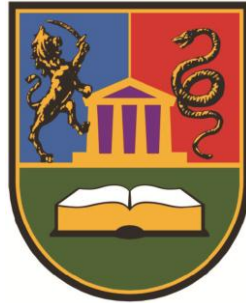


**Универзитет у Крагујевцу**  
**Факултет медицинских наука**



Снежана С. Сретеновић

**УТИЦАЈ ГЕНСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА ВСL - 2 + И МУС +  
УТВРЂЕНИХ FISH – ОМ НА ПРОГНОЗУ БОЛЕСНИКА СА  
ДИФУЗНИМ Б КРУПНОЋЕЛИЈСКИМ ЛИМФОМОМ  
ЛЕЧЕНИХ ИМУНОХЕМИОТЕРАПИЈОМ**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

Ментор: Доц. Др Слободанка Митровић – патологија

Крагујевац, 2015.

# САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Нехочкинови лимфоми .....	1
1.1.1. Историјат лимфома.....	1
1.1.2. Дефиниција нехочкинових лимфома (НХЛ).....	3
1.1.3. Дифузни Б крупноћелијски НХЛ: дефиниција и подела .....	5
1.1.4. Епидемиологија НХЛ ДБКЛ.....	8
1.1.5. Патогенеза, генске аберације и експресије, морфолошке особине ДБКЛ .....	9
1.1.6. Клиничка обележја и клинички дијагностички алгоритам НХЛ ДБКЛ.....	10
1.1.7. Лечење НХЛ ДБКЛ.....	12
1.1.8. Механизам деловања цитостатика протокола СНОР .....	12
1.1.8.1. Циклофосфамид /Endoxan <sup>®</sup> / .....	13
1.1.8.2. Винкрестин / Oncovin <sup>®</sup> / .....	13
1.1.8.3. Доксорубицин / Adriablastin <sup>®</sup> / .....	13
1.1.8.4. Преднизон / Pronizon <sup>®</sup> / .....	14
1.1.9. Механизам деловања моноклонског антитела ритуксимаб ( <i>Mabthera</i> <sup>®</sup> ).....	14
1.2. Технологија генског чипа и имунохистохемије у прогнози оболелих од НХЛ ДБКЛ .....	15
1.3. Прогностички параметри НХЛ ДБКЛ, детектовани флуоресцентном <i>in situ</i> хибридизацијом.....	16
1.3.1. Цитогенетске аберације.....	16
1.3.1.1. c-Мус.....	16
1.3.1.2. Bcl2 .....	18
1.3.1.3. Bcl6 .....	18
1.3.1.4. Bcl-2 / c-Мус - Double hit НХЛ ДБКЛ .....	19
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА .....	21
2.1. Циљеви истраживања.....	21
2.2. Хипотезе истраживања.....	21
3. ИСПИТАНИЦИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	22
3.1. Испитивана популација.....	22
3.2. Обрада материјала за анализу .....	23
3.3. Методе анализе материјала.....	24
3.3.1. Имунохистохемијски метод.....	24

3.3.2. Флуоросцентна <i>in situ</i> хибридизација .....	24
3.4. Статистичка анализа података .....	28
4. РЕЗУЛТАТИ .....	29
4.1. Анализа клиничких особености испитаника у моменту дијагностиковања .....	29
4.1.1. Анализа Б симптоматологије оболелих од НХЛ ДБКЛ .....	34
4.1.2. Анализа коморбидитета оболелих од НХЛ ДБКЛ, различитог исхода.....	36
4.2. Претерапијске лабораторијске анализе крви у оболелих од НХЛ ДБКЛ .....	37
4.2.1. Анализа претерапијске крвне слике.....	37
4.2.2. Биохемијске анализе крви претерапијске.....	40
4.2.3. Биохуморални запаљенски синдром претерапијски.....	47
4.3. Имунохистохемијска анализа и генски полиморфизам за <i>Bcl2</i> и <i>cMyc</i> утврђен <i>FISH</i> -ом.....	50
4.4. Анализа преживљавања .....	56
4.4.1. Преживљавање у односу на ИПИ, перформанс статус болесника – <i>ECOG</i> и клинички стадијум .....	57
4.4.2. Преживљавање испитаника у односу на анализиране биохемијске параметре при дијагнози НХЛ ДБКЛ.....	63
4.4.3. Анализа повезаности генског полиморфизама, ИПИ ризика и преживљавања у испитаника са НХЛ ДБКЛ .....	69
5. <i>COX</i> -ОВА РЕГРЕСИОНА АНАЛИЗА ПРЕЖИВЉАВАЊА .....	90
6. ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ И ОДГОВОР НА ТЕРАПИЈУ: КОМПЛЕТНА РЕМИСИЈА .....	93
6.1. Сензитивност и специфичност генског полиморфизма у предикцији постизања комплетне ремисије .....	96
7. ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ И ОДГОВОР НА ТЕРАПИЈУ: ПАРЦИЈАЛНИ ОДГОВОР.....	98
7.1. Сензитивност и специфичност генског полиморфизма у предикцији постизања парцијалног одговора .....	101
8. ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ И ОДГОВОР НА ТЕРАПИЈУ - РЕФРАКТЕРНОСТ НА ТЕРАПИЈУ .....	103
8.1. Сензитивност и специфичност генског полиморфизма у предикцији рефрактерности на терапију .....	106

9. ДИСКУСИЈА: .....	108
9.1. Значај $Ki-67$ .....	111
9.2. Значај $Vcl2$ .....	112
9.3. Значај $Vcl6/$ ИХХ позитивности .....	113
9.4. Значај $cMyc$ .....	114
10. ЗАКЉУЧЦИ .....	118
11. ПОПИС ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА .....	120
12. ЛИТЕРАТУРА .....	121

# 1. УВОД

## 1.1. Нехочкинови лимфоми

### 1.1.1. Историјат лимфома

Британски патолог Thomas Hodgkin, је први 1832. године у свом раду описао лимфому. Каснијом анализом утврђено је да су од седам узорака, три била Хочкинов лимфом, а четири узорка - Нехочкинови лимфоми (НХЛ), реактивна упала или туберкулоза (1). Тридесетак година касније не знајући за рад *Thomasa Hodgkin*-а британски лекар *Samuel Wilks*, поново описује болест лимфних чворова, те једна од лимфопролиферативних болести, у част првог аутора, добија назив Хочкинова болест. НХЛ су историјски обухватили све оне различите типове лимфома који нису имали патохистолошка обележја Хочкиновог лимфома. Новија историја НХЛ –а је историја различитих класификација којима се покушава постићи консензус патолога и клиничара у целом свету. Напредак науке и дијагностике је условљавао настајање нових ентитета, те је до последње класификације СЗО (Светска Здравствена Организација, *engl. World Health Organisation – WHO*) из 2008.године промењено низ класификација. Прву модерну класификацију лимфома, базирану на морфолошким особинама ћелија, је предложио *Rappaport* са сарадницима 1956.године (2). Класификација *Lukes* и *Collins* из 1974. уводи први пут поделу на Б и Т лимфому, а подтипове одређују цитолошке особине (3). *Kielska* класификација уведена 1974 године, а потом ревидирана 1988.године, задржава поделу на Т и Б лимфому (на основу имунофенотипа), а уводи поделу на ниско агресивне (*engl. Low grade*) и високо агресивне (*engl. High grade*) лимфому, занемарујући клинички ток болести. Радна класификација (*engl. „Working Formulation of non – Hodgkin Lymphomas for Clinical Usage – WF“*) за клиничку употребу из 1982. године, није дуго живела и била је модификована *Rappaport*-ова класификација (4). Ревидирана евро-америчка класификација лимфома (*REAL*) донета 1994.године имала је дуго практичну вредност и била прихваћена од стране патолога и клиничара. (5). СЗО доноси нову класификацију лимфоидних неоплазми 2001. године која је ревидирана 2008.године. Данас се у свакодневној пракси користи класификација зрелих хематолошких малигнитета СЗО из 2008. године (табела бр.1.) (6).

