici s 4 do 5 čimbenika imaju najlošije očekivano preživljenje. I drugi autori imaju slične rezultate (Bari i sur. 2010). MPI je u više radova multivarijantnom regresijskom analizom izdvojen kao nezavisan prognostički pokazatelj (Rosenwald i sur. 2002, Barans i sur. 2003, Chang i sur. 2004, Hans i sur. 2004, Berglund i sur. 2005, Hirose i sur. 2005),

Prognostički značaj citogenetskih abnormalnosti i izražavanje gena ocijenjeno je od strane nekoliko međunarodnih grupa. Analiza genske ekspresije DLBCL, pokazala je da se radi o heterogenoj bolesti različitog molekularnog profila i različitog kliničkog tijeka. Polazeći od koncepta bioloških karakteristika tumora određenih stupnjem B stanične diferencijacije, analize genske ekspresije slučajeva DLBCL jednoznačno su izdvojile skupine GCB, ABC i tip 3 heterogenih karakteristika genske ekspresije (Alizadeh i sur. 2000, Losos i sur. 2000, Rosenwald i sur. 2002, Wright i sur. 2003, Hans i sur. 2004, Poulsen i sur. 2005). Ovi podtipovi DLBCL su važni jer su ne samo genetički različiti, već različito osjetljivi na standardnu sistemnu antraciklinsku citostatsku terapiju. GCB podskupina DLBCL bolesnika ima petogodišnje preživljenje 60%, a ABC podskupina, odnosno tip 3 podskupina DLBCL ima petogodišnje preživljenje 36% odnosno 39% (Alizadeh i sur. 2000, Rosenwald i sur. 2002).

U našim rezultatima mi nismo potvrdili prognostičku značajnost podskupina DLBCL po Hansu i sur. ( $p=0,714$ ). Ni neki drugi autori ne nalaze značajnu razliku u preživljenju između GCB i ABC podskupine DLBCL (Houldsworth i sur. 2004, Imhoff i sur. 2006, Veelken i sur. 2007, Nyman i sur. 2009, Copie-Bergman i sur. 2009), koju opisuju Alizadeh i sur. (2000) i Rosenwald i sur. (2002), mada ima autora koji opisuju značajno bolje preživljenje kod GCB podskupine (Barrans i sur. 2002, Shipp 2002, Wright 2003, Tzankov 2003, Bea 2005, Gormley 2005, Oh 2006, Sweetenham i sur. 2005, Amen i sur. 2007, Veelken i sur. 2007, Choi i sur. 2009, Seki i sur. 2009).

Analizirani slučajevi fenotipskih skupina GCB i ABC i tip 3 razlikovali su se značajno u primjenjenoj terapiji, te su bolesnici s primjenjenom kemoterapijom po shemi R-CHOP imali značajno bolje preživljenje. Sweetenham i sur (2005) su objavili podatke o 5-god. općenitom preživljenju za GCB podgrupu koje iznosi 76%, dok za ABC podgrupu iznosi 34%. Ovisno o MPI, bolesnici s niskim MPI imaju 5-godišnje preživljenje 70%, dok visoki MPI ima 5-god preživljenje 40%.

Rezultati koje je objavila Njemačka grupa su utvrdili da je rituksimab jasno promjenio prognozu za sve bolesnike s DLBCL. Rituksimab u kombinaciji s CHOP je poboljšao ishod kod bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti kod svih rizičnih skupina. GELA grupa je randomizirala 399 prethodno neliječena bolesnika između 60 do 80 godina starosti od kojih je jedna grupa primila osam ciklusa CHOP kemoterapije svaka 3 tjedna, a druga grupa osam ciklusa R-CHOP (Frieberg 2008). Dugotrajno praćenje je dalo značajno bolje rezultate poboljšanog preživljenja bez relapsa bolesti, bez progresije bolesti i opće preživljenje u bolesnika liječenih R-CHOP terapijom (Feugier i sur. 2005). I drugi autori imaju takve rezultate (Seki i sur. 2009).

Slične rezultate su dala istraživanja koja su provedena u SAD, gdje je randomizirane grupe liječila CHOP ili R-CHOP kemoterapijom (Habermann i sur. 2006). R-CHOP smanjuje rizik od terapijskog neuspjeha i smrti. U usporedbi s CHOP kemoterapijom, samo R-CHOP kemoterapija primjenjena u početku liječenja daje dobar rezultat i dugotrajno praćenje bolesnika, dok terapija održavanja s rituskimabom nema koristi kod bolesnika koji su liječeni CHOP kemoterapijom (Morrison i sur. 2007).

Seki i sur. (2009) ne nalaze statistički značajnu razliku u preživljenju kod bolesnika s podgrupama DLBCL koji su primali kemoterapiju po shemi CHOP ili R-CHOP.

### **Multivarijatne analize**

Univarijatnom analizom izdvojeno je niz prognostičkih čimbenika koji su uključeni u daljnju multivarijatnu analizu. U multivarijatnu analizu uključene su i neke varijable koje se u našim univarijatnim analizama nisu pokazale prognostički značajnim, ali su drugi autori izvještavali o njihovoj prognostičkoj vrijednosti.

Ovom multivarijatnom analizom nađeno je da su nezavisni prognostički čimbenici veličina jetre, serumsko željezo i alfa1-globulin. Ovi parametri ukazuju na moguću biološku osobinu ove grupe limfoma, pri čemu veličina jetre, serumsko željezo i alfa1-globulin ukazuju na agresivnost bolesti.



Sehn i sur. (2006) su izdvojili da je u multivarijatnoj analizi od negativnih prognostičkih čimbenika bitna povišena razina beta-2-mikroglobulina (više od 3 mg/L) te prisutnost više od jednog ekстранodalnog mjesta zahvaćenog bolešću. Uzimajući u obzir veliku tumorsku masu i prisutnost još jednog čimbenika kod dobi prilagođenog MPI bolesnici mogu biti podijeljeni u dvije grupe: povoljniju koja nema veliku tumorsku masu i dobi prilagođen MPI i oni imaju znatno bolje 3 god. preživljenje od grupa s velikom tumorskom masom i dobi prilagođen MPI ali razlika u 3 god. preživljenju nije bila značajna.

Za bolje preživljenje bolesnika je bitno da je bolesnik u stadiju I ili II bolesti po Ann Arbor klasifikaciji, da nema B simptome, da je MPI 0 do 1, te da se kod bolesnika primijenjenom terapijom postigne kompletna remisija, a terapija R-CHOP daje bolje rezultate. Za lošu prognozu kod bolesnika sa smrtnim ishodom je povezan stadij bolesti III i IV, prisutnost B simptoma, prisutnost infiltracije koštane srži, terapijska shema CHOP ima lošiji ishod.

Analizirali smo zatim posebno grupu bolesnika s GCB skupinom. Nezavisni prognostički čimbenici nađeni multivarijatnom analizom su veličina tumorske mase u trenutku dijagnoze, vrijednosti alkalne fosfataze i vrijednosti gama-globulina. Ovom analizom se je pokazalo da parametri koji ukazuju na moguću agresivnost i uznapredovalost su nezavisni prognostički čimbenici.

U našoj grupi bolesnika s ABC skupinom najjači nezavisni prognostički čimbenik je varijabla koja se i u dosadašnjim analizama pokazala kao nezavisni prognostički čimbenik, a to je AST i gama-globulin. Ovi parametri ukazuju također na prirodu bolesti i uznapredovalost i agresivnost ovog oblika limfoma.

Sweetenham i sur (2005) navode da u multivarijatnoj analizi visoki MPI i ABC fenotip predstavljaju neovisne čimbenike za opće preživljenje. Zinzani i sur. (2005) su potvrdili negativan prognostički značaj ABC fenotipa kod 68 bolesnika s nodalnim oblikom DLBCL.

U grupi bolesnika s tip 3 skupinom najjači nezavisni prognostički čimbenik je varijabla koja se i u dosadašnjim analizama pokazala kao nezavisni prognostički čimbenik a to je životna dob, vrijednosti AST i gama-globulina. Dakle, grupa bolesnika s tip 3 fenotipskim nalazom se podudara s nalazima ABC grupe bolesnika i u budućim analizama ti bolesnici se mogu svrstati u ABC grupu.

