

Факултет медицинских наука
Универзитет у Крагујевцу

**Хронична лимфоцитна леукемија: прогностички маркери и апоптоза малигних
лимфоцита периферне крви и костне сржи**

-докторска дисертација-

Др Данијела Јовановић

Крагујевац, 2014

САДРЖАЈ

САДРЖАЈ	1
1. УВОД	5
1.1 ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕУКЕМИЈА	5
1.1.1 Дефиниција и историјат.....	5
1.1.2 Епидемиологија.....	5
1.1.3 Етиологија и патогенеза.....	6
1.1.4 Развој Б лимфоцита.....	7
1.1.5 Хипотеза о расту, развоју и еволуцији ХЛЛ-а.....	10
1.1.6 Клиничка слика.....	11
1.1.7 Имунолошке абнормалности.....	12
1.1.8 Лабораторијски налази.....	12
1.1.9 Дијагноза.....	14
1.1.10 Ток и прогноза.....	15
Имунофенотипски прогнозни маркери болести.....	18
1.1.11 Лечење.....	20
1.1.12 Процена терапијског одговора.....	22
1.2 АПОПТОЗА.....	24
1.2.1. Дефиниција и историјат.....	24
1.2.2 Улога апоптозе	25
1.2.3. Механизам апоптозе	27
1.2.3.1 Спољашњи (рецепторски) пут	28
1.2.3.2. Унутрашњи пут.....	29
1.2.3.2.1 Интрамитохондријални догађаји.....	32
1.2.3.2.2 Постмитохондријални догађаји.....	33
1.2.4 Инхибитори апоптозе.....	34
1.2.5 Морфолошке промене ћелије у процесу апоптозе.....	35

1.3 СОЛУБИЛНИ ФАКТОРИ (ЦИТОКИНИ) МИКРОСРЕДИНА У КОЈИМА ЦИРКУЛИШУ МАЛИГНИ ЛИМФОЦИТИ	37
1.3.1 Интерлеукин-4 (<i>IL-4</i>).....	38
1.3.2 Интерлеукин 6 (<i>IL-6</i>).....	38
1.3.3 Интерлеукин 10 (<i>IL-10</i>).....	39
1.3.4 Интерлеукин 22 (<i>IL-22</i>).....	39
1.3.5 Интерлеукин 12 (<i>IL-12</i>).....	40
1.3.6. Фактори туморске некрозе α и β (<i>TNF α и β</i>).....	40
1.3.7. Интерферон γ (<i>IFN γ</i>).....	41
1.3.8. Васкуларни ендотелни фактор раста (<i>VEGF</i>).....	41
1.3.9. Фактор раста фибробласта (<i>b-FGF /FGF-2</i>).....	42
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	43
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	44
3.1 Испитивана популација.....	44
3.2 Општи протокол истраживања.....	45
3.3 Криопрезервација леукоцита, плазме и супернатанта костне сржи.....	46
3.4 Одмрзавање леукоцита.....	46
3.5 Издајање моноклеарних ћелија.....	47
3.6 Детекција имунофенотипских маркера болести и маркера апоптозе.....	47
3.6.1. Детекција експресије површинских маркера.....	48
3.6.2 Детекција интрацелуларних маркера.....	48
3.6.2.1 Детекција <i>bcl-2</i> и <i>ZAP-70</i>	48
3.6.2.2 Детекција <i>mcl-1</i>	49
3.7 Апоптоза лимфоцита.....	50
3.8 Одређивање цитокина.....	51
3.9 Статистичка анализа.....	52
4. РЕЗУЛТАТИ.....	53
4.1 Експресија прогнозних маркера	53

4.1.1 Одређивање експресије <i>CD38</i> на лимфоцитима изолованим из периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ.....	53
4.1.2. Одређивање експресије <i>CD49d</i> на лимфоцитима изолованим из периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ.....	54
4.1.3. Одређивање експресије <i>ZAP-70</i> у лимфоцитима изолованим из периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ.....	55
4.1.4. Одређивање експресије <i>bcl-2</i> и <i>mcl-1</i> у лимфоцитима изолованим из периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ.....	57
4.1.5 Експресија прогнозних маркера у периферној крви и костној сржи као параметар разликовања пацијената у различитим стадијумима болести.....	59
4.2 Апоптоза	71
4.2.1 Процент лимфоцита у раној, касној апоптози и некрози у периферној крви и костној сржи пацијената као и периферној крви здравих испитаника.....	71
4.2.2 Процент лимфоцита у раној, касној апоптози и некрози у периферној крви и костној сржи као параметар разликовања пацијената у различитим стадијумима болести.....	74
4.3 Цитокини.....	77
4.3.1 Концентрација цитокина у плазми и супернатанту костне сржи пацијената као и плазми здравих испитаника	77
4.3.2 Концентрација цитокина у плазми и супернатанту костне сржи пацијената у различитим стадијумима болести.....	84
4.4 Параметри крвне слике, инфилтрације костне сржи и биохемијски параметри (ЛДХ) као параметри разликовања пацијената у различитим стадијумима болести	88
4.5. Процент и апсолутни број Т лимфоцита периферне крви као параметар разликовања пацијената у различитим стадијумима болести.....	90
4.6 Апоптоза лимфоцита периферне крви, али не и костне сржи зависи од нивоа експресије <i>bcl-2</i>	92
5. ДИСКУСИЈА.....	95

5.1 Прогнозни маркери	95
5.1.1 <i>CD38</i>	95
5.1.2 <i>CD49d</i>	99
5.1.3 <i>ZAP-70</i>	101
5.1.4 Т лимфоцити периферне крви	103
5.2 Апоптоза	105
5.3 Цитокини	111
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	119
7. ЛИТЕРАТУРА.....	120

1 УВОД

1.1 Хронична лимфоцитна леукемија

1.1.1 Дефиниција и историјат

Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) је прогресивна малигна болест која настаје пролиферацијом и акумулацијом клона малих, зрелих, имунолошки измењених дугоживећих лимфоцита у периферној крви, костној сржи, лимфним чворовима, слезини и другим органима. (1). Малигно измењени лимфоцити се могу разликовати у степену диференцијације, стању активације и ћелијској подгрупи. У класификацији светске здравствене организације, ХЛЛ представља искључиво болест Б лимфоцита, док је ентитет раније познат као Т-ХЛЛ сада класификован као Т пролимфоцитна леукемија. (2)

Иако се први историјски записи о ХЛЛ-у појављују још давне 1845.године, прве записе са описом клиничких случајева и клиничком сликом описују *Kundrat*, 1893 (3), а након њега и *Turk*, 1903 године. (4) У природу и патогенезу ХЛЛ-а покушавали су да проникну многи истраживачи, али прве озбиљне спекулације о патогенетским механизмима укљученим у настанак ХЛЛ-а потекли су од *Galton*-а 60тих година прошлог века. (5).

1.1.2 Епидемиологија

ХЛЛ представља најчешћи облик леукемије код одраслих у развијеним земљама чинећи око 24% свих леукемија. (6) Болест се јавља углавном код старијих особа, са дијагностиковањем најчешће од 65 до 70 године живота. Мушкарци оболевају чешће него жене и то у односу 2:1 (6). Током последњих година, број пацијената млађих од 60 година прогресивно расте и сада чини око 20% свих пацијената. (6) Такође то је болест са већом учесталосту у породицама (10-20% пацијената имају барем једног рођака у првом степену сродства који је оболео од ове болести) као и других малигнитета. (7), али и једна од ретких малигних болести код којих није забележен пораст учесталости код преживелих након нуклеарних напада и хаварија, као ни након изложености токсичним агенсима. (8)

1.1.3 Етиологија и патогенеза

Етиологија ХЛЛ-а је још увек непозната. У жеку испитивања тумора и проналажења корелација између појаве тумора и етиолошких агенаса као што су алкилирајући агенси, јонизујуће зрачење, канцерогене хемикалије, ретровирусне инфекције, повезаност ових фактора и појаве ХЛЛ-а у популацији нису пронађене. (6,7,8)

О патогенези ове болести ипак се зна мало више. Иако су први постулати указивали на то да је хронична лимфоцитна леукемија болест настала нагомилавањем малих, зрелих и репродуктивно неактивних ћелија које преживљавају дуже услед поремећених апоптотских механизма, разноликост у клиничком испољавању, исходу и прогнозе није се могла објаснити. Новија истраживања усмерена на испитивање ћелијског циклуса, интеракције микросредине као и *in vivo* и *in vitro* стимулисање ћелија ХЛЛ-а пружиле су доказе да малигни лимфоцити ХЛЛ-а активно пролиферишу и да је разлика у клиничкој слици и току болести код појединих пацијента управо и последица неравнотеже пролиферације и апоптозе. (8).

Испитивања потенцијала пролиферације ХЛЛ-а указала су на то да је брзина пролиферације од 0,1 до 1,0% клона дневно. (9). Оваква брзина пролиферације сугерише да се дневно произведе од 10^9 до 10^{10} нових леукемијских ћелија. Мерења теломеразе такође су указала да ХЛЛ ћелије имају висок проценат пролиферације, али и индиректно указале да је већа пролиферација уједно и већа шанса за стварање мутације које даље могу одређивати ток болести. (10). Ово сазнање објаснило је нагле прогресије болести код пацијената код којих се болест сматрала индолентном по току. Данас се зна да су те мутације последице, а не узрок ХЛЛ-а. Овом сазнању доприноси и чињеница да код ћелија хроничне лимфоцитне леукемије нису уочене јединствене мутације. (11)

Нови докази указују да ХЛЛ лимфоцит није наивна ћелија, и да је малигна трансформација настала након контакта са неким антигеном и активирања Б ћелијског рецептора (БЋР), па су се најновија истраживања усмерила ка доказивању непобитне улоге Б ћелијског рецептора у патогенези ХЛЛ-а. Б ћелијски рецептор ХЛЛ ћелија различитих пацијената је често структурно веома сличан, што наводи на закључак да су антигени који се за њега вежу веома слични и могу имати улогу у патогенези ХЛЛ-а. (1) Једном када се трансдукциони сигнал генерише кроз Б ћелијски рецептор Б, лимфоцит прогредира ка ћелијском циклусу или смрти, а код лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије ова стимулација покреће појачану транскрипцију антиапоптотских протеина bcl-

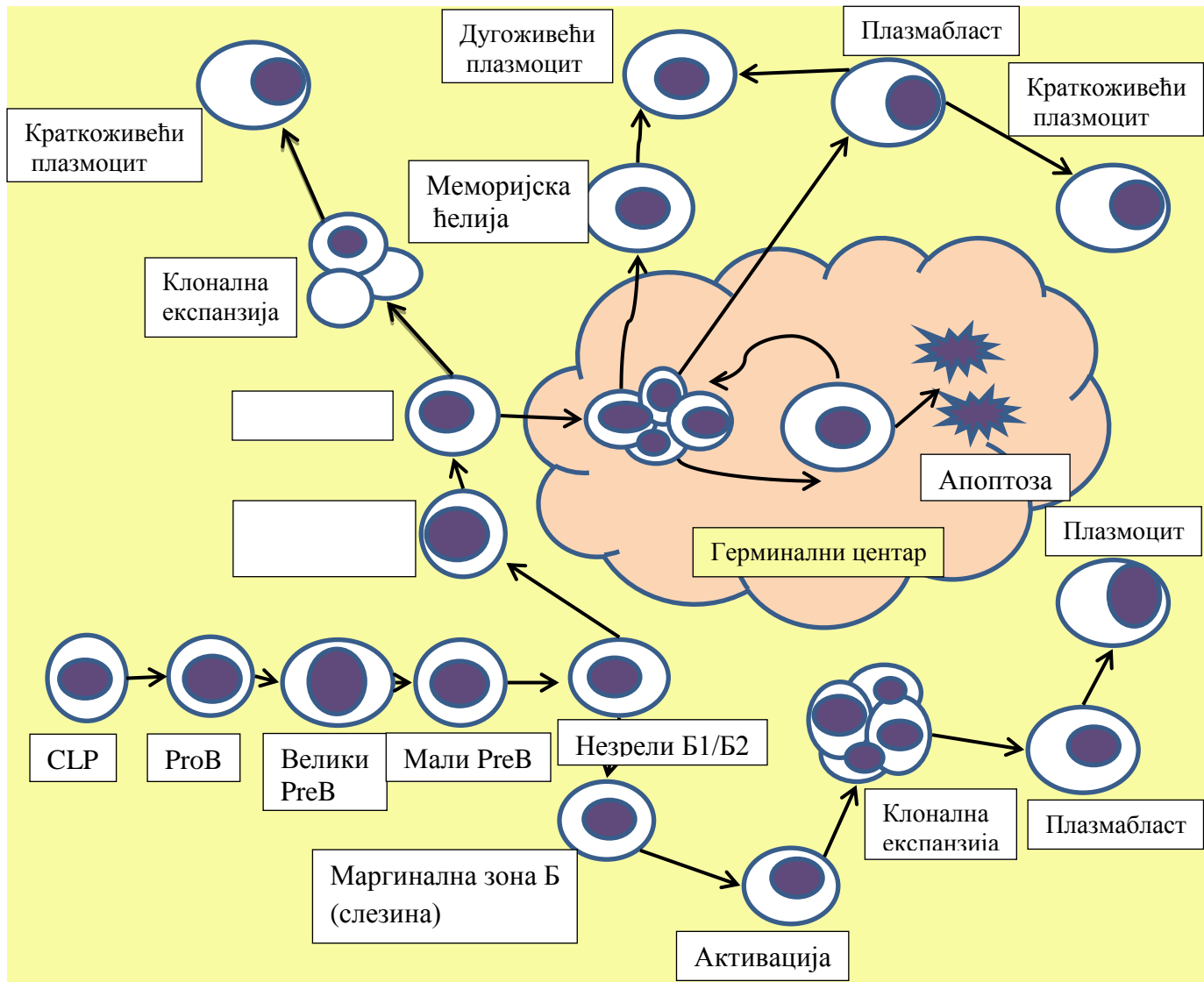
2 протеинске фамилије (bcl-2, mcl-1, bcl-XL). Крајњи резултат последица је дисбаланса између пролиферације и апоптозе која је у великој мери потпомогнута интеракцијом ХЛЛ лимфоцита са микросредином у којој се налази, а резултује продуженим животом ћелије. (12).

1.1.4. Развој Б лимфоцита

Да би се боље разумела патогенеза хроничне лимфоцитне леукемије, неопходно је и објаснити пут развоја и сазревања Б лимфоцита. Централни догађај у развоју Б лимфоцита је постепено и сукцесивно реаранжирања гена за лаки и тешки ланац имуноглобулина. (13).

Лимфоцитни прекурсори настају у костној сржи диферентовањем матичне стем ћелије. Данас се зна да је догађај који опредељује матичну ћелију да уђе у лимфогенезу експресија рецептора за интерлеукин 7 (*IL-7*) која је иницирана транскрипционим фактором *PU.1*. Након тога долази до експресије активних гена за реаранжирање (*eng. Rearranging active genes RAG-1 и RAG-2*), а онда и експресијом гена који кодирају сурогат лаког ланца имуноглобулина, V_{preB} и λ_5 , преко рецептора за *IL-7* и тирозин киназа *c-kit* и *flk-2/flk-3*. (14). На овом стадијуму развоја настаје први морфолошки и функционално препознати прекурсор Б лимфоцита, назван *proB* лимфоцит. Током овог веома раног развоја, прогентиорска Б ћелија (*ProB*) је у процесу реаранжирања тешког ланца од D_H до J_H . Када је дошло до $D_H J_H / D_H J_H$ реаранжирања, настаје *preB1* ћелија која онда улази у V_H до $D_H J_H$ реаранжман. Овај процес индукован је одласком *preB1* ћелије из стромалног окружења примарних лимфоидних органа (јетре код феталне, односно костне сржи код адултне лимфогенезе). Пронађено је да посредством лиганата за тирозин киназе *c-kit* и *flk-2/flk-3* стромално окружење задржава Б лимфоцит у стадијуму *preB1* ћелије. (15). Наставак диференцијације се сада одвија у секундарним лимфоидним органима, преваходно лимфним чворовима и слезини. Ћелија која је извршила V_H до $D_H J_H$ реаранжман сада се зове *preB2* ћелија. На овом стадијуму долази и до губитка експресије рецептора за *IL-7*. *In vitro* испитивања указала су да *IL-7* спречава диференцијацију *preB1* ћелије до *preB2* ћелије, незрелих и зрелих лимфоцита, и да спречава апоптозу *preB1* лимфоцита у одсуству стромалних ћелија. (16). Уколико је реаранжман био продуктиван у *preB2* ћелији, μH ланац се синтетише из реаранжираних гена који представља пар са сурогатним лаким ланцем, па ћелија добија сигнал за пролиферацију и на својој површини експримира пре Б ћелијски рецептор (*preB2P*). Ове *preB2* ћелије су велике јер се од њих очекује најмање 2-

7 деоба у даљем циклусу, а и заустављен им је даљи процес реаранжирања смањењем експресије RAG гена. Експримиран преБТР одговоран је за две важне функције у развоју Б ћелија и то у преласку из преБ I у преБ II ћелију. Прво, спроводи сигнал за пролиферацију великих преБ II ћелија и друго нисходном регулацијом смањује експресију гена који кодирају сурогатни лаки ланац. (17). Тако је лимитирана производња лаког ланца која се обавља у преБ I лимфоциту, а како долази до већег броја деоба при формирању преБ II лимфоцита тако се количина транскрипта сурогата лаког ланца смањује. На овом степену диференцијације, лаки ланац, који се чврсто везује са μ Н ланцем, се током деоба истроши и смањује експресију пре БТР, док се код оних ћелија код којих се лаки ланац лабаво веже, он и задржава у ћелији. На овом степену почиње и прва одбрана организма од аутореактивних ћелија.



Слика 1.1.1 Развој и диференцијација Б лимфоцита (18)

Излазак велике преБII ћелије из ћелијског циклуса последица је прекида сигнала преБТР који уводи сада малу преБII ћелију у *G0* фазу ћелијског циклуса. Алели за тешке ланце су реаранжирани до $D_H J_H$ и затворени су за даље реаранжирање, док се локуси за лаки ланац сада отварају за реаранжирања од V_L до J_L . Поново долази до активирања RAG гена и они остају активирани у ћелији док год синтетисан лаки ланац не формира аутореактивно антитело. Ово отварање локуса за лаке ланце и активирање RAG гена омогућава сада малој преБII ћелији да уђе у други степен реаранжирања гена за лаки ланац. Само Б ћелије које на својој површини имају IgM могу доћи у контакт са антигеном како би се извршила њихова даља селекција. Ове ћелије су прве које напуштају лимфни чвор и иду најчешће до слезине. Њима у слезини и костној сржи бивају презентовани аутоантигени и свака аутореактивна ћелија добија сигнал за апоптозу. (17).

Овако формиране Б лимфоцити представљају такозване наивне Б ћелије, које нису аутореактивне, али се нису ни сусреле са антигеном за који су направљене. Када се организам сусретне са инфективним агенсом, првенствено долази до активације CD4+ Т лимфоцита у контакту са антиген презентујућом ћелијом (АПЋ) на периферији. Тада CD4+ лимфоцити путују до периферних лимфоидних органа где се активирају зрели Б лимфоцити. Када се површински IgM који ове ћелије експримирају веже за антиген, CD40 који је активиран везивањем CD40L који експримира CD4+ Т лимфоцит индукује експресију деаминазе индуковане активацијом (eng. Activation induced deaminase - AID). (19). AID тада утиче на локусе за имуноглобулине што има за последицу хипермутацију имуноглобулина на Б ћелијама, појаву експресије других класа тешких ланаца који су селектовани већим афинитетом. Б лимфоцит тада постаје меморијски Б лимфоцит и ћелија која секретује антитела високе специфичности за антиген са којим је дошла у контакт. Ове ћелије су сада дугоживеће (од неколико недеља до неколико година), напуштају герминативни центар и враћају се у костну срж.

Читав процес матурације Б лимфоцита има и своје слабе тачке, на којима најчешће настале мутације могу довести до малигне трансформације ћелије. У процесу матурације Б лимфоцита говоримо о два таласа генетске нестабилности. Први талас повезан је са активацијом гена за реаранжирање у стадијумима proB лимфоцита и preB1 лимфоцитима, као и у малим preB2 лимфоцитима. Други талас повезан је са активацијом зрелих Б лимфоцита кроз везу CD40-CD40L и експресију AID, који доводе до хипермутација у активно транскрибованим генима активираног Б лимфоцита. (20)

1.1.5. Хипотеза о расту, развоју и еволуцији ХЛЛ-а

Порекло Б лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије предмет је бројних дискусија, обзиром на чињеницу о хетерогености већине испитиваних особина. Податак да ове ћелије могу имати и мутиране и немутирани гени за тежак ланац имуноглобулина унело је додатне дилеме у механизме којим ове ћелије улазе у клонску пролиферацију.

Многи нормални Б лимфоцити са немутираним варијабилним регионима имају могућност везивања бројних антигена и на тај начин спроводе прву линију одбране од микроорганизама. (21). Ако нека од ових ћелија садржи или развије генетску абнормалност која јој омогућава да превазиђе ограничење о величини клона, онда је ова ћелија прекурсор леукемијске трансформације. Тада би страни антигени и аутоантигени представљали важан стимулус за развој ХЛЛ-а. (22.) Б ћелије са немутираним полиреактивним Б ћелијским рецептором би у том случају, у контакту са микроорганизмима и аутоантигенима, добиле стимулус за повећану пролиферацију и трансформацију до ХЛЛ ћелија. (23). Сличан механизам може се применити и на порекло мутираног облика ХЛЛ-а јер се мутације варијабилног региона могу десити без помоћи Т ћелија, ван герминативног центра и понекад оне могу фаворизовати аутоимуност. Мутирани Б ћелије пролиферисаће само уколико мутације варијабилног региона имуноглобулина не мењају структуру Б ћелијског рецептора.

Обзиром да лимфоцит ХЛЛ-а одговара активираним Б лимфоцитима, његово порекло не може бити одређено само на основу фенотипских особина, већ и на основу функционалних особина. Могуће је да су Б лимфоцити маргиналне зоне лимфних фоликула прекурсори и мутираног и немутирани облика ХЛЛ-а јер је структура Б ћелијског рецептора код малигну лимфоцита слична антителима који реагују са аутоантигенима и карбохидратном компонентом инфективних агенаса. (24) Друге теорије говоре да је порекло ХЛЛ лимфоцита могуће и од Б1 ћелија (25), пре Б лимфоцита (26), али и Б лимфоцита који су прошли сазревање кроз контакт са Т лимфоцитима у герминалном центру.

Пронађено је да ХЛЛ клонови нису униформни у величини и архитектури и чак садрже ћелије које су различитих метаболичких активности. (12).

Што се тиче фенотипских особина Б лимфоцит хроничне лимфоцитне леукемије експримира антигене својствене Б лимфоцитима, али и друге антигене помоћу којих недвосмислено разликујемо ХЛЛ од других Б лимфоцитних малигнитета. ХЛЛ лимфоцит на својој површини експримира антигене својствене Б лимфоцитима (CD19, CD20, CD22,

CD23, CD79a, CD79b) (27), антигене који се сматрају карактеристиком Т лимфоцита (CD5, CD43), показују изражену моноклоналност (каппа+ или lambda+) и смањено експримира површинске имуноглобулине.

1.1.6. Клиничка слика

Клиничка слика хроничне лимфоцитне леукемије последица је прогресивне акумулације леукемијских ћелија у костној сржи, лимфоидним али и другим органима, као и поремећаја имуног одговора, хипогамаглобулинемије и аутоимуних поремећаја који прате болест. Ипак, код скоро 25-30% свих пацијента ниједан симптом болести није присутан приликом постављања дијагнозе.

Најчешћи симптоми који прате болест су: слабост, лак замор, појачано ноћно знојење, повишена температура у одсуству инфекције, губитак у телесној тежини, честе бактеријске и вирусне инфекције, свраб по кожи, склоност ка крварењу. Наведени симптоми последица су нагомилавања леукемијских ћелија, који последично супримирају нормалну хематопоезу и резултирају анемијом, тромбоцитопенијом и неутропенијом, али и имунолошких феномена. Оно што је за хроничну лимфоцитну леукемију карактеристично јесте да се ови симптоми развијају постепено, готово неприметно, чему у прилог иде и податак да се скоро трећина оболелих открива при рутинским анализама крвне слике.

Врло често пацијенти долазе и са симптомима увећаних лимфних чворова, а како болест напредује и лимфни чворови се додатно увећавају стварајући опструктивне сметње на различитим органима. Код пацијената се могу јавити и болови под десним и левим ребарним луком као последица увећања јетре и слезине.

Леукемијски лимфоцити могу инфилтрисати и друге, нелимфоидне органе, као што су плућа, плеура, кожа, менинге, гастроинтестинални тракт и друго, узрокујући симптоме и знаке својствене за захваћен орган. (28)

1.1.7. Имунолошке абнормалности

Иако је хронична лимфоцитна леукемија болест малигно измењених Б лимфоцита, читав имуни систем показује квалитативне и квантитативне дефекте, који се код пацијената манифестују како смањеном одбрамбеном способношћу, тако и бројним аутоимуним феноменима.

Број Т лимфоцита у хроничној лимфоцитној леукемији може бити нормалан, снижен или чак и повећан, али постоји инверзија CD4:CD8 односа као и промена у функцији, што се додатно продубљује применом хемиотерапије. Т лимфоцити су хиперстимулисани, као код хроничних инфекција, што резултира њиховим функционалним исцрљивањем. (29) Додатно, функција помоћничких Т лимфоцита (Т helper – T_H) је супримирана и изостаје одговор на пролиферишуће сигнале. Супримирана је и функција НК лимфоцита, што може објаснити појачану учесталост секундарних малигнитета и код пацијената који нису лечени хемиотерапијом. Осим овога постоји функционални и матурациони дефект дендритичних ћелија, али и снижене компонентне комплемента, алтернативног и класичног пута. (30)

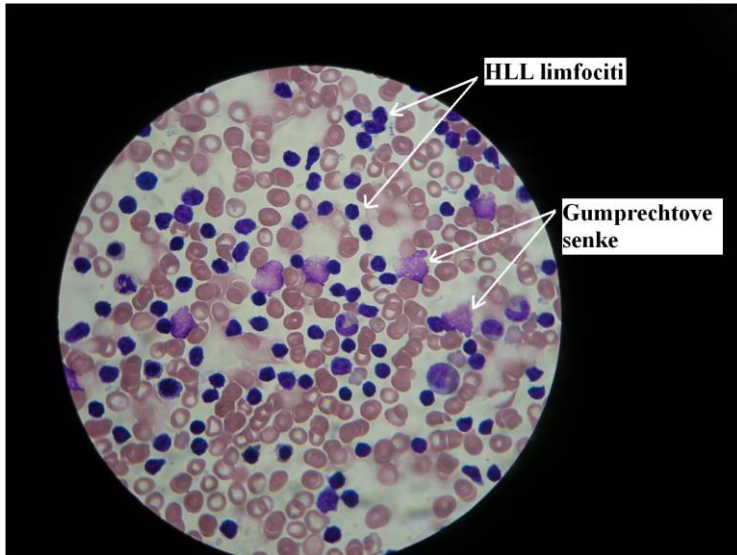
Што се тиче хуморалног имунитета који је директно везан за малигно измењене Б лимфоците код пацијената оболелих од ХЛЛ детектујемо хипогамаглобулинемију, IgA дефицијенцију, IgG дефицијенцију и дефицијенцију секундарног имуног одговора.

1.1.8. Лабораторијски налази

Основна карактеристика хроничне лимфоцитне леукемије су измењени налази у крвној слици пацијента, који представљају често основ сумње на ово обољење и пре појаве првих симптома.

Тако је основна лабораторијска карактеристика леукоцитоза са апсолутном лимфоцитозом. Број лимфоцита при постављању дијагнозе може варирати али најчешће је од $5-500 \times 10^9/\text{л}$. Вредности хемоглобина и тромбоцита могу бити нормалне, али и снижене, што се и јавља код око 15% свих пацијента, а последица је инфилтрације костне сржи леукемијским ћелијама и потискивања прекурсора осталих лоза. (28)

На размазу периферне крви углавном доминирају мали, зрели лимфоцити, као и знатан број лимфоцита који су приликом израде периферног размаза размазани, па одају утисак мрље (Gumprechtove сенке). (31)



Слика 1.1.2 Размаз периферне крви пацијента оболелог од хроничне лимфоцитне леукемије (H&E, x100)

Изглед лимфоцита на размазу периферне крви такође може варирати на основу чега пацијенте можемо поделити у три групе (32):

- типична ХЛЛ, код које доминирају мали наизглед зрели лимфоцити у више од 90%
- ХЛЛ са повећаним процентом пролимфоцита где је проценат атипичних лимфоцита (пролимфоцита) 11-55%
- атипична ХЛЛ, код које нема више од 10% пролимфоцита, али су лимфоцити хетерогени по свом изгледу.

У налазу размаза аспирата костне сржи, доминирају такође лимфоцити и то у више од 30% укупне ћелијске популације. Патолошка обрада костне сржи може дати и информације о типу инфилтрације костне сржи малигним ХЛЛ лимфоцитима, што представља и важан прогностички фактор. (28)

У хроничној лимфоцитној леукемији нису честе биохемијске абнормалности. Код пацијената са великом туморском масом могу се детектовати повишене вредности лактат дехидрогеназе и мокраћне киселине. (28)

1.1.9 Дијагноза

Дијагноза ХЛЛ поставља се на основу физикалног налаза, налаза у костној сржи и периферној крви као и доказивањем специфичног имунофенотипа ХЛЛ ћелија.

У постављању дијагнозе хроничне лимфоцитне леукемије данас важе два одвојена, призната критеријума. (2,33)

<u>Критеријуми према IWCLL</u>	<u>Критеријуми према NCI</u>
<ul style="list-style-type: none">• Апсолутна лимфоцитоза у периферној крви већа од $10 \times 10^9/\text{л}$ која се одржава дуже од 4 недеље• Више од 30% лимфоцита у аспирату костне сржи• Моноклонски Б лимфоцити у периферној крви	<ul style="list-style-type: none">• Апсолутна лимфоцитоза у периферној крви већа од $5 \times 10^9/\text{л}$, од којих је мање од 55% атипичних лимфоцита• Моноклонски Б лимфоцити специфичног имунофенотипа

Табела 1.1.1 Упоредни приказ два критеријума за постављање дијагнозе хроничне лимфоцитне леукемије

И друге лимфоцитне неоплазме могу бити праћене сличним симтпомима, сличним лабораторијским анализама и клиничком сликом, те је веома важно направити добру диференцијалну дијагнозу међу овим болестима. Најпоузданије је испитивање имунофенотипа лимфоцита, путем проточне цитометрије или имунохистохемијским бојењем, и одређивање Матутес скорa. (34)

Ћелијски површински маркер	0 бодова	1 бод
CD79b	јачо позитиван	слабо позитиван
CD23	негативан	позитиван
CD5	негативан	позитиван
FMС7	позитиван	негативан
површински имуноглобулини	јачо позитиван	слабо позитиван

Табела 1.1.2. Матутес скор за постављање дијагнозе ХЛЛ помоћу имунофенотипизације путем проточног цитометра.

Уколико се сабере 4 и више бодова недвосмислено се поставља дијагноза хроничне лимфоцитне леукемије. Уколико је резултат 3 бода и мање, треба размислити о диференцијалној дијагнози.

1.1.10 Ток и прогноза

Обзиром на велику хетерогеност клиничке слике које се могу видети код пацијената са ХЛЛ-ом, али и разлика уочљивих при самој дијагнози, можемо закључити да је ток болести веома разнолик. Поједини пацијенти живе мање од годину дана, док код неких пацијената хронична лимфоцитна леукемија не утиче на ток и квалитет живота. Због тога је још од првих спекулација о патогенези и току болести, постало јасно да се болест мора посматрати кроз већи број фактора, како би се још на почетку могао претпоставити највероватнији ток болести. Тако је најпре настала подела на клиничке стадијуме који су корелирали са величином туморске масе. *Rai* и сарадници су први приметили да је крвна слика и стање лимфоидних органа одлична слика туморске масе, те су ток ХЛЛ-а поделили у 5 стадијума, који су касније модификована према ризику који ови стадијуми носе, те су 0 и 1.стадијум ниског ризика, 2. средњег ризика и 3. и 4. високог ризика. (35). *Binet* и сарадници су касније ову поделу модификовали, поделивши ХЛЛ у 3 стадијума узимајући у обзир једноставније критеријуме. (36)

<u>Rai и сарадници</u>	<u>Binet и сарадници</u>
<ul style="list-style-type: none"> • 0 присутна је само лимфоцитоза у периферној крви • I лимфоцитоза + увећани лимфни чворови • II лимфоцитоза + увећана слазина са или без увећаних лимфних чворова • III лимфоцитоза + анемија са или без увећане слезине или лимфних чворова • IV лимфоцитоза + тромбоцитопенија са или без анемије, увећане слезине и лимфних чворова 	<ul style="list-style-type: none"> • A Мање од 3 регије лимфних чворова је увећано, без анемије и тромбоцитопеније • B 3 или више регија лимфних чворова је увећано, без анемије и тромбоцитопеније • C присуство анемије или тромбоцитопеније

Табела 1.1.3. Упоредни приказ две важеће класификације ХЛЛ-а по стадијумима

Медијана преживљавања зависи од стадијума болести и у стадијуму 0 износи преко 10 година, у стадијуму I и II преко 8 година и у стадијумима III и IV 6,5 година. (37)

Осим наведених стадијума 1998 године *Montserrat et al*, представили су још један облик хроничне лимфоцитне леукемије јединствен по томе што има најблажи ток и назвали су га „тињајући ХЛЛ“ или “*smouldering CLL*”. Преживљавање са овим обликом ХЛЛ је исто као и здраве особе одговарајућег пола и старости. Критеријуми за „тињајући ХЛЛ“ су следећи: *Binet A*, нодуларна или интерстицијална инфилтрација костне сржи, време за које се дуплира број лимфоцита мање од 12 месеци, Хемоглобин већи од 130г/л, и апсолутни број лимфоцита мањи од 30×10^9 /л. (38)

Иако обе класификације јасно одвајају пацијенте са почетном и узнапредовалом болешћу, ипак не могу прогноирити на који начин ће се болест даље развијати и колико дуго ће се задржати у истом стадијуму. Из тог разлога идентификовани су други бројни прогнозни фактори:

- старије животно доба и мушки пол су предиктори лоше прогнозе
- Тип инфилтрације костне сржи (нодуларни и интерстицијални, имају добру прогнозу, док је дифузни тип инфилтрације предиктор лоше прогнозе (39)
- Време за које се дуплира број лимфоцита у периферној крви (*LDT – Lymphocyte Doubling Time*) (ако је време краће од годину дана, болест се сматра прогресивном). (40)
- Цитогенетске абнормалности
Хромозомске аберације присутне су у 82% ХЛЛ пацијената. Најчешћа је делеција 13q са 55% учесталости и носиоци ове мутације имају добру прогнозу и дугачак интервал од постављања дијагнозе до појаве потребе за започињањем терапије. Делеција 11q је друга по заступљености са 18%, тризомија 12 са 16%, док су делеција 17p (7%) и 6q (6%) ретке. Око 10-17% пацијената имају и мутацију p-53 гена што је и најјачи негативни прогностички фактор. (41). Осим њега анти-апоптоТСки ген BCL2 је појачано експримиран у 65-70% пацијената. (42)
- Мутациони статус варијабилног региона тешког ланца имуноглобулина (немутиран – лоша прогноза, мутиран – добра прогноза) (43)
- Експресија *ZAP-70*, *CD38*, *CD49d*, БЋР на површини лимфоцита (експресија присутна – лоша прогноза, нема експресије – добра прогноза). (44, 45)
- Процент пролимфоцита у периферној крви (већи од 10%, лоша прогноза)
- Серумски ниво *sCD23* (повишен, лоша прогноза)
- Серумски ниво ЛДХ (повишен, лоша прогноза)
- Серумски ниво бета2микроглобулина (повишен, лоша прогноза)
- Серумски ниво тимидин киназе (повишен, лоша прогноза) (46)

Код већине пацијената ХЛЛ има стабилан ток, али болест може да прогредира до агресивних облика као што су пролимфоцитна леукемија, агресивни лимфоми и веома ретко у акутну леукемију. Прогресија до **пролимфоцитне леукемије** јавља се у око 10% пацијената и лоше је прогнозе. Прогресија до агресивних лимфома, или у литератури позната као **Рихтерова трансформација** јавља се у 2-6% пацијената, карактерише се наглим увећањем лимфних чворова који нису испраћени увећањем броја лимфоцита у периферној крви и хистолошким прегледом увећаног лимфоног чвора потврђује се да је реч

о неком агресивном облику лимфома, најчешће дифузном Б крупноћелијском лимфому. Лечење ових трансформација ХЛЛ-а је за сада безуспешно. (28)

1.1.11 Имунофенотипски прогнозни маркери болести

Имунофенотипски прогнозни маркери болести представљају мембранске и цитоплазматске молекуле чија је експресија повезана са неповољним током болести код пацијената и ту убрајамо *CD38*, *ZAP-70* и *CD49d*.

CD38 представља трансмембрански гликопротеин тип 2 који функционише као екто-ензимски комплекс и рецепторски молекул са сигналном функцијом у Б лимфоциту. (47). У току генезе Б лимфоцита експресија *CD38* молекула је строго регулисана и присутна је у високом нивоу у лимфоидним прекурсорима костне сржи, нисходно регулисана у зрелим Б лимфоцитима, да би се *CD38* поново експримирао у диферентованим плазмоцитима (48) Улога *CD38* молекула је врло хетерогена и донекле контрадикторна. Док са једне стране блокира лимфопоезу у костној сржи, у лимфном чвору делује антиапоптоски на Б лимфоците герминативног центра. (49, 50) Улога *CD38* молекула у патогенези и прогнози хроничне лимфоцитне леукемије још је сложенија. Претпостављало се дуго да је *CD38*, уз *ZAP-70*, маркер мутација варијабилног региона тешког ланца имуноглобулина, па самим тим и негативан прогнозни маркер (51), али су даља испитивања указала да *CD38* преноси јак пролиферативни сигнал ХЛЛ ћелији и да је одговоран како за инхибирану апоптозу, тако и за пролиферативни потенцијал ХЛЛ ћелије. Он се на површини ћелије налази у комплексу са *CD19* што додатно потенцира његову улогу, а какав ће сигнал пренети унутар ћелије зависи искључиво од средине у којој се тај лимфоцит налази. (47)

Присутна експресија *CD38* на површини ХЛЛ лимфоцита представља независни негативни прогностички маркер.

Зета (ζ) ланац придружен протеин тирозин кинази од 70кДа (*ZAP-70*), је члан *syk* фамилије киназа најпре откривен у Т лимфоцитима са улогом у иницијацији сигнала путем Т ћелијског рецептора и последичне активације Т лимфоцита. (52) . Присуство *ZAP-70* у Б лимфоцитима најпре је откривено у малигним лимфоцитима хроничне лимфоцитне леукемије, као сурогат маркер немутираних гена за тешке ланце имуноглобулина, а тек касније и на малој субпопулацији здравих Б лимфоцита. (53) Његова улога у Б лимфоцитима повезује се са његовом блиском везом са површинским

комплексом CD79b/имуноглобулин и БЋР што након везивања антигена као стимуланса БЋР, резултира појачаним сигналом унутар ћелије. (54) По везивању *IgM*, *ZAP-70* се фосфорилише, што је типично повезано са фосфорилацијом *Syk*, што даље стимулише адапторске протеине и сигналне молекуле неопходне за спровођење ефекта антигенске стимулације Б лимфоцита. Посебно треба издвојити инфлукс калцијума у ћелију што активира калцијум зависне неутралне протеазе и *NFκB* који покрећу моћан програм преживљавања Б лимфоцита.. (55) Осим овог директног утицаја *ZAP-70* позитивни ХЛЛ лимфоцити имају повећану експресију адхезионих молекула и хемокинских рецептора што резултира појачаном миграцијом у ткива где сигнали кроз хемокинске рецепторе и БЋР инхибирају апоптозу, продужавају преживљавање и потенцирају даљу пролиферацију. (56) Иако откривен као сурогат маркер за немутиране тешке ланце имуноглобулина, новија открића тачног механизма и улоге *ZAP-70* у ХЛЛ лимфоцитима, овај маркер стављају на пиједестал прогнозних маркера ХЛЛ. *ZAP-70* је независан негативни прогностички маркер клиничког тока хроничне лимфоцитне леукемије. (55)

CD49d представља површински протеински молекул из фамилије α-интегрина, прецизније α4 интегрин. Функционално, *CD49d*, који се у литератури може наћи још и под именом *VLA4* (*very late antigen alpha 4 chain*) има кључну улогу у интеракцији ХЛЛ лимфоцита са микросредином у којој се налази и то повезивањем са фибронектином, тромбоспондином и васкуларним адхезионим молекулом-1 (*VCAM-1*). (57) Ово повезивање има две важне биолошке импликације. Прво учествује у задржавању ћелија у ткиву кроз везу са екстрацелуларним матриксом, што резултује дужим преживљавањем ћелије, а са друге стране може представљати први корак у ћелијској миграцији. Други механизам је од већег значаја за лимфоците хроничне лимфоцитне леукемије. (56)

CD49d је такође и сигнални рецептор који има улогу у продуженом преживљавању Б лимфоцита кроз регулацију протеина који припадају *bcl-2* фамилији. (58) Повећана експресија *CD49d* је независни негативни прогностички маркер, нарочито код пацијената у ниском клиничком стадијуму. (59)

1.1.12 Лечење

Обзиром на веома разнолик ток болести, по постављању дијагнозе није увек обавезно и започињати активну антинеопластичну терапију. Код појединих пацијената болест треба само пратити до испуњавања критеријума за започињање терапије.

Активна болест треба бити јасно одређена и мора испунити следеће критеријуме: (60)

1. Присутан барем један од наведених симптома:

- губитак у телесној тежини више од 10% за 6 месеци
- екстреман замор (*ECOG PS 2*)
- повишена телесна температура преко 38°C више од 2 недеље без јасних знакова инфекције
- ноћно презнојавање без знакова инфекције

2. Инсуфицијенција костне сржи манифестована као појава или погоршање анемије и/или тромбоцитопеније

3. *AИНА* и/или *ITP* са лошим одговором на кортикостероидну терапију

4. Масивна (бсм или више испод лрл) или прогресивна спленомегалија

5. Лимни чворови или конгломерати већи од 10 cm у промеру, или прогресивна лимфаденопатија

6. Прогресивна лимфоцитоза са увећањем броја лимфоцита за 50% у двомесечном периоду, или претпостављено *LDT* мање од 6 месеци

Новија истраживања усмерена су ка проналажењу још већег броја критеријума заснованих на молекулским доказима активности ХЛЛ лимфоцита, који још увек нису испољили клиничке критеријуме активне болести, а представљају кандидате за брзо започињање терапије.

У избору терапије треба се осврнути и на старост пацијента, коморбидитете, као и прогнозне маркере, на првом месту цитогенетске природе.

Према важећим *ESMO* критеријума из 2011. код пацијената са „тињајућим ХЛЛ“, као и пацијената ниског стадијума ризика (*Binet A и B, Rai I, II, III*) који не испуњавају наведене критеријуме активне болести приступа се терапијској опцији „*watch and wait*“, која подразумева редовно праћење пацијента, индивидуално одређено на 3-12 месеци. (61).

Уколико је код пацијента потврђен виши клинички стадијум или активна болест одмах се приступа лечењу применом хемиотерапијских протокола. За пацијенте код којих

нема значајних коморбидитета, терапија избора је лечење пуринским аналозима и то на првом месту флударабином у комбинацији са циклофосфамидом и ритуксимабом - *FCR* (Флударабин + циклофосфамид + моноклонско анти *CD20* антитело – *Rituximab*). Комбинације које су уместо флударабина користиле кладрибин или пентостатин нису се показале као надмоћне у првој линији лечења. (61)

Током више деценија терапија хроничне лимфоцитне леукемије се заснивала на аликилирајућим лековима и њиховим комбинацијама са другим лековима, на првом месту хлорамбуцил са и без кортикостероида, а онда и циклофосфамид у комбинацији са винкристином и преднизолоном са/без доксорубицина (*COP/CHOP*). Ове терапијске опције остале су отворене за старије пацијенте са бројним коморбидитетима (61, 62)

Код пацијената са доказаним неповољним мутацијама, најпре *del(17p)* и *p53* мутација ниједна од горе наведених терапија се није показала као надмоћна, па се за ове пацијенте већ у првој терапијској линији примењује моноклонско анти *CD52* антитело (алемтузумаб), након чега се приступа трансплантацији матичне ћелије хематопоезе.

По процени одговора који је пацијент постигао на примењену терапију (Табела 1.1.4), даље терапијске опције зависиће од времена које протекне од претходне терапије. Уколико је прошло више од 12-24 месеци од монотерапије, односно 24-36 месеци од комбиноване терапије код пацијента се може поновити терапија која је дата у првој терапијској линији. Ако је пак прошло мање времена, препоручује се да пацијенти који су у првој линији лечени аликилирајућим агенсима сада приме имунохемиотерапију по протоколу *FCR*. Пацијенти који су већ лечени имунохемиотерапијом кандидати су за моноклонско анти *CD52* антитело (алемтузумаб) али са резервом и код одабраних пацијената због велике инфективне токсичности, а размотрити и бендамустин, или ритуксимаб и офатумумаб у комбинацији са високим дозама кортикостероида.

Последња истраживања на пољу терапије у ХЛЛ-у увеле су и употребу **имуномодулатроних лекова** у терапију, превасходно леналидомида, који је до сада у студијама показао ефикасност од 50-70% претходно нелечених пацијената, али и код релапса и рефракторне болести. (63, 64).

Примена **трансплантације костне сржи** углавном је индикована код млађих пацијената, али само код оних са лошом прогнозом или рефрактерном болести. (65), јер резултати нису показали надмоћ ове терапијске опције над хемиотерапијом. У лечењу ХЛЛ-а од великог значаја је свакако **потпорна терапија** у виду трансфузија, примене имуноглобулина због корекције хипогамаглобулинемије, или кортикостероида код аутоимуних феномена.