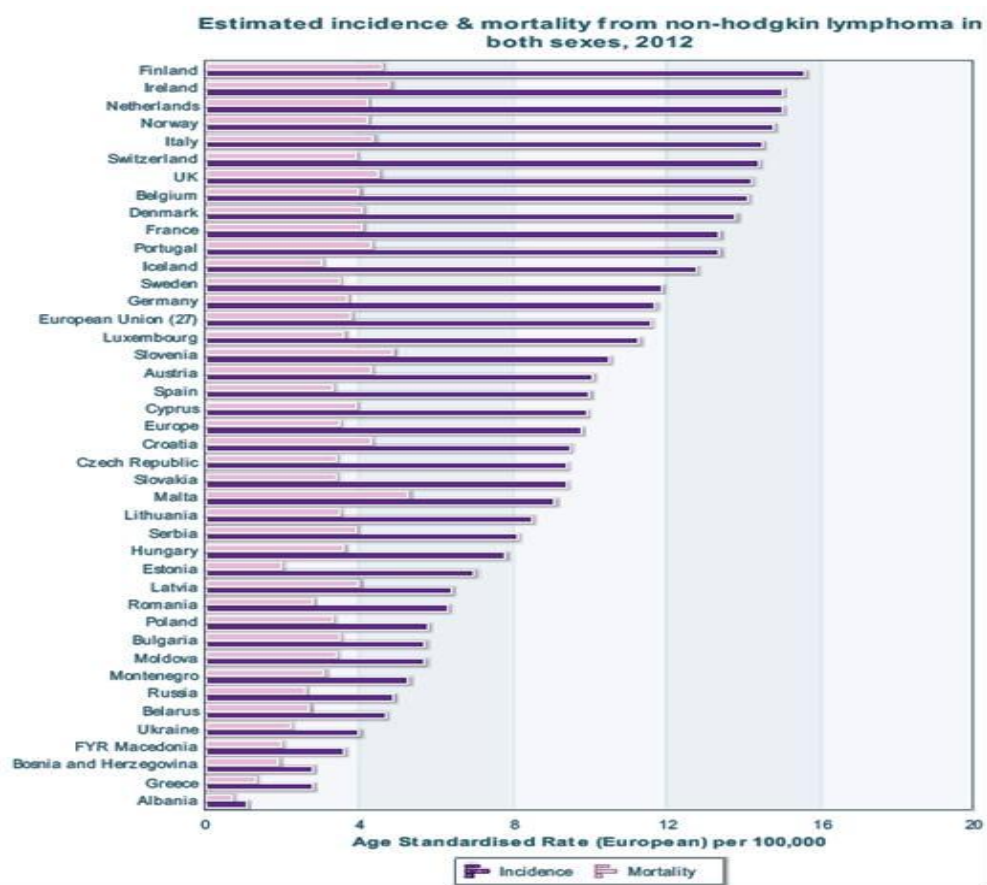
Зреле Б ћелијске неоплазме	Зреле Т и НК – ћелијске неоплазме
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Хронична лимфоцитна леукемија /лимфом малих лимфоцита</li> <li>- Б- ћелијска пролимфоцитна леукемија</li> <li>- Спленични лимфом маргинална зона</li> <li>- Леукемија власастих ћелија</li> <li>- Спленични лимфом/леукемија, неклассификован Спленични лимфом са дифузном инфилтрацијом црвене пулпе малим Б лимфоцитима</li> <li>- леукемија власастих ћелија – варијанта</li> <li>- Лимфоплазмоцитни лимфом / <i>Waldenstrom</i> макроглобулинемија</li> <li>- Болест тешких ланаца (<i>alpha, gamma, mu</i>)</li> <li>- Плазма ћелијске неоплазме</li> <li>- Екстранодални лимфом маргинална зона лимфоног ткива придруженог мукози (<i>MALT</i>)</li> <li>- Нодални лимфом маргинална зона (<i>MZL</i>)</li> <li>- Фоликуларни лимфом</li> <li>- Примарни кутани лимфом центра фоликула</li> <li>- Мантле ћелијски лимфом</li> <li>- <b>Дифузни Б – крупноћелијски лимфом (ДБКЛ), који није другачије одређен</b></li> <li>* <b><i>BCL</i> богат Т лимфоцитима/хистоцитима</b></li> <li>* <b><i>ДБКЛ</i> удружен са хроничном инфламацијом</b></li> <li>* <b><i>Epstein-Barr</i> вирус (<i>EBV</i>)</b></li> <li>+ <b><i>ДБКЛ</i> старих</b></li> <li>* <b>Примарни кутани <i>ДБКЛ</i>, <i>leg type</i></b></li> <li>* <b>интраваскуларни <i>ДБКЛ</i></b></li> <li>* <b>Лимфоматоидна грануломатоза</b></li> <li>* <b><i>ALK</i> позитивни <i>ДБКЛ</i></b></li> <li>* <b>Плазмобластни лимфом</b></li> <li>* <b>Крупноћелијски Б лимфом настао у <i>HHV8</i> мултицентричној <i>Castelman</i>-овој болести</b></li> <li>* <b>Примарни ефузиони лимфом</b></li> <li>- <i>Burkitt</i> лимфом</li> <li>- Б ћелијски лимфом, неклассификован, са заједничким особинама <i>ДБКЛ</i> и <i>Burkitt</i> лимфома</li> <li>- Б ћелијски лимфом, неклассификован, са заједничким особинама <i>ДБКЛ</i> и класичног <i>Hodgkin</i> –овог лимфома</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Т ћелијска пролимфоцитна леукемија</li> <li>- Т ћелијска леукемија великих гранулираних лимфоцита</li> <li>- Хронични лимфопродиферативни поремећај НК ћелија</li> <li>- Агресивна НК – ћелијска леукемија</li> <li>- Системска <i>EBV</i> позитивна Т ћелијска лимфопродиферативна болест дечијег доба</li> <li>- Хидроа вакциниформни –слични лимфом</li> <li>- Т ћелијска леукемија/лимфом одраслих (<i>HTLV-I</i> позитивни)</li> <li>-</li> <li>- Екстранодални НК/Т ћелијски лимфоми, назални тип</li> <li>- Т ћелијски лимфом удружен са ентеропатијом</li> <li>- Хепатоспленични Т ћелијски лимфом</li> <li>- Субкутани паникулитису сличан Т ћелијски лимфом</li> <li>- <i>Mycosis fungoides</i></li> <li>- <i>Sezary syndrom</i></li> <li>- Примарни кутани CD 30+ Т ћелијски лимфопродиферативни поремећаји</li> <li>* Лимфоидна папулоза</li> <li>* Примарни кутани анапластични лимфом великих ћелија</li> <li>- Примарни кутани <math>\gamma\delta</math> Т ћелијски лимфом</li> <li>- Примарни кутани CD8+ агресивни епидермоидни Т - лимфом цитотоксичних ћелија</li> <li>- Примарни кутани CD4+ Т – лимфом малих /средњих ћелија</li> <li>- Периферни Т – ћелијски лимфом, <i>NOS</i></li> <li>- Ангиоимунобластни Т ћелијски лимфом</li> <li>- Лимфом анапластичних великих ћелија, <i>ALK</i> - позитиван</li> <li>- Лимфом анапластичних великих ћелија, <i>ALK</i> - негативан</li> </ul>