## 6. ZAKLJUČCI

Utvdili smo:

- morfološka, imunohistokemijska i genska obilježja bolesnika s DLBCL u trenutku postavljanja dijagnoze i provedene su prognostičke analize.
- Bolesnici s DLBCL uz pomoć diferencijacijskih biljega CD10, *BCL6* i *MUM1/IRF4* su razvrstani u podgrupe limfoma GCB, ABC i tip 3. Najviše je bolesnika pripadalo podgrupi ABC.
- Istražili smo prognostički utjecaj imunohistokemijski definiranih molekularnih biljega i algoritma Hans i sur. kod DLBCL bolesnika liječenih imunokemoterapijom. Glavni zaključci su kako slijedi:
- Prognostički značaj algoritma Hans i sur. na porijeklo stanica na temelju ekspresije CD10, *BCL6* i *MUM1/IRF4* u našim analizama nije dokazan.
- Analizama bolesnika s DLBCL nije nađena značajna razlika VEGFR-2 u citoplazmi i jezgri.
- Na temelju analiza NF-κB nađeno je da prisustvo NF-κB u citoplazmi ima prognostičku značajnost.
- Analizama učinjenim metodom FISH utvdili smo poremećaje gena *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC* u stanicama DLBCL
- Prognoza bolesnika sa DLBCL može se predvidjeti na temelju kliničkih, morfoloških, genskih i imunohistokemijskih parametara. Učinjenim analizama nađene su prognostičke značajnosti kako slijedi.

### 1 Prognostičko značenje koje smo dobili univarijatnom analizom

- Kliničke katakteristike - veličina palpabilne jetre, veličina palpabilne slezene i prisutnost općih simptoma.
- Morfološke i fenotipske karakteristike - NF-κB lokalizacija u citoplazmi tumorskih stanica utječe na značajno lošije preživljenje bolesnika.
- Biokemijski parametri - LDH, serumski bakar, AST, serumsko željezo, serumski kalcij, te alfa1-globulini i imunoglobulin G.
- MPI u svih bolesnika s DLBCL, ali i u pojedinim grupama. MPI je prognostički učinkovit u svih bolesnika i s GCB podgrupom, kod bolesnika razvrstanih prema spolu, te kod bolesnika razvrstanih obzirom na infiltraciju koštane srži. Također je

prognostički učinkovit i kad se bolesnici razvrstaju u grupe obzirom na hematološke i neke biokemijske parametre.

e) Analizirani slučajevi fenotipskih skupina GCB, ABC i tip 3 značajno su se razlikovali u preživljenju obzirom na primjenjenu terapiju. Bolesnici liječeni kemoterapijom po shemi R-CHOP imali su značajno bolje preživljenje.

## **2. Prognostički čimbenici nezavisni od drugih parametara dokazani multivarijatom analizom**

a) Kliničke karakteristike - dob, uvećani limfni čvorovi, veličina jetre, stadij III i IV, infiltracija koštatne srži.

b) Hematološki i biokemijski parametri - SE, AST, AP, UIBC, kreatinin, beta-globulin, gama-globulini.

c) U grupi bolesnika s GCB podgrupom - veličine tumorske mase, aktivnost alkalne fosfataze i vrijednosti gama-globulina.

d) U grupi bolesnika s ABC podgrupom - AST i gama-globulini, te to ukazuje na drugačije biološke karakteristike ovog oblika bolesti.

e) U grupi bolesnika s tip 3 podgrupom - životna dob bolesnika, vrijednosti AST, veličina palpabilne jetre, vrijednosti UIBC i vrijednosti gama-globulina.

## 7. LITERATURA

1. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, MA C, Lossos IS, Rosenwald A et al. **Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling.** Nature 2000;403;503-511.
2. Amen F, Horncastle D, Elderfield K, Banham AH, Bower M, Macdonald D (2007). **Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients.** Histopathology 51:70-9.
3. Anderson JJ, Fordham S, Overman L, Dignum H, Wood K, Proctor SJ (2009). **Immunophenotyping of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) defines multiple subgroups of germinal centre-like tumours displaying different survival characteristics.** Int J Oncol 35:961-71.
4. Andrew M, Evens DO, Winter JN, Gordon (2011). **Cancer management:A multidisciplinary approach.- 13<sup>th</sup> edition**
5. Aoki Y, Tosato G. (2001). **Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in the pathogenesis of primary effusion lymphomas.** Leuk Lymphoma 41(3-4):229-37.
6. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M (1991). **Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.** Circulation Research 85:221-228.
7. Bai M, Agnantis NJ, C Skyrilas A, Tzanou E, Kamina S, Galani V (2003). **Increased expression of the bcl6 and CD10 proteins is associated with increased apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas.** Mod Pathol 16(5):471-80.
8. Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E (2004). **All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells.** Leuk Res 28:243-248.
9. Bari A, Marcheselli L, Sacchi S, Marcheselli R, Pozzi S, Ferri P (2010). **Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a never-ending story.** Annals of Oncology 21:1486-1491.

10. Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ (2003). **The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome.** Clin Cancer Res 9:2133-9.
11. Baris D, Zahm SH (2000). **Epidemiology of lymphomas.** Curr Opin Oncol 12(5):383-94.
12. Bartoli M, Platt D, Lemtalsi T, Gu X, Brooks S, Marrero MB (2003). **VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells.**The FASEB J 17:1562-1564.
13. Basquiera AL, Grupe VM, Di Tada CE, Diller AD, Palazzo ED, Garcia JJ (2005). **Prognostic value of immunophenotyping profile in patients with diffuse large B-cell lymphoma.** J of Clin Oncol 65(23):6736.
14. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V (2005). **Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction.** Blood 106(9):3183 -3190.
15. Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A (2004). **Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas.** J Clin Oncol 22:3498-506.
16. Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M (2005). **Evaluatin of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis.** Mod Pathology 8:1113-1120.
17. Bergman CC, Gaulard P, Leroy K, Briere J, Baia M, Jais J (2009). **Immunofluorescence in situ hybridisation indeks predicts survival in patients with diffuse large B cell lymphoma treted with R-CHOP: A Gella study.** J Clin Oncol 33(27):5573-5579.
18. Biasoli I, Morais JC, Scheliga A, Milito CB, Romano S, Land M (2005). **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 46(3):328-333.
19. Bharti AC, Shishodia S, Reuben JM, Weber D, Alexanian R, Vadhan SR (2004). **Nuclear factor- $\kappa$ B and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis.** Blood 103(8):3175-3184.

20. Blenk, S, Engelmann J, Weniger M, Schultz J, Dittrich M, Rosenwald A (2007). **Germinal Center B Cell-Like (GCB Germinal) and Activated B Cell-Like (ABC) type of diffuse large B-cell lymphoma (DLBC): Analysis of molecular predictors, signatures, cell cycle state and patient survival.** *Cancer Informatics* 3:399-420.
21. Bonizzi G, Karin M (2004). **The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.** *Trends in Immunology*; 25 (8): 280-288.
22. Booman M, Douwes J, Glas AM, de Jong D, Schuurin E, Kluin PM (2006). **Primary testicular diffuse large B-cell lymphomas have activated B-cell-like subtype characteristics.** *J Pathol* 210:163-71.
23. Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA (1998). **Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy and prognostic factors.** *Cancer* 82(3):567-75.
24. Campo E, 1. Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. (2011). **The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications.** *Blood* 117(9):5019-5030.
25. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, Quattrone S, Migliaretti G, Fassone L (2000). **Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia.** *Blood* 95:651-9.
26. Carbone PP, Kaplan HS, Mushff K, Smithers DW, Tubiana M (1997). **Report of the committee in Hodgkin's disease staging classification.** *Cancer Res* 31:1860-61.
27. Carbone A, Gloghini A, Cozzi MR, Capello D, Steffan A, Monini P (2000). **Expression of MUM1/IRF4 selectively clusters with primary effusion lymphoma among lymphotous effusions: implications for disease histogenesis and pathogenesis.** *Br J Haemat* 111(1):247-257.
28. Carbone A Gloghini A, Larocca LM, Capello D, Pierconti F (2001). **Expression profile of MUM1/IRF4, BCL-6, and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subsets of human immunodeficiency virus-related lymphomas.** *Blood* 97(3):44-751.
29. Carbone A, Gloghini A, Libra M, Gasparotto D, Navolanic PM, Spina M (2006). **A spindle cell variant of diffuse large B- cell lymphoma possesses genotypic and phenotypic markers characteristic of a germinal center B-cell origin.** *Mod Phatol* 19(2):299-306.