1.1.13 Процена терапијског одговора

Примењена терапија код пацијента може имати различит исход, а процењујемо га према важећим критеријумима *IWCLL* и *NCI*. Исход терапије може бити комплетна ремисија, парцијална ремисија, стабилна болест и прогресија болести.

Критеријум	<i>NCI</i>	<i>IWCLL</i>
CR (Комплетна ремисија)		
Физикални налаз (лимфни чворови, јетра, слезина)	нормалан налаз	нормалан налаз
Симптоми	без	без
Број лимфоцита (x 10 ⁹ /L)	≤4	<4
Неутрофили (x 10 ⁹ /L)	≥1.5	
Тромбоцити (x 10 ⁹ /L)	> 100	
Хемоглобин (g/dL)	>11 (нетрансфундован)	
Лимфоцити у костној сржи (%)	>30; без чворова	нормално,
PR (Парцијална ремисија)		прелаз у нижи стадијум болести
Физикални налаз (лимфни чворови, јетра, слезина)	≥50% смањења у величини	
Плус ≥ 1 од:		
Неутрофили (x 10 ⁹ /L)	≥1.5	
Тромбоцити (x 10 ⁹ /L)	>100	
Хемоглобин (g/dL)	>11 или увећање за 50%	
Трајање КР или ПР	≥2 месеца	није наведено

<i>Progressive disease</i> (Прогресивна болест)		Прелаз у виши стадијум болести
Физикални налаз (лимфни чворови, јетра, слезина)	$\geq 50\%$ увећања или појава нових	
циркулишући лимфоцити	$> 50\%$ увећање	
остало	Рихтерова трансформација	
<i>Stable disease</i> (Стабилна болест)	сва остала стања	није било промене стадијума болести

Табела 1.1.4. Упоредни приказ два важећа критеријума са процену терапијског одговора у ХЛЛ-у (28)

1.2 Аптоза

1.2.1. Дефиниција и историјат

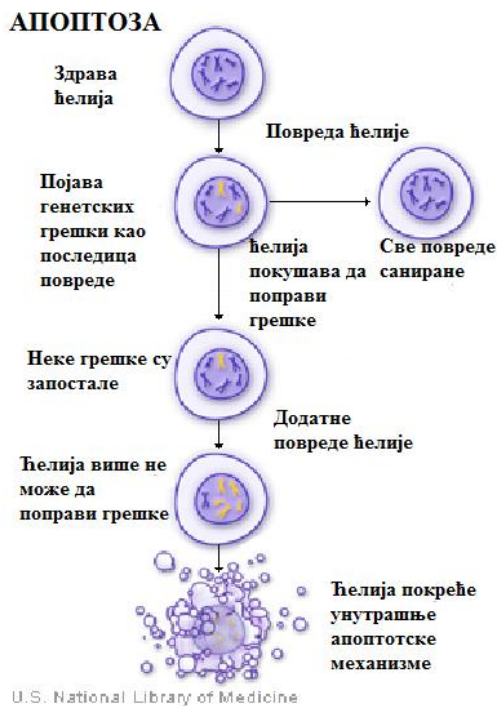
Да је изумирање ћелија организма током нормалног раста и развоја један уобичајен механизам одржања хомеостазе, откривено је пре више од 100 година. Још је немачки научник *Karl Vogts* 1842. године први описао принципе апптозе, као једног од механизма изумирања ћелија, а након њега прву потпунију дефиницију и објашњење дао је *Volter Flemming* 1885. године. Од тада, па до данашњег дана, апптоза је представљала изазов бројним научницима, како на нивоу сигнала који је проузрокују и контролишу, тако и са аспекта значаја овог феномена у бројним патолошким стањима. (66)

Оригинално термин апптоза настао је искључиво на темељима морфолошких промена у умирућој ћелији, тако да је приписиван свим процесима који су на њу и подсећали. Међутим како су се откривали бројни биохемијски механизми који учествују у умирању ћелије, сви механизми који доводе до ћелијске смрти једноставно су подељени на:

- Програмиране ћелијске смрти (процеси чији је механизам контролисан у самој ћелији)
- Акутне ћелијске смрти (које ћелија не може контролисати) (67)

Програмиране ћелијске смрти подразумевају оне облике одумирања ћелија које зависе и контролисане су генетски кодираним сигнаlima или унутрашњим биохемијским феноменима умируће ћелије – често дефинисан и као *ћелијско самоубиство*. Иако је дуго овај термин коришћен као апсолутни синоним за апптозу, данас се зна да у ову групу процеса спадају свакако и аутофагија која се дешава током нормалног ембриогеног развоја, и пироптоза – механизам ћелијске смрти зависан од активности ензима каспаза-1. (68)

Са друге стране акутне ћелијске смрти су изазване бројним деструктивним ћелијским стимулусима којима се ћелија не може одупрети, нити их било како контролисати (*ћелијско убиство*). Ови стимулуси доводе до потпуне деструкције ћелије, пуцања ћелијске мембране као и ослобађања унутрашњег ћелијског садржаја који истовремено изазива локалну запаљенску реакцију, делује хемотаксично на ћелије имунског система и изазива њихов бурни одговор. (67, 68)



Слика 1.2.1 Приказ тока апоптозе, од иницијалних генетских промена до морфолошке деструкције ћелије

Најновија дефиниција каже да је апоптоза облик програмиране ћелијске смрти повезан са интрацелуларним деловањем ензима – каспаза, проузрокујући следеће морфолошке промене: цитоплазматску и једарну кондензацију, раздвајање хроматина, формирање апоптотичних телашаца, са одржањем интактне ћелијске мембране на којој се експримирају бројни површински молекули који ћелију опредељују за супстрат фагоцитозе, без изазивања запаљенског и имунског одговора. (69.)

1.2.2 Улога апоптозе

Иако ћелијско самоубиство делује као процес чије име указује на поремећај регулације, он је ипак веома присутан и неопходан у нормалном расту, развоју и одржању хомеостазе сваког живог организма.

Апоптоза представља централни механизам у физиолошким процесима:

1. одржању организма током развоја као што је ембрионални развој, метаморфоза и ткивна атрофија услед смањења хормоналних, неуралних или механичких стимулуса
2. регулише тотални број ћелија организма

3. брани организам уклањајући непожељне и опасне ћелије као што су туморски измењене ћелије, ћелије инфициране вирусима, или поремећене имуне ћелије које почињу да препознају сопствено (68, 70)

Сваки поремећај апоптозе, као прецизно дефинисаног и строго регулисаног механизма, има веома негативан утицај на читав организам, јер покреће патогенетски механизам који резултује у појави и напредовању бројних патолошких стања:

1. Синдром стечене имунодефицијенције (СИДА), код ког долази до драстичног смањења Т помоћничких (T_H) лимфоцита. До сада спроведена истраживања указују да, поред одређеног мањег броја T_H лимфоцита који умиру услед инфекције *HIV* вирусом, знатно већи број здравих T_H лимфоцита бива преварен и стимулисан да подлегне процесу апоптозе;

2. неуродегенеративна обољења као што је *Alzheimer*-ова болест;

3. исхемичке лезије, када смањени крвни проток одређених региона мозданог или срчаног ткива током продуженог временског периода доводи до ћелијског изумирања кроз увећан број ћелија које подлежу апоптози;

4. малигне болести, код којих је као један од најважнијих патогенетских механизма у самој ћелији, поремећен процес апоптозе, тј. ћелије иако веома измењене и штетне по организам не подлежу процесу апоптозе;

5. аутоимуне болести, код којих аутореактивне имуне ћелије активирају процес апоптозе у здравим ћелијама;

6. Вирусне инфекције; (68, 69, 70)

Апоптоза у ћелији мора бити покренута неким стимулусом који долази или из саме непосредне околине ћелије, или дејством бројних паракриних, ендокриних фактора или спољашњих стимулуса.

Апоптоза се покреће :

– Из непосредног ћелијског контакта (рецепторским механизмом *CD95 (Fas)*, *TRAIL*, *TNF*)

– Одсуством фактора раста (*IL-2*, *NGF*, *TGF* и др.)

– Дејством спољашњих штетних фактора (зрачење, УВ светлост, топлота, цитотоксични лекови, бактерије, токсини, вируси)

– Појавом интраћелијских оштећујућих молекула (слободни радикали, водоник пероксид, церамиди) (68, 71, 72)

1.2.3. Механизам апоптозе

Процес апоптозе покреће се једним од два основна пута:

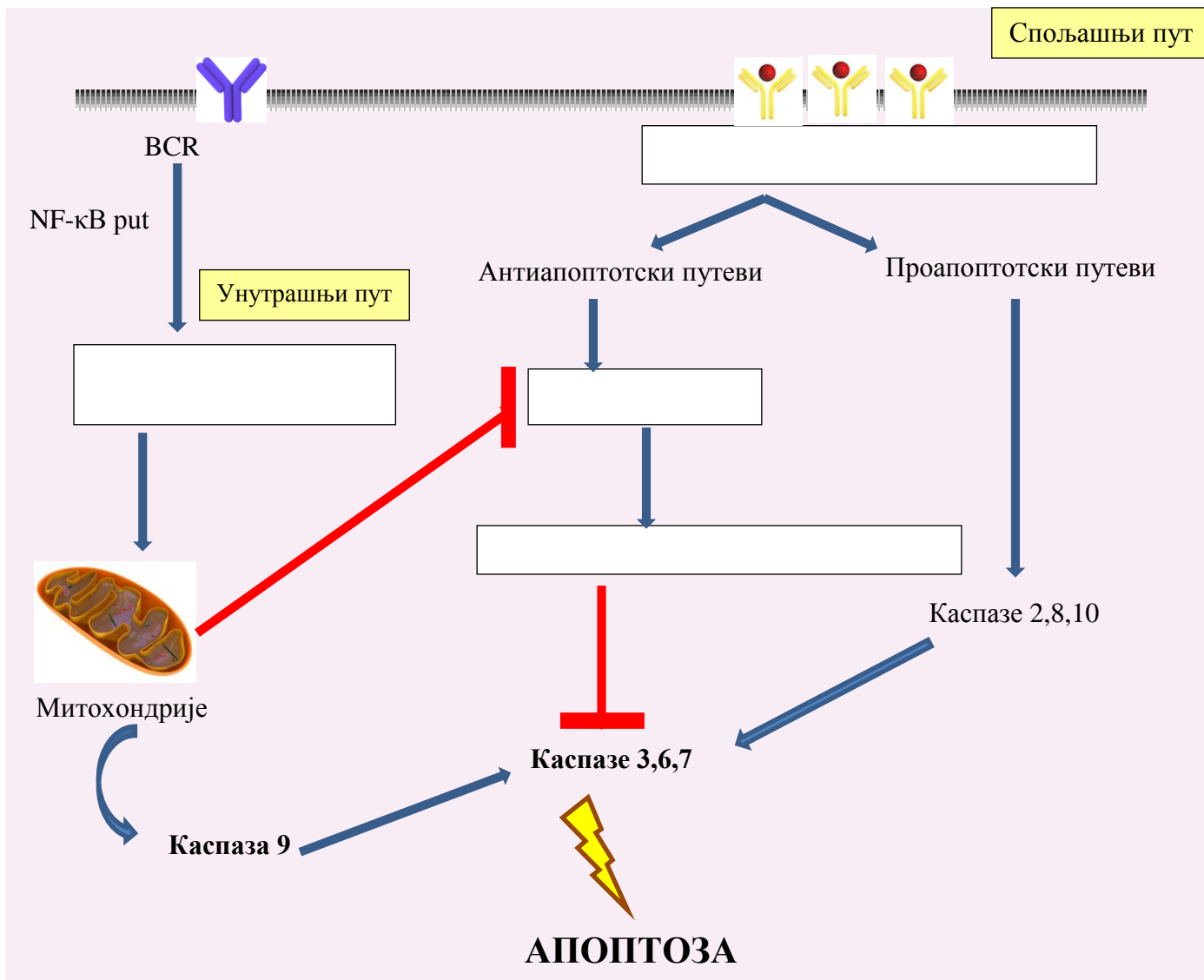
- ◆ Спољашњи (рецепторски) пут
- ◆ Унутрашњи (митохондријални) пут

Оба наведена пута иницирања и спровођења апоптозе имају заједнички циљ који представља активацију прокаспаза и гашење функције митохондрија. Каспазе, као подкласа цистеинских протеаза које цепају супстрат након аспартатских киселих остатака, играју централну улогу у процесу апоптозе. Ове протеазе су нормално присутне у свакој ћелији и синтетишу се у облику великих инактивних зимогена (прокаспаза) чији је Н-терминал прокаталитичких својстава, а Ц терминални домен, каталитичких карактеристика. Каспазе пронађене у ћелијама људског организма, могу се према својој улози поделити на :

- Иницијаторске каспазе (каспазе 2, 8, 9, 10 и 12)
- Ефекторске каспазе (каспазе 3, 6 и 7)

Иницијаторске каспазе се активирају процесом димеризације, док су ефекторске каспазе синтетисане као инактивни димери, и активирају се процесом протеолитичког цепања, најчешће деловањем већ активираних иницијаторских каспаза. Након активације, ефекторске каспазе изазивају протеолитичку деструкцију ћелије.

Наведени механизам, представља у ствари једну каспазну каскаду чији је крајњи резултат активација ефекторских каспаза, нарочито каспазе-3 која је одговорна за највећи број промена током апоптозе ћелије. (68)



Слика 1.2.2. Шематски приказ спољашњег и унутрашњег пута активације апоптозе ћелије

1.2.3.1 Спољашњи (рецепторски) пут

Спољашњи пут инициран је тзв. „лигандима смрти“ који се везују за одговарајући препознат рецептор на површини ћелије, који се експримира у стањима ћелијског оштећења и указује на спремност ћелије за самоуништење. Лиганд може бити интегрисани мембрански протеин друге, суседне ћелије (нпр. *Fas* лиганд (*CD95/Apo-1* лиганд)) или солубилни екстрацелуларни протеин (нпр. *TNFα*). Везивање лиганда иницира формирање мултипротеинског комплекса названог – комплекс који изазива смрт *DISC* (енг. *Death-inducing signaling complex*). Узимајући *Fas* рецептор као један од најчешћих сигналних молекула, везивање *Fas* лиганда изазива одговарајуће конформационе промена на самом

Fas молекулу. Ово резултује у повлачењу адапторског протеина *FADD* (енг. *Fas associated via death domain*) до *Fas*-а кроз интеракције на нивоу домена који иницирају смрт ћелија на оба протеина. Тада *FADD*, на нивоу поменутих домена, везује прокаспазу-8. Крајњи резултат активације овог рецептора је везивање прокаспазе-8 у *DISC*. Прокаспаза-8 у овом комплексу подлеже димеризацији, и активацији до иницијаторске каспазе-8. Једном активирана каспаза-8 активира иницијаторску прокаспазу-3 и *Bid*, проапоптотски протеин из фамилије протеина *Bcl-2*, који међусобно повезују спољашњи и унутрашњи пут апоптозе. (73, 74)

Осим активације прокаспазе-8, овај пут иницијације апоптозе одговоран је и за активацију још једне групе ензима – сфингомијелинидаза. Сфингомијелинидазе се осим стимулације *Fas* рецептора могу активирати такође и кроз везивање *IL-1*, *TNF* за одговарајуће рецепторе, или активацијом *CD28* на ћелијској мембрани. Сфингомијелинидазе постоје у три основне групе, киселе, алкалне и неутралне сфингомијелинидазе, а свакој од ових група основна улога је хидролиза сфингомијелина ћелијске мембране, што доводи до њене дестабилизације и консеквентне парцијализације (важан процес за формирање апоптотичних телашаца) као и генерисање церамида. (74)

1.2.3.2. Унутрашњи пут

У контрасту са спољашњим путем који спроводи специјализован сигнал ћелијске смрти, унутрашњи пут интегрише веома широк спектар екстрацелуларних и интрацелуларних стресогена. Екстрацелуларни стимулус мора бити недостатак преживљавајућих/трофичних фактора/хране, радијацију, друге хемијске агенсе и физички стрес, док интрацелуларни стресогени подразумевају оксидативни стрес, оштећење ДНК као и дезоријентацију протеина матрикса и њихово оштећење. Унутрашњи пут сигнализације је обележен комплексним преплитањем стимулуса, иницијаторских путева, а понекад и реакцију других ћелијских органела. Овај комплекс сигнала усмерен је ка митохондријама доводећи до дисфункције ове органеле, испуштање апоптогених протеина и активацији каспаза. (68)

Сви набројани екстрацелуларни и интрацелуларни стресогени фактори покрећу апоптотични сигнал путем бројних периферним механизма, резултујући заједно испрва у активацији проапоптотских протеина из **фамилије *Bcl-2*** (енг. *B cell leucaemia-2*). Ова фамилија може бити подељена у две велике групе:

1. Протеини који делују проапоптотски даље се деле у две подгрупе:
 - a) Проапоптотски протеини са већим бројем домена (*Bax*, *Bak*)
 - b) *BH-3* проапоптотски протеини (*Bid*, *Bad*, *Bim*, *Bmf*, *Noxa*, *Puma*, *Bnip3* и *Nix*)

Проапоптотски протеини са већим бројем домена *Bax* или *Bak* су неопходни за сваки сигнал апоптозе који активира унутрашњи пут. Ови протеини контролишу прилаз иницијаторским апоптотским механизмима који делују на митохондрије. Конформационе промене регулишу активност оба протеина. Као одговор на апоптотски сигнал *Bax* протеин се транслоцира у митохондрију, олигомеризује и инсертује у спољашњу мембрану митохондрија. Тада *Bax* стимулише ослобађање *citochroma C* и других апоптогених митохондријалних протеина у цитосол, у шта су још укључени и каспаза-2 и *Bax*-везујући протеини. Осим ових сигнала *p53* протеин, који је стимулисан генотоксичним стимулусима, хипоксијом и другим стрес-факторима, изазива конформациону активацију *Bax* протеина, а изазива и повећану транскрипцију и синтезу *Bax* протеина у ћелији. *Bak* протеин такође пролази кроз конформационе промене и везује се за спољашњу мембрану митохондрија, али он је инхибиран од стране *VDAC 2* (енг. *Voltage dependent anion channel 2*), протеином спољашње митохондријалне мембране који представља компоненту транзиторне пропустљиве митохондријалне поре (МПТП) али и везом са протеинима *bcl-2* фамилије из групе антиапоптотских протеина (*Bcl-2*, *bcl-b*, *bcl-w*, *bfl-1*, *mcl-1*, *Bcl-x_L*). По иницијацији апоптозе, *Bak* протеин се активиран дејством *Bid*, *Bim* и *Bad* одваја од антиапоптотских протеина који га везују. *Bak* конформационом активношћу стимулише интрамембранозну хомолигомеризацију и омогућава ослобађање апоптогених митохондријалних протеина у цитосол. (75)

BH-3 проапоптотски протеини функционишу као стражари који усмеравају апоптотске сигнале и спроводе их директно или индиректно до *Bax* или *Bak* протеина. Ова подгрупа проапоптотских протеина је најчешће специјализована да одреагује само на специфичне стимулусе. У суштини способност *BH-3* проапоптотских протеина да учествују у смрти ћелије зависи од *BH3* домена. Тако *Bid* експониран каспази-8 активираој у спољашњем путу активације, калпаину или гранзиму Б, експонира свој *BH-3* домен. Каспаза-3 такође може активирати *Bid* након почетка апоптозе и тиме осигурава наставак процеса кроз позитивну повратну спрегу. Након ове активације, *Bid* се интегрише у спољашњу митохондријалну мембрану, где се везује за *Bak* и помаже његову стимулацију. Други посттранслациони механизми који активирају *BH-3* протеине

укључују ослобађање *Bim* и *BMF* из микротубула и актина цитоскелетона, док транскрипциона индукција генске експресије је централни регулациони механизам за *Noxa*, *Puma*, *Bnip3* и *Nix/Bnip3L*. (75)

2. Протеини који делују антиапоптотски (*Bcl-2*, *bcl-b*, *bcl-w*, *bfl-1*, *mcl-1*, *Bcl-x_L*)

Протеини који делују антиапоптотски и једни су од првих протеина са доказаним дејством у апоптози, као и патогенези бројних патолошких процеса. *Bcl-2* протеин је иницијално локализован на спољашњој мембрани митохондрија, на ендоплазматском ретикулуму (ЕР) и једарном омотачу оријентисан ка цитоплазми. Иако је и *Bcl-x_L* пронађен на поменутом мембранама, значајнија количина овог протеина се ипак не налази везана за мембране. (75) Ови протеини су у директној конфронтацији *Bax* или *Bak*, при чему међусобни однос *Bcl-2* и *Bcl-x_L* према *Bax* и *Bak* детерминише да ли ће у ћелији преовладати проапоптотски или антиапоптотски сигнали. (76, 77) Физиолошка улога ових антиапоптотских протеина је од значаја одржавања хомеостазе хематопоетског система у целини. Протеин *Bcl-2* има значајну улогу у одржавању Б ћелијске популације одраслих (продужено преживљавање Б меморијских лимфоцита) (78) док је протеин *mcl-1* одговоран за преживљавање хематопоетске стем ћелије и развој зрелих Б лимфоцита. (79, 80.)

Друга фамилија протеина од великог значаја за процес апоптозе је свакако тумор супресор **протеин p53** који контролише апоптозу реагујући на факторе као што су хипоксија, оксидативни стрес и ДНК оштећење. Протеин *p53* индукује апоптозу трансактивацијом бројних проапоптотских гена укључујући *Bax*, *Puma*, *Noxa*, *Bid*, *Asc*, *Araf-1*, каспаза-6 и *Fas*. (81)

Иако су митохондрије централне органеле унутрашњег пута, ендоплазматски ретиклум (ЕР) такође значајно доприноси процесу апоптозе, чак по неким подацима и независно од митохондрија. Неки откривени стимулуси као што су церамид, арахидонска киселина, и оксидативни стрес захтевају деловање овог пута активације за постизање ћелијске смрти. Иако тачни механизми којим ЕР доводи до ћелијске смрти нису довољно истражени, централни механизам се приписује повећању интрацелуларног јона калцијума (Ca^{2+}). Верује се да је инфлукс Ca^{2+} стимулисан деловањем *Bax* или *Bak* протеина, који се осим у митохондријалној мембрани налазе и на ЕР мембрани. Њихови антагонисти, *Bcl-2* који се такође налази на ЕР мембрани смањује инфлукс Ca^{2+} . Повећана количина Ca^{2+} у

EP олакшава инфлукс Ca^{2+} у цитоплазму по пристазању апопточног стимулуса. Повећан цитоплазматски ниво Ca^{2+} активира неколико механизма.

– Митохондријални Ca^{2+} може изазвати отварање МПТП и ослобађање *cytochrome c*. Интересантан је и податак да овај механизам може бити појачан позитивном повратном спрегом у којој *cytochrome c* везује 1,4,5 инозитол трифосфат рецептор, који је одговоран за отварање Ca^{2+} канала EP, што додатно стимулише ослобађање јона из ЕФ у цитосол.

– Повећана концентрација интрацелуларног Ca^{2+} може активирати калпаин. Калпаин може активирати Бид, али и прокаспазу -12. Каспаза -12 учествује у каскади, искључиво код апоптозе активираних кроз EP пут, и делује тако што се најпре ослобађа из EP у цитоплазму, где активира прокаспазу-9, независно од формирања апоптотичних телашаца.

Овај податак управо указује да је EP пут активације апоптозе независан од митохондријалног пута, али може бити његов амплификатор. (71, 75, 82)

1.2.3.2.1 Интрамитохондријални догађаји

Митохондрија игра значајну улогу у преношењу и амплификацији смртоносних сигнала у ћелији. У унутрашњом путу активације, митохондрије учествују као место сретања иницијаторских механизма, каспаза и ефекторских машинерија смрти. Најкритичнији догађај током апоптозе представља структурно и функционално ремоделовање митохондрија као и последично ослобађање апоптогених протеина у цитоплазму. Ови протеини укључују *cytochrome C*, *Smac/DIABLO* (енг. *Second mitochondria-derived activator of caspase*), *Omi/HtrA2* (енг. *High temperature requirement protein a2*), *AIF* као и *EndoG* (ендонуклеаза G). (72)

Механизми ослобађања митохондријалних апоптогених протеина

Иако је већ добро познато да је ослобађање цитохрома ц стимулирано проапоптотским *Bcl-2* протеинима, односно инхибирано антиапоптотским протеинима поменуте фамилије, прецизан механизам којим се то дешава још увек није потпуно детерминисан. Највећи број аутора сматра да је транзиција путем повећања пропустљивости митохондријалне мембране (митохондријална пропустљива транзиција - МПТ) водећи механизам ослобађања цитохрома ц. Код здравих ћелија, унутрашња митохондријална мембрана је релативно непермеабилна, обзиром да је неопходно да

одржава одговарајући протонски градијент и осмотски градијент формиран високом концентрацијом метаболита митохондријалног матрикса. Под стресним сигнаlima МПТП се отварају до величине мање од 1,5kDa, довољно да пропусти протоне и молекуле воде. Протонски градијент и електрични потенцијал унутрашње митохондријалне мембране колабирају, што доводи до прекида оксидативне фосфорилације. Инфлукс воде из цитосола, услед смањења осмотског притиска, доводи до бубрења митохондрија и експанзије високо изувијане митохондријалне унутрашње мембране. Међутим, иако унутрашња митохондријална мембрана има могућност растезања захваљујући поменутим наборима, спољашња митохондријална мембрана има ограничену и малу моћ растезања, те на поменуте стимулусе пуца и ослобађа цитохром ц и друге апоптогене протеине у цитосол.(72)

Механизам митохондријалног ремоделовања током апоптозе

Иако пермеабилност спољашње митохондријалне мембране може објаснити на који начин цитохром ц доспева у цитосол, и даље остаје неразјашњен комплетан процес, посматран на бројним моделима апоптозе, а обзиром да се само око 15% цитохрома ц налази у интермембранозном митохондријалном простору у невезаном стању, док се остатак налази на кристама митохондрија. Ова значајнија количина цитохрома ц се у нормалним условима налази недоступна интермембранозном простору. Међутим, током апоптозе, митохондрија пролази кроз процес ремоделовања код којих се мали простор између митохондријаних кристи увећава са 19 на 57нм, а осим тога утиче и на повећану међусобну повезаност кристи. Ове промене олакшавају редистрибуцију највеће количине цитохрома ц у интермембранозни простор, а одатле након пуцања спољашње мембране и у цитоплазму. (70, 71, 75, 83)

1.2.3.1.2 Постмитохондријални догађаји

- Формирање апоптозома

Једном када се цитохром ц нашао у цитоплазми везује се за молекулу *Araf-1* (емг. *Apoptotic protease activating factor -1*) на његовом С-крају, док са нуклеотид везујућим доменом истог молекула интерагују *dATP* или *АТО*. Ови догађаји стимулишу конформационе промене *Araf-1*, хомо- олигомеризације и регрутовања и везивања прокаспазе-9. Овај комплекс назван апоптозом конформационим променама,

димеризацијом активира прокаспазу-9 до иницијаторске каспазе-9. Једном активирана каспаза -9 активира ефекторски каспазу-3 која се такође везује за формитрани апоптозом. Каспаза-3 формира позитивну повратну спрегу са каспазом-9. (83)

1.2.4 Инхибитори апоптозе

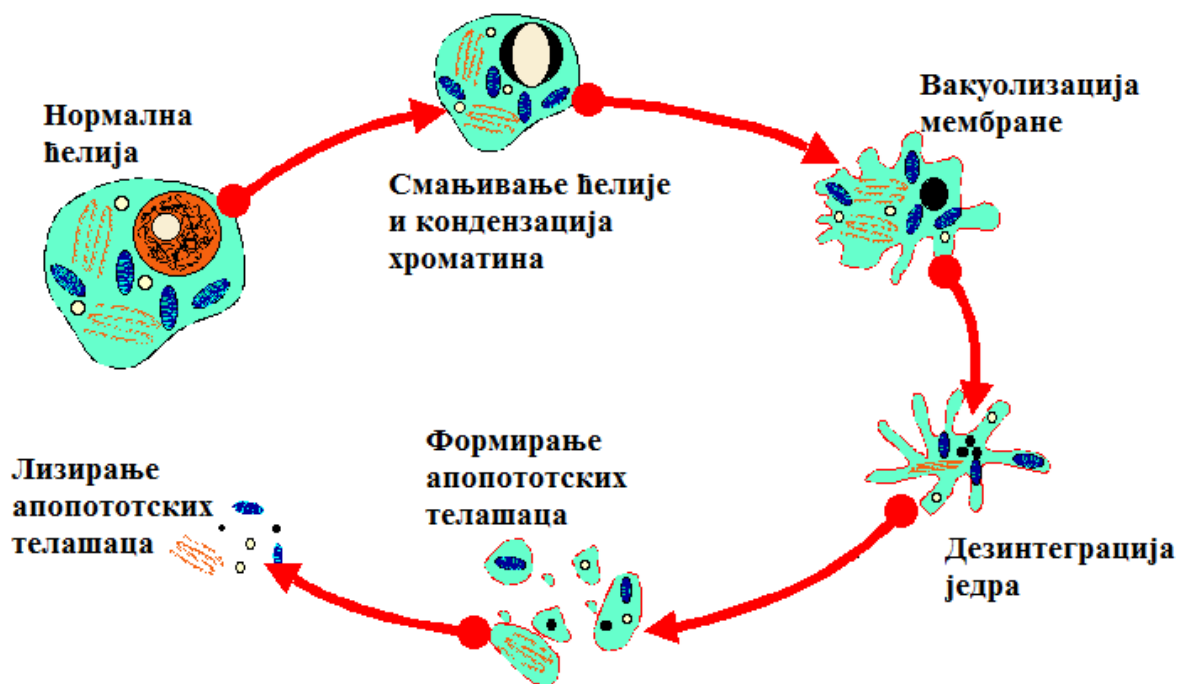
Поред набројаних каскадних механизма који имају за циљ активацију ефекторских каспаза и спровођења апоптозе ћелије, у самој ћелији присутни су и инхибиторни сигнали који не дозвољавају активацију апоптозе у ситуацијама када она није индикована, као и да сам процес измакне контроли. Неколико ендогених протеина који садрже *BIR* (енг. *Baculovirus inhibitor of apoptosis*) су антагонисти постмитохондријалних догађаја током унутрашњег пута активације. Један од таквих протеина *XIAP* (енг. *X linked inhibitor of apoptosis*) се везује за каспазе-9, 3 и 7, и тако их инхибира. Идентично делује и фактор инхибиције апоптозе (*IAP*). Њихово дејство антагонизује ослобађање *Smac/DIABLO* и *Omi/HtrA2* протеина из митохондрија. (75 ,84)

Још један митохондријални фактор који индукује ћелијску смрт када се ослободи у цитоплазму је свакако *Apoptosis Inducing Factor - AIF*, флавопротеин са оксидоредукционом активношћу. У одговору на сигнале смрти, *AIF* се ослобађа из митохондрија до једра путем који је зависан од *PARP* (*poli ADP-riboza polimeraze*). Штавише, овај фактор је неопходан у ћелијској смрти која је активирана генотоксичним и оксидативним стресом, а активира *PARP*, при чему *AIF* покреће фрагментацију једарне ДНК унутар једра активацијом ендонуклеаза. *AIF* такође покреће и ослобађање *citochroma C* из митохондрија.

Иако се *AIF* активира ослобађањем из митохондрија деловањем активираних каспаза, његово деловање је независно од унутрашњег пута активације. (71)

1.2.5 Морфолошке промене ћелије у процесу апоптозе

Објашњени механизам апоптозе доводи да бројних морфолошких промена у апоптотичној ћелији што представља основу за диференцирање апоптозе од других облика ћелијске смрти.



Слика 3. Морфолошке промене ћелије у процесу апоптозе

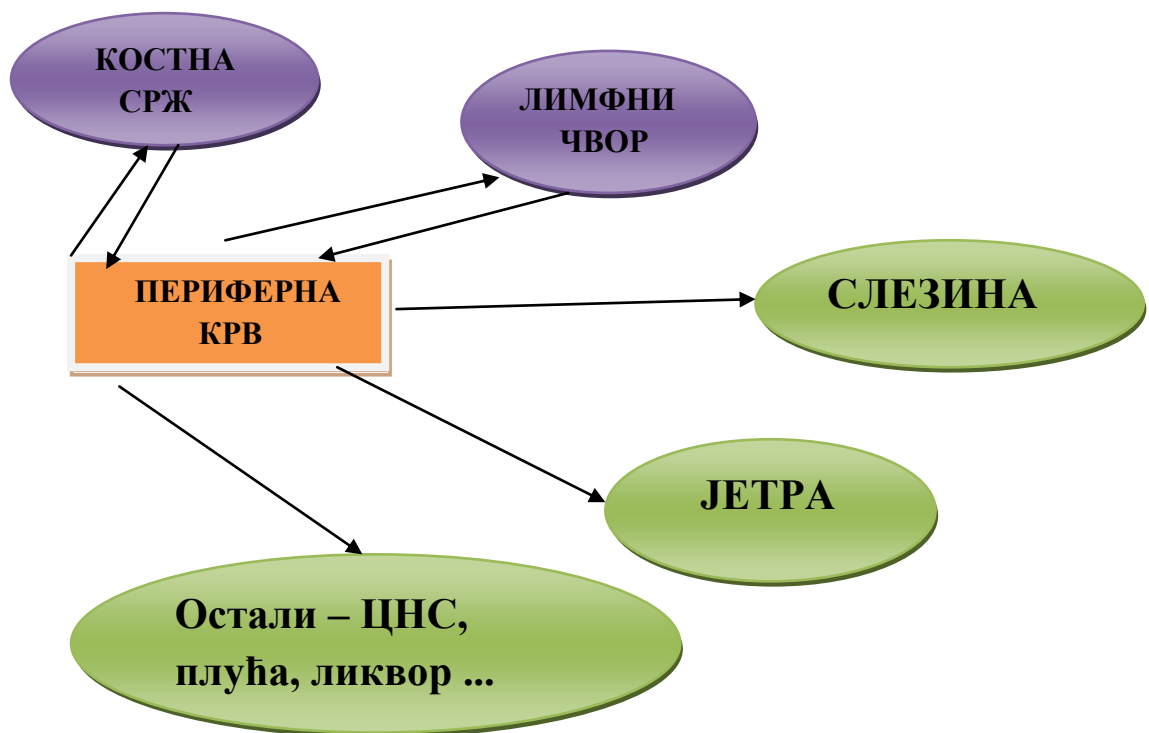
Процес почиње губитком међућелијске повезаности (нектина) али и других елемената ћелијске мембране, као што су микровили. У исто време долази до кондензовања једарног хроматина као и његове маргинације у неколико великих маса на једарној периферији. Једарце се дезинтегрише, а једарна мембрана са унутрашње стране формира бројне уврате. Након тога једро се може поделити на велики број фрагмената, чиме је процес апоптозе добио синоним у термину – аберантна митоза. Кондензација хроматина и дезинтеграција једарне мембране су укључени у оба поменута процеса и могу бити последица идентичних механизма. Док се једро кондензује, долази до смањења цитоплазматског волумена, које је повезано са губитком течности. Мембране бубре и ћелије почињу да изгледају врло фрагментисано, као састављено из великог броја мањих

телашаца – апоптотичних телашаца. Ова апоптотична телашца након тога фагоцитују суседне ћелије. (85).

У терминологији апоптозе, појављују се два појма који одређују колико је унапредовао процес апоптозе: рана апоптоза и касна апоптоза. Рана апоптоза односи се на прве промене које се могу уочити на ћелији која је започела процес апоптозе, а то је појава фосфатидилсерина на површини ћелијске мембране, док промена у величини ћелије и мембранском интегритету нема. Касна апоптоза односи се на онај стадијум апоптозе код ког је дошло до дисинтегритета ћелијске мембране и огољавања ДНК.

1.3 Солубилни фактори (цитокини) микросредина у којим циркулишу малигни лимфоцити

Иако су патогенеза хроничне лимфоцитне леукемије (ХЛЛ) као и тачни механизми који регулишу раст, развој и експанзију леукемијског клона још увек недовољно разјашњени и предмет бројних истраживања, све је више непосредних доказа о важној улози цитокинске мреже и солубилних медијатора. Леукемијски ХЛЛ лимфоцити су свакако најзаступљенија популација ћелија код пацијената оболелих од ХЛЛ али нису и једина. У крви ових пацијената циркулишу и друге не-неопластичне хематопоеетске ћелије, а у ткивима лимфоидног порекла у којима се развијају, а касније и насељавају малигни лимфоцити, бораве стромалне ћелије са којима неизбежно долазе у контакт. Самим тим хронична лимфоцитна леукемија представља комплексну болест, у којој малигни лимфоцити путем крви доспевају у бројне лимфоидне и нелимфоидне органе у којима се одвија међусобна комуникација малигног клона и стромалних и васкуларних ћелија које их насељавају. Ова комуникација остварује се кроз међусобни директни контакт, али и кроз медијаторе (цитокине и солубилне молекуле) и утиче како на експанзију и преживљавање малигног клона, на функционисање сваког компартмента који населе малигни лимфоцити, тако и на реаговање болести на примењивану терапију.



Шема 1. Приказ компартмента који најчешће насељавају малигни ХЛЛ лимфоцити

1.3.1 Интерлеукин-4 (IL-4)

Интерлеукин-4 (IL-4) представља цитокин ког у највећој мери производе помоћнички Т лимфоцити профила T_H2 (*T helper 2*) и своје дејство остварује најпре на Б лимфоците, мастоците, базофиле као и аутокринно на T_H2 лимфоците. Мастоцити и базофили под дејством IL-4 на својој површини експримирају нискоафинитетне рецепторе за IgE, а Б лимфоцити добијају стимулус за појачану производњу антитела у класи IgE, због чега је овај цитокин од значаја за алергијске малифестације. Са друге стране IL-4 је раније називан и фактор раста Б лимфоцита због своје улоге у пролиферацији и диференцијацији Б лимфоцита. (86) Ефекат на Т лимфоците огледа се у фаворизовању T_H2 имуног одговора и кроз ово дејство али и антагонизам са IFN γ постиче хуморални, а инхибише целуларни имуни одговор. Дејства IL-4 остварују се преко специфичних рецептора на површини ћелије IL4R и IL13R. (87)

У хроничној лимфоцитној леукемији бројна *in vitro* истраживања потврдила су значај IL-4 у патогенези болести и доказала да и сами малигни Б лимфоцити, поред Т лимфоцита производе овај цитокин, а да му је главна улога померање баланса пролиферације и апоптозе у корист дужег преживљавања малигног клона. (88)

1.3.2 Интерлеукин 6 (IL-6)

Интерлеукин 6 (IL-6) представља плеотропни цитокин ког продукује широка палета ћелија. Главни извори овог цитокина у организму су активирани моноцити, фибробласти и ендотелне ћелије. Осим њих макрофаги, Т лимфоцити, Б лимфоцити, гранулоцити, глатке мишићне ћелије, еозинофили, хондроцити, остеобласти, мастоцити, глијалне ћелије и кератиноцити га могу производити након одговарајуће стимулације. Физиолошки стимулуси за продукцију овог цитокина су бактеријски ендотоксини, IL-1, TNF, тромбоцитни фактор раста (*Platelet derived growth factor – PDGF*). (89)

IL-6 представља проинфламаторни цитокин који доводи до повишене телесне температуре и повећава продукцију протеина акутне фазе запаљења у јетри. На хематопоезним систем делује као фактор који помаже диференцијацију Б лимфоцита и активира Т лимфоците. У присуству IL-2 индукује диференцијацију Т лимфоцита према цитотоксичном фенотипу, али и индукује пролиферацију тимоцита и вероватно има улогу

у развоју тимичних Т лимфоцита. *IL-6* такође помаже крајњу диференцијацију Б лимфоцита до имуносекретујућих плазмоцита у садејству са *IL-4*. (90)

Његово дејство у хематолошким малигнитетима најбоље је проучено на примеру мултиплог мијелома где је *IL-6* препознат као важан фактор у патогенези и прогнози болести. (91) Друга испитивања која су укључила већи број Б ћелијских неоплазми међу којима и хроничну лимфоцитну леукемију потврдила су да је *IL-6* стимулатор пролиферације малигних лимфоцита. (92.)

1.3.3 Интерлеукин 10 (*IL-10*)

Интерлеукин 10 је антиинфламаторни цитокин са важном улогом у функционисању имуног система. Главни извор овог цитокина у физиолошким условима су моноцити, а у мањој мери и Б и Т лимфоцити, и то првенствено T_H2 лимфоцити. Своје дејство остварује на многим ћелијама и то: на макрофаге тако што смањује њихову цитокинску продукцију, на Б лимфоците тако што стимулише њихову активацију и производњу антитела и на Т лимфоците тако што инхибира T_H1 лимфоците, а стимулише T_H2 лимфоците. (93.).

Своју улогу *IL-10* остварује кроз инхибицију синтезе проинфламаторних цитокина и то *IFN γ* , *IL-2*, *IL-3*, *TNF α* и *GM-CSF*. Бројне студије наводе да *IL-10* може блокирати *NF- κ B* активност, али и да је укључен у регулацију ЈАК-СТАТ сигналног пута. Нокаут студије одвајају га као есенцијалног имунорегулатора у интестиналном тракту. (94).

У хроничној лимфоцитној леукемији *IL-10* је испитиван и као чинилац неопходан за патогенезу боелсти, али и као прогнозни маркер. Резултати ових испитивања веома су хетерогени, али већина сугерише да је повећање концентracије *IL-10* у серуму пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемији маркер негативне прогнозе. (95)

1.3.4 Интерлеукин 22 (*IL-22*)

Интерлеукин 22 (*IL-22*) (*IL-10* Т ћелијски индуцибилни фактор (*IL-TIF*)) је скорије откривен цитокин специфично индукован од стране *IL-9* код мишева. (96) *IL-22* припада *IL-10* фамилији цитокина заједно са *IL-10*, *IL-19*, *IL-20* и *IL-24*. (97). Своје дејство остварује везујући се за *IL-10R2* као и други чланови ове фамилије. *IL-22* припада групи проинфламаторних цитокина и производе га активирани дендритске ћелије и Т лимфоцити. Овај цитокин иницира урођени имуни одговор против бактеријских патогена посебно у епителним ћелијама респираторног и желудачног епитела. (98.). Његова улога је

до сада утврђена у модулацији имунског одговора код хепатитиса и панкреатитиса, тако што усходно регулише експресију протеина акутне фазе запаљења и има протективну улогу у Т ћелијском оштећењу хепатоцита. (99.)

1.3.5 Интерлеукин 12 (*IL-12*)

Интерлеукин 12 (*IL-12*) представља плеотропни цитокин чија је основна улога у интерконекцији специфичне и неспецифичне имуности. По његовој улози називан је још и „цитотоксични лимфоцитни матурациони фактор“, али и „стимулаторни фактор НК лимфоцита“. (100). Пронађено је неколико различитих форми овог цитокина, али је као активни хетеродимер издвојен облик *IL-12p70*. (101). Производе га дендритске ћелије, макрофаги и Б лимфобласти у одговору на антигенску стимулацију. *IL-12* има улогу у диференцијацији наивних Т лимфоцита у *T_H0* ћелије које се даље развијају у било *T_H1* или *T_H2* ћелије. На Т лимфоците још делује и као фактор раста и стимулише производњу *IFN γ* и *TNF α* из Т и НК лимфоцита и антагонизује *IL-4* посредовану супресију *IFN γ* . Такође *IL-12* има важну улогу у активности НК ћелија и *CD8+* цитотоксичних Т лимфоцита, што је од значаја у антитуморској имуности. Значај овог цитокина у патогенези малигних болести најбоље се може објаснити кроз чињеницу да су у току испитивања могуће употребе *IL-12* у имуноterapiји тумора. (100). У хроничној лимфоцитној леукемији *IL-12* инхибира апоптозу малигних лимфоцита чиме доприноси напредовању болести. (102)

1.3.6. Фактори туморске некрозе α и β (*TNF α и β*)

TNF α је цитокин укључен у системску инфламацију и члан је групе цитокина који стимулишу акутну фазу запаљења. У физиолошким условима углавном потиче из активираних макрофага, иако га могу продуковати и бројне друге ћелије, између осталог Т лимфоцити, НК ћелије, неутрофили, мастоцити, еозинофили и неурони. Основна улога овог цитокина је у међусобном повезивању и регулацији ћелија које учествују у имуном одговору. Као ендогени пироген *TNF α* изазива повишену телесну температуру, кахексију, инфламацију, подстиче ћелијску апоптозу и инхибира туморигенезу и виралну репликацију. Кроз стимулацију синтезе *IL-1* и *IL-6* учествује у имуном одговору у сепси. *TNF α* потпомаже убрзану пролиферацију Т лимфоцита подстакнуту различитим стимулацијама у одсуству *IL-2*, док у присуству *IL-2*, *TNF α* стимулише пролиферацију и диференцијацију Б лимфоцита. (103).

Обзиром на претходно поменућу улогу у антитуморској активности која је доказана на одређеном броју тумора, било је покушаја да се *TNF α* развије и као терапијски агенс. Његов механизам деловања је веома специфичан будући да има директан цитостатски и цитотоксични ефекат али и имуномодулаторни ефекат на бројне ефекторске ћелије имуног система укључујући неутрофиле, макрофаге и Т ћелије. (104). *TNF α* препознат је и као цитокин од значаја како у патогнези, тако и у прогнози хроничне лимфоцитне леукемије.