Табела бр.1. WHO 2008 класификација зрелих Б, Т и НК – ћелијских неоплазми

### 1.1.2. Дефиниција неходкинових лимфома (НХЛ)

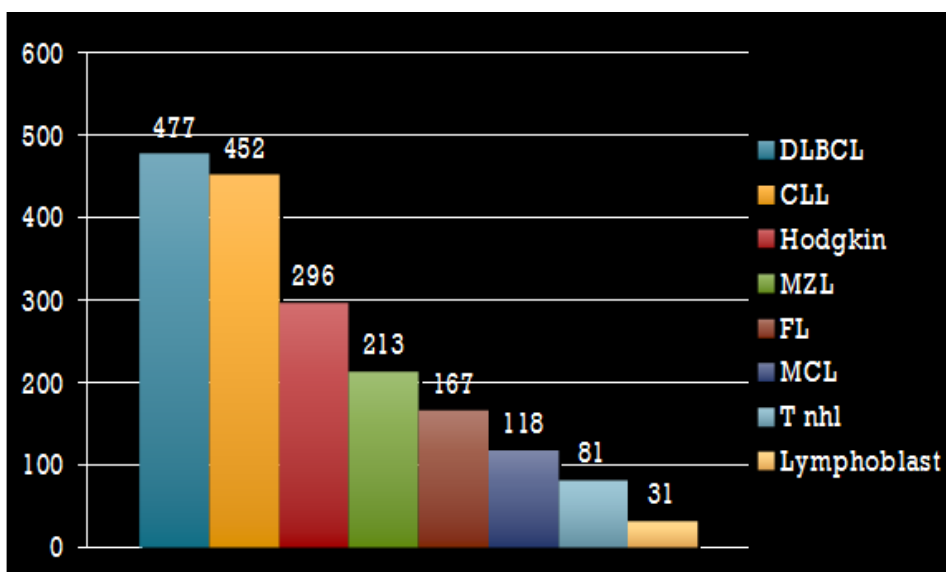
НХЛ су хетерогена група тумора која потиче од Б или Т, односно НК ћелија, заосталих у различитим стадијумима диференцијације (7). НХЛ су у 85% порекла Б лимфоцита, док преосталих 15% чини Т ћелијско порекло, НК и мешовито Б и Т порекло. Нормални лимфоцити, као носиоци имунитета, непрекидно примају сигнале смрти и преживљавања, а њихов баланс обезбеђује хомеостазу и спречава аутоимунитет. Из још не утврђених разлога, настанак функцијске дисрегулације ових ћелија води ка неопластичној промени и неконтролисаном пролиферацији. Ови лимфоми по учесталости заузимају пето место међу малигнитетима иза (карцинома плућа, простате, дојке и дебелог црева). Инциденца им је удвостручена за протеклих двадесет година (19,7%) за разлику од других лимфопролиферативних болести чија је инциденца готово непромењена (8,9).

Постоје дефиниције које инсистирају на клоналности као основној карактеристици ових болести, уз осврт на клиничко понашање – нодални, екстранодални или леукемијски раст (10). Клоналност се тумачи као последица тзв. „развојног застоја“ који може настати на било ком нивоу диференцијације Б и Т лимфоцита, са дедиференцијацијом породице (клона) малигних ћелија порекла једне родитељске ћелије, са карактеристичним фенотипом свих ћелија једног клона (11). Последње деценије клиничка и лабораторијска истраживања се допуњују новим молекуларним методама, као што је генско испитивање које ће помоћи у бољем разумевању биологије и диференцијације НХЛ-а. Ово се рефлектује у најновијој класификацији СЗО, где, да би се дефинисала болест, патолог користи све доступне информације: морфологију, имунофенотип, генске карактеристике и клиничко обележје (7). НХЛ су на петом месту међу малигнитетима у САД –у, а непосредни узрок смрти су у 4% болесника (12). Учесталост у САД износи 19,1 на 100 000 људи годишње, виша је у мушкараца него у жена са односом 23,2 : 15,8 и расте са старосном доби (13). Епидемиологија лимфоидних неоплазми у Србији је слична епидемиологији у западним земљама, ( слика бр. 1).



Слика бр. 1. Инциденца и морталитет од нехочкинових лимфома  
оба пола у Европи 2012. године

У Србији нема прецизних података о учесталости НХЛ-а, али анализа 1999 биопсија, од јануара 2011 до децембра 2012.године показује највећу учесталост НХЛ ДБКЛ, (слика бр.2).



Слика бр.2. Учесталост лимфопролиферативних болести



Анализирана структура смртности од малигну хемопатија у централној Србији за период од 1990.године до 1999. године, показује учешће НХЛ-а од 20% (14).

### 1.1.3. Дифузни Б крупноћелијски НХЛ: дефиниција и подела

Дифузни Б крупноћелијски неходкинов лимфом (НХЛ ДБКЛ) представља хетерогену групу агресивних лимфома, који се карактеришу присуством крупних, трансформисаних Б ћелија. Према најновијој класификацији (СЗО) ДБКЛ је на основу морфолошких, биолошких и клиничких особина подељен на неколико варијанти и специфичних подтипова (табела 2). Међутим неке је тешко сврстати у одређену подгрупу, те се сврставају у групу без посебних карактеристика (енгл. „*not otherwise specified*“ – *NOS DBCL*“) чинећи трећину свих НХЛ-а (15).

<b>ДБКЛ <i>not otherwise specified</i> (NOS)</b>
<p><i>Честе морфолошке варијанте</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- центробластни</li> <li>- имунобластни</li> <li>- анапластични</li> </ul> <p><i>Ретке морфолошке варијанте</i></p> <p><i>Молекуларне варијанте (GCB тип и ABC тип)</i></p> <p><i>Имунохистохемијске подгрупе</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD5 позитивни ДБКЛ</li> <li>- GCB</li> <li>- Non- GCB</li> </ul>
<p><b>Подтипови Б крупноћелијског лимфома</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Б крупноћелијски лимфом богат Т лимфоцитима</li> <li>- Примарни ДБКЛ мозга</li> <li>- Примарни кутани ДБКЛ „<i>leg type</i>“</li> <li>- EBV позитивни ДБКЛ старих особа</li> <li>- Други лимфоми крупних Б ћелија</li> <li>- Примарни медијастинални Б ћелијски лимфом</li> <li>- Интраваскуларни ДБКЛ</li> <li>- ДБКЛ повезан са хроничном инфламацијом</li> <li>- Лимфоматоидна грануломатоза</li> <li>- ALK позитиван ДБКЛ</li> <li>- Плазмобластни лимфом</li> <li>- Крупноћелијски Б лимфом настао у HHV8 мултицентричној <i>Custeman</i> - овој болести</li> <li>- Примарни ефузини лимфом</li> </ul>
<p><b>Гранични случајеви</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Б ћелијски лимфом, неклассификован, са особинама између ДБКЛ и Буркитовог лимфома</li> <li>- Б ћелијски лимфом, неклассификован, са особинама између ДБКЛ и класичног Хочкиновог лимфома</li> </ul>

Табела бр. 2. Класификација ДБКЛ (СЗО, 2008.)

Начин стадирања (*engl. „staging“ diffuse large B-cell lymphoma – DLBCL*) предвиђа, поред претходно наведене класификације СЗО учињене на основу морфолошких, биолошких и клиничких особина неоплазми, и класификацију по *Ann Arbor* систему, која је иницијално усвојена 1971.године за Хочкинову болест,( табела бр.3). Користи се и *Cotswolds* модификована *Ann Arbor* класификација,( табела бр.4).

<b>I</b>	Захваћеност једног региона лимфних жлезда или екстралимфатичног органа (места)
<b>II</b>	Захваћеност 2 (два) или више лимфних органа са исте стране дијафрагме или локализовано хватање екстралимфатичног органа или места плус једног или више лимфних региона са исте стране дијафрагме. <b>II(a)</b> - <i>Per continuitatem</i> – позитивне лимфне регије су једна поред друге <b>II (b)</b> - позитивне лимфне регије нису једна поред друге, али су и даље са исте стране дијафрагме
<b>III</b>	Захваћеност региона лимфних жлезда са обе стране дијафрагме.
<b>IV</b>	Дифузна или дисеминована захваћеност једног или више екстралимфатичних органа или ткива, са или без захваћености лимфних жлезда.

Табела. бр.3. Одређивање клиничког стадијума по *Ann Arbor* класификацији

Уз клинички стадијум се додаје А или Б, у зависности од присутних симптома као и Е, ако постоји екстранодална локализација болести. Масивна (*engl. „Bulky“*) форма болести се посебно означава, а истиче велику туморску масу (18).

	Клинички стадијум
<b>I</b>	Једна група лимфних чворова
<b>II</b>	Више група лимфних чворова са исте стране дијафрагме
<b>III</b>	Више група лимфних чворова са обе стране дијафрагме
<b>IV</b>	Више екстранодалних места или екстранодал уз лимфни чвор
<b>X</b>	Bulksy > 10 cm
<b>E</b>	Екстранодал постоји на једном екстранодалном изолованом оболелом месту
<b>A/B</b>	В-симптоми: губитак у тежини > 10%, температура, ноћно презнојавање

Табела бр.4. Одређивање клиничког стадијума по *Cotswolds* модификованој *Ann Arbor* класификацији

За сваког пацијента старијег од 60 година одређује се категорија степена ризика који се назива Интернационални Прогнозни Индекс (*engl. International Prognostic Index -IPI*), табела бр.5, и један поен се додељује у случају присуства сваког од наведених негативних прогностичких фактора, те се на основу збира одређује ризик, табела бр.5а. Додатни Интернационални Прогнозни Индекс (*engl. age-adjusted International Prognostic Index*) је утврђен за млађе од 60 година,(табела бр.6), а присуство сваког од наведених негативних прогностичких фактора носи један поен, чији збир означава прогнозни ризик, (табела бр. 6а).