30. Cattoretti G, Pasqualucci L, Ballon G (2005). **Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice.** *Cancer Cell* 7:445-55.
31. Cerchiotti LC, Alexandru F, Ghetu AF, Xiao Zhu X, Da Silva GF, Shijun Zhong S, Matthews M (2010). **A Small-molecule inhibitor of BCL6 kills DLBCL cells in vitro and in vivo.** *Cancer Cell* 17:400-411.
32. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP (2004). **Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B cell Lymphoma.** *Am J Surg Pathol* 28:464-70.
33. Chen G, Goeddel DV (2002). **TNF-R1 signaling: a beautiful pathway.** *Science* 296 (5573):1634–35.
34. Chen C, Edelstein LC, Gelinas C (2000) **The Rel/NF- $\kappa$ B family directly activated expression of the apoptosis inhibitor Bcl-xl.** *Mol and Cel Biol* 20(8):2687-2695.
35. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ (2007). **The International Harmonization Project on Lymphoma. Revised response criteria for malignant lymphoma.** *J Clin Oncol* 25:579-86.
36. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM (1999). **Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group.** *J Clin Oncol* 17:1244-53.
37. Chiu B C-H, Dave BJ, Blair A, Gapstur SM, Chmiel JS, Fought AJ (2007). **Cigarette smoking, familial hematopoietic cancer, hair dye use, and risk of t(14;18)-defined subtypes of Non-Hodgkin's lymphoma.** *Am J Epidemiology* 165(6) :652-659
38. Choi WWL, Weiseburger DD, Grenier TC, Piris MA, Barrharn AH, Delabie J (2009). **A new immunostain algorithm classified diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy.** *Clin Canrcer Res* 15(17):5494-5502.
39. Chung R, Lai R, Wei P, Lee J, Hanson J, Belch AR (2007). **Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Indeks.** *Blood* 110 (15):1278-1282.
40. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R (2002). **CHOP chemotherapy plus Rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *N Eng J Med* 346(4):235-42.

41. Coiffier B, Ship p MA, Cabanillas F, Crother D, Armitage JO, Canellos GP(1991). **Report of the first workshop on prognostic factors in large cell lymphomas.** Ann Oncol 2:213-217.
42. Coiffier B, Reyes F (2005). **Best treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a French perspective group.** Oncology 19(4):7-15.
43. Coiffier B (2005) **Current strategies for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma.** Curr Opin Hematol 12(4):259-65.
44. Coiffier B, Feugier P, Mounier N, Franchi-Rezgui P, Van Den Neste E, Marco M (2007). **Long term of teh GELA study comparing R-CHOP and CHOP chemotherapy in older patients with difusse large B- cell limphoma slow good survival in pooor risk patients.** J Clin Oncol. 188(25):Suplement.
45. Colomo L, Guillermo A L, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosh F (2003). **Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B- cell Lymphoma.** Blood 101(1):78-84.
46. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q (2009). **Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma.** Nature 459:717-21.
47. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, Briere J, Baia M, Jais JP (2009). **Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: A GELA study.** J Clin Oncol 27:5573-9.
48. Cornet E, Lesesve JF, Mossafa H, Sébahoun G, Levy V, Davi F (2009). **Long-term follow-up of 111 patients with persistent polyclonal B cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes.** Leukemia. 23(2):419–422.
49. Cozma D, Yu D, Hodawadekar S, Azvolinsky A, Grande S, Tobias JW (2007). **B cell activator PAX5 promotes lymphomagenesis through stimulation of B cell receptor signaling.** J. Clin. Invest. 117(9):2602-2610.
50. Cox MC, Nofroni I, Ruco L, Amodeo R, Ferrari A, La Verde G (2008). **Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic factor in diffuse-large-B-cell-lymphoma.** Leuk Lymphoma 49(9):1745-51.
51. Curry CV, Ewton AA, Olsen RJ, Logan BR, Hector A Preti HA, Liu CY (2009). **Prognostic impact of C-REL expression in diffuse large B-cell lymphoma.** J Hematopathol 2:20-26.



52. Dai Y, Pei X Y, Rahmani M, Conrad D H, Dent P, Grant S (2004). **Interruption of the NF- $\kappa$ B pathway by Bay 11-7082 promotes UCN-01-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human multiple myeloma cells.** Blood 103(7): 2761-2770.
53. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM (2001). **Constructive nuclear factor  $\kappa$ B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells.** J Exper Med 194(12):1861-1874.
54. de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W (2009). **Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications (a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium).** J Pathol 62:128-38.
55. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A (2007). **Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: Validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications- a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium.** J Clin Oncol 25:805-812.
56. Dias S, Hattori K, Heissig B, Zhu Z, WuY, Witte L (2001). **Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGRF-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias.** PNAS 98(19):10857-10862.
57. Dijkman R, Tensen CP, Jordanova ES, Knijnenburg J, Hoefnagel JJ, Mulder AA (2006). **Array-Based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma.** J Cl Oncol 24(2):296-305.
58. Deming SL, Nass SJ, Dickson RB (2000). **C-Myc amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance.** Br J of Cancer 83(12):1688-1695.
59. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X (2005). **NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer.** Virchows arch 446; 475-482.
60. Dumontet C, Draï I, Benvenu J, Neidhard Berrard E, Thieblemont C, Bouafia F (1999). **Profiles and prognostic values of LDH isoenzymes in patients with non-Hidgkin's lymphoma.** Leukemia 13:811-817.

61. Dyer MJS, Siebert R, Willis TG, Schlegelberger B (2000): **The molecular pathogenesis of high grade non-Hodgkin's lymphoma.** Fifth Congress of the European Haematology Association Birmingham, UK, 25-28 June Educational Book. 31-36.
62. Ebeid EN, Magdy MK, Mohamed NG, Mehany IA (2003). **Study of vascular endothelial growth factor and endostatin in childhood leukemia and lymphoma.** J Egypt Nat Canc Inst 15(1):25-32.
63. Engel I, and Murre C. (2002) **Disruption of pre-TCR expression accelerates lymphomagenesis in E2A-deficient mice.** PNAS 20(99):1322-27.
64. Espinosa I, Briones J, Bordes R, Brunet S, Martino R, Sureda A (2008). **Activation of the NF-kappaB signalling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications.** Histopathology 53:441-9.
65. Fabiani B, Delmer A, Lepage E, Guettler T, Petrella T, Briere J (2004). **CD10 expression in diffuse large B-cell lymphomas does not influence survival.** Virchows Arch 445(6):545-51.
66. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M (2000). **A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/ IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells.** Blood 95(6):2084-2092.
67. Falini B, Mason DY. (2002). **Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry.** Blood 99:409-26.
68. Fenske T S, Hari PN, Carreras J, Zhang M, Kamble RT, Bolwell BJ (2009). **Impact of pre- transplant rituximab on survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma.** Biol Blood Marrow Transplant. 15(11):1455-1464.
69. Ferenčík M, Rovensky J, Matha V (2002). **Dictionary of immunology.** Slovak Academic Press Ltd., Bratislava ;229-231.
70. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, Chen W, LaCasce AS, Cattoretti G (2005). **NF κB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes.** Blood 106(4):1392.
71. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C (2005). **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 23(18): 4117–4126.

72. Frelin C, Imbert V, Griessinger E, Peyron AC, Rochet N, Philip P (2005). **Targeting NF- $\kappa$ B activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells.** Blood 105(2):804-811.
73. Friedberg JE (2008). **Diffuse Large B-Cell Lymphoma.** Hematol Oncol Clin North Am. 22(5):941-949.
74. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X (2008). **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. 26(28):4587-94.
75. Gewies A (2003). **Introduction to apoptosis.** Aporeview 1-26.
76. Gisselbrecht, C, Glass B, Mounier N (2010). **Salvage regimens with autologous transplants for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era.** J Clin Oncol 28;4184-90.
77. Gilmore TD (2006). **Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives.** Oncogene 25; 6680-6684.
78. Ghesquières H, Berger F, Felman P, Callet-Bauchu E, Bryon PA, Glehen AT (2006). **Clinicopathologic characteristics and outcome of diffuse large B-cell lymphomas presenting with an associated low-grade component at diagnosis.** J Clin Oncol 24(33):5234-5241.
79. Gormley RP, Madan R, Dulau AE, Xu D, Tamas EF, Bhattacharyya PK (2005). **Germinal center and activated B-cell profiles separate Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma in AIDS and non-AIDS cases.** Am J Clin Pathol 124:790-798.
80. Gouill SL, Podar K, Amiot M, Hideshima T, Chauhan D, Ishitsuka K (2004). **VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis.** Blood 104(9):2886-2892.
81. Gouill S, Talmant P, Touzeau C, Moreau A, Garand R, Juge-Morineau N (2007). **The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement.** Haematologica 92(10),1335-42.
82. Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, Hsi ED, Hans CP, Polman B (2008). **Prognostic significance of VEGFR, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy.** Lab Invest 88(1):38-47.