1.3.7. Интерферон γ (*IFN γ*)

Интерферони представљају хетерогену групу цитокина (тип 1 (α и β) и тип 2 (γ)) првобитно описаних као протеини који штите незаражену ћелију од вирусних инфекција, да би се касније показало да имају бројне целуларне ефекте – регулација пролиферације и диференцијације ћелија, као и имуномодулација. (105). У физиолошким условима производе га Т и НК лимфоцити активирани различитим антигенима и митогенима. Лимфоцити који производе *IFN γ* на својој површини експримирају *CD4* и/или *CD8*. Осим Т и НК лимфоцита, у физиолошким условима и Б лимфоцити могу синтетисати *IFN γ* . Синтеза овог цитокина индукована је између осталог и *IL-2*, фактором раста фибробласта (*Fibroblast growth factor – FGF*) и ендотелним фактором раста (*Endotelium growth factor – EGF*). Ефекат *IFN γ* огледа се у антивирусној и антипаразитској активности, али и у инхибицији пролиферације и нормалних и трансформисаних ћелија. *IFN γ* је модулатор раста и функционалне диференцијације Т лимфоцита, тако што доприноси бољем одговору на митогене и факторе раста. На Б лимфоците делује тако што инхибира интерлеукином 4 индукован раст Б лимфоцита. Антагонизује и друге ефекте *IL-4*, као што је секреција антитела. (106). У хроничној лимфоцитној леукемији *IFN γ* је препознат као фактор који учествује у инхибицији апоптозе и тиме продужава живот малигном лимфоциту и доприноси прогресији болести. (107)

1.3.8. Васкуларни ендотелни фактор раста (*VEGF*)

Васкуларни ендотелни фактор раста (*VEGF*) је мултифункционални протеин који по везивању за специфичне рецепторе утиче на повећану васкуларну пермеабилност и ћелијску пролиферацију, миграцију и преживљавање, све чиниоце потребне за

ангиогенезу.(108) *VEGF*, познат и као васкуларни пермеабилizacionи фактор, првенствено је откривен као митоген специфичан за ендотелне ћелије. Производе га бројне ћелије, на првом месту макрофаги, тромбоцити, кератиноцити, мезенхималне ћелије бубрега, али и бројне туморске ћелије. Његови ефекти нису ограничени на васкуларни систем. *VEGF* има важну улогу у бројним физиолошким процесима као што су формирање костију, хематопоеза, зарашћивање рана и развој васкуларног система. У хематопоезу се укључује рано, на нивоу матичне ћелије хематопоезе и има улогу како у њеној пролиферацији тако и у миграцији. (109).

Значај *VEGF* препознат је у бројним хематолошким малигнитетима, па и хроничној лимфоцитној леукемији, као антиапоптоски фактор. (110)

1.3.9. Фактор раста фибробласта (*b-FGF /FGF-2*)

Фактор раста фибробласта представља фамилију од око 20 структурно повезаних протеина који свој сигнал успостављају преко трансмембранских рецептора високог афинитета, а као ефекат имају пролиферацију и диференцијацију ендотелних ћелија и фибробласта. (111). Овај ефекат у здравом организму или туморској експанзији подразумева ангиогенезу и неоангиогенезу, због чега је овом цитокину приписан ефекат брже прогресије солидних тумора и хематолошких малигнитета. (112)

FGF-2 представља прототип целе фамилије *FGF* цитокина, некада називан и базичним фактором раста фибробласта (*b-FGF*). Налази се у свим ткивима мезодермалног и неуроектодермалног порекла. У физиолошким условима производе га у највећој мери ендотелне ћелије, мада је интрацелуларно његово присуство доказано у многим ћелијама. Сматра се да се у њима *FGF-2* складишти не би ли се ослободио под дејством специфичних стимулуса, као што су повреде ткива, запаљенски процеси и туморски раст. Његова улога потврђена је за раст и развој бројних ћелијских група, поготово ендотелних ћелија и хематопоезних ћелија, али и као потенцијални регулатор туморског раста солидних тумора и хематолошких малигнитета. (113.)

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Свеобухватни циљеви предложене студије су да се утврди да ли постоји разлика у експресији маркера важних за прогнозу болести (*ZAP-70*, *CD38*, *CD49d*, *bcl-2* и *mcl-1*) у зависности од тога из које микросредине потичу малигни лимфоцити ХЛЛ-а, као и да се одреди постојање евентуалне разлике у цитокинском профилу (*IL4*, *IL10*, *IL6*, *IL12*, *IL 22*, *TNF α* , *TNF β* , *IFN γ* , *VEGF*, *FGF*) и спонтаној апоптози неопластичних лимфоцита различитих микросредина (периферна крв и костна срж). Стога, циљеви студије су:

1. Одредити ниво експресије прогностичких маркера *ZAP-70*, *CD38*, *CD49d*, *bcl-2* и *mcl-1* на малигним лимфоцитима хроничне лимфоцитне леукемије у два најчешће захваћена одељка - периферној крви и костној сржи, као и њихову корелацију са другим прогностичким маркерима.
2. Одредити проценат спонтане апоптозе малигну лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије у периферној крви и костној сржи.
3. Одредити цитокински профил микросредина одељака из којих потичу малигни лимфоцити хроничне лимфоцитне леукемије (плазма, супернатант костне сржи).

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 Испитивана популација

Истраживање представља клиничко-експерименталну студију која је обављена у периоду од септембра 2011.године до фебруара 2014.године у Клиници за хематологију КЦ Крагујевац и на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

У студију је укључено укупно 30 болесника оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије којима је дијагноза постављена на основу клиничких, лабораторијских и имунофенотипских карактеристика, који у последњих 6 месеци нису примали никакву антинеопластичну терапију. Групу је сачињавало 22 мушкарца и 8 жена просечне старости 66,9 година (опсег од 53 до 87 година). Сви оболели подељени су у клиничке стадијуме по важећим критеријума *Binet*, на групу пацијената нижег стадијума болести - *Binet A* (12 пацијента, 8 мушкараца и 4 жене, просечне старости 67,3 године) и пацијената виших стадијума болести - *Binet B и C* (18 пацијената, 14 мушкараца и 4 жене, просечне старости 66,5 година). Контролну групу сачињавало је 30 здравих испитаника сличне полне и старосне структуре (18 мушкараца и 12 жена, просечне старости 59,1 године (опсег од 33 до 77 година) који не болују од болести или стања који би могли да утичу на вредност испитиваних параметара.

У истраживање нису укључени испитаници који имају позитивне параметре биохуморалног запаљенског синдрома (Ц реактивни протеин, фибриноген), као и испитаници који болују од болести или стања који би могли да утичу на вредност испитиваних параметара (метаболички поремећаји, неуролошке болести, реуматолошке болести и др.) или су у акутној фази кардиоваскуларних или пулмолошких болести.

3.2 Општи протокол истраживања

Пацијентима у експерименталној и контролној групи узорци периферне крви узимани су венепункцијом у вакутајнер са цитратом у количини од 5мл, вакутајнер са *EDTA* у количини од 10мл и вакутајнер без антикоагуланса у количини од 10мл. Из узорака крви са цитратом одређивана је комплетна крвна слика са леукоцитарном формулом. Из серума узорка крви из вакутајнера без антикоагуланса свим испитаницима (контролна група, група оболелих од ХЛЛ-а) одређивани су биохемијски параметри и то уреа, креатинин, глукоза, Ц реактивни протеин, лактат дехидрогеназа (ЛДХ). Узорак крви коме је додат *EDTA* као антикоагуланс коришћен је за неколико параметара и то:

- за одређивање експресије површинских прогнозних маркера *CD38*, *CD49d*, као и броја *CD3+* ћелија узето је укупно 300 μ l.
- преостала количина узорка је центрифугирана у трајању од 10минута на 2000об/мин. Након тога одвојена је плазма и еликвирана у запреминама од 1мл у криовајлице након чега је одмах замрзнута на -70°C . Из овог узорка је након одмрзавања у једном акту одређивана концентрација цитокина.
- издвојен „бели тепих“ подељен је на два дела. Први део је након одвајања моноклеара коришћен за одређивање процента апоптоичних ћелија, а други је након припреме раствора ћелија у аутологом серуму и *DMSO*, замрзаван на -70°C . Ове замрзнуте ћелије су накнадно у једном акту одмрзнуте и у њима је одређивана експресија интрацелуларних прогнозних маркера (*mcl-1*, *bcl-2*, *ZAP-70*).

Испитаницима који болују од ХЛЛ-а узиман је и узорак костне сржи у хепаринизован шприц са 1мл хепарина и 4мл аспирата костне сржи, у локалној анестезији, по принципима асепсе и антисепсе. Из целокупног узорка костне сржи узето је укупно 200 μ l за одређивање експресије површинских прогнозних маркера *CD38* и *CD49d*. Преостала количина узорка костне сржи је центрифугирана 10 минута на 2000обртаја/мин. Издвојен супернатант је еликвиран у запреминама од 1мл у криовајлице након чега је одмах замрзнут на -70°C . Из одмрзнутих узорака супернатаната костне сржи, у једном акту, заједно са узорцима плазме пацијената и здравих испитаника одређиване су концентрације цитокина. Преостали „бели тепих“ из узорка костне сржи подељен је на два дела. Из једног дела издвојени су моноклери из којих је одређиван проценат апоптоичних ћелија, а други део леукоцита припремљен је са аутологом серумом и *DMSO*, и одмах замрзнут на -70°C . Ове ћелије су накнадно одмрзване у једном акту ради одређивања експресија интрацелуларних прогнозних маркера (*mcl-1*, *bcl-2*, *ZAP-70*).

Присуство лимфаденопатије и увећане слезине забележени су стандардним физикалним прегледом пацијента и потврђени ултразвучним налазом и додатним радиолошким прегледима (компјутеризована томографија и/или магнетна резонанца грудног коша и абдомена).

Резултат имунохистохемијске анализе биоптата костне сржи који је код пацијента рађен у склопу протокола за постављање дијагнозе хроничне лимфоцитне леукемије, дао је податке о типу инфилтрације костне сржи малигним лимфоцитима.

3.3 Криопрезервација леукоцита, плазме и супернатанта костне сржи

Добијени узорци периферне крви и костне сржи су центрифугирани (2000 обртаја/мин, у трајању од 10мин, на собној температури). Добијени бели тепих леукоцита пипетиран је пипетом од 1мл, и пренет у епрувету од 4мл где је додат аутологи серум до 3,6мл и инкубиран 15мин у леденом купатилу. У охлађене леукоците додато је 400μл *DMSO*-а тако да се финално добије 4мл суспензије леукоцита у 10% *DMSO*-у. Након инкубације у леденом купатилу од 15мин суспензија је разливена у криовајлице и одмах пренета на -70°C .

Изнад белог тепиха леукоцита издвојила се и плазма из узорака периферне крви, односно супернатант костне сржи из узорка костне сржи оболелих пацијената. Серум и супернатант пипетирани су и пренети у криовајлице у количини од 1мл по узорку и одмах замрзнути на -70°C .

3.4 Одмрзавање леукоцита

Криовајлице директно са -70°C пренете су у водено купатило згрејано на $+42^{\circ}\text{C}$ док се потпуно не растопе па су преливане у епрувете напуњене са 8мл ПБС-а загрејаног на $+42^{\circ}\text{C}$ и након тога центрифугиране на 3000обртаја 15минута. По одливању супернатанта, поступак је поновљен са ПБС-ом на собној температури још два пута. Коначно, леукоцити су растворени у ПБС-у до концентрације 1×10^6 ћелија/мл.

Узорци плазме и супернатанта костен сржи одмрзавани су спонтано на собној температури.

3.5 Издвајање мононуклеарних ћелија

Мононуклеарни леукоцити издвојени су из венске крви методом по *Boyum*-у. Узимано је 5мл крви у вакутајнере са *Na citratom* и центрифугирано на 3000 обртаја 10 минута. Након центрифугирања бели тели пребаћени су пипетом од 500µл у епрувету у којој је сипано 2мл *LymphoPrep*-а. Епрувета је након тога центрифугирана 22минута на 2500обртаја до издвајања прстена мононуклеара, који су након тога пребаћени у другу епрувету и опрани 3 пута, уз додавање 4мл ПБС-а по прању, центрифугирањем на 3000обртаја 5 мин. Опрани мононуклеари ресуспендовани су у хладном ПБС-у до концентрације 1×10^6 ћелија/мл.

3.6 Детекција имунофенотипских маркера болести и маркера апоптозе

Имунофенотипски маркери одређивани су методом проточне цитометрије на узорцима периферне крви и костне сржи пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије, користећи комбинације маркера као што је приказано у табели 3.1.

	флуорохром				
Бр.епрувете	<i>fitc</i>	<i>pe</i>	<i>ecd</i>	<i>pc5</i>	<i>pc7</i>
1. површинска контрола	<i>IgG1</i>	<i>IgG1</i>			<i>IgG1</i>
2.	<i>CD19</i>	<i>CD38</i>	<i>CD3</i>		<i>CD45</i>
3.	<i>CD19</i>	<i>CD49d</i>			<i>CD45</i>
4. интрацелул. контрола	<i>IgG1</i> <i>intracell</i>	<i>IgG1</i> <i>intracell</i>			<i>IgG1</i>
5.	<i>Bcl-2</i>	<i>CD19</i>			<i>CD45</i>
6.	<i>CD19</i>	<i>mcl-1</i>			<i>CD45</i>
7.	<i>CD19</i>	<i>ZAP-70</i>			<i>CD45</i>

Табела 3.1. Приказ комбинација антитела по епруветама коришћеним за одређивање имунофенотипских маркера и маркера апоптозе

3.6.1. Детекција експресије површинских маркера

Овом методом одређивана је експресија молекула који се експримирају на површини ћелијске мембране и то анти *CD38* Ат обележено *pe* (*Beckman Coulter A07779*) и анти *CD49d* Ат обележено *pe* (*Anti-human Integrin $\alpha4/CD49d$ -Phycoerythrin, FAB1354P*), *CD3* Ат обележено *ecd* (*Beckman Coulter IM2705U*) уз антитела неопходна за детерминисање ХЛЛ лимфоцита (*CD45* обележено *pc7* (*Beckman Coulter IM3548U*), *CD19* обележено *fitc* (*Beckman Coulter A07768*), *CD19* обележено *pe* (*Beckman Coulter A07769*)) *IgG1* обележено *fitc* (*Beckman Coulter IM0639U*) , *IgG1* обележено *pe* (*Beckman Coulter IM06700*), *IgG1* обележено *pc7* (*Beckman Coulter 737662*), *IgG1* обележено *ecd* (*Beckman Coulter 6604548*) (Епрувета 2 и 3).

У епрувету сипано је по 10 μ л антитела, након тога додато 100 μ л пуне крви и инкубирано на собној температури 15мин. Након тога је поступком лизе еритроцита на апарату *TQ Prep Beckman Coulter* стандардним протоколом узорак припреман за читање на проточном цитометру. Процент позитивних ћелија одређиван је на популацији лимфоцита на *FS/SS* дијаграму и то као проценат ћелија које истовремено експримирају испитивани маркер и *CD19* на својој површини коришћењем *CXP Cytometer* софтвера на 30.000 лимфоцита.

Присуство више од 30% ћелија које експримирају оба маркера (*CD19+/CD38+*, *CD19+/CD49d+*) сматран је позитивним резултатом.

3.6.2 Детекција интрацелуларних маркера

3.6.2.1 Детекција *bcl-2* и *ZAP-70*

Ова два маркера детектована су методом директног интрацелуларног бојења користећи реагенсе *Anti bcl-2* Ат обележено *pe* (*Invitrogen MHBCL04*), као и *Anti ZAP-70* Ат обележено *pe* (*Beckman Coulter 731901*). За пермеабилizацију и фиксацију ћелијске мембране коришћен је *IntraPrep Beckman Coulter 2389* реагенс. (епрувета 3 и 5)

*припремљен радни раствор *anti bcl-2* Ат према препоруци произвођача је 1:10 за 100 000 ћелија.

У епрувету сипано је по 10μл антитела за површинско бојење (*CD19* и *CD45*) па додато 50 μл суспензије одмрзнутих леукоцита и инкубирано 15мин у мраку на собној температури. По завршеној инкубацији у исту епрувету додато је 100 μл фиксатора - реагенса 1 (5,5% раствор формалдехида), јако вортексовано па инкубирано на собној температури 15мин. Након инкубације у епрувету додато је 400 μл ПБС-а и центрифугирано на 3000 обртаја 5мин. Након тога одливен је супернатант и без мешања додато 100 μл пермеабилizатора - реагенса 2 (0,1% *NaNO3* у ПБС-у). Инкубирано је на собној температури 5мин и након тога лагано промућкано. У ову смесу додато је 20 μл интрацелуларног антитела обележеног флуорохромом, вортексовано и инкубирано на собној температури у мраку 15мин. По завршеној инкубацији додато је 400 μл ПБС-а и центрифугирано на 3000обртаја 5мин. Одливен је супернатант, ћелије ресуспендоване у 500 μл ПБС-а и анализиране на проточном цитометру. Процент позитивних ћелија одређиван је на популацији лимфоцита на *FS/SS* дијаграму и то као проценат ћелија које истовремено експримирају испитивани маркер и *CD19* на својој површини коришћењем *CXP Cytometer* софтвера на 10.000-20.000 лимфоцита.

Присуство више од 20% ћелија које експримирају оба маркера (*CD19+/ZAP-70+*) сматран је позитивним резултатом.

За експресију *bcl-2*, ниском експресијом сматрана је експресија која по свом интензитету одговара експресији немалигних лимфоцита у узорцима (Т лимфоцити пацијента), а високом она која је за 30% виша од ове вредности. Резултат је приказан у процентима ћелија које експримирају *bcl-2* у вишем нивоу од немалигних лимфоцита у узорцима периферне крви и костне сржи пацијената.

3.6.2.2 Детекција *mcl-1*

Овај маркер детектован је методом индиректног интрацелуларног бојења коришћењем следећих реагенаса: *Anti mcl-1 At 8C6D4B1 (Abcam ab31948)* и *Goat anti mouse IgG* секундарно Ат обележено *pe (Abcam ab97041)*, као и реагенса *IntraPrep (Beckman Coulter 2389)*

*радни раствор *mcl-1* Ат 1:20 за 500 000 ћелија

*радни раствор секундарног Ат је 1:25

У епрувету сипано је по 10μл антитела за површинско бојење (*CD19* и *CD45*) па додато 50 μл суспензије одмрзнутих леукоцита и инкубирано 15мин у мраку на собној температури. По завршеној инкубацији у исту епрувету додато је 100 μл фиксатора - реагенса 1 (5,5% раствор формалдехида), који је јако вортексован па инкубиран на собној температури 15мин. Након инкубације у епрувету додато је 4мл ПБС-а и центрифугирано на 3000 обртаја 5мин. Након тога одливен је супернатант и без мешања додато 100 μл пермеабилizатора - реагенса 2 (0,1% *NaN₃* у ПБС-у). Раствор је инкубиран на собној температури 5мин и након тога лагано промућкан и у њега је додато 50 μл 0,2М раствора глицина, 20 μл козјег серума (Б11-035, *РАА Laboratories*) и 30 μл ПБС-а, ради блокирања неспецифичног везивања. Овако припремљен раствор инкубиран је на собној температури 20мин. Након инкубације ћелије су испране додавањем 4мл ПБС-а и центрифугирањем на 3000 обртаја 5мин и поступак је поновљен 2 пута. Након завршеног прања одливен је супернатант и у то додато 20 μл примарног антитела, све заједно је вортексовано и инкубирано на собној температури у мраку 30мин. По завршеној инкубацији додато је 4мл ПБС-а и центрифугирано на 3000обртаја 5мин. Одливен је супернатант, па додато 10 μл секундарног Ат и инкубирано 30мин на собној температури у мраку. Након завршене инкубације додато је 4мл ПБС-а и центрифугирано на 3000 обртаја 5 мин. Одливен је супернатант, ћелије су ресуспендоване у 500 μл ПБС-а и анализиране на проточном цитометру. Процент позитивних ћелија одређиван је на популацији лимфоцита на *FS/SS* дијаграму и то као проценат ћелија које истовремено експримирају испитивани маркер и *CD19* на својој површини коришћењем *CXP Cytometer* софтвера на 10.000-20.000 лимфоцита.

За експресију *mcl-1* ниском експресијом сматрана је експресија која по свом интензитету одговара експресији немалигних лимфоцита у узорцима (Т лимфоцити пацијента), а високом она која је за 30% виша од ове вредности. Резултат је приказан у процентима ћелија које експримирају *mcl-1* у вишем нивоу од немалигних лимфоцита у узорцима периферне крви и костне сржи пацијената.

3.7 Апоптоза лимфоцита

Апоптотичне ћелије су детектоване помоћу оригиналног *Annexin V-FITC/7-AAD kit* (*Beckman Coulter IM3614*). У раној фази апоптозе, интегритет ћелијске мембране није нарушен, али ћелија губи своју фосфолипидну симетрију. Фосфатидилсерин, негативно наелектрисан фосфолипид који се налази унутар ћелијске мембране излази на површину

ћелије. *Annexin V*, који представља протеин који везује калцијум и фосфолипиде, везује се преферирано за фосфатидилсерине. У касној апоптози као и некрози губи се интергритет ћелијске мембране и ДНК остаје огољена и доступна бројним вијабилним бојама. У нашем експреименту користили смо 7AAD (7 аминоктиномицин Д) који се везује директно за целуларну ДНК.

Из пуне крви и костне сржи изоловани су мононуклеари као што је претходно описано и према препоруци произвођача ћелије су ресуспендоване у ледено хладном везујућем пуферу до финалне концентрације од 1×10^6 ћелија/мл. Након тога, у 100 μ л радног раствора додато је 10 μ л *Annexin V* обележен фитц и 20 μ л 7-AAD и инкубирано у мраку 15мин. Након инкубације садржај је ресуспендован у 400 μ л везујућег раствора и анализиран на проточном цитометру до 20000 догађаја, на популацији лимфоцита која је одређена на FS/SS дијаграму. Сматра се да су *Annexin V* (-); 7-AAD (-) ћелије вијабилне, *Annexin V* (+); 7-AAD (-) ћелије у раној фази апоптозе, *Annexin V* (+); 7-AAD (+) ћелије се налазе у касној фази апоптозе и *Annexin V* (-); 7-AAD (+) ћелије су некротичне. Процент ране и касне апоптозе, као и некрозе одређиван је коришћењем *CXP Cytometer* софтвера.

3.8 Одређивање цитокина

Цитокини су одређивани методом микрочестица обележених моноклонским антителима специфичним за везивање растворених молекула цитокина. (*Microbeads technique*). Концентрација цитокина одређивана је у узорцима плазме пацијента оболелих од ХЛЛ и здравих испитаника, као и из супернатанта костне сржи пацијената. Као што је претходно објашњено, наведени узорци чувани на -70°C , а онда одмрзавани и у једном акту учињена је анализа свих цитокина.

У овом поступку коришћени су следећи реагенси: *Human VEGF-A Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS80277FF), *Human TNF- β Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS8202FF), *Human TNF- α Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS8223FF), *Human IL-4 Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS8225FF), *Human FGF-2 Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS82074FF), *Human IL-6 Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS8213FF), *Human IL-22 Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS82047FF), *Human IL-10 Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS8215FF), *Human IFN- γ Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS8228FF), *Human IL-12p70 Flowcitomix Simplex Kit* (*e-bioscience*, BMS8238FF), *Human Basic Kit Flowcitomix* (*e-bioscience*, BMS8420FF).

Према препоруци произвођача претходно су припремљени раствори есеј пуфера, комбинације биотин коњугата за различите цитокине и мешавина микрочестица специфичне за различите цитокине, као и стандардни раствори цитокина потребни за стандардне криве. У претходно обележене епрувете сипано је најпре 25μл различитих разблажења стандарда (за сваки цитокин према препоруци произвођача), и по 25 μл плазме/супернатанта костне сржи. У сваку епрувету након тога додато је 25 μл мешавине микрочестица и по 50 μл мешавине биотин коњугата. Све је инкубирано у мраку 2 сата на собној температури. У сваку епрувету додато је након тога по 1мл есеј пуфера и честице су опране два пута на 1600 обртаја 5минута уз пажљиво пипетирање супернатанта и остављање око 100 μл садржаја. Након прања у сваку епрувету додато је по 50 μл Стрептавидина обележеног *pe* и инкубирано 1сат на собној температури у мраку. У сваку епрувету додато је по 1мл есеј пуфера и опрано два пута на 1600 обртаја 5минута уз пажљиво пипетирање супернатанта и остављање око 100 μл садржаја. На крају додато је 500 μл есеј пуфера и анализирано на проточном цитометру.

Концентрације цитокина одређиване су помоћу софтвера *FlowCitomix Pro 3,0*. Средња концентрација цитокина приказана је у *pg/ml*. Минималне детектабилне концентрације за коришћен кит су: *IL-12p70* – 1,6 *pg/ml*, *IFN-γ* – 1,5 *pg/ml*, *IL-10* – 1,9 *pg/ml*, *IL-22* – 43,3 *pg/ml*, *IL-6* – 1,2 *pg/ml*, *FGF-2* - 11 *pg/ml*, *IL-4* – 20,8 *pg/ml*, *VEGF-A* – 7,2 *pg/ml*, *TNF-α* – 3,2 *pg/ml*, *TNF-β* – 2,4 *pg/ml*.

3.9 Статистичка анализа

Статистичка обрада података извршена је помоћу комерцијалног програмског пакета *SPSS* (верзија 20.0, *IBM SPSSStatistics*). Нормалност расподеле података евалуирана је Комогоров Смирнов-им тестом, а затим ретестирана Хи-квадрат тестом. Коришћене вредности за статистичке тестове су медијане, у резултатима приказане са квартилним интервалом у загради.

За непараметријске податке коришћени су *Mann-Withney-U* тест, *Wilcoxon W* тест и *Fisherov* тест. За корелацију посматраних параметара рачунат је *Spearmanov* коефицијент корелације. Статистички значајним сматране су *p* вредности <0,05. Параметри који су показали статистички значајну разлику тестирани су кроз програм за *ROC* криве и бинарну логистичку регресију. Коришћене вредности за статистичке тестове су медијане, у резултатима приказане са квартилним интервалом у загради.

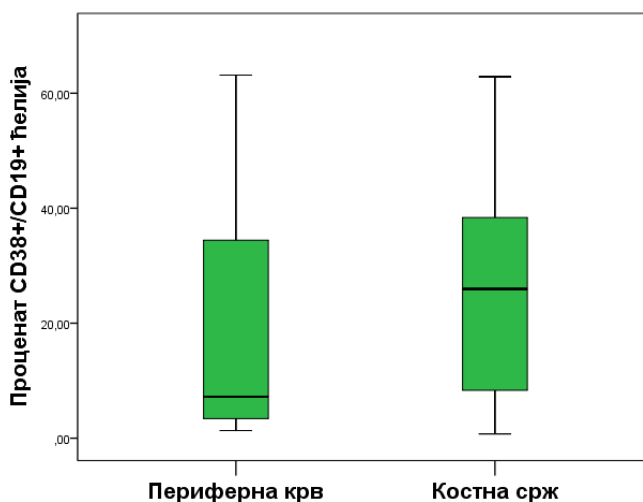
4 РЕЗУЛТАТИ

4.1 Експресија прогнозних маркера

Експресија прогнозних маркера одређивана је из две микросредине оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије и то периферне крви и костне сржи.

4.1.1 Одређивање експресије *CD38* на лимфоцитима изолованим из периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ

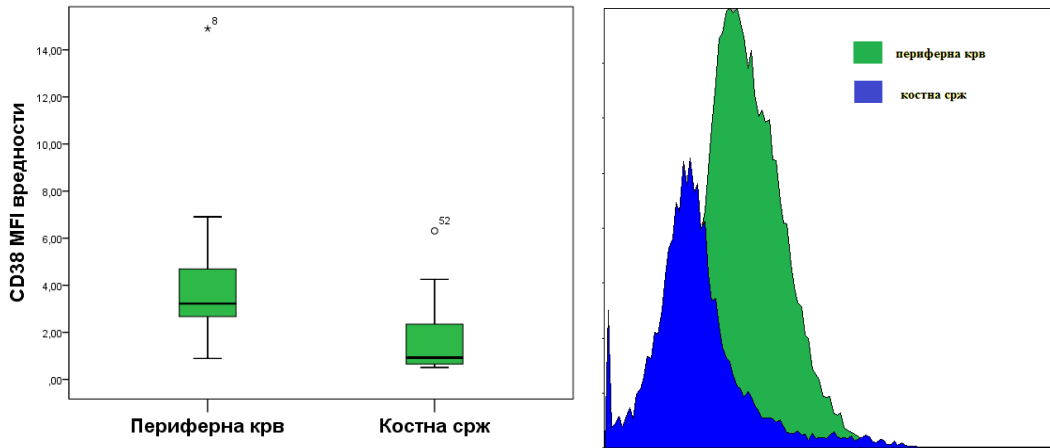
Истраживање је показало да већи проценат ХЛЛ ћелија узоркованих из костне сржи на својој површини експримира *CD38* (25,96% (8,34-38,39)) у односу на ХЛЛ лимфоците узорковане из периферне крви пацијената (7,20% (3,41-34,43)), што је статистички значајно ($p=0,034$). (слика 4.1.1).



Слика 4.1.1 Упоредна анализа процента *CD38+/CD19+* ХЛЛ лимфоцита узоркованих из костне сржи и периферне крви пацијената

Процент ХЛЛ лимфоцита узоркованих из костне сржи пацијената који експримирају *CD38* на својој површини већи је него код лимфоцита узоркованих из периферне крви. ($p=0,034$).

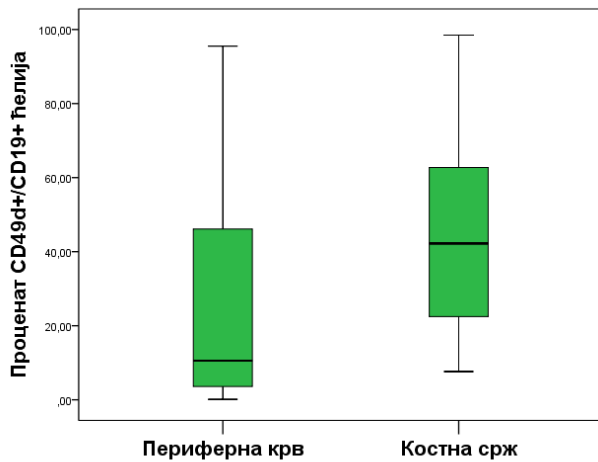
Поред податка о проценту ХЛЛ ћелија које на својој површини експримирају *CD38*, посматрали смо и јачину експресије овог маркера на позитивним ХЛЛ лимфоцитима преко средњег интензитета флуоресценце (*MFI – Median Fluorescence Intensity*). Ови резултати показали су да је експресија *CD38* у периферној крви интензивнија у односу на костну срж (3,22 (2,67-4,69) према 0,9255 (0,66-2,35)) што се статистичком анализом показало као статистички значајно ($p<0,0005$). (Слика 4.1.2). Резултати корелације за *CD38* показали су да су резултати експресије овог маркера на лимфоцитима периферне крви и костне сржи у позитивној корелацији ($r = 0.547$, $p = 0.003$), док *MFI* вредности нису у корелацији ($p=0,905$).



Слика 4.1.2. Упоредна анализа *MFI* вредности за *CD38* на ХЛЛ лимфоцитима периферне крви и костне сржи (лево) Overlay хистограмски приказ експресије *CD38* у периферној крви и костној сржи Јачина експресије *CD38*, изражена кроз средњу јачину флуоресценце (*MFI*) на површини ХЛЛ лимфоцита већа је на лимфоциту изолованом из периферне крви него костне сржи пацијента што се још сликовитије може видети на преклапајућем хистограму (слика лево). (($p < 0,0005$).

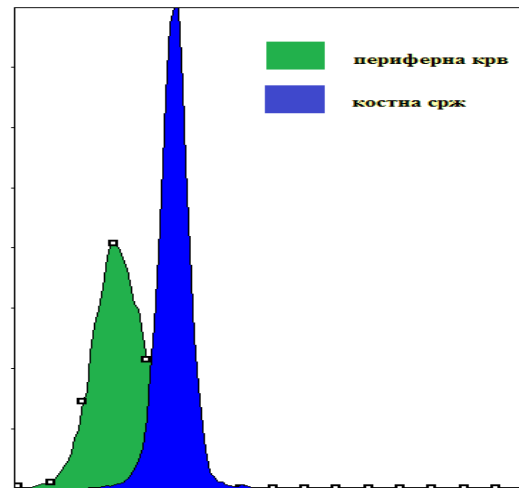
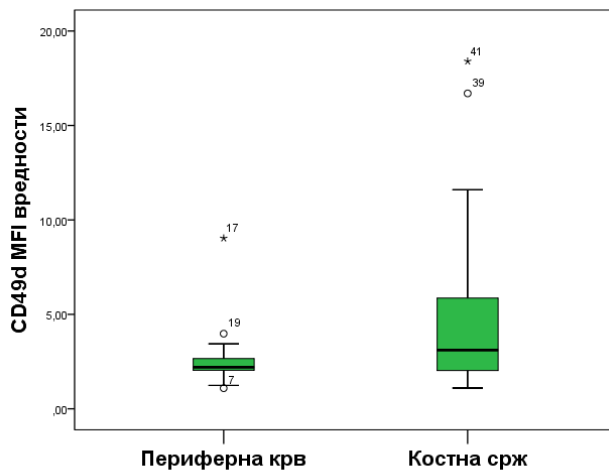
4.1.2. Одређивање експресије *CD49d* на лимфоцитима изолованим из периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ

Што се тиче експресије *CD49d*, као и код *CD38* већи проценат ХЛЛ лимфоцита у костној сржи показује експресију овог прогнозног маркера (периферна крв 10,57% (3,59-46,13), костна срж 42,21% (22,47-62,74)) што је статистички значајна разлика ($p = 0,002$). (слика 4.1.3) Интензитет флуоресценце се такође разликује, само је код овог маркера интензитет флуоресценце јачи на ХЛЛ лимфоцитима изолованих из костне сржи (периферна крв 2,20 (2,04-2,66), костна срж 3,11 (2,03-5,87)), што је доказано статистички значајно ($p = 0,032$) (слика 4.1.4). Налази експресије *CD49d* на површини ХЛЛ лимфоцита и њихове *MFI* вредности у периферној крви и костној сржи нису у међусобној корелацији. ($p = 0,765$ и $p = 0,810$).



Слика 4.1.3 Упоредна анализа процента *CD19+/CD49d+* ХЛЛ лимфоцита у периферној крви и костној сржи пацијената

Експресија *CD49d* на површини ХЛЛ лимфоцита костне сржи већа је него на ХЛЛ лимфоциту изолованом из периферне крви пацијената. ($p=0,002$)



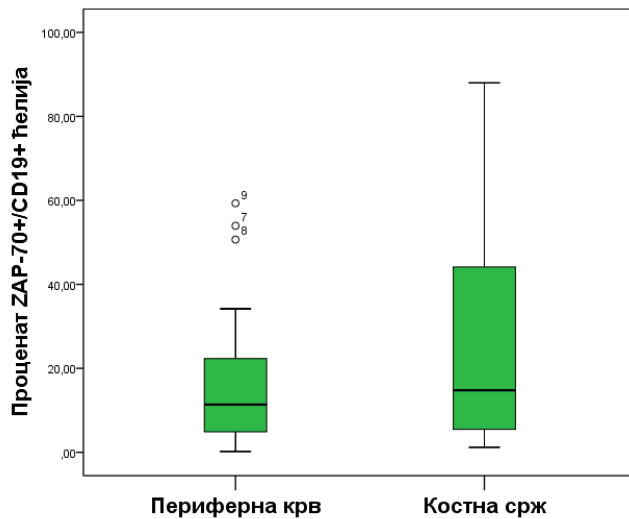
Слика 4.1.4. Упоредна анализа *MFI* вредности за *CD49d* на ХЛЛ лимфоцитима периферне крви и костне сржи (лево) *Overlay* хистограмски приказ експресије *CD49d* у периферној крви и костној сржи

Јачина експресија *CD49d*, изражена кроз средњу јачину флуоресценце (*MFI*) на површини ХЛЛ лимфоцита већа је на лимфоциту изолованом из костне сржи него периферне крви пацијента што се још сликовитије може видети на преклапајућем хистограму, где су пикови експресије јасно раздвојени по интензитету флуоресценце (слика лево). ($p=0,032$)

4.1.3. Одређивање експресије *ZAP-70* у лимфоцитима изолованим из периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ

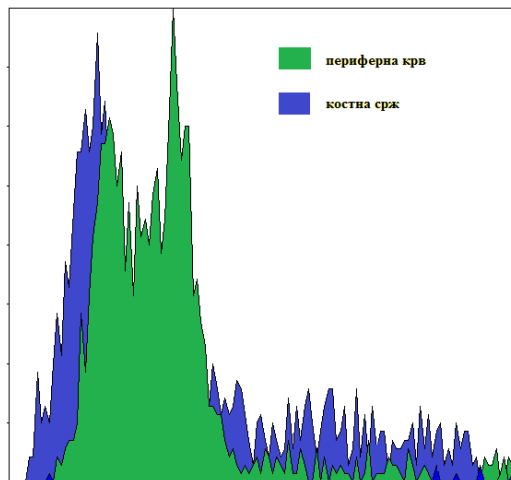
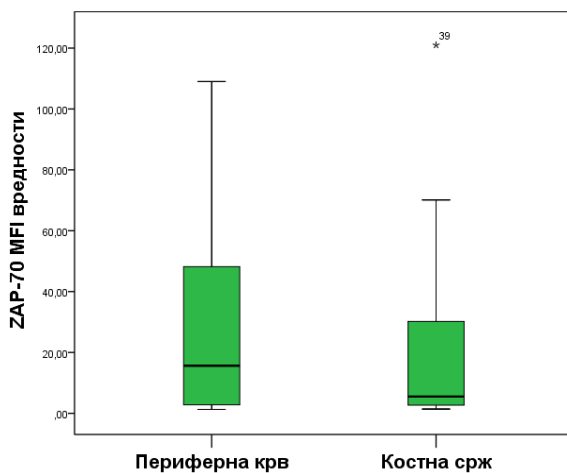
Резултати експресије *ZAP-70* маркера у ХЛЛ лимфоцитима нису показали статистички значајне разлике у зависности од микросредине из које потичу ХЛЛ лимфоцити. Експресија овог маркера у лимфоцитима периферне крви била је 11,38% (4,89-22,32), док је у костној сржи 14,75% (5,46-44,15), $p=0,335$. Ипак средњи интензитет флуоресценце за овај испитиван маркер виши је у периферној крви него у костној сржи

(15,65 (2,79-48,20) према 5,35 (2,69-30,2)) али без статистички значајне разлике ($p = 0,301$). (Слика 4.1.5 и 4.1.6) Резултати експресије *ZAP-70* у периферној крви и костној сржи нису у корелацији, док су њихови интензитети флуоресценце у позитивној корелацији ($r = 0.768$, $p < 0.0005$).



Слика 4.1.5 Упоредна анализа процента *CD19+/ZAP-70+* ХЛЛ лимфоцита у периферној крви и костној сржи пацијената

У ХЛЛ лимфоцитима узоркованим из периферне крви и костне сржи није било разлике у експресији проценту лимфоцита који експримирају *ZAP-70*.



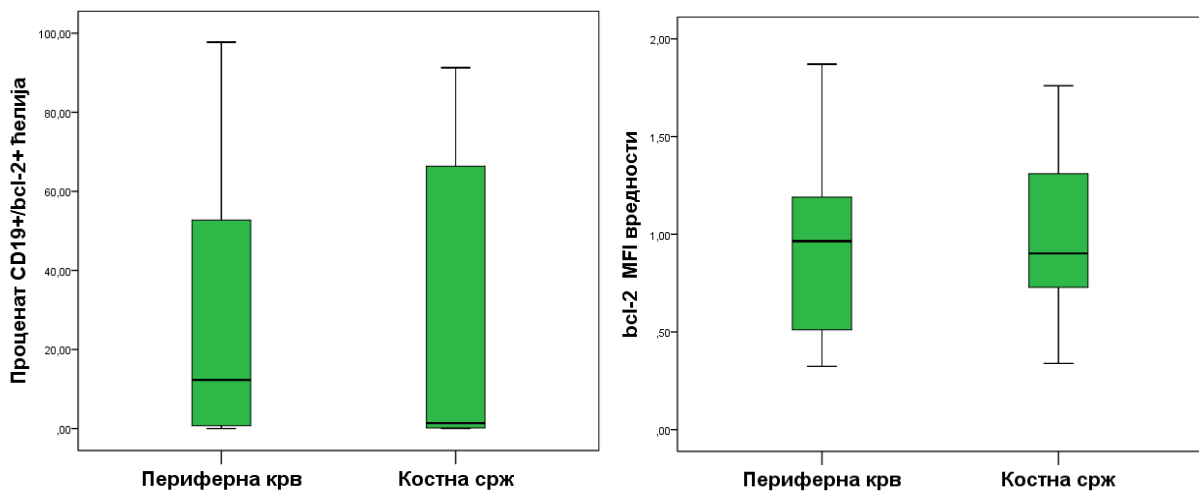
Слика 4.1.6. Упоредна анализа MFI вредности за *ZAP-70* на ХЛЛ лимфоцитима периферне крви и костне сржи (лево) *Overlay* хистограмски приказ експресије *ZAP-70* у периферној крви и костној сржи Јачина експресија *ZAP-70*, изражена кроз средњу јачину флуоресценце (*MFI*) на површини ХЛЛ лимфоцита већа је на лимфоциту изолованом из периферне крви него костне сржи пацијената, али без статистички потврђене разлике. На *Overlay* хистограму може се видети да се пикови експресије у периферној крви и костној сржи углавном преклапају. (слика лево).

4.1.4. Одређивање експресије *bcl-2* и *mcl-1* у лимфоцитима изолованим из периферне крви и костне сржи оболелих од ХЛЛ

Још два интрацелуларна маркера *bcl-2* и *mcl-1*, који представљају првенствено маркере апоптозе, али и прогнозне маркере, испитивани су у погледу разлика у експресији у зависности од микросредине из које су узорковани ХЛЛ лимфоцити (периферна крв и костна срж).

Резултати експресије *bcl-2* и *mcl-1* представљени су као ниска и висока експресија одређени према позитивној контроли немалигних лимфоцита изражених у процентима ћелија које експримирају *bcl-2* односно *mcl-1* на вишем нивоу од немалигних лимфоцита.

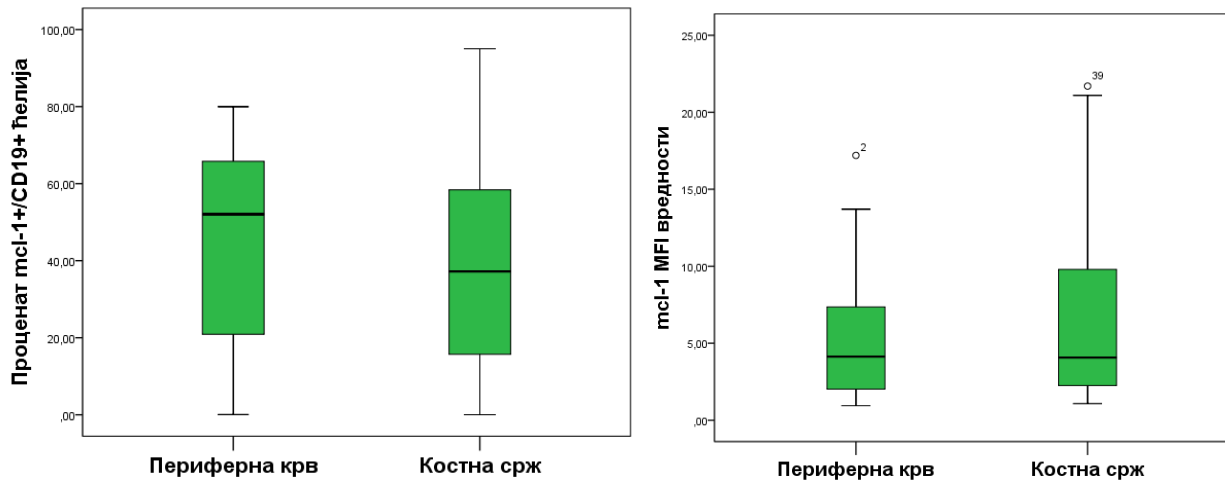
Експресија *bcl-2* на ХЛЛ лимфоцитима периферне крви виша је него на лимфоцитима костне сржи (12,29% (0,71-52,74) према 1,36% (0,15-66,365)) али без статистички значајне разлике ($p=0,323$). *MFI* вредности за *bcl-2* су врло блиске и износе у периферној крви 0,965 (0,51-1,19), а у костној сржи 0,90 (0,73-1,31), без статистички значајне разлике ($p=0,508$). (Слика 4.1.7) Резултати експресије периферне крви и костне сржи нису у корелацији, док су *MFI* вредности у позитивној корелацији ($r = 0.390$, $p = 0.040$).



Слика 4.1.7 Упоредна анализа *CD19+/bcl-2+* ћелија у периферној крви и костној сржи (лево) и *MFI* вредности експресије (десно)

У ћелијама ХЛЛ-а изолованих из периферне крви и костне сржи пацијената посматрали смо и ниво експресије *bcl-2* израженог као проценат ћелија које експримирају *bcl-2* на вишем нивоу од немалигних лимфоцита. Показали смо да нема значајне разлике у нивоу експресије *bcl-2* у зависности од средине из које су изловани лимфоцити, као ни у интензитету флуоресценце.

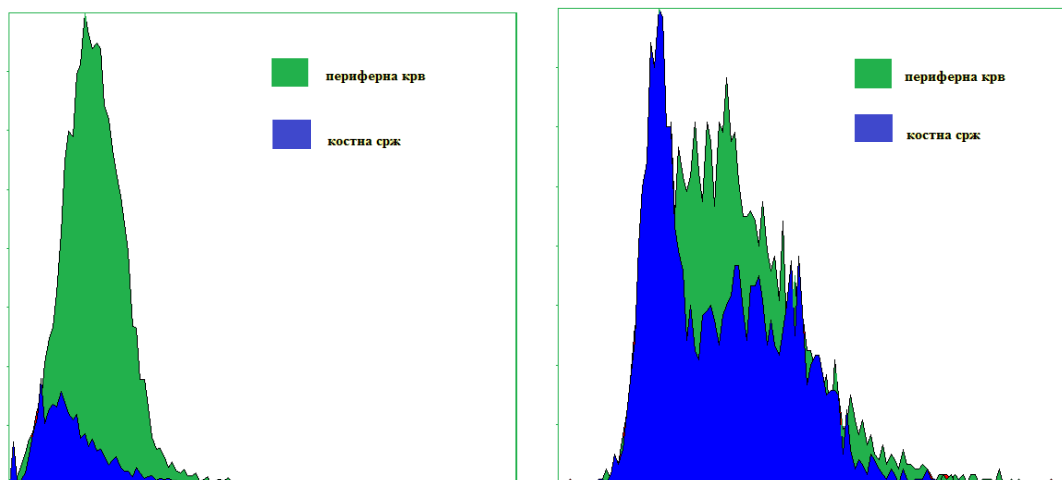
Резултати експресије *mcl-1* у ХЛЛ лимфоцитима периферне крви виша је него у ХЛЛ лимфоцитима костне сржи (52,06% (20,9-65,81) према 37,22% (15,7-58,39)) али без статистички значајне разлике ($p=0,565$). *MFI* вредности експресије у периферној крви и костној сржи не показују разлике (4,13 (2,02-7,36) према 4,07 (2,25-9,79)), $p=0,13$. (Слика 4.1.8) Резултати експресије *mcl-1* у периферној крви и костној сржи су у позитивној корелацији ($r = 0.448$, $p = 0.017$), као и њихове *MFI* вредности ($r = 0.916$, $p < 0.0005$).