Старост	≥ 60 година	1 негативан поен
Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status	≥ 2	1 негативан поен
Повишена вредност лактат дехидрогеназе (LDH)	>1x од нормалних вредности	1 негативан поен
Ann Arbor клинички стадијум	III и IV	1 негативан поен
екстранодална места болести	≥ од једне локализације	1 негативан поен

Табела бр.5. Стратификација ризика – ИПИ за старије од 60 година

Низак	0 или 1
Средње низак	2
Средње висок	3
Висок	4 или 5

Табела бр. 5а. Степен ризика у зависности од ИПИ скора:

Ann Arbor клинички стадијум	III и IV	1 негативан поен
Вредност лактат дехидрогеназе (LDH)	>1x од нормалних вредности	1 негативан поен
Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status	2 до 4	1 негативан поен

Табела бр.6. Стратификација ризика – ИПИ за млађе од 60 година

Низак	0
Средње низак	1
Средње висок	2
Висок	3

Табела бр. 6а. Категорије процене ризика млађих од 60 година

ИПИ је користан клинички начин за поделу болесника према ризику, не узимајући у обзир генетски спектар различитости, а узимајући у обзир ECOG функционално стање од (*engl. Eastern Cooperative Oncology Group performance status*), (табела бр.7) (16). Док основа концепта, генске експресије идентификује две главне подгрупе ДБКЛ са различитом прогнозом (17.).

<b>0</b>	Способност да обавља све нормалне послове безограничења (без симптома);
<b>1</b>	способност за лакше послове, ограничена способност обављања тежих физичких активности;
<b>2</b>	Способност за бригу о себи, али неспособност за било какав посао (покретни болесник везан за кревет мање од половине будног периода);
<b>3</b>	Способност за ограничену бригу о себи (везан за кревет више од половине будног периода);
<b>4</b>	Није спососбан ни за какву бригу о себи (трајно везан за кревет).

Табела бр.7. ECOG скала функционалног стања болесника

Високи ИПИ је повезан са лошом прогнозом и у периоду пре увођења ритуксимаба у стандардну терапију петогодишње преживљавање болесника са ДБКЛ и високим ИПИ-ом било је 22%, за разлику од болесника у категорији ниског ризика код којих је петогодишње преживљавање било 73% (17). Модерни терапијски протоколи који укључују ритуксимаб побољшали су прогнозу у свих болесника, али разлике према ИПИ ризику и даље постоје. Четворогодишње преживљавање са високим ИПИ-ом је 59%, а за болеснике са ниским ризиком је 82% (19, 20, 21,22).

#### 1.1.4. Епидемиологија НХЛ ДБКЛ

НХЛ ДБКЛ је најчесталија малигна хематолошка неоплазма у САД и Европи, чинећи око 40% свих НХЛ Б лимфома (23). Инциденца варира од 3,7 до 14 новооболелих на 100 000 становника годишње, чешћи је у мушкараца него у жена са односом (1,3:1). Најчешће се јавља у средњој животној доби и у старијих, а најчесталији је у седмој деценији живота са медијаном од 63 године (24). Дифузни Б крупноћелијски лимфом се презентује са екстранодалном локализацијом у чак 60% случајева (25).

Појава НХЛ ДБКЛ може бити повезана са неким стањима, лековима и хемијским супстанцама:

1. урођена имунодефицијентна стања (атаксија – телеангиектазија синдром, Bruton- тип агамаглобулинемије, неколико комбинованих имунодефицијентних стања (SCID), Wiskott-Aldrich -синдром, Duncan –синдром и Chediak-Higashi синдром.
2. Инфекције вирусима : HIV, Epstein-Barr вирус (EBV), хепатитис С вирус (HCV), хумани Т ћелијски леукемија вирус (HTLV), хумани херпес вирус (HHVS), хеликобактер пилори (*Helicobacter pylori*).

Аутоимуне болести као што су :

1. реуматоидни артритис (RA), Sjögren синдром, системски еритемски лупус (SLE)
2. употреба лекова / имunosупресиви и хемиотерапеутици /
3. изложеност токсинима као што су хербициди, винил – хлорид и органски растварачи (26,27)

### **1.1.5. Патогенеза, генске аберације и експресије, морфолошке особине ДБКЛ**

НХЛ ДБКЛ су хетерогена група обољења са вишеструким генетским абнормалностима, који резултују поремећајем регулације ћелијског циклуса, апоптозе, пролиферације ћелија, обнове дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) диференцијације и других процеса (15). Посебно су значајне промене у контроли ћелијског циклуса и контроли апоптозе. Генске аберације се деле на примарне и секундарне. Примарне рекурентне хромозомске транслокације  $t(3;14)(q27;q32)$ ,  $t(8;14)(q24;q32)$  и  $t(14;18)(q32;q21)$ , карактеришу генске подтипове у око 50% болесника са НХЛ ДБКЛ. Додатне секундарне промене укључују тризомију хромозома 3, 5, 7, 11, 12, 18 и X (присутне код > 10% случајева), монозомија хромозома 12,13,14 и 15, делеције хромозома 1p, 6q, 7q32ter, 8p, 9p, 11q,17p. У ДБКЛ су честе и мутације или губитак оба алела p53 тумор супресор гена или 17p13.1, посебно у имунобластном типу (28, 29, 30, 31). Дијагноза лимфома уопште, па самим тим и ДБКЛ, искључиво је патохистолошка и обједињава цитоморфологију, имунофенотип, начин раста тумора, генотип и клиничке податке, (табела бр. 8). Цитоморфолошки и по начину раста, ДБКЛ представља дифузну пролиферацију крупних и ћелија умерене величине, чија су једра

већа или једнака једрима хистиоцита, или су по величини четири, пет или бар два пута већег дијаметра од малог лимфоцита. У складу са изгледом ћелија, морфолошке варијанте ДКБЛ су центробластна, имунобластна и анапластична. Имунофенотипски, ћелије експримирају *Pan-B* маркере (*CD19,CD20*) и мембранске или цитоплазматске имуноглобулине (*Ig M>G>A*). У 60% случајева експримирају *Bcl-6*, у 50% *Bcl-2*, у 20-40% *CD10*, у 10% експримира се *CD5* као прогностички врло лош знак. *CD30* и *MUM-1* позитивност је хетерогена, експресија *CD138* указује на плазмоцитну диференцијацију. Пролиферациони индекс је варијабилан, увек је *Ki-67*>20%, просечна вредност му је 55%. Цитогенетски, ДКБЛ се карактеришу клоналним реаранжирањем имуноглобулинских гена, у 20% случајева је присутан реаранжман *Bcl2* гена, у 10% *Myc* гена. *Bcl6* ген је реаранжиран у 30%, а мутиран чак у 70% случајева ДКБЛ. Удруженост *Bcl2* и *Myc* мутација уводи ДКБЛ у посебну категорију „*double hit*“ лимфома. *EBV* је увек негативан, осим у склопу имунодефицијенција. Пролиферациони индекс је варијабилан, увек је *Ki-67*>20%, просечна вредност му је 55%, али пролиферативна активност је обично >40%, а може бити и до 90% (32).