83. Gratzinger D, Advani R, Zhao S, Talreja N, Tibshiranki RJ, Shyam (2010). **Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP).** Br J Haematol 148(2):235-44.
84. Gratzinger D, Zhao S, Marinelli RJ, Kapp AV, Tibshirani RJ, Hammer AS (2007). **Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes.** Am J Pathology.170: 1362-1369.
85. Guillermo AL, Colomo L, Jimenez M, Bosch F, Villamor N, Arenillas L (2005). **Diffuse large B-cell lymphoma: Clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin.** J Cl Oncol. 23(12):2797-2804.
86. Ha CH, Jhun SS, Kao HY, Jin ZG (2008). **VEGF stimulates phosphorylation and cytoplasmic accumulation modulating matrix–metalloproteinase expression and angiogenesis.** Arterioscler Tromb Vase Biol 28(10):1782-1788.
87. Haarer C F, Chadwick F (2006). **Immunohistochemical classification of de novo transformed, and relapsed diffuse large B-cell lymphoma into germinal center B-cell and nongerminal center B-cell subtypes correlates with gene expression profile and patient survival.** Arch Pathol Lab Med. 30:1819-1824.
88. Haazar B, Paydas S, Zorludemir S, Sahin B, Tuncer I (2003). **Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelia growth factor (VEGF) expression in non-Hodgkin’s lymphoma.** Leuk Lymphoma 44(12):2089-93.
89. Haberman TM, Morrison VA (2006). **Rituximab CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma.** J Clin Oncol 24:3121-3127.
90. Hachem A, Gartenhaus RB (2005). **Oncogenes as molecular targets in lymphoma.** Blood 106(6):1911-1923.
91. Halin C, Tobler NE, Vigl B, Brown LF, Detmar M (2007). **VEGF-A produced by chronically inflamed tissue induces lymphangiogenesis in draining lymph nodes.** Blood 110:3158-3167.
92. Hamada K, Oike Y, Takakura N, Ito Y, Alitalo K, Suda T (2000). **VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and haematopoiesis.** Blood 96:3793-3800.

93. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G (2004). **Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray.** Blood 103(1):275-282.
94. Hande KR, Garow GC (1993). **Acute tumour lysis syndrome in patients with high-grade non-Hodgkin's lymphoma.** Am J Med 94(2):133-9.
95. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Stein P, Banks M, Chan JKC, Cleary M (1994). **A revised European-American classification of lymphoid neoplasm's: A proposal from the International lymphoma study group.** Blood 1361-92.
96. Harris NL, Jaffe EJ, Stein H (2001). **WHO classification of tumors: Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.** Lyon, France, IARC Press, 121-126.
97. Hill DA, Wang SS, Cerhan JR, Davis S, Cozen W, Severson RK (2006). **Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes.** Blood 108(9):3161-3167.
98. Hirose Y, Masaki Y, Karasawa H (2005). **Incidence of diffuse large B-cell lymphoma of germinal center B-cell origin in whole diffuse large B-cell lymphoma: tissue fluorescence in situ hybridization using t(14;18) compared with immunohistochemistry.** Int J Hematol 81:48-57.
99. Hoefnagel JJ, Vermeer MH, Jansen PM, Fleuren GJ, Meijer CJ, L M. Willemze R (2003). **Bcl-2, Bcl-6 and CD10 expression in cutaneous B-cell lymphoma: further support for a follicle centre cell origin and differential diagnostic significance.** Br J Dermatol 149(6):1183-1191.
100. Hoffmann C, Tiemann M, Schrader C, Janssen D, Wolf E, Vierbuchen M (2005). **AIDS-related B-cell lymphoma (ARL): correlation of prognosis with differentiation profiles assessed by immunophenotyping.** Blood, 106:1762-69.
101. Hojo H, Kuze T, Nakamura N, Hashimoto Y, Sasaki Y, Sato M (2002). **Analysis of immunoglobulin VH genes in CD10-positive diffuse large B-cell lymphoma.** Pathology International 52(9):586-594.
102. Hong J, Kim AJ, Park JS, Lee SH, Lee KC, Jinny ParkJ (2010). **Additional rituximab-CHOP (R-CHOP) versus involved-field radiotherapy after a brief course of R-CHOP in limited, non-bulky diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective analysis.** The Korean J Hematol 4(45):253-259.
103. Hoppe, BS, Moskowitz CH, Zhang Z, Maragulia JC, RiceRD,, Reine AS (2009). **The role of FDG-PET imaging and involved field radiotherapy in relapsed or**

- refractory diffuse large B-cell lymphoma.** Bone Marrow Transplantation 43,941-948.
104. Horning SJ (2008). **Bevacizumab as an anti-VEGF strategy in lymphoma.** Hematology Meeting Reports 2(5):83.
105. Houldsworth J, Olshen AB, Cattoretti G (2004). **Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas.** Blood 103:1862-1868.
106. Huang JZ, Sagner Wg, Greiner T, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL (2002). **The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile.** Blood 99:2285-90.
107. Ichikawa H, Takada Y, Shishodia S, Jayaprakasam B, Muraleedharan G, Aggarwal N (2006). **Withanolides potentiate apoptosis, inhibit invasion, and abolish osteoclastogenesis through suppression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation and NF- $\kappa$ B-regulated gene expression.** Mol Cancer Ther. 5:1434-1445.
108. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A (2006). **BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma.** J Clin Oncol 24 (6):961-968.
109. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, Wright G (2007). **Leukemia/Lymphoma molecular profiling project. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma.** Leukemia 21:2332-43.
110. Imhoff GW, Boerma EJ, der Holt B, Schuurin E, Verdonck LF, Kluin Nelemans HC (2006). **Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma.** Am Soc Clin Oncol 10:4135-4142.
111. Iros J (2007). **High-grade B-cell lymphoma/leukemia associated with t(14;18) and 8q24/MYC rearrangement: a neoplasm of germinal center immunophenotype with poor prognosis.** Haematologica 92(10):1297-1301.
112. Izzo JG, Malhotra U, Wu TT, Ensor J, Luthra R, Lee J (2006). **Association of activated transcription factor Nuclear Factor  $\kappa$ B with chemoradiation resistance and poor outcome in esophageal carcinoma.** J Clin Oncol 10(24):748-754.

113. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Wardiman JW (2001). **Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of tumours: IARC Press Lyon 171-75.**
114. Jazirehi AR, Gan XH, De Vos S, Emmanouilides C, Bonavida B (2003). **Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis.** Mol Cancer Ther 2:1183-93.
115. Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B (2005). **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 65:264-76.
116. Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, Goodglick L, Bonavida B (2004). **Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab.** Cancer Res 64:7117-26.
117. Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Ståhl E, Torlakovic E, Akerman M, Mitelman F (2002). **Prognostic implications of *BCL6* rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma-a Nordic Lymphoma Group study.** Int J Oncol 20:161-5.
118. Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Ståhl E, Torlakovic E, Akerman M, Mitelman F (2002). **Prognostic implications of *BCL6* rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma-a Nordic Lymphoma Group study.** Int J Oncol 20:161-5.
119. Jerkeman M, Anderson H, Dictor M (2004). **Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patients with diffuse large B-cell lymphoma a Nordic Lymphoma Group study.** Ann Hematol 83:414 -9.
120. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Nerian S, Steidl C, Woods R (2009). **Lymphomas with concurrent *BCL2* and *MYC* translocations: the critical factors associated with survival.** Blood 114(11):2273-78.
121. Joos MI, Otano-Joos O, Ziegler S, Bruderlein S, Manoir S, Bentz M (1996). **Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene.** Am Soc Hemat 87(4):1571-1578.

122. Jost PJ, Ruland J (2007). **Aberrant NF- $\kappa$ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications.** Blood 109(7):2700-7.
123. Jørgensen JM, Søre FB, Bendix K, Nielsen JL, Olsen ML, Funder AM (2007). **Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes.** Leuk Lymphoma 48(3):454-455.
124. Juvekar A, Manna S, Ramaswami S, Chang T, Vu H, Ghosh C (2011). **Bortezomib induces nuclear translocation of I $\kappa$ B $\alpha$  resulting in gene-specific suppression of NF- $\kappa$ B dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL.** Mol Cancer Res;9(2):183-194.
125. Kadowaki I, Ichinohasama R, Harigae H, Ishizawa K, Okitsu Y, Kameoka J (2005). **Accelerated lymphangiogenesis in malignant lymphoma: possible role of VEGF-A and VEGF-C.** Br J Haematol 130(6):869-877.
126. Karnofsky DA, Abelmann WH, Craver LF, Burchenal JH (1948). **The use of nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma.** Cancer 1:634-
127. Kawasaki C, Ohshim K, Suzumiya (2001). **Rearrangements of *BCL1*, *BCL2*, *BCL6* and *c-MYC* in diffuse large B-cell lymphomas.** Leuk Lymphoma 42:1099-106.
128. Kay NE, Bone ND, Tschumper RC, Howell KH, Geyer SM, Dewald GW (2002). **B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules.** Leukemia 16 (5):911-919.
129. Kerbel RS (2008). **Tumor angiogenesis.** N Eng J Med 358:2039-49
130. Klein U, Tu Y, Stolovitzky G A., Keller J L, J Haddad J Jr, Miljkovic V (2003). **Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction.** PNAS 100 (5):2639-2644.
131. Kriehuber E, Bauer W, Charbonnier AS, Winter D, Amatschek S, Tamandl D (2005). **Balance between NF- $\kappa$ B and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death.** Blood 106(1):175-183.
132. Kojima Y, Tsurum H, GotoN, Shimizu M, Kasahara S, Yamada T (2006). **Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome.** Eu J Haematol 76(6):465-472.
133. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH (1998). **Clinical relevance of *BCL2*, *BCL6*, and *MYC* rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma.** Blood 92:3152-62.



134. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR (2003). **Disease parameters influencing prognosis and assessment of response clinical prognostic factors in aggressive NHL.** BC Decker; .
135. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V (1996). **VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development.** Mol Can Biol Lab 122:3829-3837.
136. Kuramoto K, Sakai A, Shigemasa K, Takimoto Y, Asaoku H, Tsuimoto T (2002). **High expression of MCL1 gene related to vascular endothelial growth factor is associated with poor outcome in non-Hodgkin lymphoma.** Br J Hemat 116: 158-161.
137. Kusumoto S, Kobayashi Y, Sekiguchi N (2005). **Diffuse large B-cell lymphoma with extra *BCL2* gene signals detected by FISH analysis is associated with a non-germainal center phenotype.** Am J SurgPathol 29;1067-73.
138. Kušec R (2002). **Molecular and genetic mechanisms of lymphomagenesis.** CMJ 43(5):519-525.
139. Lam LT, Davis RE, Pierce J, Hepperle M, Xu Y, Hottelet M, Nong Y, Wen D, Adams J, Dang L, Staudt LM (2005). **Small molecule inhibitors of I $\kappa$ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling.** Clin Cancer Res 11:28-40
140. Lee YK, Bone ND, Strege AK, Shanafelt TD, Jelinek DF (2004). **VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia.** Blood 104(3):788-794
141. Legg JA, Herbert JM, Clissold P, Bicknell R (2008). **Slits and roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration.** Angiogenesis 11:13-21.
142. Lerner RE, Thomas W, Defor TE, Weisdorf DJ, Burns LJ (2007). **The International Prognostic Index assessed at relapse predicts outcomes of autologous transplantation for diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma in second complete or partial remission.** Biol Blood Marrow Transplant 13:486-92.
143. Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis E (2008). **Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise distinct genetic pathways.** PNAS 105(36):13520-13525.
144. Lenz G, Staudt M (2010). **Aggressive Lymphomas.** N Eng J Med 362(15):1417-29.

145. Li Q, Verma IM (2002). **NF-kappaB regulation in the immune system.** Nat Rev Immunol 2:725-34.
146. Lim EJ, Peh SC (2000). **Bone marrow and peripheral blood changes in non-Hodgkin's lymphoma.** Singapore Med J 41(6):279-85.
147. Lin CH, Kuo KT, Chuang SS, Kuo SH, Chang JH, Chang KC (2006). **Comparison of the expression and prognostic significance of differentiation markers between diffuse large B-cell lymphoma of central nervous system origin and peripheral nodal origin.** Clin Cancer Res 12:1152-6.
148. Lin, P. Medeiros J (2007). **High-grade B-cell lymphoma/leukemia associated with t(14;18) and 8q24/MYC rearrangement: a neoplasm of germinal center immunophenotype with poor prognosis.** Haematologica 92(10):1297-01.
149. Linderoth J, Jerkeman M, Cavallin-Stahl E, Kvaloy S, Torkalovic E (2003). **Immuno-histochemical expression of CD23 and CD40 may identify prognostically favorable subgroups of diffuse large B- cell lymphoma.** Clin Cancer Res 9: 722-728.
150. Lopez-Guillermo A, Colomo L, Jimenez M, Bosch F, Villamor N, Arenillas L (2005). **Diffuse large B-cell lymphoma: Clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin.** J Clin Oncol. 23(12):2797-2804.
151. Lossos I S. (2005). **Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma.** J Clin Oncology 23(26):6351-6357.
152. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA (2004). **Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of six genes.** N Eng J Med. 350: 1828-1837.
153. Lucas PC, McAllister-Lucas L, Nufiet G (2004). **NK-kB signalling in lymphocytes: a new cast of characters.** J of cell Science. 117:31-39.
154. Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Segraves R, Blesa D, Rubio-Moscardo F, Albertson DG (2003). **Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations.** Blood 101(8):3109-3117.
155. Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2001). **VEGF receptor signal transduction.** Sci STKE 11(112): re 21.
156. McCluggage WG, Catherwood M, Alexanderj HD, McBride HA, Smith MEF, Morris TC M (2002). **Immunohistochemical expression of CD10 and t(14;18)**

- chromosomal translocation may be indicators of follicle centre cell origin in nodal diffuse large B-cell lymphoma.** *Histopathology* 41(5):414-420.
157. McMahon G (2000). **VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis.** *The Oncologist* 5(1):3-10.
158. Meli M, D'alesandro N, Tolomeo M, Rausa L, Notarbartolo M, Dusonchet L (2005). **NF- $\kappa$ B inhibition restores sensitivity to fas-mediated apoptosis in lymphoma cell lines.** *Ann N Y Academy of Sciences* 1010:232-236.
159. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A (1981). **Reporting results of cancer treatment.** *Cancer* 47:207-214.
160. Mitchell KA, Finn WG, Owens SR (2008). **Differences in germinal centre and non-germinal center phenotype in gastric and intestinal diffuse large B-cell lymphomas.** *Leuk Lymphoma* 49:1717-23.
161. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M (2005). **Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response.** *Blood* 105(5):1851-1861.
162. Morrison VA, We EA, Erhardt W, Haberman TM (2007). **Maintenance rituximab compared to observation after R-CHOP or CHOP in older patients with diffuse large B-cell lymphoma.** *J Clin Oncol* ;25:443.
163. Morschhauser F, Leonard JP, Fayad L, Coiffier B, Petillon MO, Coleman M, (2009). **Humanized anti-CD20 antibody, veltuzumab, in refractory/recurrent non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II results.** *J Clin Oncol* 27:3346-53.
164. Morschhauser F, Malton P, Vitolo U, Linden O, Seymour JF, Crump M (2010). **Results of a phase I/II study of ocrelizumab, a fully humanized anti-CD20 mAb, in patients with relapsed/refractory follicular lymphoma.** *Ann Oncol* 21(9):1870-6.
165. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS (2006). **Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001.** *Blood* 107(1):265-276.
166. Moskowitz C H, Zelenetz A D, Kewalramani T, Hamlin P, Lessac-Chenen S, Houldsworth J (2005). **Cell of origin, germinal center versus nongerminal center, determined by immunohistochemistry on tissue microarray, does not correlate with outcome in patients with relapsed and refractory DLBCL.** *Blood* 106(10):3383-3385.

167. Motlló C, Grau J, Juncà J, Ruiz N, Mate JL, Orna E (2010). **Translocation (3;8) (q27;q24) in two cases of triple hit lymphoma.** *Cancer Genet Cytogenet* 203 (2):328-32.
168. Mounier N, Briere J, Cisselbrecht C, Emile JF, Pierre Lederlin P, Sebban C (2003). **Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl2 associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBC).** *Blood* 101(11): 4279-84.
169. Murase T, Yamaguchi M, Suzuki R, Okamoto M, Sato Y, Tamaru J, Masaru (2007). **Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): a clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5.** *Blood* 109:478-485.
170. Muris JF, Meijer CJLM, Vos W, van Krieken JHJM, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ (2006). **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* 208(5):714-23.
171. Nakamura S, Ye H, Bacon CM, Goatly A, Liu h, Ken L (2008). **Translocation involving the immunoglobulin heavy chain gene locus predict better survival in gastric diffuse large B- cell lymphoma.** *Clin Cancer Res* 14(10):3002-11.
172. Naresh KN (2007). **MUM1 expression dichotomizes follicular lymphoma into predominantly, MUM1-negative low-grade and MUM1-positive high-grade subtypes.** *Hematologica* 2(2):267-268
173. Natkunam Y, Warnke R A, Montgomery B.A.K, Falini B, Rijn M (2001). **Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry.** *Mod Pathol* 14(7):686–694.
174. Natkunam Y (2007). **The biology of the germinal center.** *Hematology* (1): 210-219.
175. Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. (2009). **Clinical significance of 8q24/c-Myc translocation in diffuse large B-cell lymphoma.** *Cancer Sci* 100 (2);233-237.
176. Nikolandes C, Dimon S, Pavlidis N. (1998). **Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphomas.** *The Oncologist* 3:189-197.
177. Nishikori M (2005). **Classical and alternative NF- κB activation pathways and their roles in lymphoid malignancies.** *J Clin. Exp. Haematopathol* 45;(1):15-24.
178. Nyman H, Jantunen E, Juvonen E, Elonen E, Bohm J, Kosma VM (2008). **Impact of germinal center and non- germinal center phenotypes on overall and failure-**