Слика 4.1.8 Упоредна анализа *CD19+/mcl-1+* ћелија у периферној крви и костној сржи (лево) и *MFI* вредности експресије (десно)

У ћелијама ХЛЛ-а изолованих из периферне крви и костне сржи пацијената посматрали смо и ниво експресије *mcl-1* израженог као проценат ћелија које експримирају *mcl-1* на вишем нивоу од немалигних лимфоцита. Показали смо да нема значајне разлике у нивоу експресије бцл-2 у зависности од средине из које су изловани лимфоцити, као ни у интензитету флуоресценце.

Оба антиапоптотска протеина експримирани су у вишем проценту у ћелијама периферне крви него у ћелијама костне сржи, али без разлике у средњем интензитету флуоресценце. (слика 4.1.9)



Слика 4.1.9. Overlay хистограмски приказ експресије *bcl-2* (лево) и *mcl-1* (десно) у периферној крви и костној сржи

Хистограмски приказ експресије *bcl-2* и *mcl-1* указује да су интензитети флуоресценце ХЛЛ лимфоцита изолованих из периферне крви и костне сржи за оба параметра веома блиске, готово нераздвојиве вредности, док висина пика (број ћелија које експримирају овај маркер) указује да у периферној крви има већи број ћелија са високом експресијом.

4.1.5 Експресија прогнозних маркера у периферној крви и костној сржи као параметар разликовања пацијената у различитим стадијумима болести

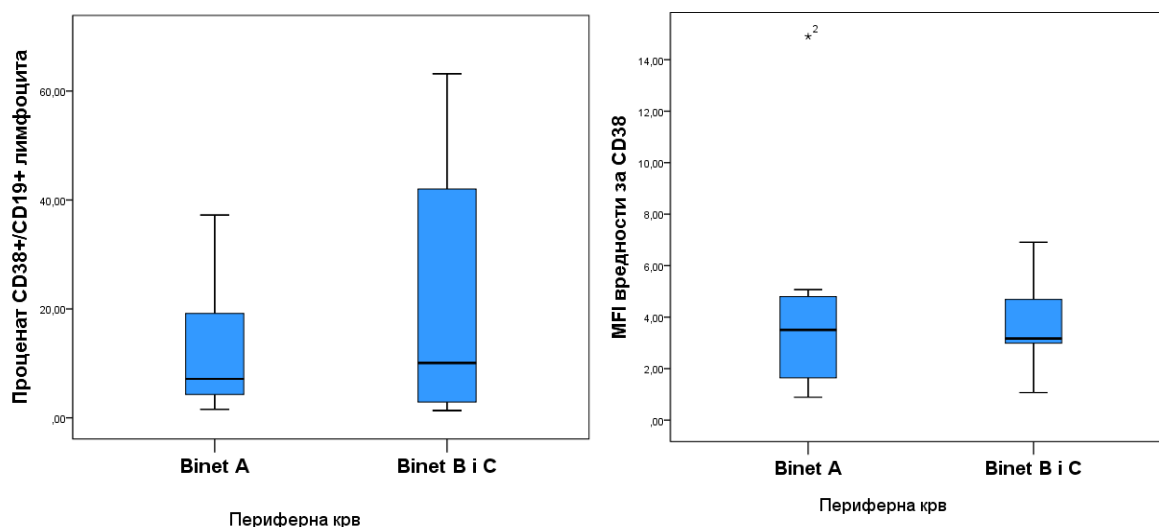
Виђене разлике у експресији и интензитету експресије прогнозних маркера у периферној крви и костној сржи додатно су посматране приликом поделе пацијента на групу пацијената вишег и нижег стадијума болести, према до сада важећем критеријуму *Binet*-а на:

1. Групу пацијента клиничког стадијума А (*Binet A*)
2. Групу пацијената вишег клиничког стадијума Б и Ц (*Binet B* и *C*)

Приликом поделе пацијената по клиничком стадијуму, експресија *CD38* у периферној крви није показала статистички значајне разлике ни у броју ХЛЛ лимфоцита који експримирају *CD38* (*Binet A* стадијум 7,15% (4,30-19,18), *Binet B* и *C* стадијум 10,08% (2,699-42,01)) $p=0,710$, али ни у вредности интензитета експресије (*MFI* вредности *Binet A* стадијум 3,50 (1,64-4,79), *Binet B* и *C* стадијум 3,17 (2,99-4,69)), $p=0,793$. (Слика 4.1.10)

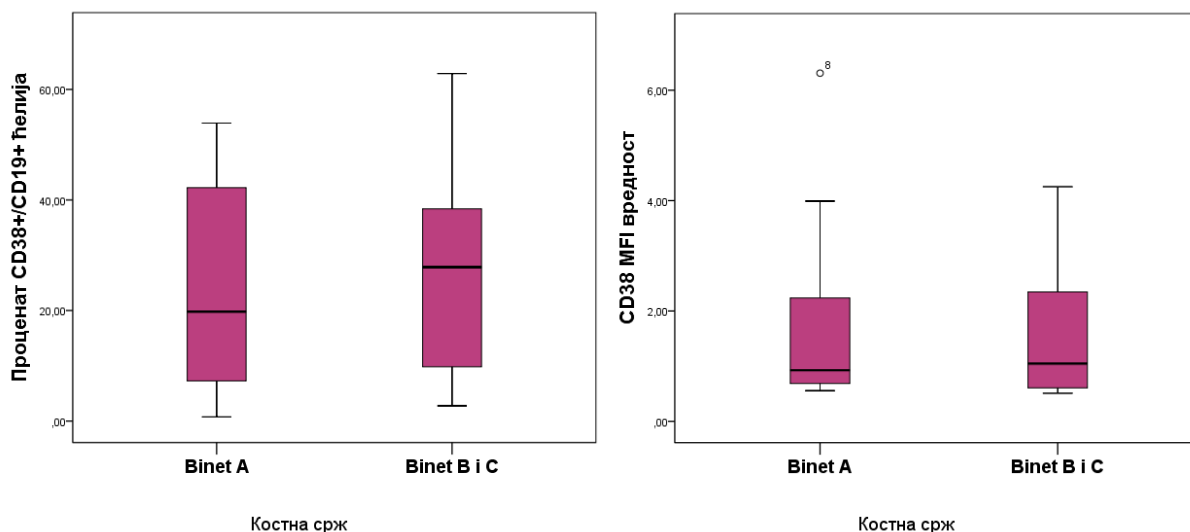
Експресија *CD38* у костној сржи са друге стране показује вишу експресију код пацијента у вишем клиничком стадијуму (*Binet A* стадијум 19,8% (7,27-42,21) и *Binet B* и *C* стадијум 27,86% (9,83-38,38)), али без статистички значајне разлике, $p=0,458$. *MFI*

вредности у *Binet B* и *C* и *Binet A* клиничком стадијуму се не разликују (0,93 (0,69-2,23) и 1,05 (0,61+2,34), $p=0,518$. (Слика 4.1.11)



Слика 4.1.10 Упоредна анализа експресије *CD38* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у периферној крви пацијената различитог клиничког стадијума

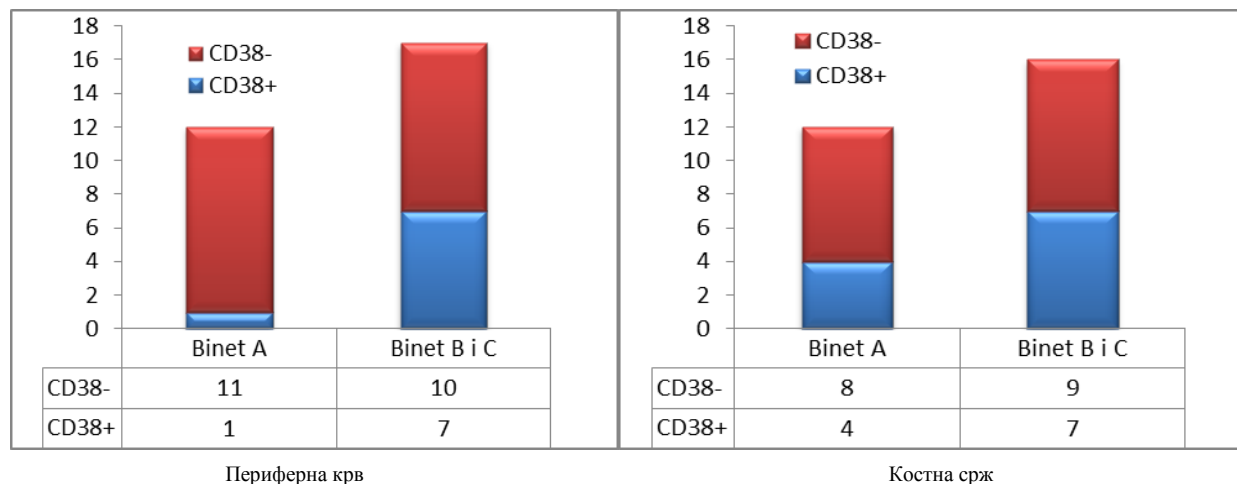
Експресија *CD38* на површини ХЛЛ лимфоцита корелирана је са стадијумом болести. Налаз у периферној крви указује да код пацијената у вишем стадијуму болести (*Binet B* и *C*) мало већи проценат ХЛЛ лимфоцита експримира *CD38*, али је интензитет експресије идентичан као у нижем клиничком стадијуму (*Binet A*).



Слика 4.1.11 Упоредна анализа експресије *CD38* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у костној сржи пацијената нижег и вишег клиничког стадијума

Код ХЛЛ лимфоцита изолованих из костне сржи експресија *CD38* на ХЛЛ лимфоциту је виша у *Binet B* и *C* стадијуму болести, а није било разлике у интензитету флуоресценце, као ни у периферној крви.

Међутим када узмемо у обзир резултат који произилази из утврђених критеријума, да је резултат позитиван уколико више од 30% ХЛЛ лимфоцита експримира *CD38* (слика 4.1.12), резултат *CD38* у периферној крви прави значајну разлику између различитих стадијума болести, уз већу позитивност код пацијента клиничког стадијума *Binet B и C* (**p= 0,06**) док је у костној сржи та разлика незнатна, p=0,239.

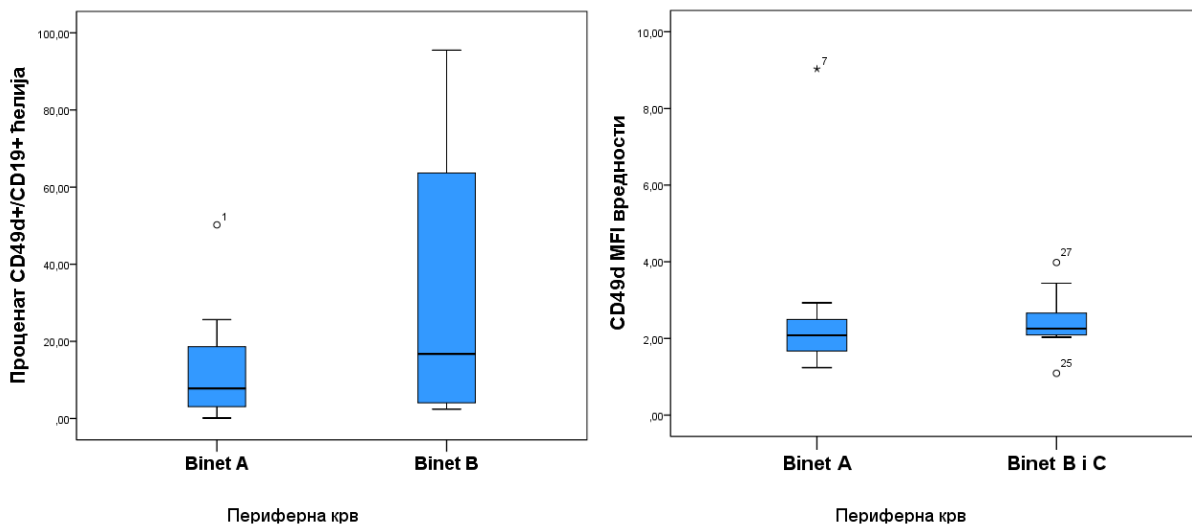


Слика 4.1.12 Упоредна анализа експресије *CD38* на лимфоцитима ХЛЛ прерачуната као позитиван и негативан резултат према важећем критеријуму (периферна крв лево и костна срж десно)

По примени *cut off* вредности од 30% за одређивања резултата експресије *CD38* као позитивне и негативне, наши резултати су указали да је позитиван резултат у периферној крви добар маркер за разликовање стадијума болести, блиско статистичкој значајности (p= 0,06), док у костној сржи нема разлике између различитих стадијума болести.

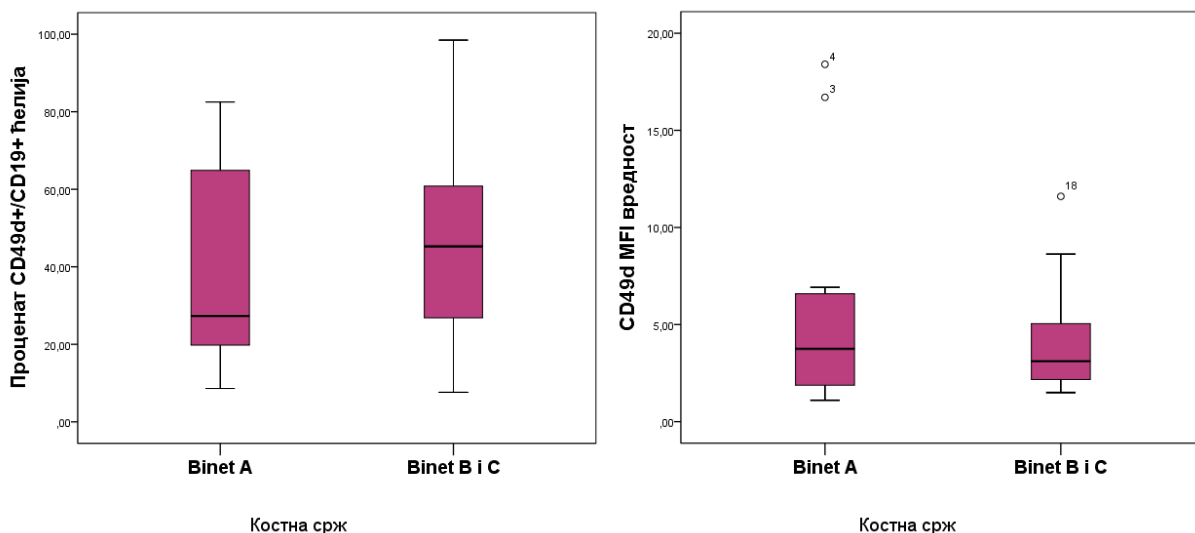
Експресија *CD49d* у периферној крви није показала статистички значајне разлике ни у броју ХЛЛ лимфоцита који експримирају *CD49d* (стадијум *Binet A* 7,79% (3,06-18,61), *Binet B и C* 16,76% (4,06-63,65)) p=0,158, али ни у вредности интензитета експресије (*MFI* вредности стадијум *Binet A* 2,08 (1,67-2,49), *Binet B и C* 2,25 (2,09-2,66)), p=0,593., иако је детектована нешто виша експресија код пацијената у *Binet B и C* стадијуму болести. (Слика 4.1.13)

Експресија *CD49d* у костној сржи са друге стране показује значајније вишу експресију код пацијента у вишем клиничком стадијуму (*Binet A* 27,29% (19,77-64,88) и *Binet B и C* 45,25% (26,83-60,81)), али без статистички значајне разлике, p=0,767. *MFI* вредности различитих клиничких стадијума се не разликују (3,75 (1,88-6,59) и 3,11 (2,17-5,04), p= 0,398. (Слика 4.1.14)



Слика 4.1.13 Упоредна анализа експресије *CD49d* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у периферној крви пацијената нижег и вишег клиничког стадијума

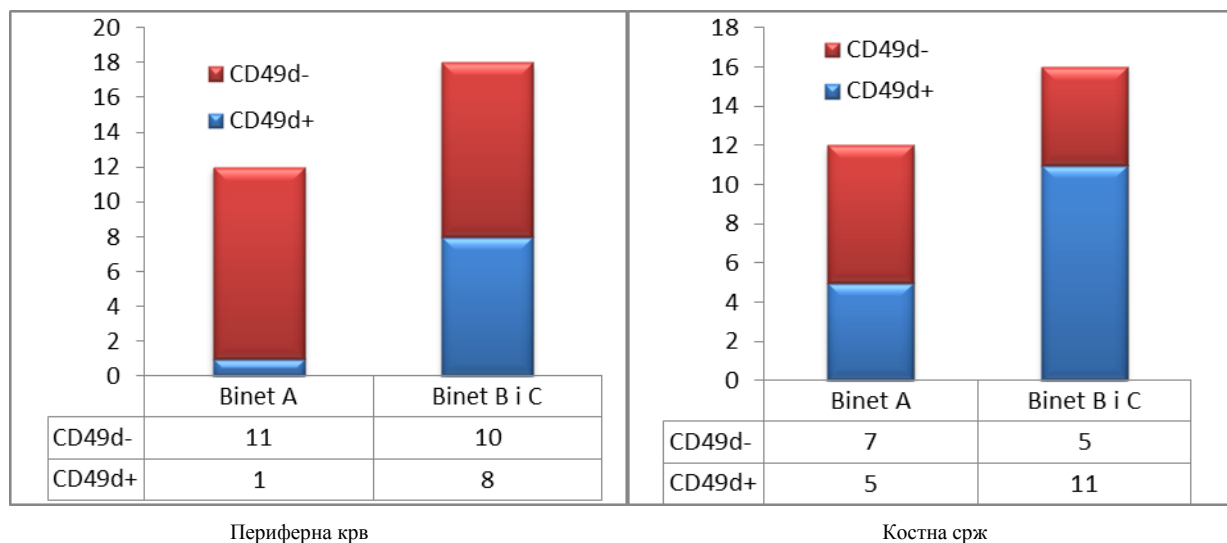
Анализа експресије *CD49d* на ХЛЛ лимфоцитима изолованим из периферне крви код пацијената подељених на стадијуме болести по *Binet* класификацији није показала статистички значајне разлике ни у броју ћелија које експримирају овај маркер ни у интензитету експресије, иако је детектован нешто виуши проценат ћелија у *Binet B* и *C* стадијуму боелсти.



Слика 4.1.14 Упоредна анализа експресије *CD49d* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у костној сржи крви пацијената нижег и вишег клиничког стадијума

Код ХЛЛ лимфоцита изолованих из костне сржи анализа експресије *CD49d* показала је да нема разлике у интензитету експресије код различитих стадијума болести, док је проценат лимфоцита који експримирају овај маркер нешто већу у *Binet B* и *C* стадијуму болести.

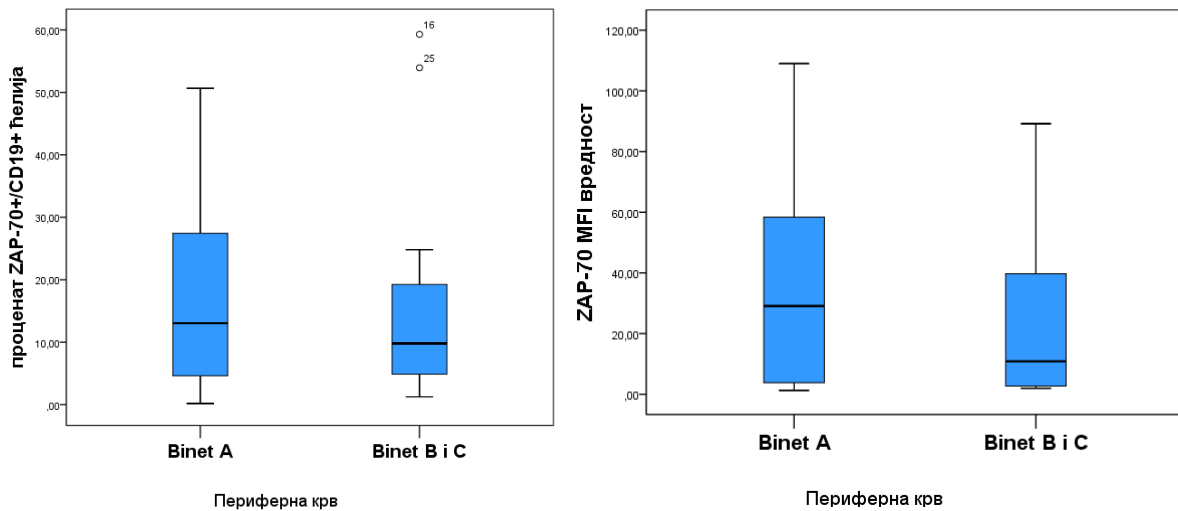
Међутим када узмемо у обзир резултат који произилази из утврђених критеријума, да је резултат позитиван уколико више од 30% ХЛЛ лимфоцита експримира *CD49d* (слика 4.1.15), резултат *CD49d* указује на вишу експресију овог површинског маркера у стадијуму високог ризика, што у периферној крви прави значајну разлику између група ниског и високог ризика, ($p= 0,049$) док у костној сржи та разлика није статистички значајна, $p=0,250$.



Слика 4.1.15 Упоредна анализа експресије *CD49d* на лимфоцитима ХЛЛ прерачуната као позитиван и негативан резултат према важећем критеријуму (периферна крв лево и костна срж десно)

По примени cut off вредности од 30% за одређивања резултата експресије *CD49d* као позитивне и негативне, наши резултати су указали да је позитиван резултат у периферној крви добар маркер за разликовање стадијума болести ($p= 0,049$), док у костној сржи нема разлике између стадијума болести.

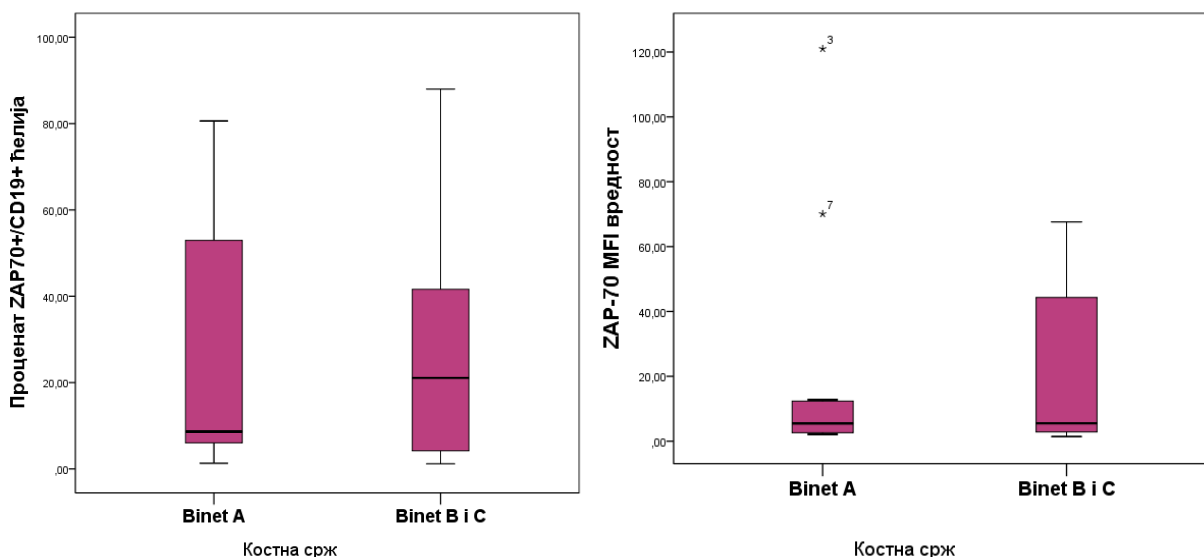
Експресија *ZAP-70* у ХЛЛ лимфоцитима пацијената у различитом клиничком стадијуму није показала значајне разлике ни у испитиваним лимфоцитима периферне крви, ни у испитиваним лимфоцитима костне сржи, ни у проценту експресије ни у средњем интензитету флуоресценце.



Слика 4.1.16 Упоредна анализа експресије *ZAP-70* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у периферној крви пацијената нижег и вишег клиничког стадијума

Анализа експресије *ZAP-70* на ХЛЛ лимфоцитима изолованим из периферне крви код пацијената подељених на стадијуме болести по *Binet* класификацији није показала статистички значајне разлике ни у броју ћелија које експримирају овај маркер ни у интензитету експресије, иако је чак парадоксално детектован нешто виши проценат позитивних ћелија и виши интензитет флуоресценце у *Binet A* стадијуму болести.

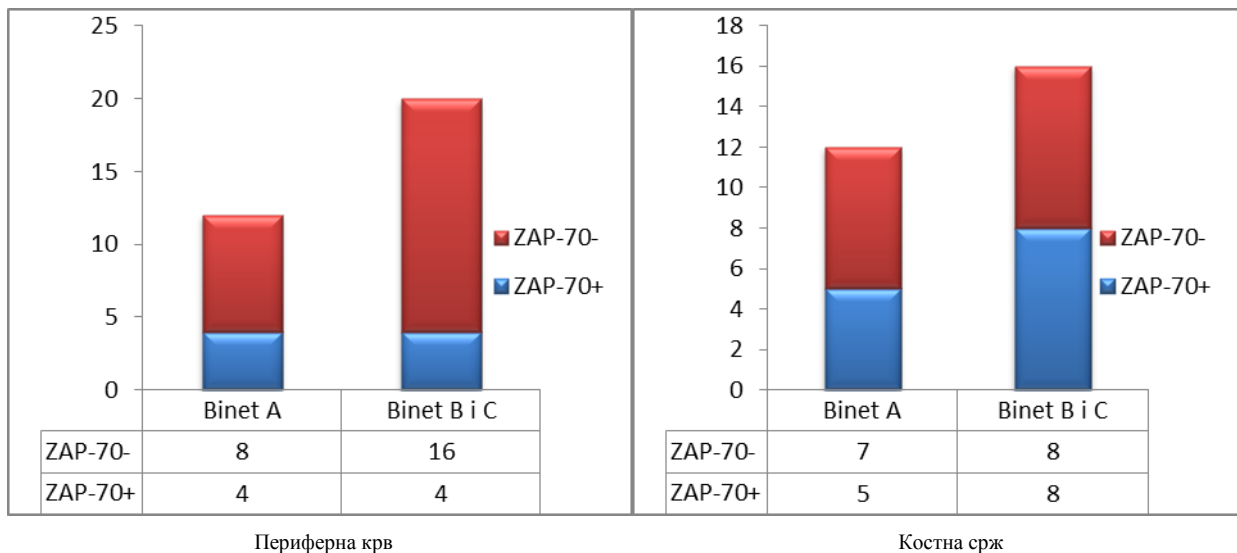
Процент лимфоцита који експримирају *ZAP-70* у периферној крви у стадијуму болести *Binet A* износи 13,04% (4,63-27,43), док у *Binet B* и *C* стадијуму износи 9,81% (4,89-19,24) $p=0,884$, док су следствено *MFI* вредности у периферној крви 29,1 (3,82-58,40) према 10,83 (2,71-39,79) $p=0,448$. (слика 4.1.16) Резултати костне сржи показују експресију у *Binet A* стадијуму 8,46% (6,035-52,95) и *Binet B* и *C* 21,07% (4,175-41,62), $p=0,945$, док су следствено *MFI* вредности 5,48 (2,60-12,35) и 5,53 (2,83-44,30) $p=0,197$. (Слика 4.1.17)



Слика 4.1.17 Упоредна анализа експресије *ZAP-70* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у костној сржи пацијената нижег и вишег клиничког стадијума

Резултати анализе експресије *ZAP-70* на ХЛЛ лимфоцитима изолованим из костне сржи, код пацијената подељених на стадијуме болести по *Binet* класификацији није показала статистички значајне разлике ни у броју ћелија које експримирају овај маркер ни у интензитету експресије. Иако без потврде статистичке значајности, већи проценат ћелија експримира *ZAP-70* код пацијената у *Binet B* и *C* клиничком стадијуму болести.

Када узмемо у обзир резултат који произилази из утврђених критеријума, да је резултат позитиван уколико више од 20% ХЛЛ лимфоцита експримира *ZAP-70* (слика 4.1.18), резултат *ZAP-70* указује на вишу експресију овог површинског маркера у *Binet B* и *C* стадијуму болести у костној сржи, али без статистичке значајности ($p=0,718$). У периферној крви нема разлике у резултату експресије када се упоређују *Binet A* и *Binet B* и *C* клинички стадијум. ($p= 0,678$).

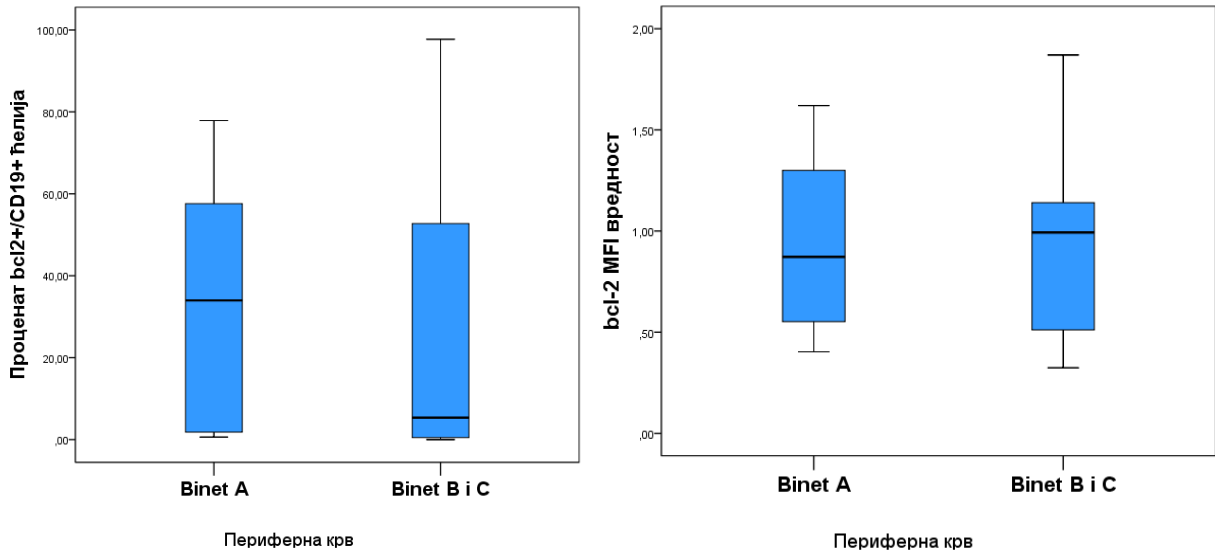


Слика 4.1.18 Упоредна анализа експресије *ZAP-70* на лимфоцитима ХЛЛ прерачуната као позитиван и негативан резултат према важећем критеријуму (периферна крв лево и костна срж десно)

Резултате експресије дефинисали смо као позитивне и негативне користећи најшире распрострањену *cut off* вредност за *ZAP-70* од 20% позитивних ћелија. Овако дефинисан позитиван и негативан резултата нису направили разлику између нижег и вишег стадијума болести ни у периферној крви ни у костној сржи.

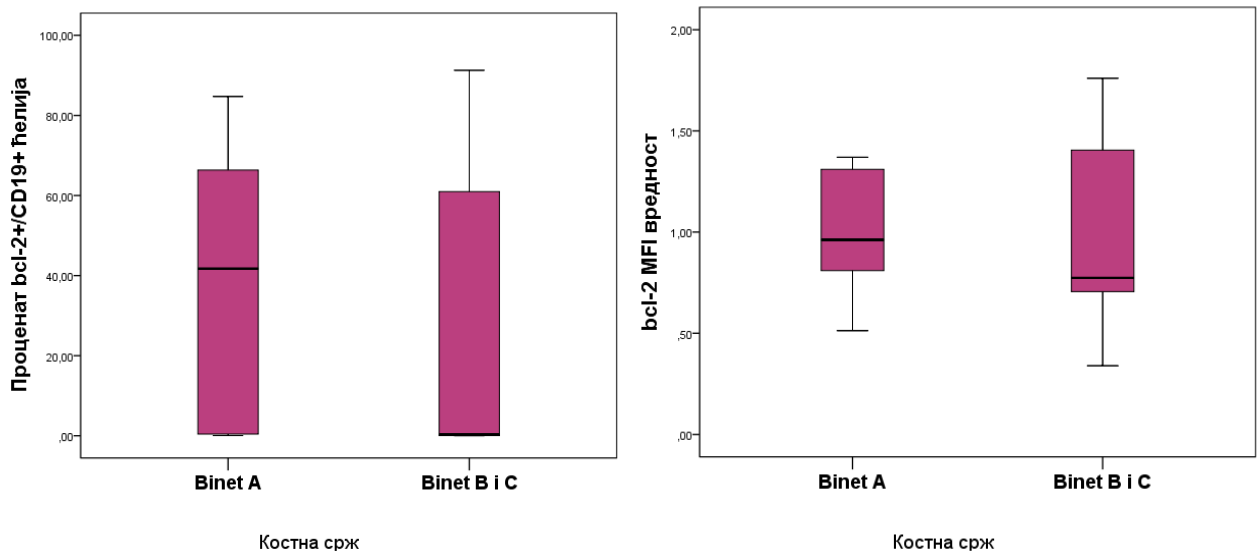
Експресија маркера апоптозе (*bcl-2* и *mcl-1*) посматрана је такође и у модалитету прогнозних параметара у групи пацијената различитог клиничког стадијума. Резултат је приказан као проценат ХЛЛ лимфоцита који експримирају ове маркере на вишем нивоу од немалигних лимфоцита истог узорка, при чему је резултат низак уколико је их је мање од 30%, односно висок уколико је ових ћелија преко 30%.

Експресија *bcl-2* у ХЛЛ лимфоцитима пацијената у различитом клиничком стадијуму показује да је проценат лимфоцита који показују високу експресију *bcl-2* већа код пацијената у *Binet A* него у *Binet B* и *C* клиничком стадијуму и то *Binet A* 33,99% (1,81-57,60), *Binet B* и *C* 5,35% (0,5-52,74) $p=0,346$, док су следствено *MFI* вредности у периферној крви 0,872 (0,55-1,3) према 0,993 (0,511-1,14) без значајне разлике, $p=0,348$. (слика 4.1.19) Резултати костне сржи такође показују већи проценат високе експресије у *Binet A* 41,73% (0,42-66,36) према стадијуму *Binet B* и *C* 0,32% (0,05-60,975), $p=0,260$, док су следствено *MFI* вредности без значајних разлика 0,9615 (0,81-1,31) и 0,774 (0,71-1,41) $p=0,778$. (Слика 4.1.20)



Слика 4.1.19 Упоредна анализа експресије *bcl-2* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у периферној крви пацијената различитог клиничког стадијума

Експресија антиапоптогског протеина *bcl-2* у ћелијама ХЛЛ изолованим из периферне крви показује вишу експресију у *Binet A* клиничком стадијуму у односу на *Binet B* и *C*, док је интензитет ове експресије без детектоване разлике.

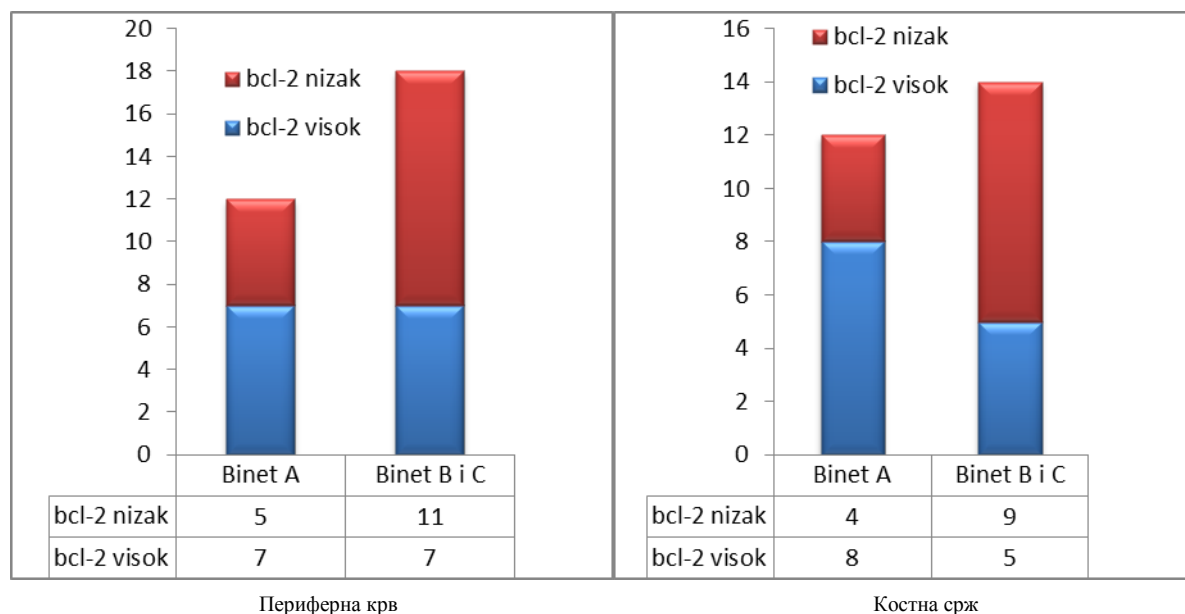


Слика 4.1.20 Упоредна анализа експресије *bcl-2* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у костној сржи пацијената нижег и вишег клиничког стадијума

Као и у анализама периферне крви експресија антиапоптогског протеина *bcl-2* у ћелијама ХЛЛ изолованим из костне сржи показује вишу експресију у нижем клиничком стадијуму у односу на виши, са забележеним и већим интензитетом флуоресценце, али без статистички значајне разлике.

Када узмемо у обзир резултат који раздваја категорију ниске и високе експресије на начин како је објашњено у методологији, (слика 4.1.21), резултат *bcl-2* указује на вишу експресију овог површинског маркера у стадијуму *Binet A* у костној сржи, али без статистичке значајности ($p=0,125$). У периферној крви такође постоји виша експресија у

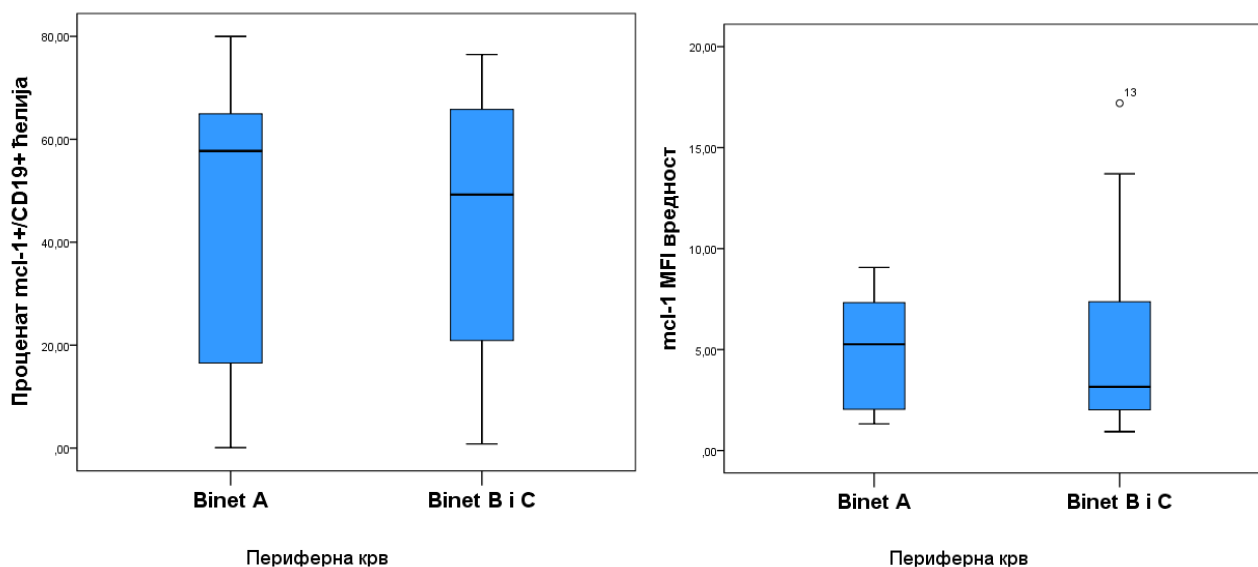
нижем клиничком стадијуму, али је она још мање изражена у ондосу на резултат у костној сржи. ($p=0,457$).



Слика 4.1.21 Упоредна анализа експресије *bcl-2* на лимфоцитима ХЛЛ прерачуната као позитиван и негативан резултат према важећем критеријуму (периферна крв лево и костна срж десно)

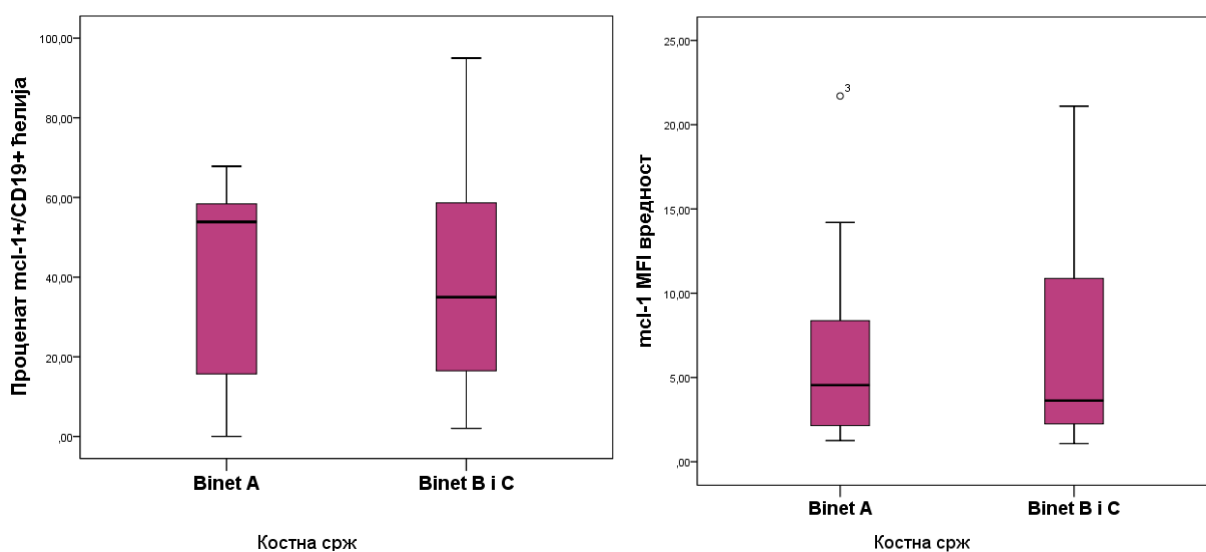
Резултат експресије *bcl-2* дефинисан као ниска и висока експресија не могу направити разлику између група пацијената подељених у клиничке стадијуме према критеријумима *Binet-a*.

Експресија *mcl-1* у ХЛЛ лимфоцитима пацијената у различитом клиничком стадијуму није показала значајне разлике ни у испитиваним лимфоцитима периферне крви, ни у испитиваним лимфоцитима костне сржи, ни у проценту експресије ни у средњем интензитету флуоресценце. Процент лимфоцита који експримирају *mcl-1* у периферној крви *Binet A* стадијум 57,72% (16,52-64,94), *Binet B* и *C* стадијум 49,25% (20,91-65,81) $p=0,884$, док су следствено *MFI* вредности у периферној крви 5,26 (2,04-7,33) према 3,15 (2,02-7,37) $p=0,448$. (слика 4.1.22) Резултати костне сржи показују експресију у *Binet A* стадијуму 53,85% (15,7-58,38) и *Binet B* и *C* 34,97% (16,48-58,65), $p=0,945$, док су следствено *MFI* вредности 4,55 (2,145-8,37) и 3,63 (2,25-10,88), $p=0,197$. (Слика 4.1.23)



Слика 4.1.22 Упоредна анализа експресије *mcl-1* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у периферној крви пацијената нижег и вишег клиничког стадијума

Експресија антиапоптог протеина *mcl-1* у ћелијама ХЛЛ изолованим из периферне крви показује вишу експресију и интензитет флуоресценце у *Binet A* клиничком стадијуму.