ЦИТОМОРФОЛОШКЕ ВАРИЈАНТЕ	ИМУНОФЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ	ЦИТОГЕНЕТСКЕ ОСОБИНЕ
центробластна	<i>Pan-B + , Ig c/m +</i>	<i>BCL2</i> (реаранжиран у 20%)
имунобластна	<i>BCL6+</i> (60%) <i>CD5+</i> (10%)	<i>MYC</i> (реаранжиран у 10%)
анапластична	<i>CD10+</i> <i>CD30+</i> <i>MUM1+</i> (варијабилна позитивност)	<i>BCL6</i> (реаранжиран у 30%, мутиран у 70%)
морфолошки ретка	<i>Ki-67</i> индекс >20% (просечно 55%)	<i>EBV-</i>

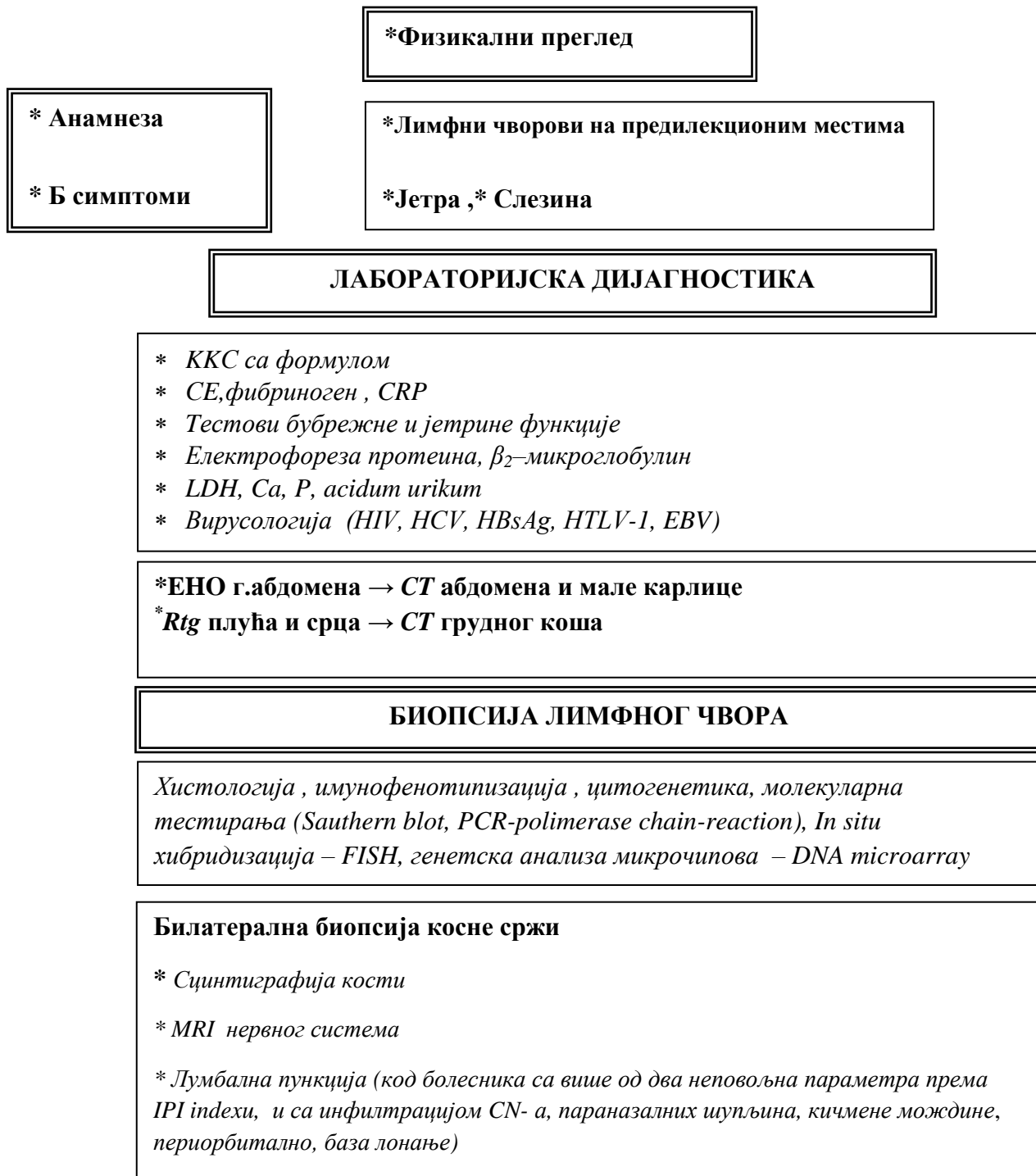
Табела бр. 8. Стандардни критеријуми за постављање дијагнозе ДКБЛ

### 1.1.6. Клиничка обележја и клинички дијагностички алгоритам НХЛ ДБКЛ

Клиничка слика НХЛ тиме и ДБКЛ, манифестује се, у почетку, безболним повећањем једног или више лимфних чворова. Симптоми се могу поделити на оне узроковане туморском масом и на опште симптоме. Симптоми узроковани туморском масом могу бити разнолики (диспноа, синдром горње шупље вене, оток једнострано или обострано доњих екстремитета, неуралгије и друго). Општи, односно Б симптоми, подразумевају ноћно презнојавање, повишену температуру без евидентне инфекције и губитак у телесној тежини већи од 10% за последњих шест месеци. Претходно

наведени симптоми су ређе присутни у НХЛ ДБКЛ него у Хочкиновој болести, а узроковани су отпуштањем цитокина из туморских ћелија или ћелија имунолошког сисема (33).

Дијагностичке процедуре у обради болесника оболелог од НХЛ ДБКЛ су приказане на (табели бр. 9).



Табела бр.9. Клинички алгоритам дијагностике НХЛ ДБКЛ

### 1.1.7. Лечење НХЛ ДБКЛ

Након патохистолошке и имунохистохемијске анализе узоркованог ткива, комплетног стадирања болести, утврђује се клинички стадијум, ИПИИ узимајући у обзир болесника са НХЛ ДБКЛ, а обично су старији од 60 година, разматрају се неповољни параметри који нису ушли у претходне индексе као што су: волуминозна туморска маса, биолошки параметри болести попут пролиферативног индекса мереног преко експресије Ki-67, специфичне локализације (централни нервни систем, гастроинтестинални тракт) као и ризик трансформације. На основу претходног одређује се терапијски модалитет лечења и исти се спроводи уз поштовање одлуке болесника за прихватање истог. Терапија треба да задовољи прво и једино правило, излечити болесника терапијом прве линије.

Хемиотерапија (ХТ) има главну улогу као терапијски избор, док радиотерапија (РТ) има превасходно палијативни карактер, изузев у нижим клиничким стадијумима где је компатибилна са ХТ.

„Златни стандард“ лечења је протокол прве генерације *CHOP* (циклофосфамид, доксорубицин, винкрестин и преднизон) који је уведен још 1976. године. Издржао је пробу времена и није изгубио на значају у односу на протоколе друге генерације *COP – BLAM*, *ProMACE – MOPP* и треће генерације *ProMACE – CytaBOM* (34, 35). Примена агресивних протокола *ProMACE – CytaBOM*, *ProMACE – MOOP*, *MACOP – B*, није показала значајан терапијски, али јесте знатан токсични ефекат.

Иако су током деценија истраживања испитиване различите интензивније терапије од *CHOP* уз комбинацију са аутоотрансплантацијом или без ње, постигнуто је побољшање исхода само код дела болесника (углавном млађих и високо ризичних) у односу на стандардни протокол *CHOP* – који је куративан у 40% свих болесника (36, 37). Задивљујуће је како је последњих година поље испитивања и лечења малигнитета изменила примена само једне молекуле, анти-CD20 моноклонског антители-ритуксимаба (38).

### 1.1.8. Механизам деловања цитостатика протокола *CHOP*

*CHOP* протокол представља скраћеницу за употребу комбинације: циклофосфамид, винкрестин, доксорубицин и преднизон. Наведени цитостатски лекови припадају различитим фармаколошким групама па је њихов механизам антитуморског дејства различит.



#### **1.1.8.1. Циклофосфамид /Endoxan<sup>R</sup>/**

Циклофосфамид је алкиријајући агенс из подгрупе азотних пликаваца. Слично другим лековима ове групе делује тако што директно, хемијским путем, оштећује ДНК. На тај начин се прекида синтеза ДНК и деоба ћелија. Циклофосфамид и други сродни лекови су врло реактивна хемијска једињења која, преко својих интермедијерних форми, формирају ковалентне везе са макромолекулама путем алкилације различитих нуклеофилних хемијских група као што су фосфатна, аминокиселинска, сулфхидрилна, хидроксилна, карбоксилна и имидазолска група. Цитотоксични ефекат је у директној вези са алкилацијом ДНК а нарочито је осетљив угљеников атом на позицији седам унутар азотне базе, гуанина. Додатне хемијске везе се формирају и са другим атомима пуринских и пиримидинских база, посебно азотом на позицији 1 и 3 унутар аденина, а позицијом 3 унутар цитозина као и атомом кисеоника на позицији 6 унутар гуанозина. Унакрсно везивање ланаца ДНК је нарочито штетна последица дејства циклофосфамида на ћелије. Поред ДНК, циклофосфамид се везује и за реактивне групе других протеина, нарочито аминокиселинских и сулфхидрилних група.