- free survival after high dose chemotherapy and auto-SCT in primary diffuse large B-cell lymphoma.** Bone Marrow Transpl 2:93-98.
179. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, Taskinen M, Berglund M, Amini RM (2009). **Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP.** Modern Pathology 22: 1094-1101.
180. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, Taskinen M, Berglund M Amini RM (2007). **Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal centre phenotype in diffuse large B cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy.** Blood 109:4930-35.
181. Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S, Tzankov A (2009). **BCL2 gene aberration as an IPI-independent marker for poor outcome in non-germinal-centre diffuse large B cell lymphoma.** J Pathol 62:903-7.
182. O'Connor S, Shumway S, Miyamoto S (2005). **Inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  nuclear export as an approach to abrogate Nuclear Factor- $\kappa$ B-dependent cancer cell survival.** Mol Cancer Research 3:42-49.
183. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C (1994). **Rearrangement of the BCL6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma.** N Eng J Med 331:74-80
184. Oh YH, Park CK (2006). **Prognostic evaluation of nodal diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemical profiles with emphasis od CD138 expression as a poor prognostic factor.** J Korean Med Sci 21:397-405.
185. Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S (2003). **VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression.** Blood 101:4878-4886.
186. Ohshima K, Kawasaki C, Muta H, Muta K, Deyev K, Haraoka S (2001). **CD10 and BCL2 expression in diffuse large B-cell Lymphoma:CD10 marker of improved prognosis.** Histopathology 39(2):156-62.
187. Oki Y, Younes A. (2007) **Endothelial progenitor cells in non-Hodgkin's lymphoma.** Haemat/ Hemat. J 92(04):433-434.
188. Orpana A, Salven P. (2002) **Angiogenic and lymphangiogenic molecules in hematological malignancies.** Leuk Lymphoma 43(2):219-24.

189. Pasqualucci L, Migliazza A,, Basso K, Houldsworth J, Changati R, Dalla-Favera R (2003). **Mutations of the *BCL6* protooncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphomas.** Blood 101:2914-23.
190. De Paepe P, Achten R, Verhoef G, Wlodarska I, Stul M, Vanhentenrijk V (2005). **Large cleaved and immunoblastic Lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entites within the group of diffuse large B-cell lymphomas.** J Clin Oncol 23(28):7060-7068.
191. Park YH, Sohn SK, Kim JG, Lee MH, Song HS, Kim MK (2009). **Interaction between *BCL2* and interleukin-10 gene polymorphisms alter outcomes of diffuse large B-cell lymphoma following rituximab plus CHOP chemotherapy.** Clin Cancer Res 15:2107-15.
192. Passam FH, Sfiridaki A, Pappa C, Kyriakou D, Petreli E, Roussou PA, Alexanderakis MG (2008). **Angiogenesis-related growth factors and cytokines in the serum of patients with B non-Hodgkin lymphoma; relation to clinical features and response to treatment.** Inter J Lab Hematol 30(1):17-25.
193. Phan RT, Dalla-Favera R (2004) **The *BCL6* proto-oncogene suppresses p53 expression in germinalcentre B cells.** Nature 432:635-9.
194. Pedersen LM, Klausen TW, Davidsen UH, Johnsen HE (2005). **Early changes in serum IL-6 and VEGF levels predict clinical outcome following first-line therapy in aggressive non-Hodgkin's lymphoma.** Annals of Hematol 84(8):510-516.
195. Pedersen LM, Jürgensen GW, Johnsen HE (2005). **Serum levels of inflammatory cytokines at diagnosis correlate to the *BCL6* and CD10 defined germinal centre (GC) phenotype and *BCL2* expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma.** Br J Haemat 28(6):813-819.
196. Perez-Rosado A, Artiga MJ, Vargiu P, Sanchez-Aguilers A, Alvarez-Barmentos A, Piris MA (2008). ***BCL6* represses NF-κB activity in diffuse large B-cell lymphomas.** J Pathol 214:498-507.
197. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stähl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I (2008). **MabThera International Trial (MinT) Group. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInT) study.** Lancet Oncol 9:435-44.

198. Pillai G, Cook N, Turley H, Leek RD, Blasquez C, Pezzella F (2005). **The expression and cellular localization of phosphorylated VEGFR2 in lymphoma and non-neoplastic lymphadenopathy:an immunohistochemical study.** *Histopathology* 45(2):209-16.
199. Planinc-Peraica A (1999). **Prognostički čimbenici u bolesnika s ne-Hodgkinovim limfomom.** Doktorska dizertacija str 72.
200. Podar K, Anderson KC. (2005) **The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications.** *Blood* 2005;105:1383-1395.
201. Poulsen CB, Borup R, Nielsen FC (2005). **Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma.** *Eur J Haematol* 74:453-65.
202. Prakash S, Swerdlow SH (2007). **Nodal aggressive B-cell lymphomas: a diagnostic approach.** *J f Clin Pathol* 60:1076-1085.
203. Rabson AB, Weissmann D. (2005).**From microarray to bedside: Targeting NF-κB for therapy of lymphomas.** *Clin Cancer Research*; 2 (11): 2-6.
204. Ranger AM, Zha J, Harada H (2003). **Bad- deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9324-9.
205. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, Louie DC (1998). **Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell Lymphoma.** *Blood* 92 (1):234-240.
206. Reed JC, Pellecchia M (2005). **Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies.** *Blood* 106 (2):408-418.
207. Ribas C, Colleoni GWB, Silva MRR, Carregoza MJ, Bordin JO (2004). **Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunoexpression in the context of adverse standard prognostic factors in multiple myeloma.** *Eur J Haematol* 73(5):311-317.
208. Riihijarv S, Nyman H, Holte H, Bjorkholm M, Fluge O, Pedersen LM (2011). **High serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level is an adverse prognostic factor in high risk diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients treated with dose-dense chemoimmunotherapy and systemic CNS prophylaxis. Results from a Nordic phase II study.** 53rd Annual Meeting and Exposition December 10-13 Abstract 4142.
209. Roberts RA, Wright G, Rosenwald AR, Jaramillo MA, Grogan TM, Miller TP (2006). **Loss of major histocompatibility class II gene and protein expression in**

- primary mediastinal large B-cell lymphoma is highly coordinated and related to poor patient survival** Blood 108(1):311-318.
210. Rofstad EK, Halsør EF. (2000). **Vascular endothelial growth factor, Interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts.** Cancer Res 60:4932-4938.
211. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI (2002). **The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma.** N Eng J Med 346(25):1937-1947.
212. Rosenwald A, Staudt LM. (2003). **Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma.** Leuk Lymphoma 44(3):S41-S437.
213. Roumier C, Galiegue-Zouitina S, Bastard C (2000). **FISH analysis with a YAC probe improves detection of LAZ3/BCL6 rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma.** Hematol J 1:117-25.
214. Ruan J, Hyjek E, Kermani P, Christos PJ, Hooper AT, Coleman M. (2006) **Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma.** Cl Cancer Res 12,5622-5631.
215. Saito M, Gao J, Basso K, Kitagawa Y, Smith PM, Bhagat G, Pernis A (2007). **A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma.** Cancer Cell 12:280-292.
216. Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T (2007). **Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging.** Ageing Res Rev 7:83-105
217. Salles G. (2008). **Treating diffuse large B-cell lymphoma: optimising the use of anti-CD20 antibodies.** Hematology Education: The education program for the annual congress of the European Hematology Association. 2:339-344.
218. Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, Piris MA (2003). **Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas.** Blood 101(4):1220-1235.
219. Sanchez-Izquierdo D, Siebert R, Harder L (2001). **Detection of translocations affecting the BCL6 locus in B cell non-Hodgkin's lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization.** Leukemia 15:1475-84.
220. Santos SCR, Dias S. (2004). **Internal and external autocrine VEGF/KDR loops regulate survival of subsets of acute leukemia through distinct signaling pathways.** Blood 103(10):3883-89.