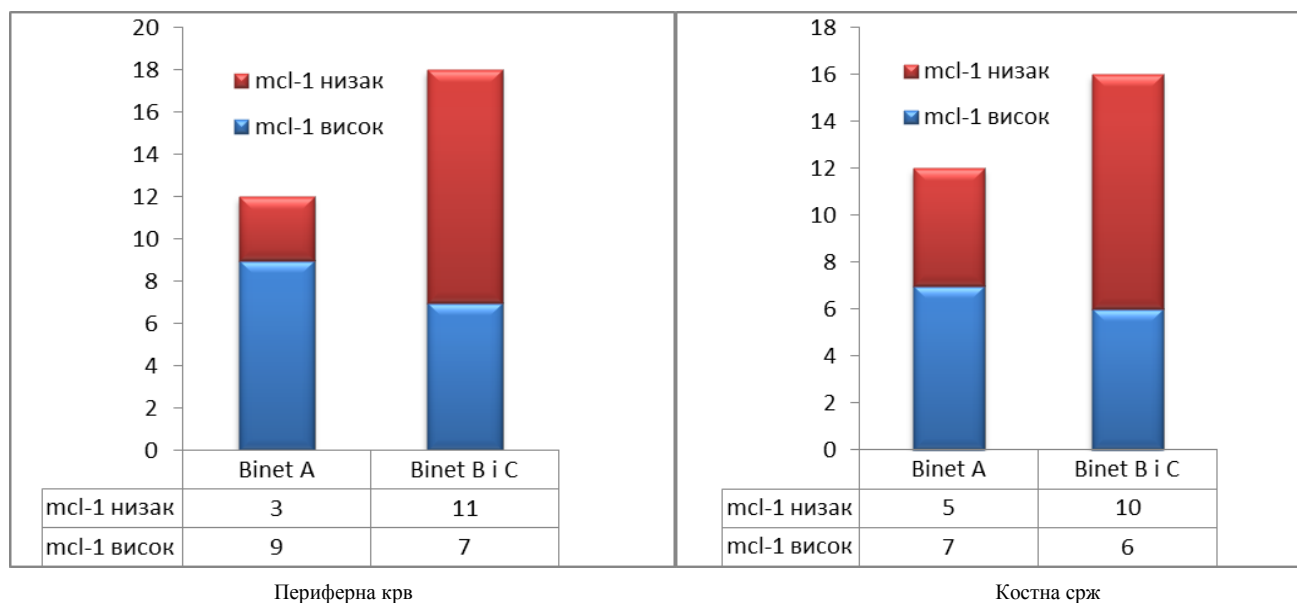


Слика 4.1.23 Упоредна анализа експресије *mcl-1* (лево) и средњег интензитета флуоресценце (десно) у костној сржи пацијената нижег и вишег клиничког стадијума

Експресија антиапоптог протеина *mcl-1* у ћелијама ХЛЛ изолованим из костне сржи показује вишу експресију у *Binet A* клиничком стадијуму, док у интензитету флуоресценце нема разлике.

Када узмемо у обзир резултат који раздваја категорију ниске и високе експресије на начин како је објашњено у методологији, (слика 4.25), резултат експресије *mcl-1* указује на вишу експресију овог површинског маркера у *Binet A* стадијуму болести у периферној крви, без статистичке значајности ($p=0,072$). У костној сржи такође постоји виша

експресија у *Binet A* клиничком стадијуму, али је она мање изражена у односу на резултат у периферној крви. ($p= 0,457$).



Слика 4.1.24 Упоредна анализа експресије *mcl-1* на лимфоцитима ХЛЛ прерачуната као висока и ниска експресија (периферна крв лево и костна срж десно)

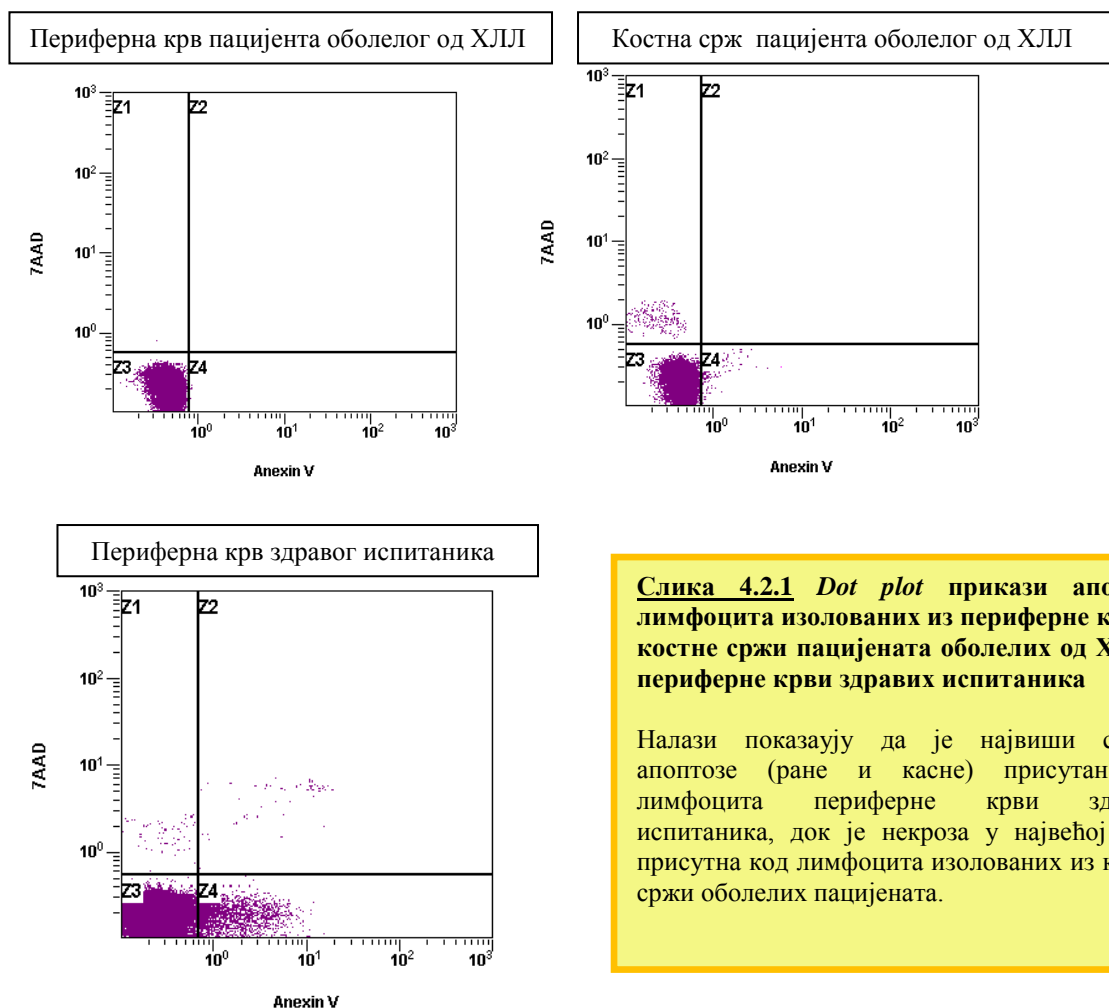
Резултат експресије *mcl-1* дефинисан као ниска и висока експресија не могу направити разлику између група пацијената подељених у клиничке стадијуме према критеријумима *Binet*-а када су лимфоцити ХЛЛ изоловани из костне сржи, док код лимфоцита изолованих из периферне крви висок *mcl-1* доминира у налазу пацијента у *Binet A* клиничком стадијуму, док је низак *mcl-1* карактеристика *Binet B* и *C* стадијума болести. ($p=0,072$)

4.2 Апоптоза

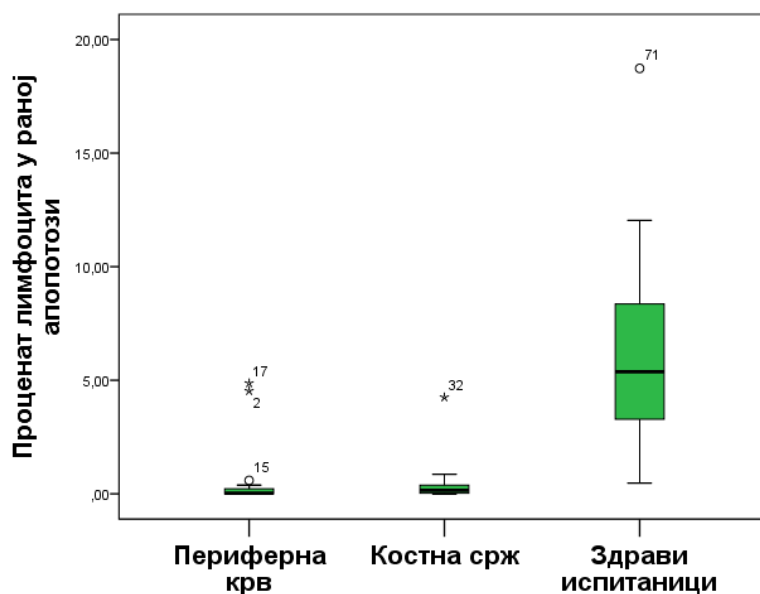
Апоптоза је изражавана као проценат апоптотичних лимфоцита у раној, касној апоптози и некрози изолованих „ex vivo“ лимфоцита из две микросредине у којима се крећу ХЛЛ лимфоцити, периферне крви и костне сржи.

4.2.1 Процент лимфоцита у раној, касној апоптози и некрози у периферној крви и костној сржи пацијената као и периферној крви здравих испитаника

Вредности параметара апоптозе у периферној крви упоређиване су и са вредностима апоптозе лимфоцита здравих испитаника такође изолованих из периферне крви. Добијени резултати тумачени су као рана апоптоза, касна апоптоза и некроза, а према критеријумима објашњеним у методологији. Оригинални резултати приказани су сумарно на слици 4.2.1.



Рана апоптоза лимфоцита пацијената оболелих од ХЛЛ у периферној крви 0,03% (0,00-0,22) нижа је од ране апоптозе лимфоцита пацијената изолованих из костне сржи 0,155% (0,025-0,38), $p=0,068$, а обе вредности значајно су ниже од ране апоптозе лимфоцита периферне крви здравих испитаника 5,37% (3,28-8,36). ($p < 0,0005$). (Слика 4.2.2)



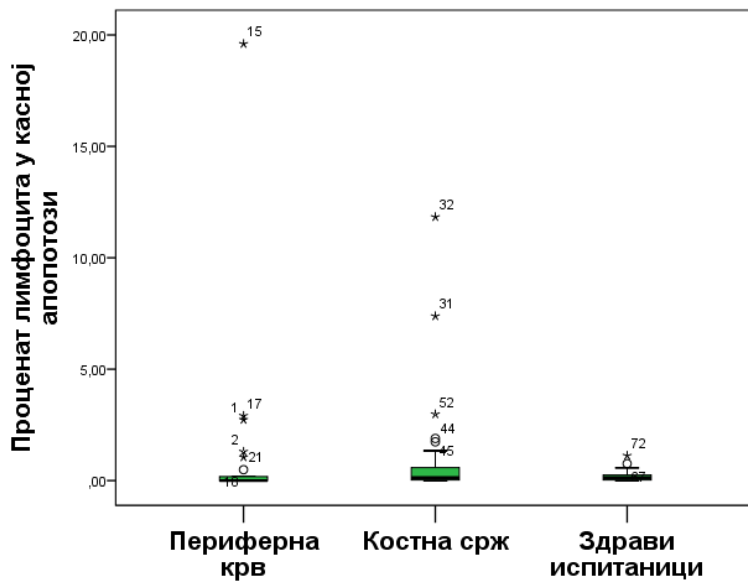
Слика 4.2.2 Упоредна анализа процента апоптогичних лимфоцита у раној фази апоптозе у периферној крви и костној сржи пацијената оболелих од ХЛЛ као и лимфоцита периферне крви здравих испитаника

Процент лимфоцита периферне крви и костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ у раној апоптози знатно је нижи од процента лимфоцита у раној апоптози здравих испитаника. ($p < 0,0005$)

Касна апоптоза лимфоцита периферне крви здравих испитаника по својим вредностима блиска је вредности касне апоптозе лимфоцита костне сржи оболелих, док је касна апоптоза периферне крви оболелих на нижем нивоу од друга два параметра. (Слика 4.2.3)

Касна апоптоза периферне крви пацијената оболелих од ХЛЛ износи 0,001% (0,001-0,18), костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ 0,13% (0,03-0,58), док је ова вредност за лимфоците периферне крви здравих испитаника 0,13% (0,025-0,25).

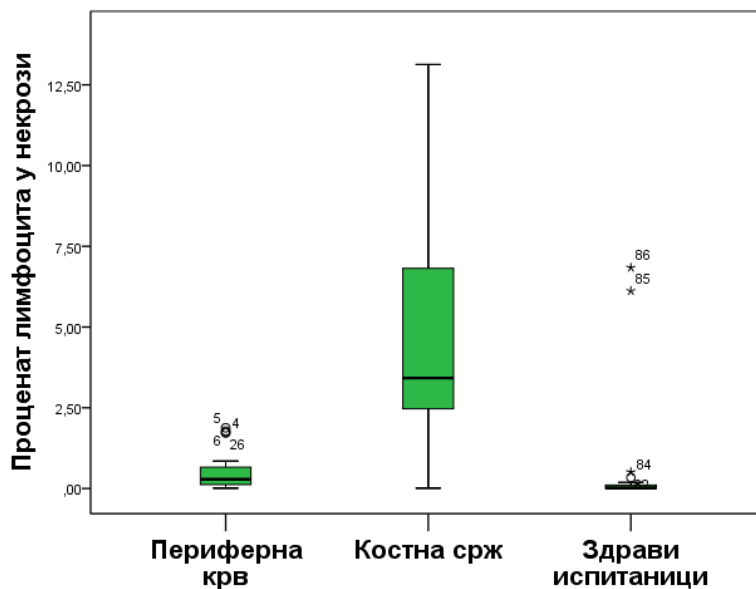
Утврђена разлика између процента лимфоцита у касној апоптози у периферној крви и костне сржи оболелих пацијената је статистички значајна $p=0,005$, као и разлика између касне апоптозе лимфоцита периферне крви пацијената и здравих испитаника $p = 0,017$.



Слика 4.2.3 Упоредна анализа процента апоптотичних лимфоцита у касној фази апоптозе у периферној крви и костној сржи пацијената оболелих од ХЛЛ као и лимфоцита периферне крви здравих испитаника

Процент лимфоцита у касној апоптози значајно је виши у костној сржи пацијената оболелих од ХЛЛ и периферној крви здравих испитаника у односу на периферну крв оболелих пацијената. ($p=0,005$ и $p = 0,017$)

Процент некротичних лимфоцита одређиваних према претходно објашњеном критеријуму показује да је некроза лимфоцита виша у периферној крви пацијената него периферној крви здравих испитаника (периферна крв оболелих 0,285% (0,12-0,66), здрави испитаници 0,02% (0,00-0,105), $p < 0,0005$), као и да је вредност некрозе лимфоцита костне сржи значајно виши од процента некрозе лимфоцита периферне крви оболелих од ХЛЛ (костна срж 3,42% (2,47-6,82), $p < 0,0005$). (Слика 4.2.4)



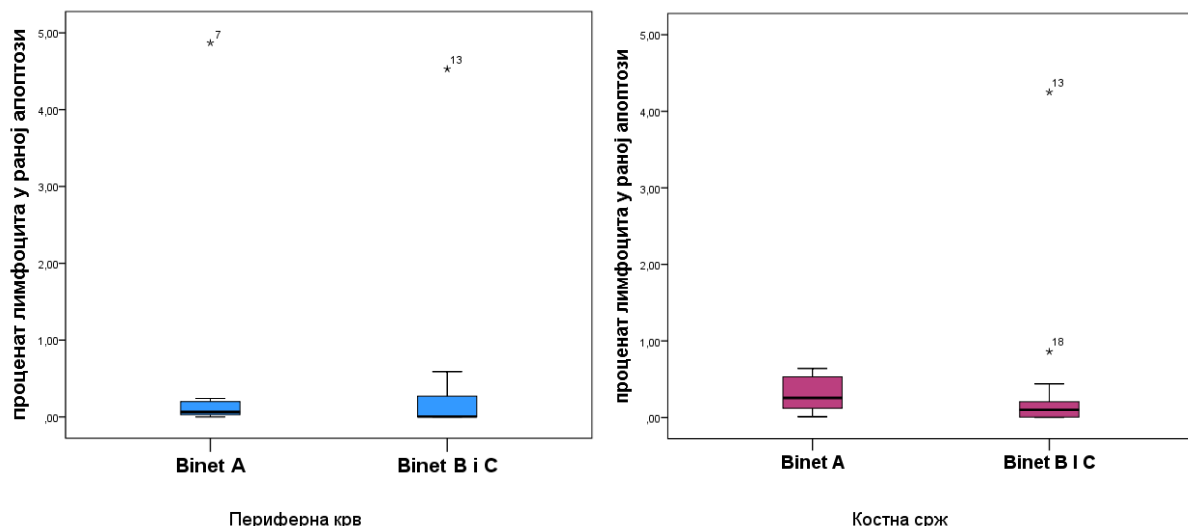
Слика 4.2.4 Упоредна анализа процента некротичних лимфоцита у периферној крви и костној сржи пацијената оболелих од ХЛЛ као и лимфоцита периферне крви здравих испитаника

Процент некротичних лимфоцита значајно је виши у костној сржи пацијената оболелих од ХЛЛ у односу на периферну крв оболелих пацијената ($p < 0,0005$), као и у периферној крви оболелих у односу на периферну крв здравих испитаника. ($p < 0,0005$)

4.2.2 Процент лимфоцита у раној, касној апоптози и некрози у периферној крви и костној сржи као параметар разликовања пацијената у различитим стадијумима болести

„*Ex vivo*“ одређивана апоптоза лимфоцита периферне крви и костне сржи посматрана је и као могући прогнозни маркер, када се пацијенти оболели од ХЛЛ-а поделе у нижи (*Binet A*) и виши (*Binet B* и *C*) клинички стадијум према критеријуму *Binet-a*.

Рана апоптоза лимфоцита у периферној крв показује виши ниво апоптозе код пацијената у *Binet A* клиничком стадијуму (0,065% (0,03-0,2) према 0,005% у *Binet B* и *C* стадијуму (0,00-0,27)) али без статистички значајне разлике, $p=0,200$. Ова разлика у корист *Binet A* стадијума болести потврђена је и код лимфоцита костне сржи, али са статистички значајном разликом. (0,255% (0,12-0,53) према 0,1% (0,005-0,205)), $p=0,047$. (Слика 4.2.5)

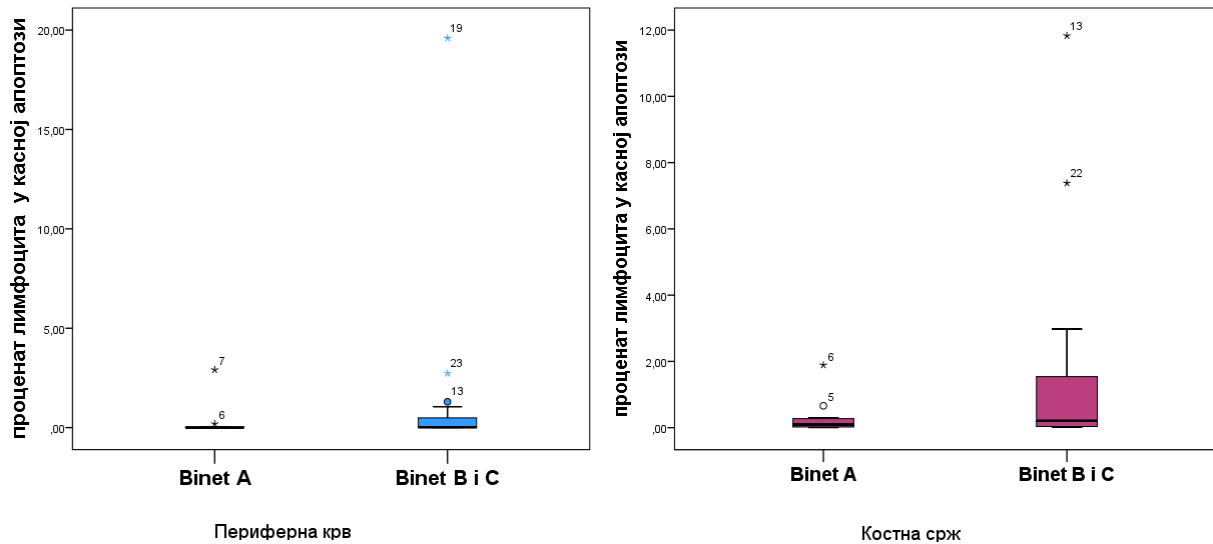


Слика 4.2.5 Упоредна анализа процената ћелија у раној апоптози пацијената оболелих од ХЛЛ у нижем (*Binet A*) и вишем (*Binet B* и *C*) стадијума болести у периферној крви (лево) и костној сржи (десно)

Процент лимфоцита у раној апоптози лимфоцита периферне крви пацијената нижег и вишег стадијума болести није показала статистички значајне разлике, док је рана апоптоза у костној сржи значајно виша у нижем стадијуму *Binet A* болести у односу на *Binet B* и *C* стадијум болести. ($p=0,047$)

Резултати процента касне апоптозе лимфоцита указали су да нема разлике у нивоу касне апоптозе у зависности од стадијума болести у ком се пацијент налази (*Binet A* клинички стадијум 0,00% (0,00-0,04), *Binet B* и *C* клинички стадијум 0,005% (0,00-0,49)), $p=0,285$. У костној сржи ова разлика је нешто израженија, те је касна апоптоза лимфоцита костне сржи у *Binet A* клиничком стадијуму (0,095% (0,02-0,275)) нижа у односу на

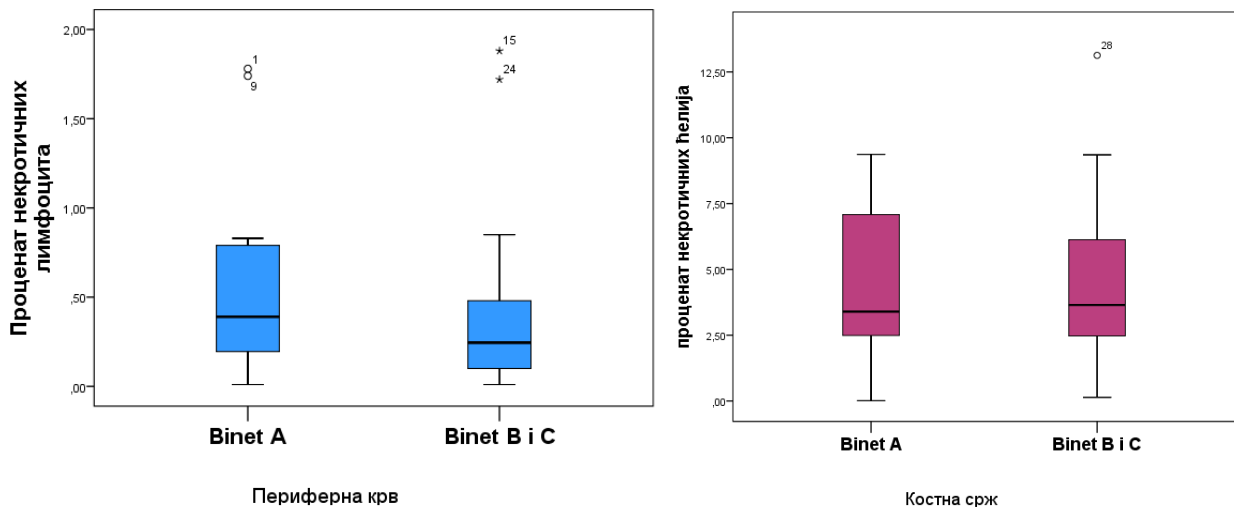
вредност овог параметра у *Binet B* и *C* клиничком стадијуму (0,21% (0,035-1,54), али ова разлика није статистички значајна. $p=0,241$ (Слика 4.2.6)



Слика 4.2.6 Упоредна анализа процената ћелија у касној апоптози пацијената оболелих од ХЛЛ у нижем (*Binet A*) и вишем (*Binet B* и *C*) стадијума болести у периферној крви (лево) и костној сржи (десно)

Процент лимфоцита у касној апоптози периферне крви, али и костној сржи пацијената различитог стадијума болести није показала статистички значајне разлике.

Некроза лимфоцита у периферној крви показује виши ниво некрозе код пацијената у *Binet A* клиничком стадијуму (0,39% (0,195-0,79) према 0,245% у стадијуму *Binet B* и *C* (0,1-0,48)) али без статистички значајне разлике, $p=0,415$. Ова разлика није потврђена ни код лимфоцита костне сржи (*Binet A* 3,39% (2,49-7,08) према *Binet B* и *C* 3,64% (2,47-6,125)), $p=0,982$. (Слика 4.2.7)



Слика 4.2.7 Упоредна анализа процената некротичних лимфоцита код пацијената оболелих од ХЛЛ у нижем (*Binet A*) и вишем (*Binet B* и *C*) стадијума болести у периферној крви (лево) и костној сржи (десно)

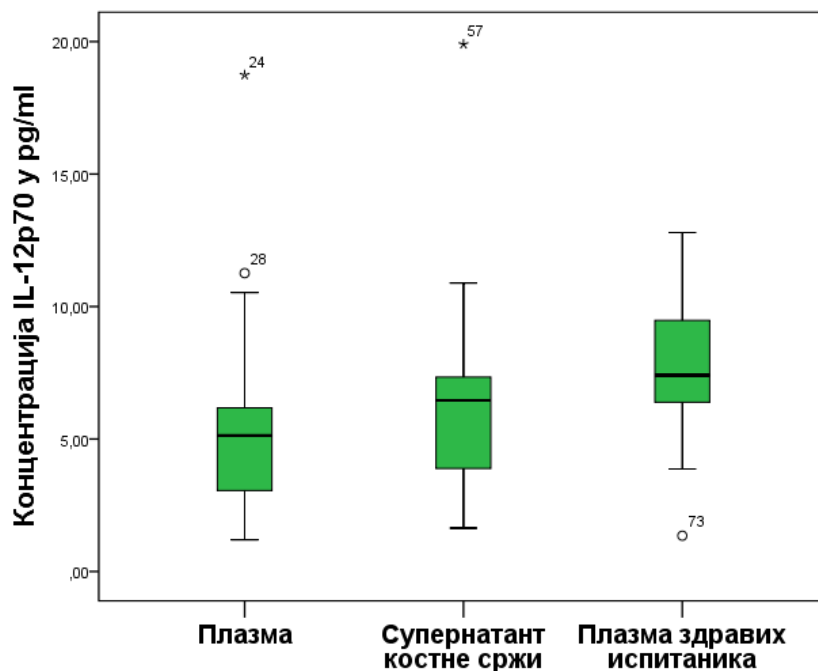
Процент некротичних лимфоцита не показује разлику између различитог стадијума болести.

4.3 Цитокини

4.3.1 Концентрација цитокина у плазми и супернатанту костне сржи пацијената као и плазми здравих испитаника

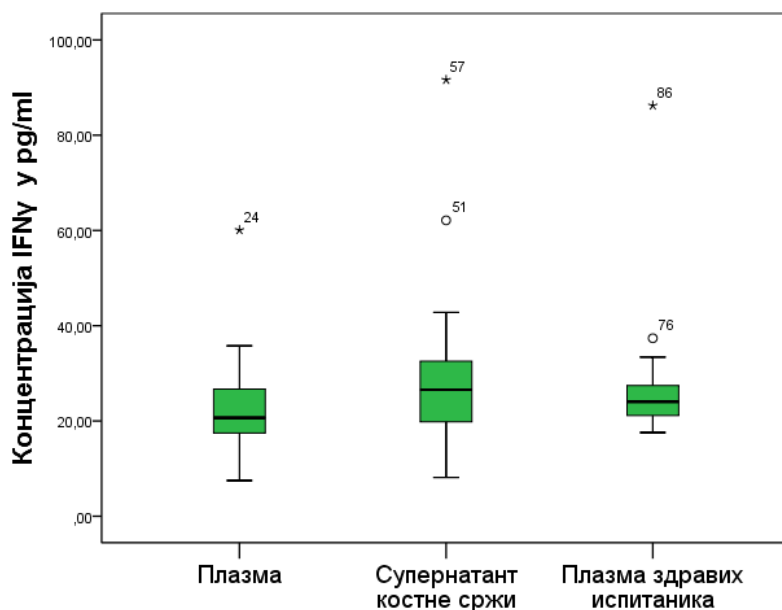
Током нашег истраживања одређивали смо и цитокински састав различитих микросредина у којим бораве ХЛЛ лимфоцити, периферне крви и костне сржи и упоређивали смо их са параметрима здравих испитаника.

Одређена концентрација *IL-12p70* значајно је виша у плазми здравих испитаника 7,41 *pg/ml* (6,39-9,48), у односу на плазму ХЛЛ пацијената 5,13 *pg/ml* (3,05-6,18), **p= 0,004**. Концентрација овог цитокина је виша у супернатанту костне сржи 6,46 *pg/ml* (3,89-7,33) у односу на плазму оболелих од ХЛЛ-а, али без статистички значајне разлике. p= 0,401. (Слика 4.3.1)



Слика 4.3.1 Упоредна анализа концентрације *IL-12p70* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација *IL-12p70* значајно је виша у плазми здравих испитаника у односу на плазму пацијената оболелих од ХЛЛ (p= 0,004), док нема разлике у плазматској концентрацији и концентрацији у супернатанту костне сржи оболелих.

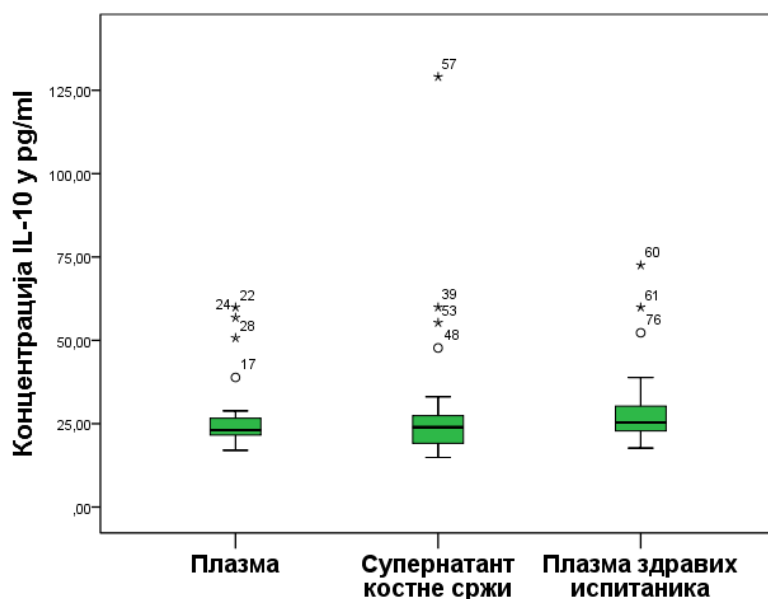


Слика 4.3.2 Упоредна анализа концентрације *IFN γ* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација *IFN γ* нижа је у плазми оболелих у односу на плазму здравих испитаника и супернатант костне сржи оболелих, али без статистички значајне разлике.

Одређена концентрација *IFN γ* виша је у плазми здравих испитаника 24,03 pg/ml (21,13-30,26), у односу на плазму ХЛЛ пацијената 20,67 pg/ml (17,48-26,69), $p=0,249$. Концентрација овог цитокина је виши у супернатанту костне сржи 26,56 pg/ml (19,83-32,55) у односу на плазму, али без статистички значајне разлике. $p=0,273$. (Слика 4.3.2)

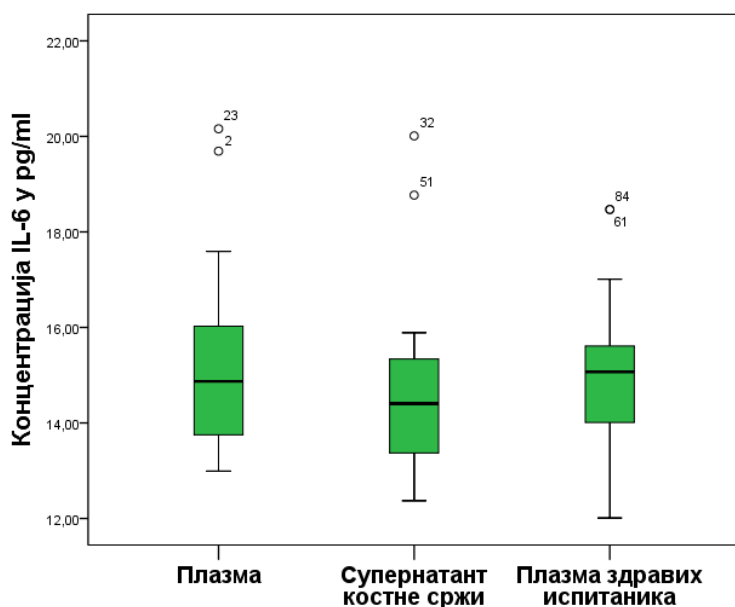
Одређивана је и серумска концентрација IL-10. Резултатаи су показали да је концентрација IL-10 виша у плазми здравих испитаника 25,34 pg/ml (22,82-30,26), у односу на плазму ХЛЛ пацијената 23,07 pg/ml (21,61-26,64), $p=0,354$. Концентрација овог цитокина у супернатанту костне сржи 23,94 pg/ml (19,13-27,43) у односу на плазму пацијената оболелих од ХЛЛ не показује разлику. $p=0,427$. (Слика 4.3.3)



Слика 4.3.3 Упоредна анализа концентрације *IL-10* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација *IL-10* не показује значајне разлике између плазме и супернатанта костне сржи оболелих и плазме здравих испитаника.

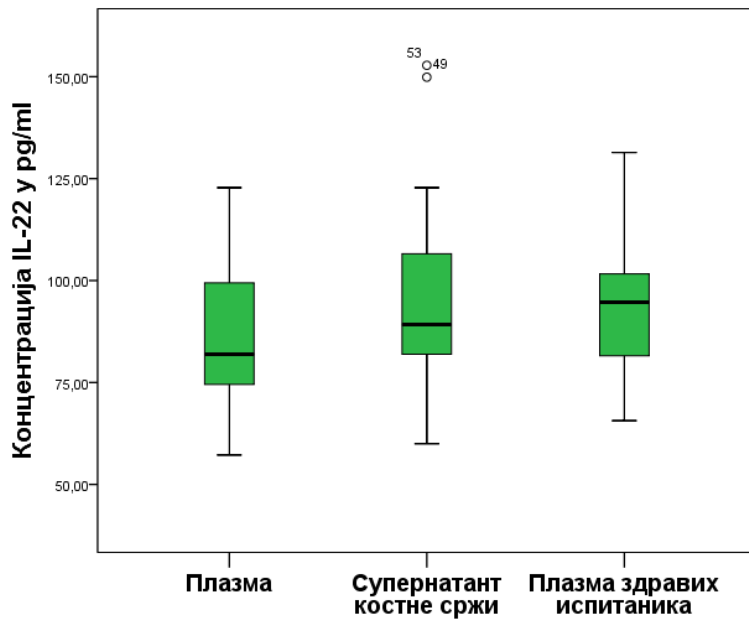
Одређена концентрација *IL-6* виша је у плазми здравих испитаника 15,07 pg/ml (14,01-15,61), у односу на плазму ХЛЛ пацијената 14,87 pg/ml (13,75-16,02), али без статистички значајне разлике, $p = 0,958$. Концентрација овог цитокина у супернатанту костне сржи 14,4 pg/ml (13,37-15,34) нижа је у односу на плазму пацијена оболелог од ХЛЛ, али без статистички значајне разлике. $p = 0,209$. (Слика 4.3.4)



Слика 4.3.4 Упоредна анализа концентрације *IL-6* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација *IL-6* не показује значајне разлике између плазме и супернатанта костне сржи оболелих и плазме здравих испитаника.

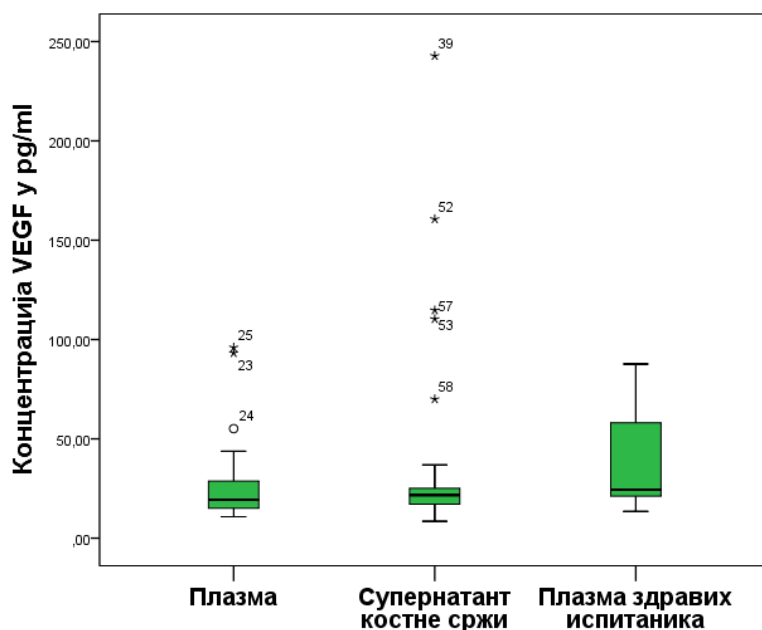
Одређена концентрација IL-22 виша је у плазми здравих испитаника 94,69 pg/ml (81,55-101,63), у односу на плазму ХЛЛ пацијената 81,95 pg/ml (74,54-99,43), али без статистички значајне разлике, $p = 0,214$. Концентрација овог цитокина у супернатанту костне сржи 89,22 pg/ml (81,92-106,56) виша је у односу на плазму пацијената оболлих од ХЛЛ, али без статистички значајне разлике. $p = 0,171$. (Слика 4.3.5)



Слика 4.3.5 Упоредна анализа концентрације IL-22 у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболлих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација IL-22 не показује значајне разлике између плазме и супернатанта костне сржи оболлих и плазме здравих испитаника.

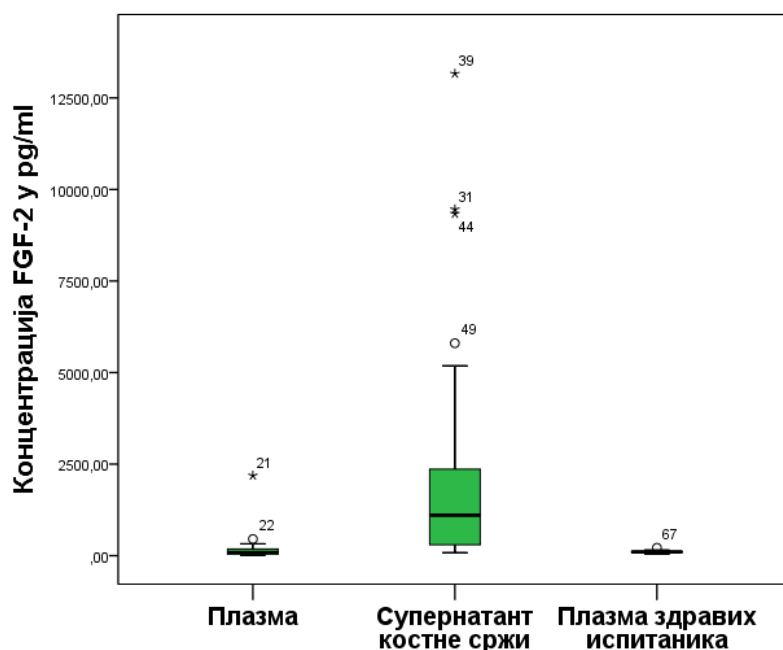
Одређена концентрација VEGF-A виша је у плазми 24,42 pg/ml (21,16-58,05), у односу на плазму ХЛЛ пацијената 19,31 pg/ml (15,075-28,76), са потврђеном статистичком значајношћу, $p = 0,040$. Ниво овог цитокина у супернатанту костне сржи 21,69 pg/ml (17,14-25,10) виша је у односу на плазму оболлих пацијената, али без статистички значајне разлике. $p = 0,791$. (Слика 4.3.6)



Слика 4.3.6 Упоредна анализа концентрације *VEGF-A* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација *VEGF-A* значајно је виша у плазми здравих испитаника у односу на плазму пацијената оболелих од ХЛЛ ($p=0,04$), док нема разлике у плазматској концентрацији и концентрацији у супернатанту костне сржи оболелих.

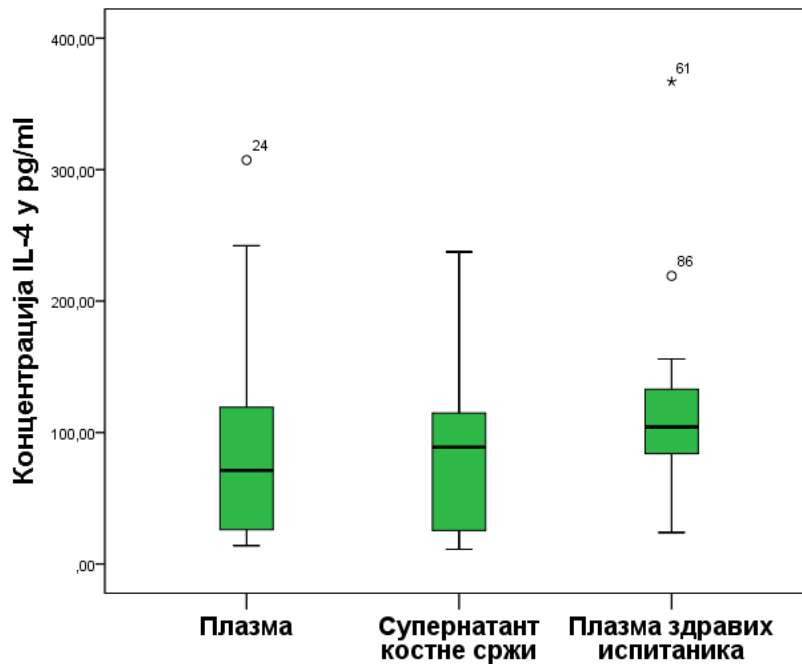
Одређена концентрација *FGF-2* виша је у плазми здравих испитаника 103,75 pg/ml (86,67-119,51), у односу на плазму ХЛЛ пацијената 94,56 pg/ml (41,15-182,85), али без статистички значајне разлике, $p=0,952$. Концентрација овог цитокина у супернатанту костне сржи 1106,24 pg/ml (299,64-2360,87) знатно је виша у односу на плазму оболелих пацијената, $p<0,005$. (Слика 4.3.7)



Слика 4.3.7 Упоредна анализа концентрације *FGF-2* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација *FGF-2* значајно је виша у супернатанту костне сржи у односу на плазму пацијената оболелих од ХЛЛ ($p<0,005$), док нема разлике у плазматској концентрацији оболелих пацијената и здравих испитаника.

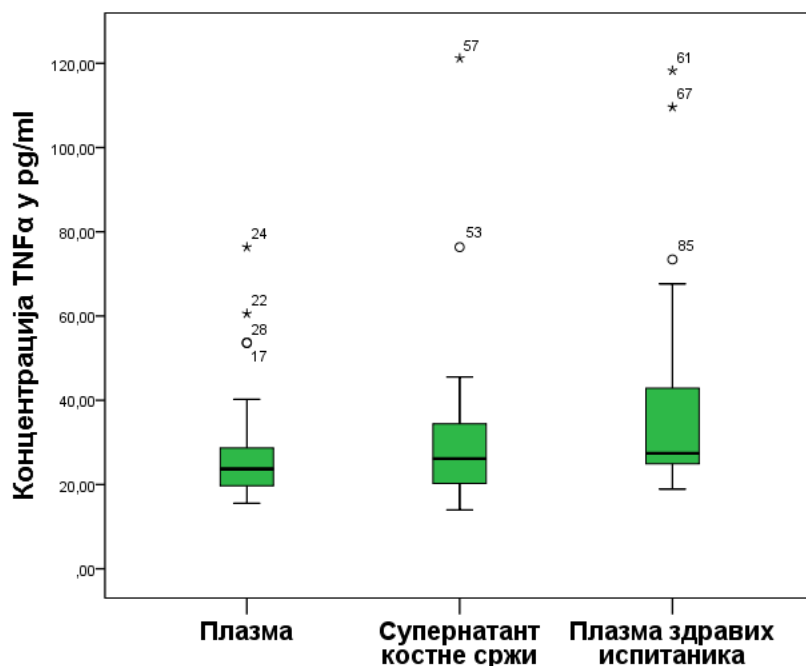
Одређена концентрација *IL-4* виши је у плазми здравих испитаника 104,2 pg/ml (83,94-132,98), у односу на плазму ХЛЛ пацијената 71,13 pg/ml (26,1-119,24), али без статистички значајне разлике, $p = 0,120$. Концентрација овог цитокина у супернатанту костне сржи 88,91 pg/ml (25,52-114,77) виша је у односу на плазму оболелих пацијената, али без статистички значајне разлике. $p = 0,674$. (Слика 4.3.8)



Слика 4.3.8 Упоредна анализа концентрације *IL-4* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација *IL-4* нижа је у плазми и супернатанту костне сржи оболелих у односу на здраве испитанике, али без статистички значајне разлике.

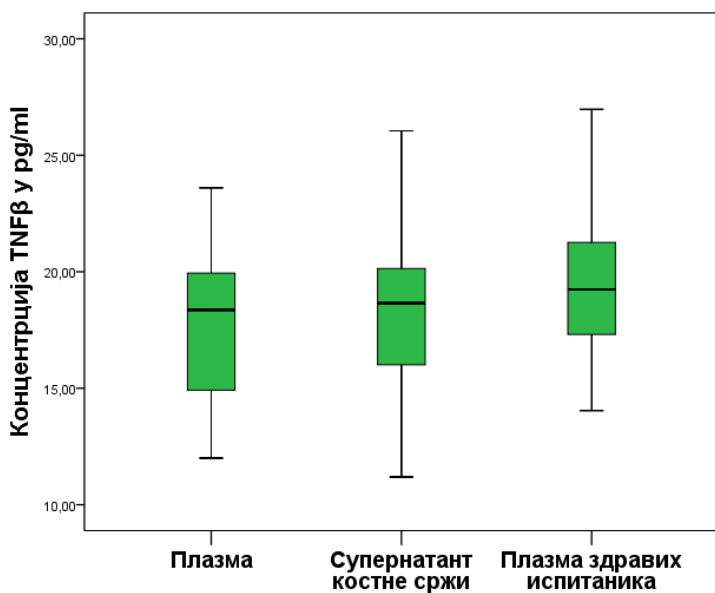
Одређена концентрација *TNF α* виша је у плазми здравих испитаника 27,43 pg/ml (24,93-42,87), у односу на плазму ХЛЛ пацијената 23,72 pg/ml (19,69-28,69), са потврђеном статистичком значајношћу, $p = 0,045$. Концентрација овог цитокина у супернатанту костне сржи 26,17 pg/ml (20,24-34,41) виша је у односу на плазму оболелих пацијанта, али без статистички значајне разлике. $p = 0,901$. (Слика 4.3.9)



Слика 4.3.9 Упоредна анализа концентрације *TNFα* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација *TNFα* значајно је виша у плазми здравих испитаника у односу на плазму пацијената оболелих од ХЛЛ ($p= 0,045$), док нема разлике у плазматској концентрацији и концентрацији у супернатанту костне сржи оболелих.