#### **1.1.8.2. Винкрестин /Oncovin<sup>R</sup>/**

Винкрестин је лек природног порекла, изолован из биљке *Catharanthus roseus* (раније *Vinca rosea*), припада подгрупи винка алкалоида и у хемијском погледу представља асиметрични димерички молекул. Дејство остварује блокирајући митозу. Винкрестин се везује за бета тубулин и блокира његову полимеризацију са алфа тубулином, што је неопходно за формирање микротубула и деобног вретена. Последица тога је њихова дезинтеграција и заустављање ћелијског циклуса у метафази, са последичном дисперзијом хромозома и завршеном апоптозом ћелија. С обзиром да су микротубули важни и за друге физиолошке функције, на пример аксонални транспорт, овакво дејство винкрестина условљава и његову токсичност као што је оштећење нервних влакана са последичном неуропатијом.

#### **1.1.8.3. Доксорубицин /Adriablastin<sup>R</sup>/**

Доксорубицин је такође лек природног порекла, изолован из гљивице *Streptomyces speucetius var. caesius*. У хемијском погледу је антрациклин, који поседује тетрациклични прстен, хинонске и хидрохинонске структуре које су врло активне у примопредаји електрона. Цитотоксично дејство доксорубицина је последица бројних биохемијских реакција. Неке од најважнијих су директна интеракција са ланцом

ДНК, формирање комплекса са топоизомеразом II и самом ДНК, стварање слободних радикала и стварање реактивних интермедијера који даље оштећују макромолекуле. Ове реакције имају значајне негативне последице по ћелију као што су прекид транскрипције ДНК, слабљење процеса репарације оштећене ДНК и оштећења ДНК формираним слободним радикалским хемијским врстама што све резултира програмираном ћелијском смрћу тј. апоптозом.

#### **1.1.8.4. Преднизон / *Pronizon*<sup>R</sup> /**

Преднизон је синтетски гликокортикоидни хормон са снажним катаболичким дејством на лимфоидно ткиво где доводи до лизе и супресије митозе лимфоцита. Дејство глукокортикостероида се остварује путем интрацелуларних рецептора и утицајем на експресију гена. У зависности од типа ћелија од десет до око стотину гена је доступно глукокортикостероидима од којих су најзначајнији они за хемокине (IL-8, RANTES, MCP), цитокине (IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 16, 17, 18, TNF $\alpha$ , GM-CSF), индуцибилне ензиме (iNOS, COX-2, PLA2), рецепторе за ендотелне ћелије и неурокине, адхециони молекули, инхибитори PLA2 (lipokortin-1, aneksin-1, CC10), SLPI, MAP киназа фосфатаза 1 (MKP-1), антагонисте рецептора за IL-1, инхибитор NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), бета2 рецептор, CD163 (рецептор хватач) и други. У основи, многи од ових механизма глукокортикостероида се рефлектују кроз утицај и на имуни инфламаторни одговор организма, што је биолошка подлога њиховог антлимфоцитног дејства.

#### **1.1.9. Механизам деловања моноклонског антитела ритуксимаб (*Mabthera*<sup>R</sup>)**

Ритуксимаб је химеричко моноклонско антитело које припада групи биолошких лекова. Ритуксимаб се селективно и специфично везује за CD20 антиген који се налази на ћелијској мембрани Б лимфоцита. Тачна функција CD20 антигена није довољно позната а постоје докази који га везују са трансмембранским транспортом калцијума. Ритуксимаб и друга моноклонска антитела која се везују за CD20 антиген имају сложен механизам дејства а зна се да доводе у ћелији до активације разноврсних трансмембранских сигналних путева који узрокују аутофосфорилацију и активацију серин /треонин киназа и индукцију експресије *c-Myc* онкогена и молекула *MHC* комплекса класе II (39).

Ритуксимаб представља химеричко антитело са мишијим варијабилним регионом и хуманим константним регионом, који се специфично везује за CD20

антиген, експримиран на површини ћелија Б лимфоцитног порекла. Као химеричко антитело, Ритуксимаб је високо специфичан у мобилизацији ефекторних механизма домаћина са циљем уништења туморских ћелија, са минималном имуногеношћу и ниским степеном токсичности. CD20 антиген се испољава на више од 95% ћелија индолентног и више од 85% ћелија агресивног нехочкиновог лимфома. Ритуксимаб је прво терапијско моноклонско антитело које циљано убија туморске ћелије путем вишеструких механизма дејства. Крајње последице дејства Ритуксимаб су процеси који се деле у три основне групе, цитотоксичност зависна од компламента, ћелијска цитотоксичност зависна од антитела и индукцијом апоптозе тј. програмиране ћелијске смрти (40, 41).

Ритуксимаб смањује експресију антиапоптозног *Bcl-2* протеина чиме подспешује апоптозу лимфомских ћелија и повећава њихову осетљивост на цитостатску терапију (42). Антитело- Ритуксимаб има синергичко дејство са хемиотерапијским режимом *СНОР* и *СVP* и то без преклапања токсичности (43, 44, 45). Увођењем Ритуксимаба први пут се постиже продужење преживљавања оболелих од НХЛ ДБКЛ (46). Ритуксимаб плус *СНОР* је данас „златни стандард“ у терапији ДБКЛ-а.

Рандомизирани клиничке студије су потврдиле корист примене Ритуксимаба у одабраним групама болесника (*US Intergroup trial* и *RICO-VER -60* студија код старих болесника, а *MinT* студија код болесника млађих од 60 година са добрим прогностичким профилем), као и у неселекционираним групама болесника (47, 48, 49, 50).

У студији Српске лимфомске групе, упоредна анализа хемиотерапије у односу на имунохемиотерапију код болесника са ДБКЛ указала је на статистички значајно успешнији терапијски одговор као и укупно преживљавање код болесника лечених комбинацијом ритуксимаба и *СНОР* и њему сличним протоколима (51, 52).

## **1.2. Технологија генског чипа и имунохистохемије у прогнози оболелих од НХЛ ДБКЛ**

Развојем технологије генског чипа омогућена је анализа великог броја гена из туморског ткива, тако да су установљене три подгрупе НХЛ ДБКЛ –а (53, 54). Независно од ИПИ ризика, прва подгрупа је НХЛ ДБКЛ означена као група налик герминативном центру (*engl. Germinal center like*) има експресију гена сличну лимфоцитима герминативног центра, друга активирани Б ћелијама сличне (*engl. Activated B – cell like*) има експресију гена као активирани Б лимфоцити, док је најмања,

трећа група врло хетерогена. Претходно наведене групе прогнозно су не зависне од ИПИ ризика, група герминативног центра има бољу прогнозу од друге две, које заједно чине скупину са лошом прогнозом означену као група не герминативног центра (*engl.non-Germinal centre group*) (55, 56, 57). Обзиром на тешку изводљивост и високу цену ове методологије, показано је да се и обичном имунохистохемијом, активацијским и диференцијацијским маркерима специфичним за НХЛ ДБКЛ може учинити подела на повољну групу герминативног центра и неповољну групу не герминативног центра. Најчешће коришћени маркери су CD10, Vcl-6, MUM-1, а у неким стадијумима и CD138. Најчешће коришћена класификација је по *C.P.Hans*-у :

Герминални центар је : CD10+, MUM1-, Vcl-6+.

Не герминални центар је : CD10-, Vcl-6-и MUM -1+.

Ki -67 је пролиферативни индекс, као маркер лоше прогнозе, не завистан је од осталих маркера и ИПИ ризика (58).

### **1.3. Прогностички параметри НХЛ ДБКЛ, детектовани флуоресцентном *in situ* хибридизацијом**

Око 40% свих Б ћелијских лимфома експонира рекурентне хромозомске транслокације и већина од њих се може лако детектовати употребом конвенционалне цитогенетике (одређивање кариотипа) или молекуларном цитогенетиком (флуоресцентном *in situ* хибридизацијом). (59, 60, 61). НХЛ ДБКЛ са двоструким и троструким ударом (*engl. Doble hit (DH)* и *Triple hit (TH)*) Б ћелијски лимфоми се карактеришу рекурентним хромозомским транслокацијама у комбинацији са *Myc* (8q24) тачком прекида, касније углавном као секундарним догађајем.