221. Sato M, Yamaguchi M, Suzuki R, Okamoto M, Sato Y, Tamaru J.(2007). **Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): a clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5.** Blood 109(15):478-485.
222. Savage KJ, Monti S, Kotor JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L (2003). **The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma.** Blood 102(12):3871-9.
223. Savage KJ, Al-Rajhi N Voss N, Paltiel C, R. Klasa R, Gascoyne RD (2006). **Favorable outcome of primary mediastinal large B-cell lymphoma in a single institution: the British Columbia experience.** Annals of Oncology 17:123-130.
224. Savage KJ, Jonson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinna P (2009). **MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B- cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy.** Blood 114(17): 3533-3537.
225. Segal MR. (2006). **Microarray gene expression data with linked survival phenotypes: diffuse large-B-cell lymphoma revisited.** Biostatistics 7(2):268-285.
226. Sehn LH, Myron S. Czuczman MS, DeAngelis LM. (2006). **Optimal use of prognostic factors in non-Hodgkin lymphoma.** Hematology 295 302.
227. Sehn L H, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P (2007). **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 109(5):1857-1861.
228. Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, Uike N, Kawano F, Gondo H (2009). **Prognostic impact of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era.** Cancer Sci 100:1842-7.
229. Seto M, Honma K, Nakagawa M (2010). **Diversity of genome profiles in malignant lymphoma.** Cancer Sci 01(3):573-578.
230. Shaffer AL, Rosenwald A. Staudt LM (2002). **Lymphoid malignancies: the darkside of B-cell differentiation.** Nat Rev Immunol 2:920-32.
231. Sharon L, Barrans SL, Paul A. S. Evans PAS, .O'Connor SJM, Kendall SJ (2003). **The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome.†** Cl Cancer Res 9:2133-2139.

232. Shin JW, Huggenberger R, Detmar M (2008). **Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis.** Blood 112:2318-26..
233. Shipp M, Harrington D (1993). **A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: the International NHL Prognostic Factors Project.** N Eng J Med. 329:987-994.
234. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P (2002). **Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning.** Nat Med 8:68-74.
235. Sjö LD, Poulsen CB, Hansen M, Moller MB, Ralfkiaer E. (2007). **Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups.** Eur J Haematol 79:501-7.
236. Skibola CF, Curry JD, Nieters A (2007). **Genetic susceptibility to lymphoma.** Haematologica 92(7):960-969.
237. Snuderl M, Kolman, O K.; Chen, Y B, Hsu J. AM, Ackerman A M, Cin P (2010). **B-cell lymphomas with concurrent *IGH-BCL2* and *MYC* rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and Diffuse large B-cell lymphoma.** AJSP 34(3):327-340.
238. Stein H (2008). **How to translate molecular prognostic markers into clinical practice?** Hematology Education: The education program for the annual congress of the European Hematology Association. 2:336-338.
239. Sud R, Friedberg JW (2008). **Salvage therapy for relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: impact of prior rituximab.** Haematologica 93(12):1776-80.
240. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H (2008). **WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.** International Agency for Research on Cancer, Lyon, 233-237.
241. Sweetenham JW (2005). **Diffuse large B-cell lymphoma: Risk stratification and management of relapsed disease.** Am Soc Hematology 1:252-260.
242. Tabruyn SP, Griffioen AW (2008). **NF- $\kappa$ B: a new player in angiostatic therapy.** Angiogenesis 11:101-106.

243. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K (2005). **Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma.** Blood 106:1770-77.
244. Takada Y, Andreeff M, Aggarwal BB (2005). **Indole-3-carbinol suppresses NF- $\kappa$ B and IKK $\alpha$  kinase activation, causing inhibition of expression of NF- $\kappa$ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells.** Blood 106(2):641-49.
245. Tavani A, La Vecchia C, Franceschi S (2000). **Medical history and risk of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas.** Eur J Cancer Prev 9:59-64.
246. Tian MT, Gonzalez G, Scheer B, DeFranco (2005). **BCL10 can promote survival of antigen-stimulated B lymphocytes.** Blood 2005;106(6):2105-12.
247. Tibileti MG, Martin V, Bernasconi B, Del Curto B, Pecciarini L, Uccella S (2009). **BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome.** Hum Pathol 40:645-52.
248. Thieblemont C, Grosseuvre A, Broussais-Guillaumont F, Salles G, Traulle C, Coiffier B (2008). **Non-Hodgkin's lymphoma in very elderly patients over 80 years. A descriptive analysis of clinical presentation and outcome.** Ann Oncol 19(4):774-779.
249. Tome ME, Johnson DBF, Rimsza LM, Roberts RA, Grogan TM, Mille TP (2000). **A redox signature score identifies diffuse large B-cell lymphoma patients with a poor prognosis.** Blood (106)10:3594-3601.
250. Tomita N, Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, Takeuchi K, Koike J, Motomura S (2009). **Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocation.** Haematologica 94(7):935-943.
251. Tomita N (2011). **BCL2 and MYC Dual-Hit Lymphoma/Leukemia.** J Clin Exper Hemat 50(1):7-12.
252. Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, Kato M, Hayami Y, Hanamura I (2000). **MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies.** Leukemia 14(3):449-56.
253. Tzankov A, Pehrs AC, Zimpfer A (2003). **Prognostic significance of CD44 expression in diffuse large B-cell lymphoma of activated and germinal center B cell-like types: a tissue microarray analysis of 90 cases.** J Clin Pathol 56: 747-52.

254. Tzankov A, Zlobec I, Went P, Robl H, Hoeller S, Dirnhofer S (2010). **Prognostic immunophenotypic studies in diffuse large B-cell lymphoma with special emphasis on rational determination of cut-off scores.** *Leuk Lymphoma* 51(2):199-212.
255. Uherova P, Ross CW, Schnitzer B, Singleton TP, Finn WG (2001). **The clinical significance of CD10 antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma.** *Am J Clin Pathol* 15(4): 582-88.
256. Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, Philippo K, Kleiverda K, Kluin P (2000). **Interphase FISH detection of *BCL2* rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes.** *Genes Chromosomes Cancer* 27:85-94.
257. Veelken H, Dannheim SV, Moenting JS, Martens UM, Finke J, Schmitt-Graeff A (2007). **Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy.** *An Oncol.*
258. Velasquez WS, Jagannath S, Tucker SL, Fuller LM, North LB, Redman JR (1989). **Risk classification as the basis for clinical staging of diffuse large B-cell lymphoma derived from 10-year survival data.** *Blood* 74(2):551-557.
259. Vineis P, Crosignani P, Sacerdote C (2008). **Haematopoietic cancer and medical history: a multicentre case control study.** *J Epidemiol Community Health* 54:431-36.
260. Verschuren EW, Hodgson JG, Gray JW, Kogan S, Jones N, Gerard I (2004). **The role of p53 in suppression of KSHV cyclin-induced lymphomagenesis.** *Cancer Research* 64(15):581-89.
261. Vumbaca F, Phoenix KN, Rodriguez-Pinto D, Han DK, Kevin P K. Claffey (2008). **Double-Stranded RNA-Binding protein regulate Vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis.** *Molecular and Cellular Biology* 28(2): 772-783.
262. Wang ES, Teruya-Feldstein J, Wu Y, Zhu Z, Hicklin D, Moore MAS (2004). **Targetin autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo.** *Blood* 104(9):2893-02.
263. Wang SS, Davis S, Cerhan JR, Hartge P, Severson RK, Cozen W (2006). **Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma.** *Carcinogenesis* 27(9):1828-34.
264. Wei MC (2004). ***BCL2* related genes in lymphoid neoplasia.** *Int J Hematol* 80:205-9.