Одређена концентрација *TNFβ* виша је у плазми здравих испитаника 19,24 pg/ml (17,31-21,26), у односу на периферну кр плазму ХЛЛ пацијената 18,36 pg/ml (14,92-19,94), са потврђеном статистичком значајношћу, $p= 0,178$. Концентрација овог цитокина у супернатанту костне сржи 18,65 pg/ml (16,01-20,14) нешто је виша у односу на плазму пацијената оболелих од ХЛЛ, али без статистички значајне разлике. $p= 0,988$. (Слика 4.3.10)



Слика 4.3.10 Упоредна анализа концентрације *TNFβ* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ, као и плазми здравих испитаника.

Концентрација *TNFβ* не показује значајне разлике између плазме и супернатанта костне сржи оболелих и плазме здравих испитаника.

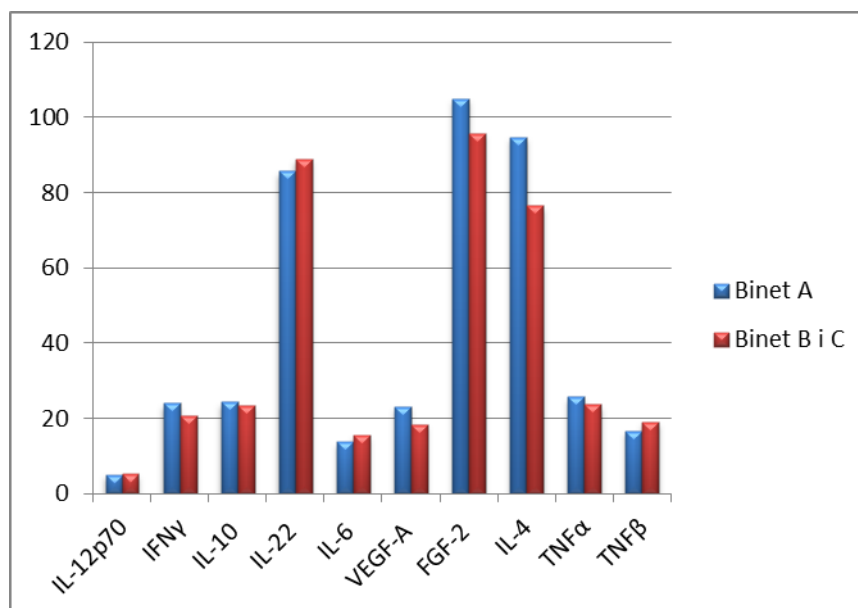
4.3.2 Концентрација цитокина у плазми и супернатанту костне сржи пацијената у различитим стадијумима болести

Одређиване концентрације цитокина у плазми и супернатанту костне сржи оболелих и њихове међусобне разлике створиле су потребу и тестирања нивоа цитокина у међу различитим стадијумима болести, а ради прецизнијег одређивања ризика ка бржој прогресији болести.

Плазма Цитокини	Концентрација цитокина <i>pg/ml</i>		Статистичка значајност (<i>p</i>)
	<i>Binet A</i>	<i>Binet B i C</i>	
IL-12p70	5,065 (3,88-7,77)	5,295 (2,78-6,53)	0,787
IL-22	85,62 (76,84-101,65)	88,91 (70,03-100,74)	0,545
IFNγ	24,03(18,03-26,91)	20,67 (18,62-32,64)	0,755
IL-10	24,33 (22,58-27,615)	23,315 (20,89-27,43)	0,692
IL-6	13,75 (13,37-14,81)	15,41 (14,27-16,16)	0,009
VEGF-A	23,13 (15,77-35,36)	18,41 (15,26-30,1)	0,692
FGF-2	104,98 (43,64-233,64)	95,72 (42,24-177,23)	0,950
IL-4	94,79 (42,91-134,85)	76,57 (26,54-116,54)	0,545
TNFα	25,68 (19,69-37,05)	23,72 (20,69-29,95)	0,950
TNFβ	16,57 (14,57-19,74)	19,045 (15,46-20,44)	0,232

Табела 4.3.1 Концентрације цитокина у плазми пацијената у нижем (*Binet A*) и вишем стадијуму болести (*Binet B* и *C*)

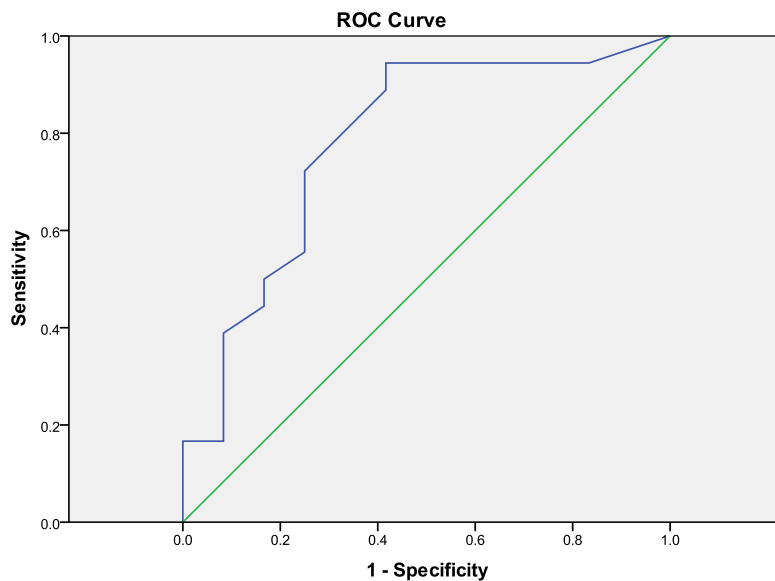
Значајну разлику и потенцијални прогнозни значај има само одређивање концентрације IL-6 у плазми пацијената, која је већа у вишем стадијуму болести. ($p=0,009$).



Слика 4.3.11 Концентрације цитокина у плазми пацијената у нижем (*Binet A*) и вишем стадијуму болести (*Binet B* и *C*)

Концентрације *IFN γ* , *IL-10*, *VEGF-A*, *FGF-2*, *TNF α* , *IL-4* су више у стадијуму *Binet B* и *C*, док су концентрације *IL-12p70*, *IL-22*, *IL-6*, и *TNF β* више у стадијуму *Binet A* при чему само је разлика у концентрацији *IL-6* статистички значајна

Резултати приказани табеларно (табела 4.3.1) и графички (Слика 4.3.11) показују да је у *Binet A* клиничком стадијуму болести у периферној крви повишена концентрација *IFN γ* , *IL-10*, *VEGF-A*, *FGF-2*, *TNF α* , *IL-4*, док су *IL-12p70*, *IL-22*, *IL-6*, и *TNF β* нижих концентрација него у *Binet B* и *C* стадијуму болести. Одређивање концентрације *IL-6* у плазми може направити статистички значајну разлику пацијената ниског (*Binet A*) и високог (*Binet B* и *C*) клиничког стадијума.



Слика 4.3.12 ROC крива сензитивности и специфичности одређивања концентрације *IL-6* у плазми пацијената за разликовање нижег и вишег стадијума болести

Сензитивност од 75% и специфичност од 75% одређивања концентрације *IL-6* у плазми пацијената класификују овај параметар као врло добар маркер за диференцијацију вишег и нижег стадијума болести. (area = 0.782, p = 0.010).

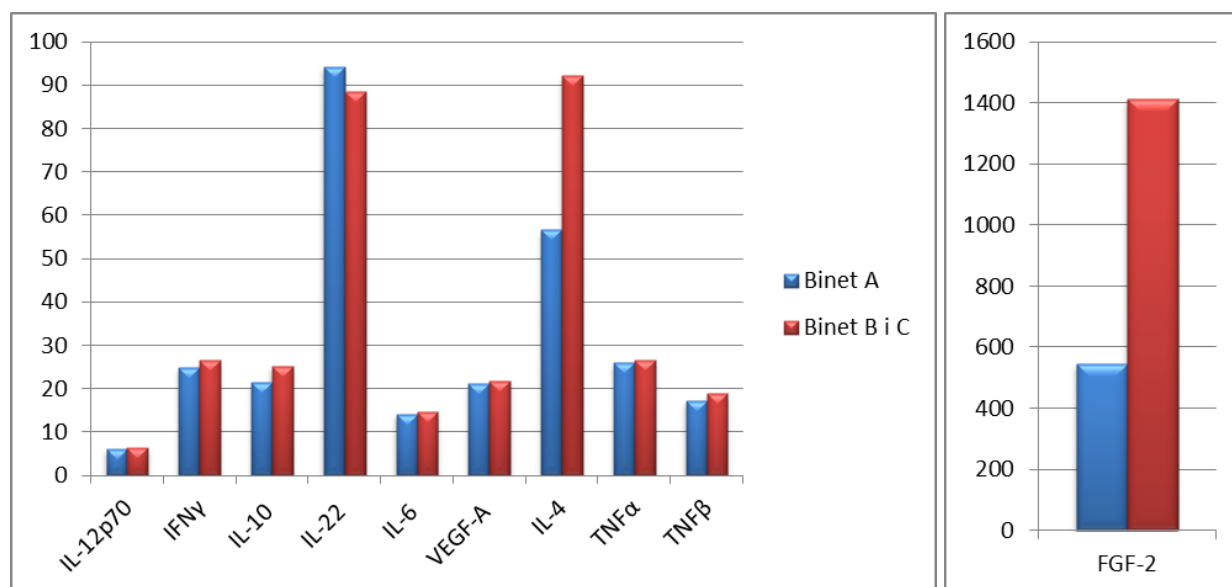
Прорачуната *cut off* вредност од 14,47pg/ml, уз специфичност од 75,0% и сензитивност од 75,0%, сврстава концентрацију *IL-6* у серуму пацијената у врло добар маркер за предикцију прогнозе болести. (area = 0.782, p = 0.010).

Упоређивани су и параметри концентрације цитокина у супернатанту костне сржи у разликовању виског и ниског стадијума боелсти. Резултати су приказани табеларно (Табела 4.3.2) и графички (Слика 4.3.13)

Супернатант костне сржи Цитокини	Концентрација цитокина <i>pg/ml</i>		Статистичка значајност (p)
	<i>Binet A</i>	<i>Binet B i C</i>	
IL-12p70	6,25 (2,47-6,125)	6,53 (3,9-7,33)	0,802
IL-22	94,31 (82,32-110,97)	88,4 (81,135-106,56)	0,599
IFNγ	24,91 (20,39-32,67)	26,57 (17,58-30,87)	0,698
IL-10	21,37 (18,79-40,58)	25,22 (20,55-27,43)	0,599
IL-6	14,21(12,93-14,95)	14,8 (14,01-15,75)	0,082
VEGF-A	21,07 (17,14-90,12)	21,9 (15,12-24,65)	0,507
FGF-2	547,14 (299,64-1106-24)	1412,21 (530,98-3999,8)	0,048
IL-4	56,64 (25,52-125,86)	92,25 (46,63-114,77)	0,837
TNFα	25,92 (20,71-36,23)	26,54 (19,16-34,41)	0,945
TNFβ	17,31 (14,93-19,94)	18,85 (16,94-20,34)	0,568

Табела 4.3.2 Концентрације цитокина у супернатанту костне сржи пацијената у нижем (*Binet A*) и вишем стадијуму болести (*Binet B и C*)

Значајну разлику и потенцијални прогнозни значај има само одређивање концентрације FGF-2 у супернатанту костне сржи пацијената, која је већа у вишем стадијуму болести. ($p=0,048$).



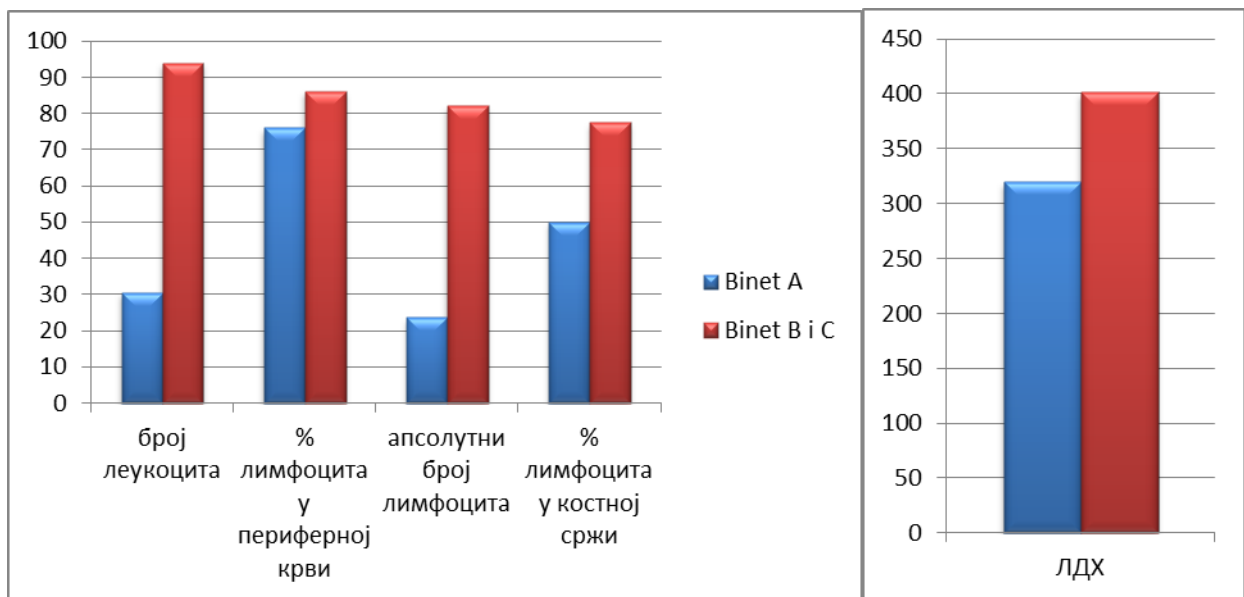
Слика 4.3.13 Концентрације цитокина у супернатанту костне сржи пацијената у нижем (*Binet A*) и вишем стадијуму болести (*Binet B и C*)

Концентрације IFN γ , IL-10, VEGF-A, FGF-2, TNF α , IL-, IL-12p70, IL-6, и TNF β су више у стадијуму *Binet B и C*, док је концентрација IL-22, виша у стадијуму *Binet A* при чему само је разлика у концентрацији FGF-2 статистички значајна.

Приказани резултати показују да је у *Binet A* клиничком стадијуму болести у супернатанту костне сржи повишене концентрације *IL-22*, док су *IL-12p70*, *IFN γ* , *IL-10*, *IL-6*, *IL-4*, *VEGF-A*, *FGF-2*, *TNF α* и *TNF β* ниже него у *Binet B* и *C* стадијуму болести. Једино концентрација *FGF-2* у супернатанту костне сржи показује статистички значајну разлику између ниског и високог стадијума болести, али нема довољну сензитивност и специфичност да буде коришћена као прогнозни параметар.

4.4 Параметри крвне слике, инфилтрације костне сржи и биохемијски параметри (ЛДХ) као параметри разликовања пацијената у различитим стадијумима болести

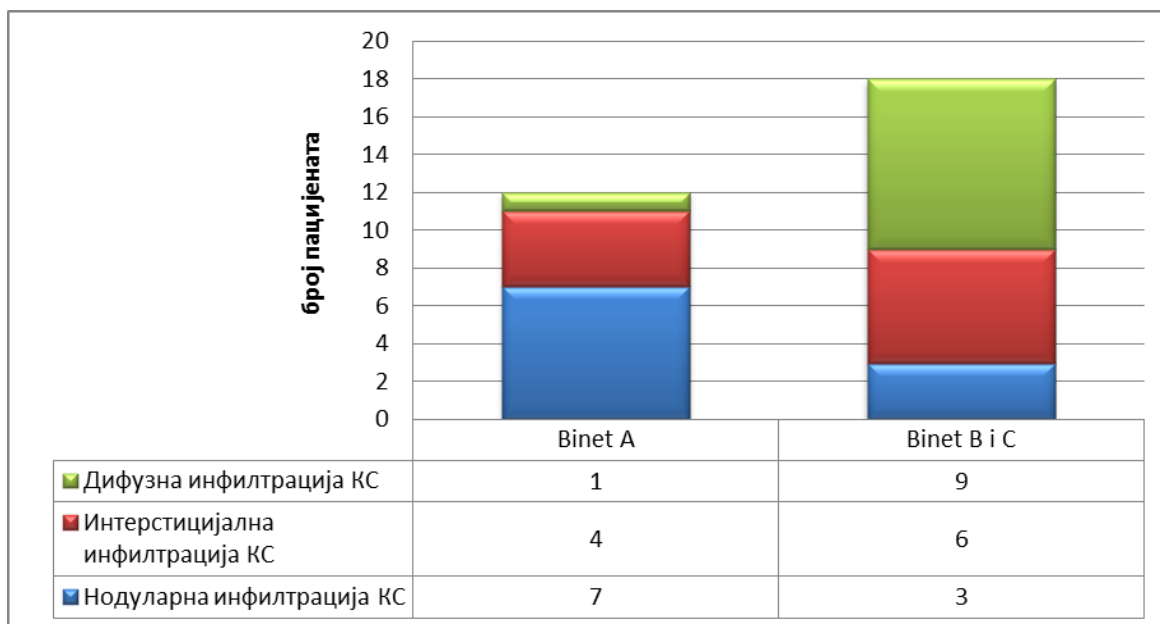
Стандардни прогнозни маркери (биохемијски (ЛДХ), као и број леукоцита, проценат лимфоцита, тип инфилтрације костне сржи) посматрани су као параметри потврде прогнозе пацијената ниског и високог клиничког стадијума. Ови резултати приказани су графички (Слика 4.4.1) и показују да је ниво ЛДХ виши у групи високог ризика 401,5 (322-704), него у групи ниског ризика 381,5 UI/l (277,5-350,5), али без статистички значајне разлике, $p=0,08$. Остали параметри показују јасну статистички значајну разлику између високог и ниског клиничког стадијума и то: апсолутни број леукоцита низак стадијум 30,6 (21,95-38,05), висок стадијум 86,11 (79,31-90,14), $p<0,0005$, проценат лимфоцита у периферној крви низак стадијум 76,12 (65,78-80,77), висок стадијум 86,11 (79,31-90,14), $p=0,001$, апсолутни број лимфоцита у периферној крви низак стадијум 23,6 (14,6-29,07), висок стадијум 82,01 (55,68-91,24), $p=0,000$, проценат лимфоцита у костној сржи низак стадијум 50 (40-52,5), висок стадијум 77,5 (65-85), $p=0,001$.



Слика 4.4.1 Упоредни приказ односа вредности броја леукоцита, % лимфоцита у периферној крви, апсолутни број лимфоцита, % лимфоцита у костној сржи и нивоа ЛДХ код пацијената нижег и вишег клиничког стадијума

Сви посматрани параметри показују јасно више вредности у вишем стадијуму болести са статистичком значајношћу.

Што се тиче типа инфилтрације костне сржи малигним ХЛЛ лимфоцитима, пацијенти са ниским клиничким стадијумом имали су претежно заступљену нодуларну инфилтрацију, док су пацијенти у високом клиничком стадијуму имали претежно заступљену дифузну инфилтрацију. Интерстицијална инфилтрација као интермедијарни фактор ризика, био је процентуално подједнако засупљен у обе групе.(слика 4.10) Пронађена разлика у типу инфилтрације костне сржи малигним ХЛЛ лимфоцитима статистички је значајна. $p= 0,025$.

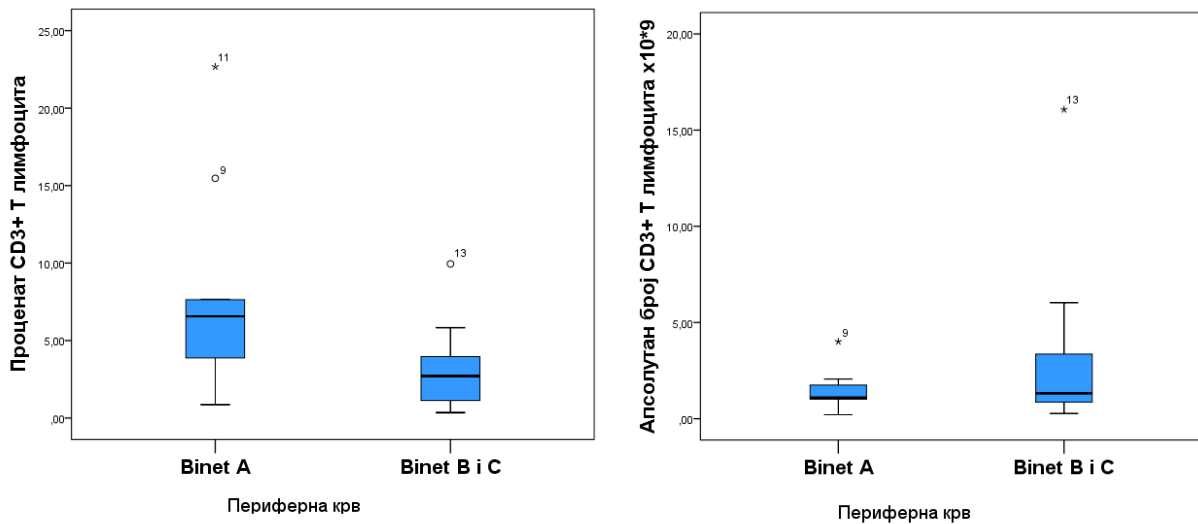


Слика 4.4.2 Упоредни приказ типа инфилтрације костне сржи код пацијента у нижем (Binet А) и вишем стадијуму болести (Binet В и С).

Пацијенти у нижем стадијуму болести доминантно имају нодуларно инфилтрацију костне сржи, док пацијенти у вишем стадијуму болести доминантно имају дифузну инфилтрацију костне сржи. Интерстицијална инфилтрација као интермедијерни фактор ризика подједнако је заступљена у обе групе. ($p= 0,025$)

4.5. Процент и апсолутни број Т лимфоцита периферне крви као параметар разликовања пацијената у различитим стадијумима болести

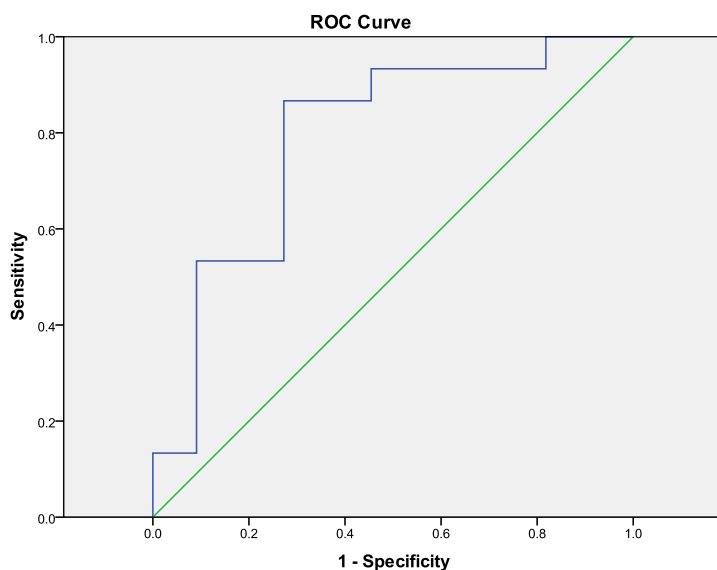
Као додатни маркер прогнозе пацијената оболелих од ХЛЛ-а у овој студији посматран је и проценат Т лимфоцита у периферној крви као и апсолутан број Т лимфоцита, изражен као $CD3+$ лимфоцити. Када се упореди проценат $CD3+$ лимфоцита он је значајно виши код пацијанта *Binet A* клиничког стадијума 6,56 (3,88-7,364), према *Binet B i C* клиничком стадијуму 2,71 (1,13-3,96), $p=0,013$, док апсолутни број $CD3+$ лимфоцита није показао значајне разлике код пацијената различитог клиничког стадијума: *Binet A* 1,1 (1,01-1,74), наспрам *Binet B i C* 1,31 (0,86-3,36). ($p=0,683$). (Слика 4.5.1)



Слика 4.5.1 Упоредна анализа процента $CD3+$ лимфоцита у периферној крви (лево) и апсолутног броја $CD3+$ лимфоцита (десно) у периферној крви пацијената високог и ниског клиничког стадијума хроничне лимфоцитне леукемије

Процент $CD3+$ лимфоцита у периферној крви пацијената оболелих од ХЛЛ значајно је већи у нижем стадијуму болести у односу на виши стадијум болести, док у апсолутном броју $CD3+$ лимфоцита није било детектоване разлике.

Добијена статистички значајна разлика клиничких стадијума у вредности процента $CD3+$ лимфоцита у периферној крви тестирана је кроз програм за генерисање ROC кривих који је показао да је овај параметар врло добар маркер за разликовање *Binet A* наспрам *Binet B i C* клиничког стадијума (area = 0.788, $p = 0.014$). (Слика 4.5.2)



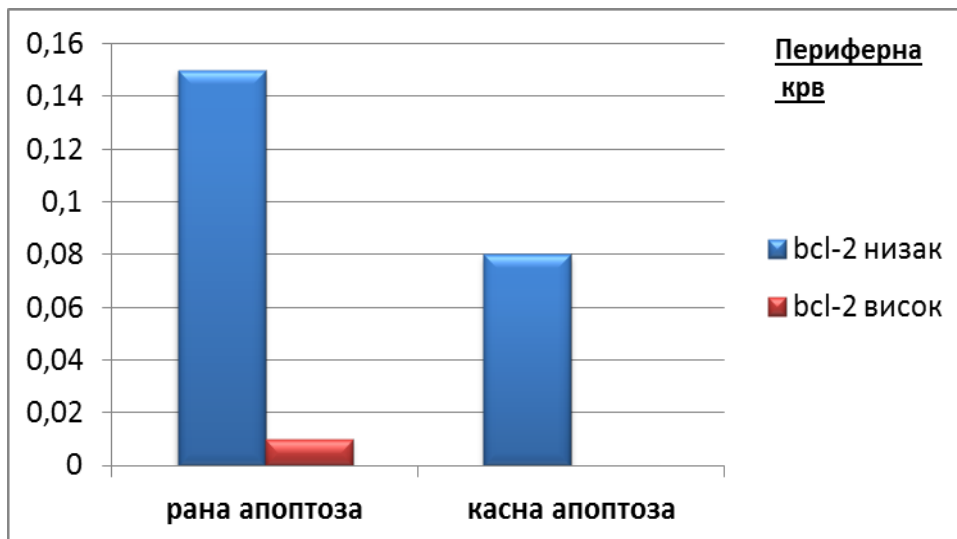
Слика 4.5.2 ROC крива сензитивности и специфичности одређивања процента CD3+ лимфоцита у периферној крви за разликовање нижег и вишег стадијума болести

Сензитивност од 86,7% и специфичност од 72,7% одређивања процента CD3+ лимфоцита у периферној крви класификују овај параметар као врло добар маркер за диференцијацију вишег и нижег стадијума болести. (area = 0.788, p = 0.014)

Cut-off вредност од 4.46%, уз сензитивност 86.7 %, и специфичност 72.7 % указује да уколико код нашег пацијента пронађемо вредности процента CD3+ лимфоцита, већи од 4,46%, пацијент је врло вероватно у нижем стадијуму болести, са бољом прогнозом.

4.6 Апоптоза лимфоцита периферне крви, али не и костне сржи зависи од нивоа експресије *bcl-2*

Посматрана подела пацијената на оне који експримирају низак ниво *bcl-2* молекула и висок ниво *bcl-2* молекула, указала је на значајне разлике у нивоима ране и касне апоптозе. Рана апотоза у периферној крви пацијената са ниском *bcl-2* експресијом 0,15% (0,03-0,325), значајно је виша у односу на пацијенте са високом *bcl-2* експресијом 0,01% (0,00-0,035), **p=0,011**. Вредности касне апоптозе такође показују виши ниво касне апоптозе код пацијената са ниском *bcl-2* експресијом 0,08% (0,01-1,175) у односу на високу експресију 0,00% (0,00-0,00) **p=0,007**. (слика 4.6.1)



Слика 4.6.1 Упоредна анализа процента лимфоцита у раној и касној апоптози периферне крви код пацијанта са ниском и високом експресијом *bcl-2*

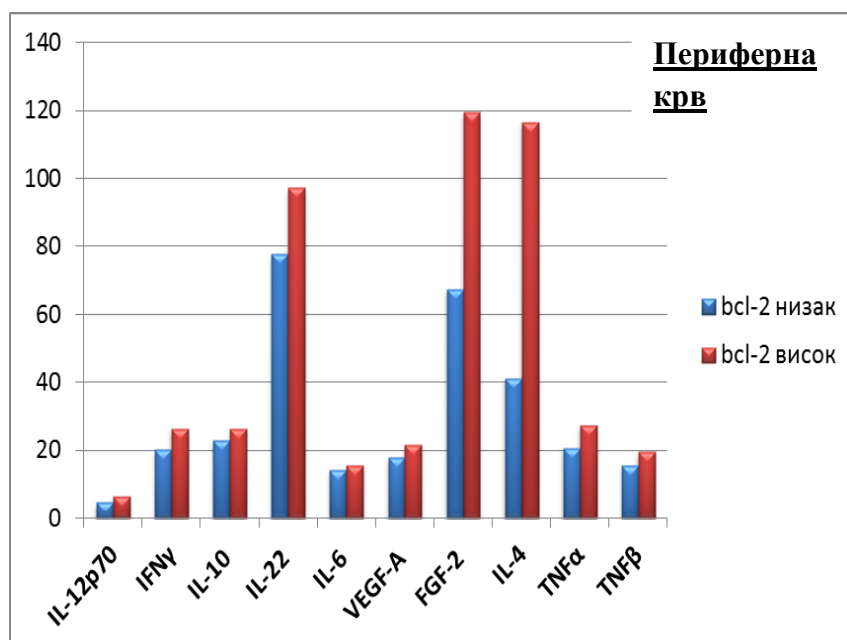
Процент лимфоцита периферне крви у раној и касној апоптози значајно је виши у ћелијама које експримирају нижи ниво *bcl-2*. ($p=0,011$ и $p=0,007$)

Код ових пацијената посматране су и разлике у цитокинском профилу плазме пацијената. Вредности концентрације цитокина приказане су табеларно. (табела 4.6.2) Резултати су указали на статистички значајно више концентрације *IL-12p70*, *IFN γ* , *IL-10*, *IL-4*, *FGF-2*, *TNF α* , *TNF β* код пацијената са високом експресијом *bcl-2*, што се још боље може видети на графикону, (Слика 4.6.3)

Плазма Цитокини	Концентрација цитокина <i>pg/ml</i>		Статистичка значајност (<i>p</i>)
	Низак <i>bcl-2</i>	Висок <i>bcl-2</i>	
IL-12p70	4,65 (2,49-5,29)	6,46 (5,065-10,89)	0,002
IL-22	77,61 (69,37-96,46)	97,26 (78,40-106,55)	0,067
IFNγ	20,1 (15,85-23,41)	26,38 (23,31-34,21)	0,037
IL-10	22,82 (20,65-24,59)	26,38 (23,31-39,79)	0,026
IL-6	14,27 (13,88-15,61)	15,34 (13,88-16,16)	0,595
VEGF-A	17,72 (13,46-26,26)	21,58 (17,92-36,93)	0,061
FGF-2	67,46 (30,565-113,435)	119,51 (71,30-196,15)	0,033
IL-4	41,20 (25,51-92,25)	27,43 (23,0-46,94)	0,009
TNFα	20,69 (17,625-24,93)	27,43 (23,0-46,94)	0,005
TNFβ	15,46 (14,66-18,95)	19,44 (17,98-21,27)	0,033

Табела 4.6.2 Концентрација цитокина у плазми пацијената оболелих од ХЛЛ чији лимфоцити показују ниску и високу експресију *bcl-2* молекула

Плазматске концентрације *IL-12p70*, *IFN γ* , *IL-10*, *IL-4*, *FGF-2*, *TNF α* , *TNF β* показују разлике у зависности од нивоа експресије *bcl-2*, са високом статистичком значајношћу.

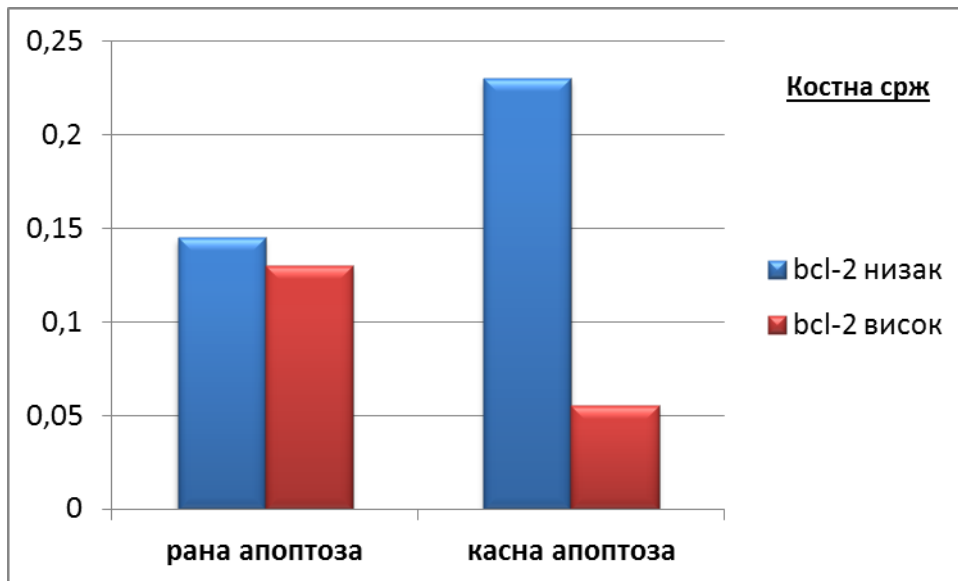


Слика 4.6.3 Концентрација цитокина у плазми пацијената оболелих од ХЛЛ чији лимфоцити показују ниску и високу експресију *bcl-2* молекула

Плазматске концентрације свих посматраних цитокина биле су више код пацијената са високом експресијом *bcl-2*, од којих су концентрације *IL-12p70*, *IFN γ* , *IL-10*, *IL-4*, *FGF-2*, *TNF α* , *TNF β* са високом статистичком значајношћу.

Процент лимфоцита у раној апоптози у костној сржи пацијената са ниском *bcl-2* експресијом 0,185% (0,03-0,51), виша у односу на пацијенте са високом *bcl-2* експресијом 0,13% (0,01-0,32) иако ова разлика није статистички значајна. $p=0,454$. Вредности касне апоптозе такође показују виши ниво касне апоптозе код пацијената са ниском *bcl-2*

експресијом 0,23% (0,06-1,34) у односу на високу експресију 0,055% (0,03-0,42) али такође без статистички значајне разлике. $p=0,194$. (слика 4.6.4)



Слика 4.6.4 Упоредна анализа процента лимфоцита у раној и касној апоптози костне сржи код пацијанта са ниском и високом експресијом *bcl-2*

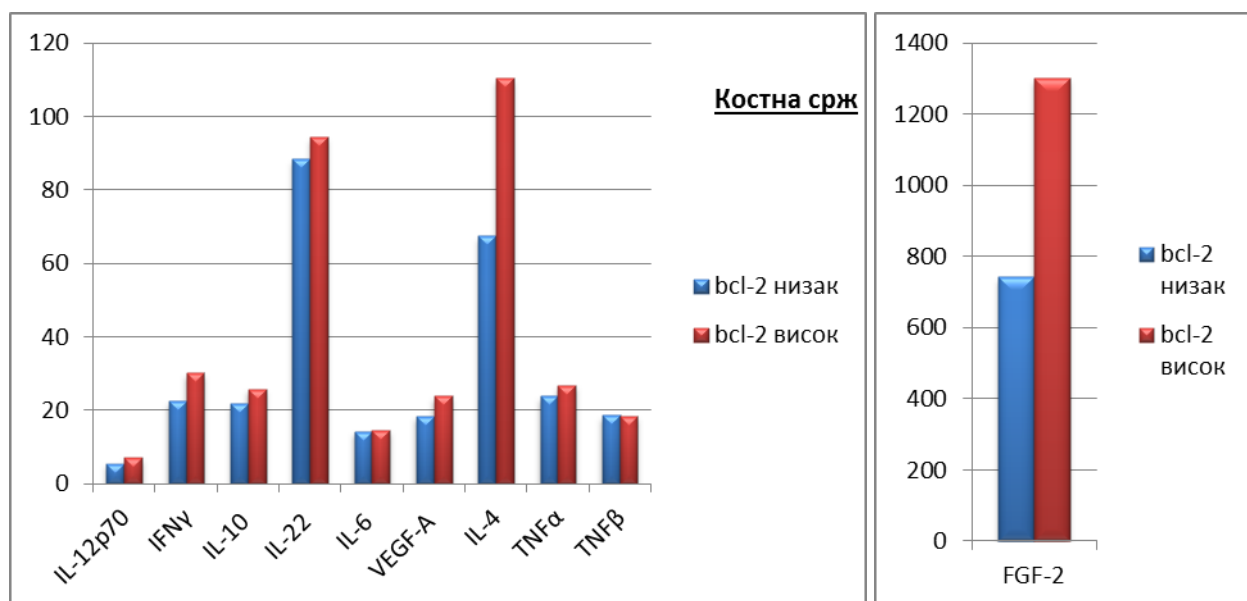
Процент лимфоцита периферне крви у раној и касној апоптози не разликује се у зависности од нивоа експресије *bcl-2*.

Код ових пацијената посматране су и разлике у цитокинском профилу супернатанта костне сржи пацијената. Концентрације цитокина приказане су табеларно. (Табела 4.6.5) Резултати су указали на статистички значајне разлике међу посматраним групама пацијената у нивоима *IL-12p70*, *IL-4*, *VEGF-A*, и *TNF α* што се још боље може видети на графикаону. (Слика 4.6.6)

Костна срж Цитокини	Концентрација цитокина pg/ml		Статистичка значајност (p)
	Низак bcl-2	Висок bcl-2	
IL-12p70	5,565 (3,0-6,67)	7,07 (4,78-8,1)	0,039
IL-22	88,4 (81,53-104,29)	94,315 (82,32-111,32)	0,062
IFNγ	22,43(18,99-28,16)	30,215 (21,63-39,84)	0,085
IL-10	21,85 (18,57-26,12)	25,73 (21,85-47,72)	0,401
IL-6	14,27 (14,01-15,34)	14,67 (13,12-15,34)	0,541
VEGF-A	18,53(13,82-22,44)	23,98 (20,30-110,28)	0,019
FGF-2	741,99(199-1369,57)	1300,3 (466,14-2499,51)	0,376
IL-4	67,44 (23,37-100,75)	110,33 (48,28-140,51)	0,050
TNFα	23,96(18,48-29,95)	26,80 (25,92-45,53)	0,044
TNFβ	18,65 (16,56-19,64)	18,46 (15,46-21,68)	0,603

Табела 4.6.5 Концентрација цитокина у супернатанту костне сржи пацијената оболелих од ХЛЛ чији лимфоцити показују ниску и високу експресију bcl-2 молекула

Концентрације *IL-12p70*, *VEGF-A*, *IL-4* и *TNF α* , показују разлике у зависности од нивоа експресије *bcl-2*, са статистичком значајношћу.



Слика 4.6.6 Концентрација цитокина у плазми пацијената оболелих од ХЛЛ чији лимфоцити показују ниску и високу експресију bcl-2 молекула

Концентрације свих посматраних цитокина, осим *TNF β* биле су више код пацијената са високом експресијом *bcl-2*, али су само концентрације *IL-12p70*, *VEGF-A*, *IL-4* и *TNF α* показале статистичку значајност.

5 ДИСКУСИЈА

У нашем истраживању испитивали смо потенцијалне разлике у експресији прогнозних маркера, проценту апоптотичних ћелија као и концентрацијама цитокина у периферној крви и костној сржи пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије, а са циљем њихове могуће употребе у процени тока болести. Обзиром да су у клиничкој пракси присутни и узорци периферне крви и костне сржи, намеће се питање за који параметар треба користити који тип узорка, на шта је ова дисертација и покушала да да одговор.

5.1 Прогнозни маркери

5.1.1 *CD38*

CD38 представља убиквитаран површински молекул ког експримирају бројне ћелије организма. (114). Представља трансмембрански гликопротеин тип 2, који се састоји од кратког цитоплазматског репа, кратког једноструког трансмембранског дела и дугачког екстрацелуларног домена.(114) Првобитно пронађен као рецептор на Т ћелијама са улогом преноса сигнала за цитокинску продукцију, откривен је и на Б лимфоцитима. Такође бројна истраживања показала су и експресију *CD38* на ХЛЛ лимфоцитима, који делује као снажан преносник сигнала за ћелијску пролиферацију. (115)

CD38 остварује своју улогу као ектоензим и као рецептор који омогућава снажан флуks калцијума у ћелију, покреће фосфорилацију каскаде интрацелуларних субстрата и последично активацију нуклеарног фактора *NF- κ B* комплекса. Последице ових интрацелуларних догађаја су различита и зависе од матурације Б лимфоцита. Активација *CD38* на мембрани Б лимфоцитних прекурсора супимира Б лимфопоезу индукцијом апоптозе. (116) Супротни ефекти уочени су код зрелих циркулишућих Б лимфоцита и Б ћелија у тонзиларним герминативним центрима, где активација *CD38* води Б лимфоцит у пролиферацију, инхибицију апоптозе и цитокинску секрецију.(117)

Експресија *CD38* на лимфоцитима оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије повезана је са пролиферацијом малигног клона, интракцијом малигног клона са микросредином. (118) и лошијом прогнозом. Прогнозни потенцијал и евентуална рефрактерност у терапији *CD38+* ХЛЛ није последица само повећане пролиферације малигног клона, него и веће

вероватноће генетских грешака које се дешавају током ДНК репликације. Овај ефекат је и доказан кроз већу учесталост генетских абнормалности (*11q* и *17p* делеције) код пацијената са присутном експресијом *CD38*. (119.)

У нашем истраживању одређивали смо експресију маркера *CD38* на малигним лимфоцитима изолованим из две различите микросредине, периферне крви и костне сржи. Истраживање је показало сигнификантно већи број позитивних лимфоцита у костној сржи, него у периферној крви пацијената, али је ниво експресије овог маркера изражен као средњи интензитет флуоресценце (*Median Fluorescence Intensity - MFI*) вредност већи у периферној крви него у костној сржи пацијената. Као и у нашим налазима *Ghia* и сарадници, (120) такође су доказали да је експресија у костној сржи овог молекула виша него у периферној крви, док *Јакшић* и сарадници (121), *Hamblin* и сарадници (122.), *D'Arena* и сарадници (123), нису потврдили постојање ове разлике.

Обзиром да је већ предочено да су пролиферативни центри малигних ХЛЛ лимфоцита смештени у костној сржи и лимфоидним органима, а повећана пролиферација у овим центрима за последицу има увећање броја циркулишућих малигних ћелија, јасно је да између ових компартмента постоји стална циркулација малигних лимфоцита. Ова интракција посредована је и *CD38* молекулом. *CD38* молекул се везује за свој рецептор (*CD31*) који је експримиран на различитим ћелијама, почевши од ендотелних ћелија, моноцита, самих малигних ХЛЛ лимфоцита, стромалних ћелија дадиља у костној сржи и лимфном чвору, али и периферној крви где посредством *CCL3* и *CCL4* омогућава регрутацију моноцита из периферне крви ка костној сржи. (124) Са друге стране веза *CD31* молекула са *CD38* у костној сржи и лимфним чворовима као и пролазак малигних лимфоцита ка овим компартментима олакшан је и присуством хемокина, стромалног фактора (*Stromal derived factor-1 (SDF-1 α)/CXCL12*) ког производе ћелије дадиље, а који делује посредством специфичног рецептора *CXCR4* који се налази у неодвојивом комплексу са *CD38*. (125) Када се ХЛЛ лимфоцит нађе у овим пролиферативним центрима подложен је дејству *IL-2* ког производе Т лимфоцити ових микросредине у контакту са *CD38* молекулом, али и *CD40L*, *IL-4* (126) што за последицу има усходну регулацију експресије овог молекула која када достигне своју критичну концентрацију на површини ћелије почиње да преноси унутар ћелије снажне пролиферативне сигнале (47).

Ови налази указују да је експресија *CD38* регулисана од стране микросредине у којој се ХЛЛ лимфоцит нашао, и може послужити као маркер активираниог или скорије активираниог малигног клона. *Calissano* и сарадници (127) описали су да је експресија *CD38* варијабилна, и да *CD38* позитивни ХЛЛ лимфоцити могу постати *CD38* негативни

што је и потврђено подацима да *CD38* позитивне и *CD38* негативне ћелије имају исту дужину теломере и да нема клоналне еволуције *CD38+* клона (128), чиме се може објаснити добијена разлика у експресији, али и интензитету експресије овог молекула на ХЛЛ лимфоцитима узоркованим из периферне крви и костне сржи.

Обзиром на овако потврђену динамику експресије *CD38* молекула на површини ХЛЛ лимфоцита неће се и питање у којој средини експресија *CD38* молекула даје бољи увид у прогнозу пацијента оболелог од ХЛЛ-а. Из тог разлога пацијенте смо поделили у групу нижег клиничког стадијума (*Binet A*) и вишег клиничког стадијума (*Binet B* и *C*). Добијене разлике указале су да је када се посматра проценат ћелије које експримирају *CD38*, експресија у костној сржи прави већу разлику у односу на групе различитог клиничког стадијума, што се и може објаснити већим пролиферативним потенцијалом у костној сржи, иако је већи број ових резултата на самој граници позитивности (30%), док је у периферној крви ова разлика занемарљива. Ипак када се према актуелним критеријума више од 30% *CD38+/CD19+* лимфоцита класификује као позитиван (122), овај резултат у периферној крви показује сигнификантну разлику клиничких стадијума, док у костној сржи ове разлике нема.