#### **1.3.1. Цитогенетске аберације**

##### **1.3.1.1. *c-Myc***

*c-Myc* ген (*engl. Myelocytomatosis viral oncogene homolog*) налази се на позицији 24 дугог крака хромозома 8, регији q24. Транслокација t(8;14) (q24;q32) је прва карактеристична хромозомска аберација откривена у лимфопрлиферативним болестима (62). Резултат је прекомерна експресија протеина *c-Myc*, важног транскрипционог фактора који подстиче ћелијски циклус и пролиферацију туморских ћелија. Осим тога, има важну улогу у метаболизму ћелија, синтези протеина, регулацији mRNA те индукцији апоптозе активацијом p53 или проапоптотичних

сигналних путева (63, 64, 65). Ова транслокација је најчешћа и карактеристична је за *Burkittov* лимфом, међутим транслокација *c-Myc* може се доказати у отприлике 5-10% ДБКЛ-а, као и у неклассификованом Б – лимфому са особинама између *Burkitt*- овог лимфома и ДБКЛ-а, плазмобластичном и лимфобластичном лимфому то јест акутној лимфобластној леукемији (66, 15). У наведеној транслокацији партнер гену *c-Myc* је ген који кодира синтезу тешког ланца имуноглобулина, међутим понекад у транслокацији учествује неки други ген, на пример ген за имуноглобулин *kappa* лаког ланца (2p12/IGK) као t(2;8)(p12;q24) или ген за имуноглобулин *lambda* лаког ланца (22q11/IGL) као t(8;22) (q24;q11). Као партнерски гени у транслокацији описани су и таковани не- имуноглобулински гени као што су: BCL6, BCL11A, PAX5 и IKAROS 49 (67). Тумори са морфологијом карактеристичном за НХЛ ДБКЛ и транслокацијом *c-Myc* према класификацији СЗО (2008) сврставају се у хетерогену групу ДБКЛ без посебних карактеристика (15). Већина студија које су истраживале прогностичку вредност *c-Myc* транслокације утврдиле су да ови пацијенти имају агресивнију болест, лошији одговор на терапију и краће преживљавање (68). Истраживања која су показала корелацију лоше прогнозе и постојања *c-Myc* транслокације, била су испитивања Niitsu и сардника, учињена на 252 болесника, Savage-а и сардника на 135, а такође и истраживања Baggans-а и сардника на 245 узорка оболелих од НХЛ ДБКЛ (69, 70, 71). За разлику од претходних студијских резултата, у студији *Kramera* и сардника утврђено је да се *c-Myc* транслокација најчешће налази код болесника са екстранодалним ДБКЛ, посебно примарним лимфомима гастроинтестиналног тракта, а и ови болесници имају бољу прогнозу (72). Сличне резултате су објавили *Gualco* и сардници, који су на пацијентима оболелим од ДБКЛ у дечијем узрасту (10 до 18 година) потврдили корелацију *c-Myc* транслокације са повољном прогнозом (73). Значајне разлике у методологији вероватно су део објашњења за неподударност добијених резултата, с тога биологија и патогенеза новодијагностикованих НХЛ ДБКЛ с транслокацијом *c-Myc* данас још није потпуно разјашњена. За разлику од њих, *Tibiletti* и сардници су утврдили да транслокација *c-Myc* нема прогностичко значење код болесника са ДБКЛ, али студија је обухватила 74 узорка, за анализу (74). *FISH* може бити користан у идентификацији *Myc* гена, али није успела да идентификује *Myc* измењен другим механизмима, а није ни доступан у свим клиничким лабораторијама. Напокон, ново моноклонско антитело, чија мета је N- терминални *Myc* протеин показало је сензитивно и специфично нуклеарно бојење *Myc* протеина у ткиву фиксираном у формалину и укалупљеном у парафин укључујући и НХЛ ДБКЛ (75, 76, 77).

### 1.3.1.2. *Bcl2*

*Bcl2* ген (*engl. B-cell CLL/lymphoma 2*) налази се смештен је на хромозому 18, у регији дугог крака *q21*. Његова је функција кодирање синтезе протеина смештеног на унутрашњој митохондријалној мембрани, који има важну антиапоптотску улогу (78, 79,80). Постоји две изоформе протеина *Bcl2*, за које се због специфичне интерреакције са протеинима *Bad* и *Bak* сматра да имају улогу у најмање два различита антиапоптотска механизма (81). Ова транслокација нађена је у НХЛ ДБКЛ, али и у другим лимфомима Б имунофенотипа, фоликуларном, примарном кожном лимфому, лимфому маргиналне зоне, хроничној лимфоцитној леукемији/лимфому малих лимфоцита, спленичном лимфому, моноклоналној лимфоцитози Б ћелија и хистиоцитном саркому насталом трансформацијом фоликуларног лимфома. У свим наведеним туморима *Bcl2* реаранжман резултује експресијом протеина *Bcl2* (82, 83, 84, 85). Осим важне улоге у лимфомагенези, транслокација *Bcl2* доказана је и код здравих људи. Перзистентни клон нормалних, зрелих Б лимфоцита са овом транслокацијом чешће се јавља у старијој популацији (86). Постојање транслокације код здравих људи, као и њена релативно рана појава током сазревања Б лимфоцита, упућује на важну улогу транслокације *Bcl2* у лимфогенези, као и на закључак да сам настанак транслокације није довољан за развијање лимфопролиферативне болести (87). У класификацији СЗО такође се истиче важност утврђивања транслокације *Bcl2* приликом постављања дијагнозе агресивних лимфома с двоструким транслокацијама (*engl. double hit lymphoma*) које је потребно разликовати од НХЛ ДБКЛ без посебних карактеристика (15).

### 1.3.1.3. *Bcl6*

*Bcl-6* ген (*engl. B-cell CLL/lymphoma 6*) смештен је на хромозому 3, дугог крака у регији *q27*, а кодира синтезу транскрипцијског фактора, који помоћу интерреакције са ћелијским протеинима има важну улогу у репресији транскрипције (88, 89).

Експресија *Bcl-6* гена је посебно важана за формирање и нормалну функцију герминативних центара, има улогу у заустављању апоптозе индуковане прекидима двоструке спирале ДНК у Б лимфоцитима а прекиди су потребни за соматску хипермутацију и рекомбинацију имуноглобулинских ланаца (90). *Bcl-6* такође учествује у регулацији ћелијског циклуса, у различитим механизмима репарације ДНК, апоптози, ћелијској пролиферацији и диференцијацији (91, 92). Осим тога има директан утицај на

контролу бројних гена, као што су на пример *Bcl-2* и *p53* (93, 94). Генске аберације *Bcl-6* у облику транслокација или тачкастих мутација најчешће се налазе код НХЛ ДБКЛ и фоликуларног лимфома. Транслокација *Bcl-6* с неким од бројних могућих партнерских гена сматра се обележјем посебне групе тзв. „*double-hit*“ лимфомима (15, 95). За разлику од *Bcl-1* и *Bcl-2* гена који су након завршене транслокације хромозомских фрагмената увек блиско лоцирани у односу на гене за кодирање синтезе лакних и тешких ланаца (*IgH* и *IgL*), *Bcl-6* ген се лоцира у близини различитих генских секвенци. У транслокацији је укључен хромозом 3 и *Rho* (*TTF* гена), хромозом 11 (*BOB 1 / OBF 1* као „партнер“ ген), хромозом 6 (H4 хистон ген у блиској позицији), хромозом 13 (*LCP 1* ген у блиској позицији), као и већи број других не имуноглобулинских гена. Физиолошка функција гена *Bcl-6* је учешће у формирању герминативних центара секундарних лимфоидних фоликула, као и на другим местима Б ћелијског сазревања. Његова друга, такође значајна улога, је спречавање процеса преписивања ДНК као и регулација програмиране ћелијске смрти посредством адхезионог молекула CD 40. Хромозомска преуређења која захватају *Bcl-6* ген се јављају у различитим процентима. Када је у питању ДБКЛ, промене на нивоу *Bcl-6* се јављају код 49 до 61% болесника (96). У герминативном центру *Bcl-6* игра улогу репресије транскрипције многих таргет гена који учествују у апоптози, одговоран је за оштећење ДНК, контролу ћелијског циклуса, пролиферацију и диференцијацију (97, 98). Важне директне мете су *Bcl-2*, *TP53*, *IRF4* и *BLIMP-1* који касније постају неопходни у сазревању, односно матурацији плазма ћелија (99,100). Интересанто да је *BLIMP-1* репресор истовремено *Bcl-6* и *Мус* у плазма ћелијама. Резултатат је да су *Bcl-6* посредоване репресије *TP53*, соматске хипермутације и класне рекомбинације олакшане (101).