265. Westphal JR, Hullenaar RV, Peek R, Willems RW, Crickard K, Crickard U (2000). **Angiogenic balance in human melanoma: expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo.** *Cancer* 86(6):768-76.
266. Willis TJ and Dyer MJS (2000). **The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies.** *Blood* 96(3):808–822.
267. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ (2006). **Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice.** *Genetics in Medicine* 8(1):16-23.
268. Wilson KS, Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald CA, Gill KB, Sutherland J (2007). **CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of *BCL2* expression in diffuse large B-cell lymphoma.** *Leuk Lymphoma* 48:1102-9.
269. Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM (2008). **Phase II study of dose-adjusted EPOCH and Rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers.** *J Clin Oncol* 26:2717-24.
270. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM (2006). **Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study.** *Blood* 107(11):4207-4213.
271. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hunt EH, Wiestner A, Staudt LM (2003). **A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma.** *PNAS* 100(12):9991-96.
272. Xu Y, McKenna RW, Doolittle JE, Hladik CL, Kroft SH (2005). **The t(14;18) in diffuse large B-cell lymphoma: correlation with germinal center-associated markers and clinical features.** *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 13:116-23.
273. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, Ichinohasama R, Nakamura N, Yoshino T (2002). **De novo CD5 diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients.** *Blood* 99(3): 815-21.
274. Yang YL, Wang J, Zhao LZ, Gao ZF, Jing HM, Ke XY (2008). **Clinical characteristics cell origin and prognosis of primary gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma: a report of 40 cases].** *Ai Zheng* 27(6):636-41.
275. Yared JA, Girinsky T, Koscielny S, Ribrag V, Patrice Carde P, Ceapa S (2010). **Prognostic value of angiogenic factors (vascular endothelial growth factor**

- [VEGF] and basic fibroblast growth factor [bFGF]) and endostatin in patients with non-Hodgkin Lymphoma** ASH 2010; Annual Meeting 10-13; Abstract 1768.
276. Yeh KH, Kuo SH, Chen LT, Mao TL, Doong SI, Wu MS (2005). **Nuclear expression of BCL10 or nuclear factor kappa B helps predict Helicobacter pylori-independent status of low grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with or without t(11;18)(q21;q21).** Blood 106(3):1037-41.
277. Yi S, An G, Qi J, Zou D, Zhao Y, Zhang P (2010). **The Significance of bone marrow involvement in aggressive lymphomas: A retrospective comparison of clinical outcome between peripheral T cell lymphoma and diffuse large B cell lymphoma in China.** Acta Haematol 124:239–244.
278. Yoshida S, Nakamura N, Sasaki Y, Yoshida S, Yasuda M, Sagara H (2005). **Primary breast diffuse large B-cell lymphoma shows a non-germinal center B-cell phenotype.** Modern Pathol 18:398-05.
279. Younes A (2008), **Targeted therapy of diffuse large cell lymphoma.** Hematology Education: The education program for the annual congress of the European Hematology Association. 2:347-50.
280. Young HO, Chan-Kum P (2006). **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 21:397-40.
281. Yu D, Cozma D, Park A, and Tikhonenko AT (2007). **Functional validation of genes implicated in lymphomagenesis. An in vivo selection assay using a Myc-induced B-cell tumor.** Nature Genetics 40,108 -12.
282. Zinzani PL, Dirnhofer S, Sabbatini E (2005). **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 90:341-7.
283. Zhang H, Li Y, Li H, Bassi R, Jimenez X, Witte L (2004). **Inhibition of both the autocrine and the paracrine growth of human leukemia human antibody direct against vascular endothelia growth factor receptor.** Leuk Lymphoma 45(9):1887-97.
284. Zhao X F, Hassan A, Perry A, Ning Y, Sanford A, Stass SA (2008). **C-MYC Rearrangements are frequent in aggressive mature B-cell lymphoma with atypical morphology.** Int J Clin Exp Pathol 1:65-74.



## POPIS KRATICA

<b>aa-IPI</b>	-	dobi prilagođen Međunarodni Prognostički Indeks
<b>ABC</b>	-	aktivirane B stanice (activated B-cell-like profile)
<b>AID</b>	-	aktivacija-inducirana pomoću citidine deaminaza
<b>AIDS</b>	-	sindrom stečene imunodeficijencije (acquired immunodeficiency syndrome)
<b>ALCL</b>	-	anaplastični limfom velikih stanica (anaplastic large cell lymphoma)
<b>ASCT</b>	-	autologna transplatacija matičnih stanica
<b><i>BCL2</i></b>	-	B stanični limfom 2 gen (B cell lymphoma 2 gene)
<b><i>BCL6</i></b>	-	B stanični limfom 6 gen (B cell lymphoma 6 gene)
<b>BL</b>	-	Burkittov limfom
<b>CD</b>	-	razlikovni antigen na površini stanice (cluster of differentiation)
<b>cDNA</b>	-	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
<b>CHOP</b>	-	ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon
<b>COP</b>	-	ciklofosamid, vinkristin, prednizolon
<b><i>c-MYC</i></b>	-	c-Myc gen
<b>DAPI</b>	-	4',6-diamidino-2-fenil-indol (4',6-diamidino-2-phenylindol)
<b>DLBCL</b>	-	difuzni B velikostanični limfom (diffuse large B-cell lymphoma)
<b>DNA</b>	-	deoksiribonukleinska kiselina
<b>EDTA</b>	-	etilen diamin tetraoctena kiselina (ethylene diamine tetracetic acid)
<b>EBV</b>	-	Epstein-Barr virus
<b>ECOG</b>	-	Eastern Cooperative Oncology Group
<b>FDC</b>	-	folikularna dendritična stanica - (follicular dendritic cell)
<b>FL</b>		folikularni limfom
<b>18FFDG</b>	-	PET/CT pozitron emission tomography sa fluorine-18 fluorodeoxyglocose
<b>FISH</b>	-	Interfazna fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)
<b>G</b>	-	zeleni signal (green signal)
<b>GC</b>	-	germinativni centar
<b>GCB</b>	-	B stanice germinativnog centra (germinal center B-cell-like profile)
<b>GELA</b>	-	Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte
<b>GEP</b>	-	profil genske ekspresije
<b>HDT</b>	-	visoke doze terapije



<b>H&amp;E</b>	-	hemalaun & eozin
<b>HIV</b>	-	virus humane imunodeficijencije
<b>HHV8</b>	-	humani herpes virus 8
<b>HTLV-1</b>		ljudska T stanična leukemija virus-1
<b>IgVH</b>	-	geni varijabilne regije teškog lanca imunoglobulina
<b>IRF</b>	-	interferon regulatorni faktor
<b>IHC</b>	-	imunohistokemijsko bojenje
<b>LDH</b>	-	laktat dehidrogenaza
<b>LSAB</b>	-	vizualizacijski set streptavidin-biotin (labelled streptavidin-biotin system)
<b>LSI</b>	-	lokus specifična proba
<b>MPI</b>	-	Medunarodni prognostički indeks (International Prognostic Index)
<b>mRNA</b>	-	glasnička ribonukleinska kiselina
<b><i>MUM1/IRF4</i></b>	-	multipli mijelom-1/interferon regulatorni faktor-4 gen (multiple myeloma-1/interferon regulatory factor-4 gene)
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	-	nuklearni faktor kappa B
<b>NHL</b>	-	ne-Hodgkinov limfom
<b>NK</b>	-	stanice prirodne ubice (natural killer cells)
<b>O</b>	-	narančasti signal (orange signal)
<b>p</b>	-	kratki krak kromosoma
<b>q</b>	-	dugi krak kromosoma
<b>REAL</b>	-	Revidirana Europsko-američka klasifikacija limfoma (Revised European-American Lymphoma Classification)
<b>RT-PCR</b>	-	reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (reverse transcription and polymerase chain reaction)
<b>SSC</b>	-	natrijev citrat i klorid (sodium chloride salt and citrate)
<b>SZO</b>	-	Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organisation)
<b>R-IPi</b>	-	revidirani Međunarodni prognostički indeks
<b>TMA</b>	-	tkivni mikroarray (tissue microarray)
<b>VEGF</b>	-	vaskularni endotelijalni faktor rasta

## ŽIVOTOPIS

Završila sam Medicinski Fakultet u Rijeci 1978 god. i započela staž u Medicinskom centru Zadar. Nakon staža sam radila u Primarnoj zdravstvenoj zaštiti 4 godine u raznim ambulantama na području Zadarske regije. 1982 god. sam dobila specijalizaciju iz Interne medicine, staž sam obavila na KBC-u REBRO, ispit sam položila 1987 godine. Istovremeno sam pohađala poslijediplomsko istraživanje iz Hematologije. Specijalizaciju iz Hematologije sam završila 2004 godine na KB"MERKUR". Iste godine sam obranila magistarski rad s naslovom teme "Prisutnost p53, bcl-1, bcl-2, i Epstein-Barrovog virusa u bolesnika sa ne-Hodgkinovim limfomom". Od 1990 god. sam voditeljica Odsjeka za Hematologiju.

Moj znanstveni rad se temelji na kliničkom istraživanju bolesnika odrasle životne dobi u području ne-Hodgkinovih limfoma i drugih kroničnih limfoproliferativnih bolesti, uključujući dijagnostički postupak, terapiju, efekt terapije, kvalitetu života i evaluaciju novih terapijskih lijekova.

Od 2001. godine sam član Europskog udruženja Hematologa.