Ghia и сарадници (120) су предложили и занимљив модел тумачења експресије *CD38*, не као позитивне и негативне, већ као образац експресије овог молекула. Пацијенте су поделили на оне који апсолутно експримирају *CD38*, који не експримирају *CD38* и они код којих се детектују две популације лимфоцита и *CD38+* и *CD38-*, које су тумачили као бимодалну експресију. Пацијенти са *CD38+* имају најлошију прогнозу, пацијенти који су *CD38-* најбољу, док су пацијенти са бимодалном експресијом такође са лошом прогнозом, мада се у клиничкој пракси овакви пацијенти често класификују као *CD38-*. Обзиром на претходно анализирани радове може се предпоставити да је бимодална експресија последица усходне регулације експресије *CD38* у интеракцији са пролиферативним нишама костне сржи и лимфних чворова, након чега је дошло до рецикулације *CD38+* ХЛЛ лимфоцита, али и даље без достизања прага дијагностике (мање од 30% позитивних ХЛЛ лимфоцита). Овај рад даје добру основу за могуће објашњење резултата добијених у овој тези, да детекција експресије *CD38* молекула по до сада утврђеним стандардима (>30% позитивних лимфоцита) у периферној крви, пре него у костној сржи боље раздваја пацијенте са ниским и високим ризиком за брзу прогресију болести, иако су првобитни резултати упоређивања процента *CD38+* ћелија дале предност костној сржи као бољем прогнозном параметру.

5.1.2 CD49d

CD49d представља површински протеински молекул из фамилије α -интегрина, прецизније $\alpha 4$ интегрин. У хроничној лимфоцитној леукемији игра важну улогу у активацији и преживљавању леукемијског клона и такође олакшава интеракцију између леукоцита и стромалних ћелија. (129). *CD49d* се налази удружен са *CD29* ($\beta 1$ интегрин), па тако формирају комплекс назван *VLA-4* (*Very Late Antigen-4*), који се експримира на леукоцитима, укључујући Т и Б лимфоците и *CD34+* прогениторским ћелијама. (130) Овај комплекс је најчешћи комплекс у који улази *CD49d* и детектован је на ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије.(131)

Директно дејство овог молекула остварује се преко везивања за друге молекуле и то за $\beta 7$ интегрин које помаже везивању за мукозни адресин адхезиони молекул 1, и тиме олакшава пролазак лимфоцита кроз интестинална лимфоидна ткива, што је посматрано као важан патогенески механизам код лимфома. (132), али није доказан као механизам од значаја код хроничне лимфоцитне леукемије.

Други, важнији механизам дејства *CD49d* остварује се кроз повезивање са васкуларним адхезионим фактором 1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1 – VCAM-1*) и фибронектином.(133, 134). Ова веза од круцијалног је значаја за хематопоезу и то за одговарајући диференцијацију и сазревање свих хематопоеетских линија (135), али што је још значајније и за насељавање и задржавање прогениторских ћелија у костној сржи (136).

Експресија *CD49d* на површини ХЛЛ лимфоцита може имати различите улоге у патогенези, а што је можда и значајније у току и прогнози хроничне лимфоцитне леукемије. Наши резултати показали су да се експресија *CD49d* молекула на површини малигног лимфоцита разликује у зависности од микросредине из које је лимфоцит узоркован, и то већи проценат *CD49d+* малигнух лимфоцита, али и виши интензитет експресије, детектовани су на лимфоцитима узоркованих из костне сржи, што су показали и *Brachtl* и сарадници (137)

Експресија овог молекула на површини ћелије олакшава миграцију ХЛЛ лимфоцита кроз ендотел и то кроз везу са *VCAM-1* на ендотелним ћелијама, због чега је израженија лимфоденопатија и инфилтрација костне сржи код пацијената који имају експримован *CD49d*. (137), али за разлику од нормалних Б лимфоцита, улазак малигнух ХЛЛ лимфоцита у костну срж не захтева присуство леукоцитног адхезионог фактора 1 (ЛФА-1), већ само *CD49d*, што додатно олакшава улазак у костну срж. Једном када је лимфоцит доспео у микросредину костне сржи, постаје подложен другим утицајима ове

микросредине и то посредством индуковања *NF-κB* сигналног пута (138), али и интеракција се васкуларним ендотелом и *CD40L+* фибробластима (139). Тада долази до усходне регулације и повећаног експримирања *CD49d* на површини лимфоцита чиме се директно објашњавају резултати добијени у нашем истраживању. *CD49d* у *VLA-4* комплексу у костној сржи, посредством везе са *VCAM-1* или фибронектином стромалних ћелија костне сржи, има неколико важних функција. Са једне стране доприноси усходној регулацији *bcl-2* и *bcl-xL* и нисходној регулацији *Wah* што доприноси инхибицији апоптозе и дужем преживљавању лимфоцита (140), а са друге стране доприноси преживљавању лимфоцита и кроз везу са *MMP9* и *CD44v*, која активира *Lyn-STAT3-mcl-1* антиапоптотску сигналну каскаду. (141) *CD49d* је покушан да се доведе и у везу са повећаним пролиферативним потенцијалном ХЛЛ лимфоцита, али то још увек није доказано.

Иако је *CD49d* до сада доказан као независни прогнозни параметар (142), није било студија које су упоређивале прогнозни значај одређивања експресије *CD49d* на малигним лимфоцитима узоркованих из различитих микросредина. Резултати наше студије, слично као и код *CD38* молекула, показују да је експресија *CD49d* у костној сржи прави већу разлику међу групама високог и ниског ризика од процента експресије у периферној крви, док у интензитету флуоресценце нема разлике. Када се као позитиван класификује резултат од више од 30% *CD49d+/CD19+* лимфоцита (142) добија се статистички значајна разлика између група различитог клиничког стадијума само код лимфоцита узоркованих из периферне крви, док из костне сржи ове разлике нема. Овај резултат се може објаснити рецикулацијом лимфоцита из костне сржи, али и чињеницом да је усходном регулацијом *CD49d* молекула у костној сржи повећана експресија овог молекула и *CD49d* негативне пацијент доводи до вредности блиске *cut off* вредности, које немају прогнозни значај.

Brachtl и сарадници су одлично објаснили заједничку улогу *CD38* и *CD49d* у току хроничне лимфоцитне леукемије, при чему *CD49d* експримиран на ХЛЛ лимфоциту омогућава улазак малигног лимфоцита у "заштитне нише" лимфног чвора и костне сржи, док експримиран *CD38* омогућава везивање малигног лимфоцита за ћелије дадиле и покретање целог механизма убрзане ћелијске пролиферације, што заједно доприноси бржој прогресији хроничне лимфоцитне леукемије. (127) Ово потврђују и наши резултати који су показали да је експресија *CD49d* и *CD38* у позитивној корелацији и у периферној крви и у костној сржи, али упоредна анализа показала је да ипак само експресија ових маркера у периферној крви прави статистички значајну разлику између група *Binet B* и *C* са једне стране и *Binet A* клиничког стадијума са друге стране.

5.1.3. ZAP-70

ZAP-70 представља протеинску тирозин киназу која је иницијално детектована у Т лимфоцитима, са улогом покретања активационе каскаде као последицу активације Т ћелијског рецептора. (143) Ова тирозин киназа није иницијално детектована у Б лимфоцитима, јер је код њих улога у преносу сигнала са Б ћелијског рецептора и иницирање активационе каскаде припада *syk* кинази.

Током испитивања патогенезе и прогнозе хроничне лимфоцитне леукемије, као сурогат маркер немутираним варијабилним регионима за тешки ланац имуноглобулина, откривена је експресија ZAP-70 у малигним Б лимфоцитима, која је кроз каснија испитивања проглашена независним маркером лоше прогнозе. (144). Иако се најпре веровало да је у појединим агресивним облицима хроничне лимфоцитне леукемије ZAP-70 преузео покретање активационе каскаде по стимулацији БЋР, сада се зна да је он само помоћни фактор, док *syk* киназа и даље има најзначајнију улогу. (45)

Ћелије ХЛЛ-а које експримирају ZAP-70 осетљивије су на везивање антигена, нарочито *IgM* класе, након чега започиње низ активационих догађаја. (145). На почетку сваког од њих је свакако фосфорилација протеинских киназа и то у првом реду *syk* киназе и ZAP-70. Тачна улога ZAP-70 није потпуно разјашњена, али постоје два могућа објашњења. Једно да је његова основна улога у стабилизацији фосфорилисане *syk* киназе и на тај начин посредно нагомилавање њене активне форме у ћелији, а друго да ZAP-70 функционише као појачивач сигнализације путем БЋР и има улогу у смањивању прага за фосфорилацију *syk* киназе (146) Којим год начином да ZAP-70 олакшава или продужава активацију БЋР, ефекат ове активације огледа се у покретању путева продуженог преживљавања. Са једне стране активира се антиапоптотска каскада преко *NF-κB* сигналног пута, а са друге стране омогућава појачан флуks калцијума у ћелију који има улогу у расту и пролиферацији. (147)

Експресија ZAP-70 предмет је бројних истраживања, не толико у патогенези и току болети, већ у покушајима да се на што бољи начин стандардизује метода његовог одређивања, јер су бројни контраверзни литературни подаци управо везани за ову проблематику. Одређивање ZAP-70 помоћу проточне цитометрије, најједноставнији је и најприступачнији вид одређивања за бројне и мање лабораторије, али је стандардизација ове методе већ годинама дискутабилна. У нашој дисертацији, предложили смо један модел одређивања ZAP-70, који је по методологији најприближнији предложеном од стране *Rizzo* и сарадника (148), али смо у нашем раду одређивање вршили из замзнутих

узорака током једног дана, како подешавања апарата или трајност реагенаса не би утицали на одређивање. Одређивана експресија *ZAP-70* у ХЛЛ лимфоцитима различитих микросредина показала је да већи проценат лимфоцита изолованих из костне сржи показује експресију овог молекула у односу на лимфоците изоловане из периферне крви, али да је интензитет експресије већи у периферној крви. Иако у нашој студији нисмо доказали статистичку значајност ове разлике, *Sheridan* и сарадници (149) су у својој студији на већем броју пацијената, али на неупареним узорцима доказали да већи број узорака костне сржи показује позитивност на *ZAP-70* у односу на узорке периферне крви. Већ је раније објашњено да је за пролиферацију и продужено преживљавање малигну лимфоцита потребни строго контролисани услови микросредине костне сржи и лимфног чвора, па су бројни аутори доказивали и улогу *ZAP-70* у овим интеракцијама. Обзиром да у Т лимфоцитима *ZAP-70* предствља есенцијални елемент у *CXCR4*, *Deaglio* и сарадници (150) су претпоставили да би исти механизам могао да буде значајан и у малигним лимфоцитима. Стромални фактор (*Stromal derived factor -1 - SDF1 α*), лиганд за *CXCR4* већ има доказану улогу у ХЛЛ-у као значајан хемотаксин, па је веза малигног лимфоцита и стромалне ћелије костне сржи која се остварује преко овог рецептора од великог је значаја за продужено преживљавање малигног лимфоцита. (151) Активација овог рецептора ин витро, показала је да само ћелије које експримирају *ZAP-70* имају продужено преживљавање, што додатно потврђује чињеницу о улози *ZAP-70* у *CXCR4* активацији. Такође, *Richardson* и сарадници (152) показали да је повећан ниво *CCR7* пронађен код *ZAP-70* позитивних ХЛЛ лимфоцита што повећава могућност његовог везивања за лиганде, *CCL19* и *CCL21*, који су значајни хемокини за Т и Б ћелијску миграцију и опредељују насељавање лимфоидних органа, периферне крви и лимфних чворова. Сви ови налази заједно указују да и *ZAP-70* учествује у миграцији лимфоцита ка костној сржи и лимфном чвору, где постоји повећана пролиферација и продужено преживљавање малигну лимфоцита, али не могу да објасне разлику у експресији између компартмента периферне крви и костне сржи.

Иако је *ZAP-70* до сада у више наврата и студија доказан као несумњиви прогнозни параметар, овде већ наведена разлика у експресији у малигним лимфоцитима периферне крви и костне сржи, није узета у обзир. У нашем раду покушали смо и да донесемо закључак, који тип узорка би био валиднији у процени прогнозе болести код пацијента. Резултати наше студије показали су да када се пацијенти поделе према стадијумима *Binet*, већи проценат ћелија у *Binet A* клиничком стадијуму показује позитивност у периферној

крви, док је у костној сржи, већи број позитивних ћелија у *Binet B* и *C* стадијуму болести. Такође, што се тиче интензитета флуоресценце, он је у костној сржи приближан у различитим стадијумима болести, док је у периферној крви знатно виши у *Binet A* клиничком стадијуму. Међутим када се узме у обзир резултат (*ZAP-70 +* или *ZAP-70 -*) према *cut off* вредности од 20%, углавном узимане од стране аутора, иако разлике нису статистички значајне, дају предност резултату експресије из костне сржи, као валиднијем. Што се корелације тиче, доказали смо да је *ZAP-70* експресија у корелацији са *CD38*, док није уочена корелација са бројем леукоцита, нивоом ЛДХ ии са другим прогнозним маркерима (*CD49d*).

Ове разлике могу се објаснити и методолошки, јер је као референтан узиман однос интензитета флуоресценце изотипске контроле и обележеног моноклонског антитела на *ZAP-70*, која је и показана супериорнија (148) у односу на претходно коришћене методе упоређивања односа интензитета флуоресценце Т и Б лимфоцита, али јој је ограничење у одређивању тачног нивоа експресије.

Са друге стране *Deglesne* и сарадници (153) нису пронашли корелацију статуса *ZAP-70* са другим прогнозним параметрима, као и у нашој студији, док *Gachard* и сарадници (154) тврде да је *ZAP-70* најпозузданији прогнозни параметар и да је у корелацији са свим осталим прогнозним параметрима (стадијумом болести, мутационим статусом, биохемијским параметрима, ЛДТ).

Ипак када посматрамо различите микросредине, и *Zanotti* и сарадници (155) показали су прогнозни значај одређивања експресије *ZAP-70* у малигним лимфоцитима костне сржи у корелацији са свим другим посматраним факторима, а на првом месту са дужином преживљавања и временом које је потребно да пацијент испуни критеријуме за почетак лечења.

5.1.4 Т лимфоцити периферне крви

Иако је хронична лимфоцитна леукемије препозната као малигна алтерација Б лимфоцита, већ годинама је познато да је улога Т лимфоцита у току и развоју болести непобитан чинилац. До данас се зна да је улога Т лимфоцита у хроничној лимфоцитној леукемији веома хетерогена, да они путем међућелијске интеракције, али и путем лучења солубилних фактора (citoкина, хемокина) доприносе продуженом преживљавању леукемијског клона (156), миграцији малигних лимфоцита ка пролиферативним нишама

лимфних чворова и костне сржи (157), али имају и улогу у патогенези бројних компликација хроничне лимфоцитне леукемије као што су аутоимуна хемолитна анемија (АИХА), аутоимуна тромбоцитопенија (158), али и појава секундарних тумора (159). Новија истраживања усмерена у правцу испитивања тачних механизма који су поремећени у функцији Т лимфоцита дошло се до бројних закључака. Код пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије фаворизује се T_H2 имунски ћелијски одговор са значајном инверзијом односа $CD4/CD8$ лимфоцита у периферној крви у корист $CD8+$ лимфоцита. (160) Наивне Т ћелије се највероватније посредством хемокина ($CCL17$ и $CCL22$) секвестрирају према костној сржи и лимфним чворовима, где заједно са стромалним ћелијама интерагују са ХЛЛ лимфоцитима који су ту насељени. Ова интеракција води активацији Т лимфоцита који губе свој фенотип „наивне“ ћелије и репрограмирају се према T_H2 диференцијацији. (161) Са тим у вези, у периферној крви пацијента детектовани су повећани број како регулаторних Т лимфоцита (162), тако и меморијских Т лимфоцита (163). Овако усмерени Т лимфоцити остају активирани дуго, па се у њиховом функционалном испитивању дошло до резултата да су они функционално исцрпљени, слично као код хроничних инфекција (164). Т имунски одговор и компетенција Т лимфоцита измењена је у хроничној лимфоцитној леукемији, али се разликује од пацијента до пацијента, и претходно описане промене нису уочене код пацијената са индолентном формом болести, сугеришући прогнозни значај ових феномена (165). Испитивања са циљем доказивања прогнозног значаја показала су да је повећан број Т лимфоцита меморијског фенотипа у корелацији са неповољном прогнозом болести. (166), али није било студија које су повезивале проценат или апсолутни број Т лимфоцита са прогнозом.

Наши резултати су показали да проценат Т лимфоцита (изражених као $CD3+$) у популацији лимфоцита значајно виши код пацијента ниж *Binet A* клиничког стадијума у односу на *Binet B* и *C* клинички стадијум, што потенцијално може представљати и параметар прогнозе пацијента, док у апсолутном броју Т лимфоцита у периферној крви није било значајне разлике. У односу на већ приказане резултате *Montserrat* и сарадника, наши резултати се могу схватити као различити, јер су ови аутори доказали да је у *Binet B* и *C* клиничком стадијуму повећан број меморијских Т лимфоцита у периферној крви, али без освртања на укупан број Т лимфоцита. Могуће објашњење је управо да се основна протективна улога Т лимфоцита у ХЛЛ-у управо одиграва кроз међусобну интеракцију са малигним клоном у костној сржи и лимфним чворовима, па је код пацијента са лошом

прогнозом број Т лимфоцита у овим нишама повећан, услед повећане миграције, а последично у периферној крви овај проценат је снижен, што смо и показали кроз наше резултате.

5.2 Апоптоза

Поремећај у апоптотским механизмима, одложена апоптоза и продужен живот малигну лимфоцита сматрали су се основним поремећајима у хроничној лимфоцитној леукемији који су водили нагомилавању дугоживећих лимфоцита и на тај начин увећавању малигног клона. Иако је ова претпоставка оповргнута новијим истраживањима у патогенези хроничне лимфоцитне леукемије, и дала велики значај пролиферацији лимфоцита која се одиграва у тзв. пролиферативним нишама костне сржи и секундарних лимфоидних органа, на првом месту лимфних чворова, и даље није умањен значај дисрегулације апоптозе како у патогенези болести, тако и у дијагностици и прогнози.

Иако је овај аспект хроничне лимфоцитне леукемије доста детаљно истражен, литературни подаци ограничени су углавном на *in vitro* студије, а само мали број радио је *ex vivo* испитавања, а у циљу што бољег проучавања *in vivo* услова.

Студије које су проучавале *in vitro* преживљавање ХЛЛ лимфоцита у културама недвосмислено су показале да култивисани ХЛЛ лимфоцити у монокултури имају виши степен апоптозе од култивисаних немалигну Б лимфоцита (167), што је допринело закључку да инхибиција апоптозе ХЛЛ лимфоцита није урођени механизам саме ћелије, већ је последица интеракције малигне ћелије са протективном микросредином.

Апоптозу лимфоцита смо у нашем испитивању посматрали као рану апоптозу код које је дошло само до испољавања фосфатидилсерина на површини ћелијске мембране и касну апоптозу код које је већ дошло до дисинтегритета и једарне и ћелијске мембране и изложености ДНК, у популацији лимфоцита изолованих из периферне крви и костне сржи пацијената. Показали смо да је *ex vivo* рана апоптоза лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије значајно нижа од ране апоптозе лимфоцита периферне крви здравих испитаника. Касна апоптоза такође је била нижа у групи оболелих у односу на здраве испитанике, али је ова разлика мање изражена. Такође, што нам је и био примарни циљ, истраживања је показало да су и рана и касна апоптоза лимфоцита периферне крви, мерене *ex vivo*, ниже од ране и касне апоптозе лимфоцита изолованих из костне сржи. Добијени резултати који су посматрали некрозу лимфоцита периферне крви и костне сржи, дали су веома контрадикторне резултате, издвајајући лимфоците костне сржи као

оне који најпре подлежу некрози, док је проценат некротичних лимфоцита у периферној крви како оболелих, тако и здравих испитаника на доста нижем нивоу. Овај феномен, као и податак о већем проценту апоптотичних ћелија костне сржи, који је у диспропорцији са до сада објављеним резултатима, који бројним доказима фаворизују јаче антиапоптотске сигнале у костној сржи него периферној крви, може се објаснити делом и методолошки. Обзиром да је ово била *ex vivo* студија, узимани узорци су ипак пре одређивања нивоа апоптозе, током процеса изоловања моноклеара, неко време провели ван свог регуларног окружења, што је према резултатима дефинитивно било више стресно за лимфоците костне сржи. Ово индиректно указује да се ХЛЛ лимфоциту у костној сржи највећим делом међућелијским интеракцијама преносе антиапоптотски сигнали, који се прекидају узимањем узорка за испитавање. Врло су оскудне *in vitro* студија које су за своје експерименте узорковали ХЛЛ лимфоците костне сржи, а које би можда показали појачану апоптотску активност након култивације у монокултури у односу на ХЛЛ лимфоците узорковане из периферне крви.

Током нашег истраживања смо одређивали и интрацелуларну експресију два протеина *bcl-2* фамилије и то *bcl-2* и *mcl-1* у малигним лимфоцитима периферне крви и костне сржи и резултат посматрали као високу и ниску експресију. Према нашим резултатима *mcl-1* и *bcl-2* показују већи проценат експресије у периферној крви него у костној сржи, али без статистички детектоване разлике, док су њихове средњи интензитети флуоресценце без детектоване разлике.

Обзиром на презентоване резултате ове дисертације о разлици у нивоу и ране и касне апоптозе код малигнух лимфоцита изолованих из периферне крви и костне сржи, индиректно би се могло рећи да се у ове две различите микросредине, услед интеракција малигног клона са микросредином мења и његова апоптотска активност. Увелико је већ постављена хипотеза о улози микросредине у пролиферацији и преживљавању малигног клона, па су бројне *in vitro* студије, мењањем услова микросредине, покушале да на што бољи и детаљнији начин опишу ову интеракцију. Зна се да је за преживљавање малигног клона неопходно присуство стромалних ћелија костне сржи, ћелија дадиља и фоликуларних дендритских ћелија. Тако су *Pedersen* и сарадници (168), *Burger* и сарадници (169, 170) доказали да у контакту са стромалним ћелијама костне сржи, као и ћелијама дадиљама и фоликуларним дендритским ћелијама, а посредством хемокина и површинских рецептора долази до усходне регулације експресије протеина инхибитора апоптозе из *bcl-2* фамилије. *Smit* и сарадници (171) показали су и да је експресија *mcl-1* у малигним лимфоцитима лимфног чвора израженија него у малигним лимфоцитима

периферне крви. Такође постојање позитивне корелације нивоа *bcl-2* и васкуларног ендотелног фактора раста (VEGF) у лимфном чвору сугерише улогу ендотелних ћелија у усходној регулацији експресије овог антиапоптотског протеина. Улога ендотелних ћелија у интеракцији са ХЛЛ лимфоцитима и усходној регулацији *bcl-2* али у костној сржи потврђена је и од стране *Buggins* и сарадници (172) Усходна регулација *bcl-2* углавном је последица сигнала који се малигном лимфоциту преноси путем везивања преко ЦД40 лиганда, док се усходне регулација *mcl-1* остварује преко *CD40* лиганда, али и преко БТР и *VEGF*. Иако су *bcl-2* и *mcl-1* највише испитивани чланови *bcl-2* фамилије, ни други чланови се не могу искључити, па је тако доста доказа и за експресију *bcl-xL* и *Bfl/A1* која је готово занемарљива у ћелијама које циркулишу у периферној крви, али се зато усходно регулише при култивацији са фибробластима и ендотелним ћелијама са којима остварује везу преко *CD40* лиганда.

Највише доказа у поремећеној апоптотској активности ХЛЛ лимфоцита приписује се поремећеном унутрашњем путу апоптозе, а у највећој мери *bcl-2* протеинској фамилији. Већ деценију уназад, повећана експресија *bcl-2* протеина у малигним ХЛЛ лимфоцитима сматра се главним обележјем ове болести. (172) Биохемијски она се може објаснити хипометилацијом промотерског региона *bcl-2* гена, због чега је он активнији и резултира повећаном синтезом *bcl-2*. (172) Ипак новија истраживања покушала су детаљније да објасне овај феномен, па је тако *Cimino* и сарадници (173) доказао да недостатак микроРНК-15 и 16, чија је физиолошка улога у пост транскрипционој инхибицији *bcl-2*, доприноси повећаној интраћелијској концентрацији *bcl-2*, а недостатак микро РНК-29 доприноси повећаној интраћелијској концентрацији *mcl-1*. Као што је у уводу детаљно описано, *bcl-2* и *mcl-1* представљају протеине инхибиторе апоптозе, који везивањем за активаторне протеине *Bax*, *Bid*, *Puma*, *Noxa* доводе до њихове инхибиције, а самим тим и до снижене апоптозе ћелије.

Наши резултати нису потврдили *in vitro* испитивања која се тичу експресије *bcl-2* и *mcl-1*, али су свакако потврдили постојање разлике у раној и касној апоптози различитих микросредина, што би фаворизовало улогу и неких других антиапоптотских механизма.

Осим описане јасне антиапоптотске улоге *bcl-2* фамилије, није код свих ХЛЛ лимфоцита описана једнака апоптотска инхибиција, па су нивои *bcl-2* и *mcl-1* повезивани са током болести, али и реаговањем на примењивану терапију. Тако, висока експресија *bcl-2* повезана је са краћим укупним преживљавањем и повећаном резистенцијом на

терапију и независан је негативни прогнозни параметар. (172). Висока експресија *bcl-2* такође је повезана са резистенцијом на терапијску примену хлорамбуцила. (174). Други члан *bcl-2* фамилије, *mcl-1* такође је повезиван са лошом прогнозом, али што је много значајније са резистенцијом на примењену терапију, и то хлорамбуцилом, флударабином и ритуксимабом. (175). Иако су многе студије потврдиле да ниво *bcl-2* и *mcl-1* корелира са прогнозом болести, ипак је као кључан члан *bcl-2* фамилије препознат Вах, чији ниво корелиран са нивоима *bcl-2* и *mcl-1* показује најјачу повезаност са прогресивном болешћу и резистенцијом на примењивану терапију. (172)

Обзиром на утврђене разлике у *ex vivo* апоптози ћелија узоркованих из периферне крви и костне сржи, корелирали смо резултате ране и касне апоптозе, као и нивое *bcl-2* и *mcl-1* протеина са клиничким стадијумом болести као једних од важних параметара прогнозе пацијената. Наши резултати указали су да код пацијената различитих клиничких стадијума болести нема статистички значајне разлике у нивоима касне апоптозе као и као у проценту *bcl-2* позитивних и *mcl-1* лимфоцита ни у периферној крви ни у костној сржи. Значајна разлика није пронађена ни у резултату ниске или високе експресије *bcl-2*. Изражена, статистички значајна разлика у нивоу ране апоптозе указала је да је код пацијената у *Binet A* клиничком стадијуму већи проценат лимфоцита у костној сржи у фази ране апоптозе него у *Binet B* и *C* стадијуму, док у периферној крви ова разлика није тако изражена. Ниво ране апоптозе у периферној крви могао би се користити као потенцијални прогнозни маркер. Слично нашим резултатима и Sieklucka и сарадници (176) потврдили су прогнозни значај одређивања апоптозе лимфоцита оболелих од ХЛЛ. Осим нивоа ране апоптозе, наизглед контрадикторан резултат је и резултату *mcl-1* позитивних ћелија у периферној крви код ког већи број пацијената *Binet A* клиничког стадијума има високу експресију *mcl-1* у односу на пацијенте *Binet B* и *C* клиничког стадијума, док овај феномен није забележен код лимфоцита изолованих из костне сржи. Овакав налаз *mcl-1* може бити последица *cut off* вредности и методолошког поступка коришћеног у овој дисертацији за одређивање ниске и високе експресије, али и индиректан доказ да *mcl-1* као механизам инхибиције апоптозе није и једини. Са друге стране недвосмислен резултат указује да ниво апоптозе у периферној крви одређиван *ex vivo* може бити валидан прогнозни параметар. Овај феномен није до сада посматран у литератури, иако су неки новији радови испитивали и утицај процента апоптотичних лимфоцита на прогнозу болести. Тако су *Witkowska* и сарадници (177) доказали корелацију између апоптозе лимфоцита периферне крви у *in vitro* условима са прогнозом

болести. Спонтана апоптоза лимфоцита периферних крви након инкубације у монокултури показује знатно виши ниво код пацијента са добром прогнозом у односу на пацијенте са лошом прогнозом и то након 24h и 48h, упоређујући их са до сада признатим прогнозним параметрима код *de novo* дијагностикованих пацијената.

Ипак студије које су рађене са циљаним инхибиторима сваког од поменутих протеина понаособ показале су да само инхибиција *mcl-1* у малигном ХЛЛ лимфоциту смањује вијабилност и повећава проценат апоптозе, тако да се овај протеин сматра главним регулатором антиапоптотске активности ћелија.(172) Наши резултати ипак не подржавају ову констатацију у потпуности, јер упоређене групе пацијената које су имале високу и ниску *mcl-1* експресију немају детектоване разлике у нивоу ране и касне апоптозе ни у периферној крви ни у костној сржи. Са друге стране резултати који су посматрали високу и ниску експресију *bcl-2* у малигним лимфоцитима указале су да код пацијента са високом експресијом *bcl-2* у периферној крви се детектује нижа рана и касна апоптоза у односу на пацијенте са ниском експресијом *bcl-2*, док се у костној сржи ова разлика не детектује. Закључак који се може извести јесте да *bcl-2* има утицаја на ниво апоптозе у периферној крви али не и у костној сржи, док ниво *mcl-1* не утиче на ниво апоптозе ни у периферној крви ни у костној сржи самостално, што као резултат указује на неопходност испитивања и других механизма инхибиције апоптозе.

Обзиром да се зна да апоптотски механизми делују кроз два пута, спољашњи и унутрашњи, досадашња истраживања могућег механизма инхибиције апоптозе у хроничној лимфоцитној леукемији су дала предност унутрашњем путу апоптозе.

Што се спољашњег пута тиче у хроничној лимфоцитној леукемији највише је испитивана *TNF* рецепторска суперфамилија, иако су и ови подаци доста оскудни. *Laytragoon-Lewin* и сарадници (178) публиковали су чињеницу да је на ХЛЛ лимфоцитима нисходно регулисан *FAS* рецептор који у *in vitro* условима није могао бити додатно експремиран као на неизмењеним Б лимфоцитима. Ипак чак и повећана експресија *FAS* рецептора на површини Б лимфоцита није резултирала повећаном апоптотом, па се дошло до закључка да нисходна регулација *FAS* рецептора није механизам преко ког се Б лимфоцит штити од потенцијалних сигнала смрти. (179). Са друге стране доказана експресија *CD40* која такође као једну од опција своје активације има покретање спољашњег пута апоптозе, али и *NF-κB* антиапоптотског пута, у ХЛЛ лимфоциту усмерена је ка антиапоптотском механизму и један је од споредних механизма заштите од апоптозе. (180).

Транскрипциони фактор *p53* такође има доказану улогу у апоптози, када у ћелији дође до непоправљивих ДНК оштећења и то кроз повећање транскрипције проапоптотских протеина *bax* и *Puma* али и директну везу са *bcl-2* која инхибира овај антиапоптотски протеин. (181) Око 10-15% пацијената оболелих од ХЛЛ имају доказану мутацију на *TP53* гену лоцираном на 17p13, која се испољава као дефектна улога *p53* и преовладавање *bcl-2* зависне инхибиције апоптозе. (182). Још једна сигнална каскада има доказану улогу у преносу пролиферативног сигнала и инхибицији апоптозе у малигном ХЛЛ лимфоциту је систем фосфатидил инозитол 3 хидрокси киназе (*PI3K*) и *Akt* киназе. По пријему пролиферативног сигнала посредством бројних површинских рецептора, *PI3K* се премешта на унутрашњу површину ћелијске мембране где фосфорилише фосфоинозитиде мембране који регрутују *Akt* киназу из цитосола у ћелијску мембрану и активирају је фосфорилацијом. (183). Овако активирана *Akt* киназа има неколико путева који као крајњи ефекат имају инхибицију апоптозе. Она се везује за *Bad*, фосфорилише га и притом инактивира, форсисрајући на тај начин ефекат антиапоптотских протеина на првом месту *bcl-XL*. Осим тога, *Akt* киназа инактивира каспазу 9, индукује *NF-κB* антиапоптотски пут, инактивише фамилију Forkhead протеина, фосфорилацијом *XIAP* (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), овај потентни инхибитор апоптозе постаје мање осетљив на протеолизну дегрегадацију и дуже испољава свој интрацелуларни ефекат. (183). Сигнал који ХЛЛ лимфоцит прима, а резултује активацијом, потиче од микросредине у којој се лимфоцит налази а остварује се преко активације БЋР, *CD40* (184), или преко *CD106*. Иако је фаворизовање дејства *bcl-XL* до сада препознато као главни ефекат ове каскаде, активација *Akt* киназе повећава и експресију *mcl-1* у малигним лимфоцитима, (185).

5.3 Цитокини

Као што је у претходном тексту већ више пута наглашавано, циркулисање малигно измењених лимфоцита у различитим микросрединама условљава како промене у експресији прогнозних параметара тако и у проценту апоптотичних лимфоцита у овим микросрединама. У нашем даљем раду смо стога покушали да утврдимо разлике у концентрацији цитокина (IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-22, TNF α i β , IFN γ , VEGF-A, FGF-2) овим микросрединама (плазма и супернатант костне сржи), као и у односу на здраве испитанике, али и међу групама пацијента у различитом клиничком стадијуму.

Интерлеукин 4 у хроничној лимфоцитној леукемији предмет је бројних истраживања. Осим Т лимфоцита који су и у физиолошким условима главни извор овог цитокина, бројним *in vitro* студијама доказано је да га производе и сами ХЛЛ лимфоцити. Због тога се пошло од претпоставке да ће серумске концентрација овог цитокина бити веће код оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије него у општој популацији, што су поједине студије потврдиле. (186). Наши резултати, али и резултати других студија (167, 187) нису потврдили постојање ове разлике. Обзиром да су резултати добијени у обе испитиване популације, оболелих и здраве контроле, били врло хетерогени може се претпоставити да на концентрацију IL-4 осим саме болести утичу и други параметри. У групи оболелих испитивали смо и разлике у концентрацији IL-4 у плазми и супернатанту костне сржи. Иако је концентрација у супернатанту костне сржи била виша у односу на плазму оболелих пацијената нисмо нашли статистички значајну разлику. Ово се може објаснити чињеницом да су ХЛЛ лимфоцити у костној сржи метаболички активнији, као и да је број активираних Т лимфоцита већи у костној сржи.

Улога IL-4 у хроничној лимфоцитној леукемији проучава се деценијама. Највећи број студија је у *in vitro* условима доказао да је додавање IL-4 медијуму у ком су култивисани ХЛЛ лимфоцити доводи до смањења спонтане апоптозе. Овај ефекат IL-4 објашњава се чињеницом да додат IL-4 узрокује усходну регулације експресије bcl-2.(188.) Иако је ефекат на апоптозу јасно описан, контраверзна је улога IL-4 у индукцији пролиферације. Иако једни аутори тврде да IL-4 има улогу у превођењу ХЛЛ лимфоцита из G₀/G₁ у G₁/S фазу ћелијског циклуса (189), други тврде чак да IL-4 инхибира пролиферацију ХЛЛ лимфоцита.(190) Овакви налази најбоље се могу објаснити утицајем различитих сигналних путева које су аутори користили у *in vitro* експериментима. Поред наведених и бројних *in vitro* студија, једна клиничка студија фазе I/II коју су спровели *Lundin* и сарадници примењивала је IL-4 код оболелих пацијената. Код већине пацијената

администрација *IL-4* повећавала је број циркулишућих лимфоцита стимулаторним или анти-апоптотским ефектом, што несумњиво потврђује улогу *IL-4* у напредовању болести. (191) Обзиром на хетерогене литературе податке покушали смо и да разлику у концентрацијама *IL-4* припишемо различитом току болести, али није било значајних разлика у концентрацијама овог цитокина ни у плазми, ни у супернатанту костне сржи пацијента у *Binet A* клиничком стадијуму и *Binet B* и *C* клиничком стадијуму.

Интерлеукин 6 (IL-6), плеотропни цитокин којег продукује широка палета ћелија, представља битан фактор раста и диференцијације Б лимфоцита и мегакариоцита и укључен је у патогенезу неколико Б ћелијских малигнитета међу којима је и хронична лимфоцитна леукемија. (192)

У хроничној лимфоцитној леукемији потиче из Т лимфоцита, али га продукују и бројне друге ћелије као што су ендотелне ћелије, стромалне ћелије али и сами малигни ХЛЛ лимфоцити. (193) Има улогу у интерћелијској комуникацији у костној сржи и лимфним чворовима, али и у индукцији експресије *bcl-2* што додатно има инхибиторни утицај на апоптозу ХЛЛ лимфоцита. (88).

Бројни аутори испитивали су концентрацију *IL-6* у плазми пацијента оболелих од ХЛЛ-а, али су резултати ових испитивања веома хетерогени. И поред јасног циља да се докаже да оболели од хроничне лимфоцитне леукемије имају веће концентрације *IL-6* у плазми највећи број студија ово није потврдио (194). *Robak* и сарадници (195) потврдили су да су серумске концентрације *IL-6* ниже код лечених пацијента оболелих од ХЛЛ у односу на здраве испитанике, док између нелечених пацијента и здравих испитаника није било разлике, док су *Hulkkonen* и сарадници (196) потврдили повишене серумске концентрације код оболелих испитаника.

У нашем испитивању нисмо нашли разлику у серумској концентрацији *IL-6* код пацијента оболелих од ХЛЛ и здравих испитаника, што је у сагласности са литературним подацима. Такође нисмо нашли ни разлику у концентрацији *IL-6* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената. Ови резултати могу се објаснити и величином испитиване групе, али и методом коришћења за одређивање концентрације цитокина.

Оно што смо приметили код наших резулата била је свакако хетерогеност концентрација *IL-6* унутар саме групе оболелих. Стога смо посматрали концентрацију *IL-6* код пацијената подељених по стадијуму болести на *Binet A* и *Binet B* и *C*, где смо детектовали статистички значајно већу серумску концентрацију *IL-6* код пацијента у *Binet B* и *C* стадијуму болести. Концентрације у супернатанту костне сржи такође указују да је

већа концентрација *IL-6* детектована код пацијената у *Binet B* и *C* стадијуму болести, али без статистичке значајности. Ове резултате потврдиле су бројне студије које су указале да високи нивои *IL-6* у плазми корелирају са лошијом прогнозом болести, и то у корелацији са стандардним прогнозним параметрима (старост, стадијум болести, пол, претходна терапија). (197). Значај *IL-6* у узнапредовалој болести може се приписати директном ефекту на пролиферацију и продужено преживљавање ХЛЛ лимфоцита, али и индиректно кроз његове ефекте на микросредину који се огледају у стимулацији секреције *IL-4* од стране Т лимфоцита, али и кроз индукцију *VEGF* зависне неоваскуларизације. (198). Чак се и неки додатни симптоми који се јављају у узнапредовалој болести у виду повишене телесне температуре, малаксалости и слабости приписују дејству *IL-6*. (198)

Улога *IL-10* у патогенези и клиничком току ХЛЛ можда је једна од најконтраверзнијих у литератури. *IL-10* је у литератури препознат као инхибитор пролиферације ХЛЛ лимфоцита (199), инхибитор апоптозе (200) али и цитокин који индукује апоптозу малигних ХЛЛ лимфоцита. (201) Контраверзни су и подаци о концентрацији *IL-10* у плазми пацијената оболелих од ХЛЛ и здравих испитаника. *DiLillo* и сарадници (202) наводе да је концентрација *IL-10* у плазми пацијената оболелих од ХЛЛ виша у односу на здраве испитанике, док друге студије (203, 204) наводе да је ова концентрација нижа код пацијената оболелих од ХЛЛ али и да међу пацијентима има веома хетерогених резултата. Наши резултати указали су да је концентрација *IL-10* у плазми пацијената али и супернатанту костне сржи нижа него у плазми здравих испитаника али без статистички значајне разлике.

Обзиром на хетерогене резултате који се добијају код пацијената у концентрацији *IL-10* у плазми, студије су се оријентисале на одређивање концентрације али и параметара као што су мРНК, тачкасте мутације у гену који детерминише *IL-10* код пацијената у зависности од прогнозе болести, а у корелацији са до сада признатим параметрима прогнозе. Тако је испрва *Fayad* и сарадници навео да је повишен ниво *IL-10* у плазми независни негативни прогнозни параметар.(197) Док су *Lech-Maranda* и сарадници (205) доказали да присуство тачкастих мутација у гену који детерминише *IL-10* негативни прогнозни параметар. Испитивање нивоа *IL-10* у плазми као и експресије *IL-10* мРНК у ХЛЛ лимфоцитима показали су да је код пацијента у узнапредовалим стадијумима низак ниво *IL-10* мРНК а висок ниво сеурмског *IL-10*. (206). Наши резултати који су упоређивали концентрацију *IL-10* у плазми пацијената, али и супернатанту костне сржи код пацијената у *Binet A* и *Binet B* и *C* клиничком стадијуму показали су да су више

концентрације *IL-10* присутне код пацијената са узнапредовалом болешћу с тим да већу разлику међу овим групама прави концентрација у супернатанту костне сржи, али без статистички значајне разлике. Ово се може објаснити механизмом деловања *IL-10* у хроничној лимфоцитној леукемији. У студији *Fluckinger* и сарадници су показали да *IL-10* има утицај у индуковању апоптозе ХЛЛ лимфоцита кроз смањење нивоа *bcl-2* протеина. (207) Други аутори приказују чак и аутокрини модел путем ког ХЛЛ лимфоцити производњом *IL-10* инхибирају сопствену апоптозу. (207). Новија истраживања потврђују чињеницу да *IL-10* инхибира апоптозу кроз механизам фосфорилације транскрипционог фактора СТАТ3, што је већ препознат модел деловања неких других цитокина, *IFN α* и *IFN γ* . (208). Осим учествовања у СТАТ путу, други аутори предлажу да је ипак централно место деловања *IL-10* уствари доминантно активација транскрипционог фактора НФАТ2 (209). Сви ови механизми продужавају преживљавање појединачне ћелије и повећавају њихову метаболичку улогу, што може бити објашњење негативног утицаја *IL-10* на ток хроничне лимфоцитне леукемије.

IL-22 као члан *IL-10* суперфамилије цитокина, познат је по својој протективној улози у запаљенским болестима јетре, респираторног тракта и желуца. (98) Ипак у хроничној лимфоцитној леукемији овај цитокин није испитиван. Наши резултати који се односе на концентрацију *IL-22* у плазми пацијената у односу на плазму здравих испитаника указали су да је концентрација у плазми оболелих нижа у односу на здраве испитанике али без статистички значајне разлике. Концентрација *IL-22* у супернатанту костне сржи, виша је у односу на плазму пацијената али без значајне разлике. Резултати упоређивања концентрације *IL-22* у плазми и супернатанту костне сржи пацијената различитог стадијума болести нису показали разлике. Једини рад у ком је *IL-22*, тј. његова генска експресија испитивани у хроничној лимфоцитној леукемији показао је да је ген за *IL-22* ниже експримиран у малигним лимфоцитима који се налазе у лимфном чвору. (210), али обзиром да није реч о концентрацији цитокина, наши резултати се не могу упоредити. Ради расветљења евентуалне улоге *IL-22* у хроничној лимфоцитној леукемији, требало би спровести испитивања на већој групи испитаника и у култури лимфоцита.

Интерлеукин 12 (*IL-12*) који је већ доказан као веома важан у подстицању антитуморског имуног одговора проучаван је и у хроничној лимфоцитној леукемији. Мали број радова који су се бавили овом проблематиком потврдило је да се у плазми пацијената оболелих од ове болести детектују више концентрације него у здоровој

популацији (211). Насупрот овим резултатима наша студија показала је да је концентрација *IL-12* нижа у плазми пацијената оболелих од ХЛЛ у односу на плазму здравих испитаника са високом значајношћу. Обе студије учињене су на малом броју испитаника, па је овај феномен свакако погодно додатно пеорверити на већој групи испитаника. Наши резултати који се тичу разлика у концентрацији *IL-12* у супернатанту костне сржи наспрам плазме пацијента није показао разлике, као ни концентрација овог интерлеукина у плазми и супернатанту костне сржи пацијената у различитом стадијуму болести.

Студије које су се бавиле ефектом *IL-12 in vitro* показале су да *IL-12* инхибира апоптозу ћелија хроничне лимфоцитне леукемије и тако доприноси напредовању болести (102), али да овај ефекат није довољно потентан када се ХЛЛ лимфоцити култивишу само са *IL-12*, већ свој пун потенцијал показује у комбинацији са другим цитокинима. (212).

TNF α је проинфламаторни цитокин са хетерогеном активношћу, укључујући модулацију имуног одговора и регулацију туморског раста. Додатно, овај цитокин има улогу и као фактор раста за различите ћелијске популације, највише Т и Б лимфоците. (103). Доминантно га производе активирани макрофаги, а у хроничној лимфоцитној леукемији и сами малигни Б лимфоцити, уз истовремену експресију рецептора, па се сматра да његова продукција има аутокрину улогу и паракрину улогу. (213) Објашњења о улози овог цитокина у етиопатогенези ХЛЛ-а су веома различите. Сматра се да *TNF α* директно утиче на пролиферацију ХЛЛ лимфоцита као и да кроз успоравање механизма нисходне регулације *bcl-2* доприноси инхибицији апоптозе (88). *Digel* и сарадници сугеришу чак да *TNF α* инхибира пролиферацију ХЛЛ лимфоцита (215), а *Alvarez-Mon* и сарадници и да нема улоге у продуженом преживљавању малигнух лимфоцита. (215). Неки радови су показали и да је улога *TNF α* у ХЛЛ-у посредна и да он регулише путеве других цитокина и молекула, најпре синтезу *IL-1* и *IL-6* и експресију *IL-2R*. (216) Такође овај цитокин делује и тако што повећава експресију *CD20* на површини ХЛЛ лимфоцита што га чини погоднијим за терапију моноклонским анти *CD20* антителом. (217) Разлог за овако хетерогене резултате везане за функцију *TNF α* је свакако чињеница да *TNF α* свје дејство остварује везујући се за два рецептора: *TNFR1* и *TNFR2*. На тај начин у ћелији се истовремено покрећу и про и антиапоптоски механизми. Покретањем *NF κ B* сигналног пута и митоген активирани протеин киназе (*MAPK*) покрећу се механизми ћелијске

пролиферације, диференцијације и антиапоптозски механизми, а са друге стране истовремено се покреће и механизам који индиректно активира каспазу 8 што резултује активацијом апоптозе. (218) Обзиром да ХЛЛ лимфоцити експримирају доминантно *TNFR2* сматра се да су антиапоптозски сигнали преовлађујући. (219)

Досадашња испитивања потврдила су повишене серумске нивое овог цитокина код оболелих од ХЛЛ-а са прогресивним повећањем у зависности од напредовања болести. (220) Наши резултати нису то и потврдили, већ оповргли ове резултате доказавши да је концентрација *TNF α* у плазми пацијената нижа него у плазми здравих испитаника. Концентрација у супернатанту костне сржи виша је него у плазми али без значајне разлике. Иако смо у групи пацијената јасно могли да детектујемо две групе са ниском концентрацијом *TNF α* и врло високом концентрацијом *TNF α* , то није било у корелацији са стадијумом болести или другим конвенционалним прогнозним параметрима. Слично нашим резултатима и *Singer* и сарадници (221) потврдили су нижу концентрацију *TNF α* у плазми пацијената у односу на здраве испитанике, али ове разлике нису биле значајне. Група пацијената која се издвојила са високом концентрацијом *TNF α* имала је негативне преостале прогнозне параметре. Ови хетерогени налази свакако су последица хетерогене улоге *TNF α* , за чије испитивање у хроничној лимфоцитној леукемији има још места.

Интерферон γ (IFN γ) припада групи цитокина са потврђеним значајем у хроничној лимфоцитној леукемији. Иако у физиолошким условима IFN γ анатагонизује пролиферацију Б лимфоцита индуковану IL-4, његов утицај на ток и развој Б лимфоцита хроничне лимфоцитне леукемије указује на позитиван ефекат који овај цитокин има у продуженом преживљавању малигнух лимфоцита. Његово порекло у ХЛЛ-у је двоструко. Производе га активирани Т лимфоцити, али и саме малигне ћелије и то чак у вишем нивоу, што сугерише аутокрини модел. (222) У патогенези ХЛЛ-а досадашња истраживања из поља базичне науке показала су да је IFN γ антиапоптозски цитокин који кроз успоравање нисходне регулације bcl-2 инхибира апоптозу малигнух лимфоцита и самим тим им продужава живот. (223) Концентрацију овог цитокина у плазми пацијената оболелих од ХЛЛ-а испитивало је више истраживача међу којима је први *Buschle* et al (107) доказао да је она већа код пацијената у односу на здраве испитанике. Радови који су следили поврдили су ову чињеницу (224), али новији радови ипак указују да сама концентрација IFN γ варијабилна, и да је на почетку болести нижа, а како болест одмиче тако и она расте. (225). Чак су *Urbanowicz* et al (226) потврдили да су здрави испитаници

са нижом концентрацијом $IFN\gamma$ као последицом генског полиморфизма (+847 A/T) са повећаним ризиком од обољевања од хроничне лимфоцитне леукемије. Наши резултати нису показали значајну разлику између концентрација $IFN\gamma$ у плазми пацијената и здравих испитаника. Концентрација $IFN\gamma$ виша је супернатанту костне сржи него у плазми пацијената, али није детектована корелација са стадијумом болести и другим параметрима прогнозе болести.

Васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF) као и други ангиогени молекули су последњих година у жижи интересовања због њихове значајне улоге у туморском расту и склоности ка метастазирању. Улога овог фактора раста у хематолошким малигнитетима није баш потпуно разјашњена, иако за ХЛЛ постоје бројни докази да је великог значаја у самој патогенези болести.

У ХЛЛ-у производе га саме малигне ћелије те је његов ниво повишен у плазми пацијената у односу на здраву популацију, али са детектабилном разликом у нивоу код пацијента са мањим и већим ризиком ка прогресији болести, што га сврстава у добар рани прогнозни параметар. (227). Наши резултати показују значајно више плазматске концентрације VEGF код оболелих пацијената у односу на здраве испитанике, као и више концентрације у супернатанту костне сржи у односу на серум пацијената. Што се тиче разлике код пацијената у различитом стадијуму болести, није било разлике у концентрацији VEGF ни у плазми ни у супернатанту костне сржи. Више концентрације VEGF у супернатанту костне сржи у односу на плазму у складу су са литературним подацима. Chen et al су показали да је експримирање рецептора за VEGF као и самог молекула од значаја за прогресију болести у костној сржи, лимфном чвору, али и другим секундарним лимфоидним ткивима. (228) Малигни ХЛЛ лимфоцити експримирају и неколико врста VEGF рецептора (Flt1, Tie1 и KDR) што говори у прилог аутокрином моделу деловања.(229) Везивање VEGF за специфичне рецепторе на малигну ХЛЛ лимфоциту највероватније свој ефекат остварује преко индукције експресије bcl-2 чиме делује антиапоптоски на малигну ћелију. (110) Са друге стране VEGF делује и на друге ћелије, на првом месту ендотелне ћелије које под дејством овог цитокина секретују друге молекуле, и то G-CSF, M-CSF и IL-6 који у ХЛЛ-у имају улогу у расту и преживљавању леукемијског клона.(103).

Фактор раста фибробласта (FGF-2) у хроничној лимфоцитној леукемији испитиван је сходно чињеници да малигни лимфоцити циркулишу у нишама лимфних чворова и костне сржи где се налазе бројне ендотелне и стромалне ћелије које га производе. Такође има и бројних доказа о томе да и сами малигни лимфоцити производе овај фактор раста који има аутокрину улогу, али што је важније и паракрину улогу на стромалне и ендотелне ћелије, модификујући услове микросредине према пролиферацији и продуженом преживљавању малигног клона. Доказана је такође и дисрегулација ФГФ рецептора на површини малигне ћелије са утицајем на повећану на неоангиогенезу која подржава туморски раст. (111). Иако постоји претпоставка да присуство ФГФ-2 фактора у овим пролиферативним центрима инхибира апоптозу ХЛЛ лимфоцита ово дејство није доказано. (230). Ипак студије које су се бавиле одређивањем концентрације FGF-2 у плазми пацијента показале су повећане вредности ФГФ-2 у односу на здраве испитанике. (227). *Molica* и сарадници потврдили су и да пацијенти у вишем клиничком стадијуму имају више концентрације FGF-2 у серуму пацијената, али овај резултат нису потврдиле све студије (231.)

Наши резултати нису показали разлику у плазматској концентрацији FGF-2 између оболелих од ХЛЛ-а и здравих испитаника. Ипак потврдили смо веома високе вредности FGF-2 у супернатанту костне сржи, што је и очекивано обзиром да се ту и налазе стромалне ћелије које су главни извор овог фактора раста. Ипак када се упореде пацијенти у различитом клиничком стадијуму, серумске концентрације FGF-2 не праве разлику међу овим групама, што није у сагласности са литературним подацима, али концентрације FGF-2 у супернатанту костне сржи значајно су више код пацијената са унапредовалом болешћу. Ово потврђује протективни ефекат FGF-2 у костној сржи.

6 ЗАКЉУЧЦИ

Анализом резултата добијених у овој, судији могу се донети следећи закључци:

1. Експресије имунофенотипских прогнозних маркера попут *CD49d*, *CD38* и *ZAP-70* на површини малигнух ХЛЛ лимфоцита разликују се у зависности од микросредине из које су ови лимфоцити изоловани.
2. Експресија прогнозних маркера (*CD49d* и *CD38*) само на малигним лимфоцитима периферне крви корелира са стандардним прогнозним маркерима.
3. Процент Т лимфоцита виши је код пацијената у *Binet A* клиничком стадијуму у односу на *Binet B* и *C* клинички стадијум и има потенцијални прогнозни значај.
4. Малигни лимфоцити изоловани из костне сржи оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије подложнији су спонтаној „ex vivo“ апоптози у односу лимфоците изоловане из периферне крви оболелих, а обе вредности значајно су ниже у односу на спонтану апоптозу лимфоцита периферне крви здравих испитаника.
5. Процент „ex vivo“ спонтане ране апоптозе виши је код пацијената у *Binet A* клиничком стадијуму у односу на *Binet B* и *C* клинички стадијум и у корелацији је са другим прогнозним маркерима.
6. Концентрације *IL-12p70*, *VEGF*, *TNF α* значајно су ниже у плазми пацијената у односу на плазму здравих испитаника, док у концентрацијама *IL-4*, *IL-10*, *IFN γ* , *IL-22*, *IL-6*, *TNF β* , *FGF-2* нису детектоване разлике.
7. Концентрација *FGF-2* значајно је виша у супернатанту костне сржи пацијената у *Binet B* и *C* клиничком стадијуму у односу на *Binet A* клинички стадијум и у корелацији је са другим конвенционалним прогнозним параметрима.
8. Ниво експресије *bcl-2* у малигним лимфоцитима оболелих од ХЛЛ-а корелира са процентом „ex vivo“ апоптотичних лимфоцита у периферној крви, али не и у костној сржи.

7 ЛІТЕРАТУРА

1. Chiorazzi N, Ferrarini M. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Ann Rev Immunol.* 2003;21:841-894
2. Hallek M, Cheson MB, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR and Kipps TJ. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute_Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 2008 111: 5446-5456
3. Kundrat H. Ueber Lympho-Sarkomatosis. *Wien Klin Wochenschr* 1893;6:211–213.
4. Turk W. Ein System der Lymphomatosen. *Wein. Klin Wochenschr* 1903;16:1073–1085.
5. Galton DAG. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Can Med Assoc J* 1966;94:1005–1010
6. Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base Report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with CLL *Cancer* 1999; 86: 684-692
7. Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familiar CLL *Hematol Oncol Clin North Am* 2004; 18: 783-794
8. Caligaris-Cappio F and Hamblin TJ. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia:A Bird of a Different Feather. *JCO.*1999;17(1):399-408
9. Messmer B, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005 Mar;115(3):755-64
10. Federico Caligaris-Cappio and Terry J. Hamblin. B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia:A Bird of a Different Feather. *JCO.*1999;17(1):399-408, Chiorazzi N, Rai KR and Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia – mechanisms of disease. *N Engl Med* (2005): 352-358
11. Dalla-Favera R, Gaidano G. *Molecular biology of lymphomas.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott, 2001.
12. Chiorazzi N, Rai KR and Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia – mechanisms of disease. *N Engl Med* (2005): 352-358
13. Melchers F., Kinkade P. Early B cell development to a mature, antigen-sensitive cell. In Alt FW, Honjo T., Neuberger M (eds.) *Molecular biology of B cells.* Elsevier Science (USA), 2004:101-126

14. DeKoter RP, Lee HJ, Singh H. PU.1 regulates expression of the IL-7 receptor for lymphoid progenitors. *Immunity* 2002;16:297-309
15. Rolink AG, Ghia P., Grawunder U, Haasner D, Karasusama H, Kalberer C, Winkler T, Melchers F. In vitro analysis of mechanisms of B cell development (review). *Semin Immunol.*1995;7:155-167
16. Rolink A, Kudo A, Karasuyama H, Kikuchi Z, Melchers F. Long-term proliferating early pre B cell lines in vitro and in vivo. *EMBO J.* 1991;10:327-336
17. Caligaris- Carpio F., Dalla-Favera R (eds) Chronic lymphocytic leukemia. Springer- Verlag Berlin. 2005
18. Tucker W. LeBien and Thomas F. Tedder. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112: 1570-1580
19. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000;192:1833-1839
20. Kuppers R, Dalla Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene.* 200;20:5580-5594
21. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 2000;37:1141-9
22. Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, et al. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003:153-75
23. Pugh-Bernard AE, Silverman GJ, Cappione AJ, et al. Regulation of inherently autoreactive VH4-34 B cells in the maintenance of human B cell tolerance. *J Clin Invest* 2001;108:1061-70
24. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a key role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004;200:519-25
25. Martin F, Kearney JF. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2001;13:195- 201.
26. Meffre E, Schaefer A, Wardemann H, Wilson P, Davis E, Nussenzweig MC. Surrogate light chain expressing human peripheral B cells produce self-reactive antibodies. *J Exp Med* 2004;199:145-50.
27. Danijela Jovanovic, Predrag Djurdjevic, Nebojsa Andjelkovic, Ljubica Zivic. Possible role of CD22, CD79b and CD20 expression in distinguishing small lymphocytic lymphoma from chronic lymphocytic leukemia. *Contemp Oncol (Pozn)* 2014; 18 (1): 29–33

28. Чоловић М. Хронична лимфоцитна леукемија. у, Чоловић М, Јанковић Г. Малигне боелсти крви, Београд, Завод за уџбеенике и наставна средства, 1999:195-221
29. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, Ramsay AG, Gribben JG. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 2013 Feb 28;121(9):1612-21
30. Ravandi F, O'Brien S Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2006 Feb;55(2):197-209
31. Стефановић С. Хематологија, Медицинска књига, Београд-Загреб, 1989.
32. O'Brien S. Clinical challenges in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1998; 35: 22-26
33. International Workshop on chronic lymphocytic leukemia. Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging and response criteria. *Ann Intern Med* 1989;1(10):236-43
34. Matutes E, Polliack A. Morphological and Immunophenotypic Features of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology* 2000;4(1):22-47
35. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-234, Rai KR A critical analysis of staging in CLL In: *CLL: Recent Progress and Future Directions*. Gale RP, Rai KR (eds). Alan R. Liss 1987; 253-264
36. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al A new prognostic classification of CLL derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206
37. Wierda WG, O'Brien S, Wang X et al. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1637–1643.
38. Montserrat E, Vinolas N, Reverter JC, et al. Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and prognosis of early clinical stages. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 359-361
39. Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, et al. Bone marrow histological pattern – The best single prognostic parameter in CLL: A multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 1984; 64: 642-648
40. Montserrat E, Sanchez-Bisno J, Vinolas N, et al Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62: 567-575
41. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia *New Engl J Med* 2000; 343: 1910-1916

42. Korz C, Pscherer A, Benner A, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood* 2002; 99: 4554-4561
43. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A et al. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848–1854.
44. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP 70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in CLL. *New Engl J Med* 2003; 348: 1764-1775,
45. Kipps T. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Best practice and reserach Clinical Haematology*. Vol 20. No3. (2007): 415-426
46. Van Bockstaele F., Verhasselt B, Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Reviews* (2009) 23, 25–47
47. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Durig J, Morabito F, Duhren U et al. CD 38 is a signaligng molecule in B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003;102:2146-2155
48. Campana D, Suzuki T, Todisco E, Kitanaka A. CD38 in hematopoiesis. *Chem Immunol*. 2000; 75:169-188.
49. Kumagai M, Coustan-Smith E, Murray DJ, et al. Ligation of CD38 suppresses human B lymphopoiesis. *J Exp Med*. 1995;181:1101-1110.,
50. Zupo S, Rugari E, Dono M, Taborelli G, Malavasi F, Ferrarini M. CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cells. *Eur J Immunol*. 1994;24:1218-1222.
51. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:1840-1847
52. Chan, A. C., M. Iwashima, C. W. Turck & A. Weiss . ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*, 1992:71, 649-62.
53. Pede V, Rombout A, Verhasselt B and Philippé J (2012). The Biological Relevance of ZAP-70 in CLL, *Chronic Lymphocytic Leukemia*, Dr. Pablo Oppezzo (Ed.),Intech, 2012: 135-153
54. Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marshak F et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of ZAP-70 expression. *Cancer Res* 2006; 66: (14): 7158-7166
55. Kipps T. The B-cell receptor and ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia. *Best practice and reserach Clinical Haematology*. 2007;20(3): 415-426
56. Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *ASH Education Book*, 2012; 2012(1): 76-87

57. Rossi FM, Zucchetto A, Tissino E, Dal Bo M, Bomben R, Caldana C, Pozzo F, Del Poeta G, Rossi D, Gaidano G and Gattei V. CD49d expression identifies a chronic-lymphocytic leukemia subset with high levels of mobilized circulating CD34⁺ hemopoietic progenitors cells. *Leukemia*. 2014;28(3):705-8
58. Koopman, G., Keehnen, R.M., Lindhout, E., Newman, W., Shimizu, Y., van Seventer, G.A., de Groot, C. and Pals, S.T. Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinalcenter B cells. *Journal of Immunology*, 1994; 152:3760–3767.
59. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S and Del Poeta G. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*: 2008 111: 865-873
60. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National cancer institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87: 4990-4997
61. Eichhorst B, Dreyling M, Robak T, Montserrat E and M. Hallek. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2011;22 (6): vi50–vi54
62. Eichhorst BF, Busch R, Stilgenbauer S et al. First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 114: 3382–3391.
63. Chen CI, Bergsagel PL, Paul H, et al.: Single-agent lenalidomide in the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 29 (9): 1175-81, 2011.,
64. Ferrajoli A, Lee BN, Schlette EJ, et al.: Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 111 (11): 5291-7, 2008
65. Dreger P, Corradini P, Kimby E et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007; 21: 12–17.
66. Jones BA, Gores GJ. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas and intestine, *Am J physiol gastrointest Liver Physiol*, 1997;273:G1174-G1188, Reed JC. Mechanisms of apoptosis, *American Journal of Pathology*, 2000;157:1415-1430
67. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis, *Genes and Development*, 2003;17:2481-2495

68. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukariotic cells; *Infection and Immunity* 2005;73(4):1907-1916
69. Wang A, Dean D. Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms, *JAMA*, Nov 2007; 298: 2203 – 2204
70. Adachi-Yamada T, O'Connor MB. Mechanisms for removal of developmentally abnormal cells: Cell competition and morphogenetic apoptosis, *J.Biochem*; 2004; 136 (1):13-17
71. Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassme H, Lang F. Physiology of apoptosis, *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000;279:F605-F615
72. Hengartner. The Biochemistry of Apoptosis. *Nature*.2000; 407(6805).770-6
73. Bredesen D, Mehlen P, Rabizadeh S. Apoptosis and dependence receptors: A molecular basis of cellular addiction, *Physiol.Rev.* 2004;84:411-430
74. Schimmer AD, Haedley DW, Penn LZ, Minden MD. Receptor- and mitochondrial- mediated apoptosis in acute leukaemia: a translational view, *Blood*, dec 2001;98(13):3541-3553
75. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jan;15(1):49-63
76. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart, *Am J Physiol Cell Physiol*; 2007; 292:C45-C51
77. White E. Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis.*Cell Death Differ.* 2006;13(8):1371-7
78. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993;75:229-240.
79. Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K, Korsmeyer SJ. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 2005;307:1101-1104.,
80. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 2003;426:671-676
81. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis – p53 network, *Journal of Cell Scienc*, 2003;116:4077-4085
82. Gavrilescu C, Denkers EY. Apoptosis and the balance of homeostatic and pathologic response to protozoan infection, *Infection and Immunity*,Nov 2003;71(11):6109-6115

83. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis, *circulation research*, 2004;95:957-966
84. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*.2001 ;410(6824):112-6
85. Rogalinska M. Alterations in cell nuclei during apoptosis. *Cell Mol Biol Lett*. 2002;7(4): 995-1018, Häcker G. The morphology of apoptosis, *Cell tissue Res*, 2000;301(1):5-17
86. Banchereau J, Bidaud C, Fluckiger AC, et al. Effects of interleukin 4 on human B-cell growth and differentiation. *Res Immunol* 1993;144:601–605
87. Luzina IG¹, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP.. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *Journal of Leukocyte Biology* vol. 92 no. 4 753-764
88. Tangye SG, Raison RL. Human cytokines suppress apoptosis of leukaemic CD5+ B-cells and preserve expression of bcl-2. *Immunol Cell Biol* 1997;75:127–135.
89. Kishimoto T: IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010;22:347–352
90. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M: IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2012;122:143–159
91. Klein B, Zhang XG, Lu ZY, Bataille R: Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 1995; 85:863–872
92. Brown PD, Diamant M, Jensen PO, Geisler CH, Mortensen BT, Nissen NI. S-phase induction by interleukin- 6 followed by chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1999;34:325–333
93. Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 1991;12:A49–53.)
94. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:71-109.
95. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 2001;97:256–263
96. Dumoutier L, Louahed J, Renaud JC. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 2000;164: 1814–1819.
97. Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 2002;23:89 –96

98. Rutz S, Eidenschenk C, Ouyang W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol Rev.* 2013 Mar;252(1):116-32
99. Radaeva S, Sun R, Pan H, Hong F, and Gao B. Interleukin 22 (IL-22) Plays a Protective Role in T Cell-mediated Murine Hepatitis: IL-22 Is a Survival Factor for Hepatocytes via STAT3 Activation. *HEPATOLOGY* 2004;39:1332–1342
100. Lasek W, Zagożdżon R, and Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63: 419–435
101. Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher A, Reis e Sousa C. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity.* 2000;13:453–462.
102. Schuhknecht, S. Duensing, I. Dallmann, J. Grosse, M. Reitz, and J. Atzpodien. Interleukin-12 Inhibits Apoptosis in Chronic Lymphatic Leukemia (CLL) B Cells *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals.* 2002, 17(5): 495-499
103. Orsini E, Foa R. Cytokines and Soluble Molecules in CLL in *Chronic Lymphocytic Leukemia: Molecular Genetics, Biology, Diagnosis, and Management*, edited by GUY B. FAGUET, 2004, Humana Press, Totowa, New Jersey
104. Mundt AJ, Vijayakumar S, Nemunaitis J, Sandler A, Schwartz H, Hanna N, Peabody T, Senzer N, Chu K, Rasmussen CS, Kessler PD, Rasmussen HS, Warso M, Kufe DW, Gupta TD, Weichselbaum RR: A phase I trial of TNFerade biologic in patients with soft tissue sarcoma in the extremities. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 5747–5753
105. Sen GC, Lengyel P. The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem* 1992;267:5017– 5020
106. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):163-89
107. Buschle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 1993 Jan 1;177(1):213-8
108. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271:603–606.
109. Gerber HP, Malik AK, Solar GP. et al. VEGF regulates hematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature.* 2002;417:954–958
110. Dias S, Shmelkov SV, Lam G. et al. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood.* 2002;99:2532–2540.

111. Ribatti D, Vacca A, Rusnati M, Presta M. The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2007;18: 327–334
112. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:159–78
113. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 1992; 59: 115–165
114. Liu Q, Kriksunov IA, Graeff R, Munshi C, Lee HC, Hao Q. Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure*:2005; 13(9):1331–1339
115. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, Vaisitti T, Aydin S. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 2008; 88(3):841–886.
116. Rodriguez-Alba JC, Moreno-Garcia ME, Sandoval-Montes C, Rosales-Garcia VH, Santos-Argumedo L. CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen. *Blood*. 2008;111(7):3644-3652
117. Funaro A, Morra M, Calosso L, Zini MG, Ausiello CM, Malavasi F. Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens*. 1997;49(1):7-15.
118. Chillemi A, Zaccarello G, Quarona V, Lazzaretti M, Martella E, Giuliani N, Ferracini R, Pistoia V, Horenstein AL, Malavasi F. CD38 and bone marrow microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014 Jan 1;19:152-62.
119. Chiorazzi N. Implications of new prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *ASH education book (2012)*:2012;76-87;
120. Ghia P, Guida G, Stella S, et al. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood*. 2003;101:1262-1269
121. Jaksic O, Paro MM, Kardum Skelin I, Kusec R, Pejisa V, Jaksic B. CD38 on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells has higher expression in lymph nodes than in peripheral blood or bone marrow. *Blood*. 2004;103:1968-1969.,
122. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99:1023-1029.
123. D'Arena G, Nunziata G, Coppola G, et al. CD38 expression does not change in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:3052-3053

124. Zucchetto A, Benedetti D, Tripodo C, et al. CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 Chemokines, and CD49d/Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Are Interchained by Sequential Events Sustaining Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Survival *Cancer Res* 2009;69:4001-4009
125. Deaglio S, Vaisitti T, Zucchetto A, Gattei V, Malavasi F. CD38 as a molecular compass guiding topographical decisions of chronic lymphocytic leukemia cells. *Semin Cancer Biol.* 2010; 20(6):416-423
126. Willimott S, Baou M, Huf S, Deaglio S, Wagner SD. Regulation of CD38 in proliferating chronic lymphocytic leukemia cells stimulated with CD154 and interleukin-4. *Haematologica.* 2007;92(10):1359-1366.
127. Calissano C, Damle RN, Hayes G, Murphy EJ, Hellerstein MK, Moreno C, Sison C, Kaufman MS, Kolitz JE, Allen SL, Rai KR, Chiorazzi N. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2009 114(23):4832–4842
128. Brachtl G, Hofbauer JP, Greil R, Hartmann TN. The pathogenic relevance of the prognostic markers CD38 and CD49d in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol* (2014) 93:361–374
129. Rose, D.M., Han, J. & Ginsberg, M.H. (2002) Alpha4 integrins and the immune response. *Immunological Reviews*, 186, 118–124
130. Hemle ME, Elices MJ, Parker C, Takada Y (1990) Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol Rev* 114:45–65
131. Hartmann TN, Grabovsky V, Wang W, Desch P, Rubenzer G, Wollner S, Binsky I, Vallon-Eberhard A, Sapozhnikov A, Burger M, Shachar I, Haran M, Honczarenko M, Greil R, Alon R. Circulating B-cell chronic lymphocytic leukemia cells display impaired migration to lymph nodes and bone marrow. *Cancer Res*, 2009: 69(7):3121–3130
132. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC. Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*:1995; 80(3):413–422
133. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/ fibronectin binding site. *Cell* 1990;60(4):577–584,
134. Guan JL, Hynes RO. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell* 1990;60(1):53–61
135. Arroyo AG, Yang JT, Rayburn H, Hynes RO (1999) Alpha4 integrins regulate the proliferation/differentiation balance of multilineage hematopoietic progenitors in vivo. *Immunity* 11(5): 555–566

136. Priestley GV, Ulyanova T, Papayannopoulou T Sustained alterations in biodistribution of stem/progenitor cells in Tie2Cre+ alpha4(f/f) mice are hematopoietic cell autonomous. *Blood*;2007; 109(1): 109–111
137. Brachtl G, Sahakyan K, Denk U, Girbl T, Alinger B, Hofbauer SW, Neureiter D, Hofbauer JP, Egle A, Greil R, Hartmann TN. Differential bone marrow homing capacity of VLA-4 and CD38 high expressing chronic lymphocytic leukemia cells. *PloS One* 2011; 6(8): e23758
138. Binsky I, Lantner F, Grabovsky V, Harpaz N, Shvidel L, Berrebi A, Goldenberg DM, Leng L, Bucala R, Alon R, Haran M, Shachar I (2010) TAp63 regulates VLA-4 expression and chronic lymphocytic leukemia cell migration to the bone marrow in a CD74-dependent manner. *J Immunol* 184(9):4761–4769.
139. Hamilton E, Pearce L, Morgan L, Robinson S, Ware V, Brennan P, Thomas NS, Yallop D, Devereux S, Fegan C, Buggins AG, Pepper C. Mimicking the tumour microenvironment: three different co-culture systems induce a similar phenotype but distinct proliferative signals in primary chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*;2012 158(5):589–599.
140. de la Fuente MT, Casanova B, Garcia-Gila M, Silva A, Garcia-Pardo A Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leuk Off J Leuk Soc AmLeuk Res Fund UK* 1999;13(2):266–274
141. Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Terol MJ, Van den Steen PE, Hernandez del Cerro M, Roderfeld M, Roeb E, Opendakker G, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A (2010) Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* 17(2):160–172
142. Gattei V, Bulian P, Del Principe MI, Zucchetto A, Maurillo L, Buccisano F, Bomben R, Dal-Bo M, Luciano F, Rossi FM, Degan M, Amadori S and Del Poeta G. Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*: 2008 111: 865-873
143. Isakow N, Wange RL, Burgess WH, et al. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosinebased activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med.* 1995;181: 375-380
144. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine* 2004; 351(9): 893–901.
145. Chen L, Apgar J, Huynh L, et al. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2005;105:2036-2041.

- 146.Chen L, Widhopf G, Huynh L et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100(13): 4609–4614.
- 147.Bernal A, Pastore RD, Asgary Z et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 2001; 98(10): 3050–3057.
- 148.Rizzo D., Bouvier G, Youlyouz I., guerin E, Trimoreau F., Bordessoule D., Jaccard A., Gachard N. And Feuillard J. T/B ratio does not reflect levels of ZAP70 expression in clonal CLL B cells due to ZAP70 overexpression in patients T cells, *Clin Cyt*, 2013;84B;125-132
- 149.Sheridan R, Mounajjed T, Ehrmann DE, Hurtubiuse PE and Schragger JA. Comparison of bone marrow and peripheral blood ZAP-70 status examined by flow cytometric immunophenotyping in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry part B (Clinical cytometry)* 70B (2006): 320-321
- 150.Deaglio S., Vaissiti T., Aydin S, D'Arena G, Bonello L., Omede P., Scatolini M., Jaksic O., Chiorino G., Efremov D and Malavasi P. CD38 and Zap-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential . *Blood*, 2007;100;4012-21.
- 151.Burger AJ., Tsukada N., Burger M, Zvaifler M, Dell'Aquila and Kipps TJ. Blood derived nurse like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal derived factor -1. *Blood*,2000;96;2655-63.
- 152.Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* (2006): 107 (9): 3584-3592
- 153.Deglesne PA, Chevallier N, Letestu R, Baran-Marshak F et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of ZAP-70 expression. *Cancer Res* 2006; 66: (14): 7158-7166
- 154.Gachard N, Salviat A, Boutet C et al. Multicenter study of ZAP-70 expression in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia using an optimized flow cytometry method. *Hematologica* (2008); 93(2): 215-223
- 155.Zanotti R., Ambrosetti A., Lestani M., Ghia P., Pattaro C., Remo A., Zanetti F., Stella S., Perbellini O., Preto G., Guida G., Caligaris-Varpio F., Menestrina F., Pizzolo G. And Chilosi M. ZAP-70 expression as detected by immunohistochemistry on bone marrow biopsies from early phase CLL patients is a strong adverse prognostic factor.*Leukemia*, 2007;21;102-109.
- 156.Pascutti MF, Jak M, Tromp JM, Derks IA, Remmerswaal EB, Thijssen R, van Attekum MH, van Bochove GG, Luijckx DM, Pals ST, van Lier RA, Kater AP, van Oers MH, Eldering E. IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells.*Blood*. 2013 Oct 24;122(17):3010-9

157. Willimott S, Baou M, Huf S, Deaglio S, Wagner SD. Regulation of CD38 in proliferating chronic lymphocytic leukemia cells stimulated with CD154 and interleukin-4. *Haematologica*. 2007;92(10):1359-1366
158. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2427-2437.
159. Travis LB, Curtis RE, Hankey BF, Fraumeni JF Jr. Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(18): 1422-1427.
160. Hofbauer JP, Heyder C, Denk U, Kocher T, Holler C, Trapin D, Asslaber D, Tinhofer I, Greil R, Egle A Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL. *Leukemia*. 2011 Sep;25(9):1452-8.
161. Ai WZ, Hou JZ, Zeiser R, Czerwinski D, Negrin RS, Levy R. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Int J Cancer*. 2009;124(1):239- 244.
162. Piper KP, Karanth M, McLarnon A, Kalk E, Khan N, Murray J, Pratt G, Moss PA. Chronic lymphocytic leukaemia cells drive the global CD4⁺ T cell repertoire towards a regulatory phenotype and leads to the accumulation of CD4⁺ forkhead box P3⁺ T cells. *Clin Exp Immunol*. 2011 Nov;166(2):154-63.
163. Correia RP, Silva FAM, Bacal NS, Campregher PV, Hamershlak, Amarante-Mendes GP. Involvement of memory T-cells in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2014;36(1):60-64
164. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, Ramsay AG, Gribben JG. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 2013 Feb 28;121(9):1612-21.
165. Christopoulos P, Pfeifer D, Bartholomé K, Follo M, Timmer J, Fisch P, Veelken H. Definition and characterization of the systemic T-cell dysregulation in untreated indolent B-cell lymphoma and very early CLL. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3836-46
166. Monserrat J, Angel Sánchez M, de Paz R, Díaz D, Mur S, Reyes E, Prieto A, de la Hera A, Martínez-A C, Alvarez-Mon M. Distinctive patterns of naïve/memory subset distribution and cytokine expression in CD4⁺ T lymphocytes in ZAP-70⁺ B-chronic lymphocytic patients. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013 Jul 29. doi: 10.1002/cytob.21120. [Epub ahead of print]

167. Ђурђевић П. Хронична лимфоцитна лаукемија: апоптоза малигно измењених лимфоцита и оксидативни стрес, Медицински факултет у Крагујевцу, 2006, докторска дисертација
168. Pedersen, I.M., Kitada, S., Leoni, L.M. et al. Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood*. 2002; 100: 1795–1801
169. Burger, M., Hartmann, T., Krome, M. et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2005; 106: 1824–1830,
170. Burger, J.A., Tsukada, N., Burger, M. et al. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell derived factor-1. *Blood*. 2000; 96: 2655–2663
171. Smit, L.A., Hallaert, D.Y., Spijker, R. et al. Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity. *Blood*. 2007; 109: 1660–1668
172. Buggins AG, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res*. 2010 Jul;34(7):837-42
173. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 13944–13949
174. Pepper, C., Thomas, A., Hoy, T., and Bentley, P. Chlorambucil resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is mediated through failed Bax induction and selection of high Bcl-2-expressing subclones. *Br J Haematol*. 1999; 104: 581–588
175. Hussain, S.R., Cheney, C.M., Johnson, A.J. et al. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 2144–2150
176. Malgorzata Sieklucka, Agnieszka Bojarska-Junak, Agata Surdacka, Iwona Hus, Ewa Wasik-Szczepanek, Anna Dmoszynska, Malgorzata Wach, Magdalena Lewandowska, and Jacek M. Rolinski. Increased Apoptosis of Peripheral Blood and Bone Marrow B and T Cells Correlates with Advanced Stages and Poor Risk Factors in Patients with B-CLL. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2008; 112: 4162
177. Witkowska M, Nowak W, Cebula-Obrzut B, Majchrzak A, Medra A, Robak T, Smolewski P. Spontaneous in vitro apoptosis of de novo chronic lymphocytic leukemia cells correlates with risk of the disease progression. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014: epub ahead of print doi: 10.1002/cyto.b.21163

- 178.Laytragoon-Lewin N, Duchony E, Bai X and Melstedt H. Downregulation of the CD95 receptor and defect CD40 mediated signal transduction in B-CLL cells. *European journal of Hematology*, 1998;61(4):266-271
- 179.Romano C, De Fanis U, Sellito A, Chiorazzi F, Gustafierro S, Guinta R, Tirelli A, Rotoli B and Lucivero G. Induction of CD95-mediated apoptosis. *Immunology letters*. 2005;97(1):131-139
- 180.von Bergwelt-Balidon M, Maecker B, Shultze J and Gribben J. CD40 activation: potential for specific immunotherapy in B-CLL. *Annals of Oncology*, 2004;15(6):853-857
- 181.Steele A, Prentice A, Yogashangary B., Hart S., necheva E, Howard-Reeves J, Duke V, Kottaridis P, Cwynarski K, Vassilev L and Wickremasinghe R. P-53 mediated apoptosis of CLL cells: evidence for a transcription-independent mechanism, *Blood*, 2008;112(9):3827-3834
- 182.Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krber A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M and Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*.2000;343(26):1910-1916
- 183.Wojtowicz M and Wolowiec D. Dysregulation of Apoptosis and proliferation in CLL cells in Chronic Lymphocytic Leukemia, Dr. Pablo Opezzo (Ed.), *InTech*. 2012:37-50-6
- 184.Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G, Vargas J, Sanches A, Martin-Saavedra F, Ballester S, Garcia-Marco J, Jorda J and Durantez A. A sustained activation of PI3K/NF- κ B pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia*. 2004;18(8):1391-1400
- 185.Longo P, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G and Efremov D. The Akt/mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic downstream of the B cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2008;111(2):846-855
- 186.Mainou-Fowler T, Miller S, Proctor SJ, Dickinson AM. The levels of TNF alpha, IL4 and IL10 production by T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Leuk Res* 2001;25:157-163
- 187.Al-Dabagh and Al-Mayah. EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. II: HUMORAL IMMUNE RESPONSE *Iraqi journal of science*. 2011;52(3):388-393
- 188.Mainou-Fowler T, Craig VA, Copplestone AJ, Hamon MD, Prentice AG. Effect of anti-APO1 on spontaneous apoptosis of B-cells in chronic lymphocytic leukaemia: the role of bcl-2 and interleukin 4. *Leuk Lymphoma* 1995;19:301-308

189. Fluckiger AC, Rossi JF, Bussel A, Bryon P, Banchereau J, Defrance T. Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B-cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors. *Blood* 1992;80:3173–3181
190. van Kooten C, Rensink I, Aarden L, van Oers R. Interleukin-4 inhibits both paracrine and autocrine tumor necrosis factor-alpha-induced proliferation of B chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1992;80:1299–1306.
191. Lundin J, Kimby E, Bergmann L, Karakas T, Mellstedt H, Osterborg A. Interleukin 4 therapy for patients with chronic lymphocytic leukaemia: a phase I/II study. *Br J Haematol* 2001;112:155–160
192. Burger R. Impact of Interleukin-6 in Hematological Malignancies. *Transfus Med Hemother* 2013;40:336–343.
193. Moreno A, Villar ML, Camara C, et al. Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2001;97:242–249
194. Callea V, Morabito F, Luise F et al. Clinical significance of sIL-2R, sCD23, sICAM-1, IL-6 and sCD14 serum levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematologica* 1996; 81: 310–15.
195. Robak T, Wierzbowska A, Blasinska-Morawiec M, Korycka A, Blonski JZ. Serum levels of IL-6 type cytokines and soluble IL-6 receptors in active B-cell chronic lymphocytic leukemia and in cladribine induced remission. *Mediators Inflamm* 1999; 8: 277–286
196. Hulkkonen J, Vilpo J, Vilpo L, Hurme M. Diminished production of interleukin-6 in chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells from patients at advanced stages of disease. Tampere CLL Group. *Br J Haematol* 1998; 100:478–483.
197. Fayad L, Keating MJ, Reuben JM, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood* 2001;97:256–263
198. Buggins AG, Patten PE, Richards J, Thomas NS, Mufti GJ, Devereux S. Tumor-derived IL-6 may contribute to the immunological defect in CLL. *Leukemia*. 2008 May;22(5):1084-7
199. Tangye SG, Weston KM, Raison RL. Interleukin-10 inhibits the in vitro proliferation of human activated leukemic CD5+ B-cells. *Leuk Lymphoma* 1998;31:121–130
200. Castejon R, Vargas JA, Romero Y, Briz M, Munoz RM, Durantez A. Modulation of apoptosis by cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry* 1999;38:224–230
201. Fluckiger AC, Durand I, Banchereau J. Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J Exp Med* 1994;179:91–99

202. DiLillo DJ¹, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, Matsushita T, Matta KM, Chen Y, Venturi GM, Russo G, Gockerman JP, Moore JO, Diehl LF, Volkheimer AD, Friedman DR, Lanasa MC, Hall RP, Tedder TF. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia*. 2013 Jan;27(1):170-82.
203. Lech-Maranda E¹, Grzybowska-Izydorczyk O, Wyka K, Mlynarski W, Borowiec M, Antosik K, Cebula-Obrzut B, Makuch-Lasica H, Nowak G, Klimkiewicz-Wojciechowska G, Wawrzyniak E, Bilinski P, Robak T, Warzocha K. Serum tumor necrosis factor- α and interleukin-10 levels as markers to predict outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia in different risk groups defined by the IGHV mutation status. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012 Dec;60(6):477-86.
204. Djurdjevic P¹, Zelen I, Ristic P, Baskic D, Popovic S, Arsenijevic N. Role of decreased production of interleukin-10 and interferon-gamma in spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia lymphocytes in vitro. *Arch Med Res*. 2009 Jul;40(5):357-63.
205. Lech-Maranda E, Mlynarski W, Grzybowska-Izydorczyk O, Borowiec M, Pastorczyk A, Cebula-Obrzut B, Klimkiewicz-Wojciechowska G, Wcislo M, Majewski M, Kotkowska A, Robak T, Warzocha K. Polymorphisms of TNF and IL-10 genes and clinical outcome of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Mar;52(3):287-96.
206. Sjoberg J, Aguilar-Santelises M, Sjogren AM, et al. Interleukin-10 mRNA expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia inversely correlates with progression of disease. *Br J Haematol* 1996;92:393–400
207. Kitabayashi A, Hirokawa M, Miura AB. The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death. *Int J Hematol* 1995;62:99–106.
208. Jurlander J, Lai CF, Tan J, et al. Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1997;89:4146–4152
209. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, Berthou C, Mageed RA, Renaudineau Y, Youinou P. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol*. 2011 Apr 15;186(8):4835-44
210. Garaud S, Morva A, Lemoine S, Hillion S, Bordron A, Pers JO, Berthou C, Mageed RA, Renaudineau Y, Youinou P. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J Immunol*. 2011 Apr 15;186(8):4835-44

211. Parfieńczyk A, Kiersnowska-Rogowska B, Rogowski F. Interleukin-6 and interleukin-12 blood levels in patients with chronic B-cell lymphocytic leukemia *Pol Merkur Lekarski*. 2004 Feb;16(92):157-61.
212. Ghamlouch H, Ouled-Haddou H, Damaj G, Royer B, Gubler B, Marolleau JP. A combination of cytokines rescues highly purified leukemic CLL B-cells from spontaneous apoptosis in vitro. *PLoS One*. 2013;8(3):e60370
213. Aguilar-Santelises M, Gigliotti D, Osorio LM, Santiago AD, Mellstedt H, Jondal M. Cytokine expression in BCLL in relation to disease progression and in vitro activation. *Med Oncol* 1999;16:289–295.
214. Digel W, Stefanic M, Schoniger W, et al. Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1989;73:1242-1246
215. Alvarez-Mon M, Garcia-Suarez J, Prieto A, et al. Heterogeneous proliferative effect of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin on mitogenactivated B cells from B-chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 1993;43:81-85.
216. Heslop HE, Bianchi AC, Cordingley FT, et al. Effects of interferon alpha on autocrine growth factor loops in B lymphoproliferative disorders. *J Exp Med* 1990;172:1729–1734
217. Venugopal P, Sivaraman S, Huang XK, Nayini J, Gregory SA, Preisler HD. Effects of cytokines on CD20 antigen expression on tumor cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2000;24:411–415.
218. Wang Y, Yue B, Yu X, Wang Z, Wang M. SLUG is activated by nuclear factor kappa B and confers human alveolar epithelial A549 cells resistance to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *World J Surg Oncol*. 2013 Jan 22;11:12
219. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z, Koller CA, Kurzrock R, Thomas DA, Faderl S, Lerner S, O'Brien S, Albitar M. The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1215-9
220. Aguilar-Santelises M, Gigliotti D, Osorio LM, Santiago AD, Mellstedt H, Jondal M. Cytokine expression in BCLL in relation to disease progression and in vitro activation. *Med Oncol* 1999;16:289–295
221. Singer MK, Assem M, Abdel Ghaffar AB, Morcos NY. Role of TNF-alpha as a survival prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia patients. *Egypt J Immunol*. 2011;18(1):51-60.
222. Mainou-Fowler T, Prentice AG. Modulation of apoptosis with cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1996;21:369–377

- 223.Zaki M, Douglas R, Patten N, Bachinsky M, Lamb R, Nowell P, Moore J. Disruption of the IFN-gamma cytokine network in chronic lymphocytic leukemia contributes to resistance of leukemic B-cells to apoptosis. *Leuk Res* 2000;24:611–621.
- 224.Rojas R, Roman J, Torres A, et al. Inhibition of apoptotic cell death in B-CLL by interferon gamma correlates with clinical stage. *Leukemia* 1996;10:1782–1788
- 225.Karmali R, Paganessi LA, Frank RR, Jagan S, Larson ML, Venugopal P, Gregory SA, Christopherson KW 2nd. Aggressive disease defined by cytogenetics is associated with cytokine dysregulation in CLL/SLL patients. *J Leukoc Biol.* 2013 Jan;93(1):161-70
- 226.Urbanowicz I, Mazur G, Stacherzak-Pawlik J, Bogunia-Kubik K, Wróbel T, Woźniak M, Kuliczkowski K IFN gamma gene polymorphism may contribute to the susceptibility to CLL..*Pathol Oncol Res.* 2010 Jun;16(2):213-6.
- 227.Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1999;107: 605–610.
- 228.Chen H, Treweeke AT, West DC, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000;96:3181–3187
- 229.Aguayo A, Manshouri T, O'Brien S, et al. Clinical relevance of Flt1 and Tie1 angiogenesis receptors expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Res* 2001;25:279–285. Ferrajoli A, Manshouri T, Estrov Z, et al. High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2001;7:795–799
- 230.Krejci P, Dvorakova D, Krahulcova E, Pachernik J, Mayer J, Hampl A and Dvorak P. FGF-2 abnormalities in B cell chronic lymphocytic and chronic myeloid leukemias. *Leukemia* (2001) 15, 228–237
- 231.Vrbacky F, Nekvindova J, Rezacova V, Simkovic M, Motyckova M, Belada D, Painuly U, Jiruchova Z, Maly J, Krejsek J, Zak P, Cervinka M, Smolej L. Prognostic relevance of angiopoietin-2, fibroblast growth factor-2 and endoglin mRNA expressions in chronic lymphocytic leukemia.*Neoplasma.* 2014;61(5):585-92