#### **1.3.1.4. *Bcl-2 / c-Myc - Double hit* НХЛ ДБКЛ**

Удруженост *Bcl-2+/cMyc+*, генског преуређења, чини велику већину. *Doble-Hit -DH* лимфома чак и до 62% по наводима *Mitelman* базе података. (102, 103). Транслокација *Мус* гена, који учествује у бројним ћелијским функцијама укључујући и пролиферацију, показује лошу прогнозу (104, 105, 106). Уз додатак, транслокације *Bcl-2*, као централног антиапоптотског гена, утиче на лошу прогнозу у неким студијама, али не у свим (107, 108). ДБКЛ са транслокацијом оба *Мус* и *Bcl-2* одређује *Double-hit* лимфоме и карактерише се лошим одговором на стандардну терапију уз агресиван клинички ток (109,110,111). Ова два гена у комбинацији имају синергистички клинички ефекат, *Мус* као промотер ћелијске пролиферације и *Bcl-2* као блокатор ћелијске смрти.

Данас истраживања комбинације *Myc* и *Bcl-2* у лимфомима имају фокус на генским методама, углавном флуоресцентној *in situ* хибридизацији, али *Myc* и *Bcl-2* се могу активирати другим механизмима, носећи повишену експресију протеинских продуката *Myc* и *Bcl-2* (112, 113). Клинички прогностички ефекат комбинације експресије *Myc* и *Bcl-2* у дифузном крупноћелијском лимфому је још непознат.



## 2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

### 2.1. Циљеви истраживања

**Први циљ** предложене студије јесте да утврди утицај генског полиморфизма *Bcl-2+* и *Myc+*, како појединачан тако и удружен, на терапијски одговор код болесника са Дифузним Б крупноћелијским лимфомом третираних стандардном имунохемиотерапијом.

**Други циљ** је да се утврди коју групу болесника, према ИПИ ризику, као признатом прогнозном параметру, треба обавезно тестирати на генски полиморфизам и тако индивидуализовати терапијски приступ без непотребног исцрпљивања болесника стандардном терапијом.

### 2.2. Хипотезе истраживања

1. Дифузни Б крупноћелијски лимфом који је *Bcl-2+*, показује лошији одговор на примењену имунохемиотерапију од *Bcl-2*-лимфома.
2. Дифузни Б крупноћелијски лимфом који је *Myc+* показује лошији одговор на имунохемиотерапију од *Myc*- лимфома.
3. Постојање *Myc+* и *Bcl-2+* истовремено показује лошији одговор на терапију у односу на *Myc*- и *Bcl2*- дифузне Б крупноћелијске лимфоме.
4. Постоји значајна разлика у присутности генског полиморфизма између болесника са ниским и средње ниским ИПИ-ом и оних са средње високим и високим ИПИ-ом.
5. Упоредна анализа прогнозног значаја двоструких мутација (*енгл: Double Hit mutation*) и ИПИ скорa у одговору на примењену имунохемиотерапију оболелих од НХЛ ДБКЛ

## 3. ИСПИТАНИЦИ, МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

### 3.1. Испитивана популација

Истраживање је спроведено у Клиници за Хематологију, Служби за патолошку анатомску дијагностику Клиничког Центра у Крагујевац и приватној лабораторији „Бео-лаб“ у Београду. Студија је ретроспективна клиничко-експериментална и компаративна, упоређује тестиране параметре оболелих од НХЛ ДБКЛ у оквиру стандардног испитивања болесника са ниским и средње ниским ИПИ - ом, који су контрола, анализирани групе са средње високим и високим ИПИ - ом.

Подаци су прикупљени из писане медицинске документације (историје болести, лекарски извештаји и здравствени картони) који су били доступни за 90 болесника са нодалном и екстранодалном локализацијом од 01.01.2004. године до 30.03.2010. године.

У болесника који су укључени у студију, анализирано је следеће : пол, старосна доб, клинички стадијум болести према *Ann Arbor* класификацији, Б симптоматологија (повишена температура, презнојавање, губитак у телесној тежини већи од 10% за шест месеци), вредност ИПИ-а који настаје збрајањем негативних поена и може бити: низак-0 неповољних параметара, средње низак -1 неповољан параметар, средње висок са 2 неповољна параметра и висок са 3 или 4 неповољна параметра. Интернационални Прогнозни Индекс за болеснике млађе од 60 година је *Adge Adjusted* ИПИ, а може бити: низак са 0 неповољних параметара, средње низак има 1 неповољним параметром и средње висок са 2 неповољна параметра.

*ECOG* перформанс статус је одређен на дан постављања дијагнозе, носећи оцене од 0 за болеснике у одличном општем стању до 4 што бодује трајну везаност за кревет и неспособност за бригу о себи. Утврђује се локализација, нодална и екстранодална и посебно наводи велика туморска маса >7cm, означена као „*Bulky*“ форма болести.

Крв за анализу је узоркована наташте а одређивана је: седиментације (SE), лактат дехидрогеназа (LDH), укупни протеини, албумини, аспартат-аминотрансфераза у серуму (AST), аланин- аминотрансаминаза (ALT), гама глутамил-транспептидаза

серума (гама GT), алкална фосфатаза (ALP), мокраћна киселина, гвожђе у серуму, и С реактивни протеин (CRP) на апарату за биохемијске анализе *Beckman AU 600*, оргиналним тестовима. Анализе фибриноген и D – димер, одређиване су на апарату *ACL Elite PRO*, уз оргиналне тестове. Комплетна крвна слика са леукоцитарном формулом анализирана на аутоматском бројачу крвних елемената *Beckman Coulter LH-780 Analyzer*.

Терапијски одговор на примењену иницијалну - прву терапијску линију (имунохемиотерапија по протоколу *R-CHOP*) одређиван је као: одсуство болести - комплетна ремисија –КР (*engl. Complete respons - CR*) што подразумева нестанак и најмањих биолошких и радиолошких абнормалности које су виђене на презентацији, парцијални одговор ПО (*engl. Partial response – PR*) уз регресију свих параметара за више од 50% (од 50% до 75%) или као прогресија болести ПБ (*engl. refracterio* или *Progressio Disease - PD*) означавајући изостанак одговора или увећање туморске масе за најмање 25% у односу на презентацију након учињених претрага по завршеној терапији. Процена одговора код свих болесника је учињена 4 недеље након примене последњег циклуса имунохемиотерапије, односно после 6 недеља ако је у болесника додатно примењена и радиотерапија.

### **3.2. Обрада материјала за анализу**

Код свих болесника дијагноза је постављена на основу патохистолошке анализе узорака ткива, добијених хирушком интервенцијом и биопсијом кости. У рутинској обради препарата добијени узорци ткива су фиксирани у 4% неутралном пуферисаном раствору формалина, у току 24 часа, на собној температури. По завршеној фиксацији узорци су дехидратисани провођењем кроз серију алкохола растуће концентрације (70%, 96% и 100%), просветљавани у ксилолу и калупљени у парапласт. Попречни серијски пресеци, дебљине 4  $\mu\text{m}$ , сечени су микротомом *Leica RM2135, Austria*. Биопат кости декалцинисан је током три дана, а потом подвргнут претходном поступку. После депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућем реду алкохола, исечци су бојени *Haematoxylin* –ом по *Mayer-* у, просветљавани у 2% раствору еозина, затим дехидратисани, просветљивани и монтирани на плочице са *Canadabalsamom*, ова класична *H&E* метода омогућила је микроскопским прегледом уз патохистолошку анализу узоркованог ткива. Патохистолошки тип лимфома одређен је на основу начина

раста, морфолошког изгледа ћелија и имунофенотипа, према критеријумима СЗО класификације из 2008. године.

### 3.3. Методе анализе материјала

Класичном имунохистохемијом (*IHC*) анализирани су Б маркери, као и: *Bcl-2*, *Bcl-6* и *Ki-67*, а *FISH*-ом је утврђивана генска мутација за *Bcl-2* и *c-Myc*.

#### 3.3.1. Имунохистохемијски метод

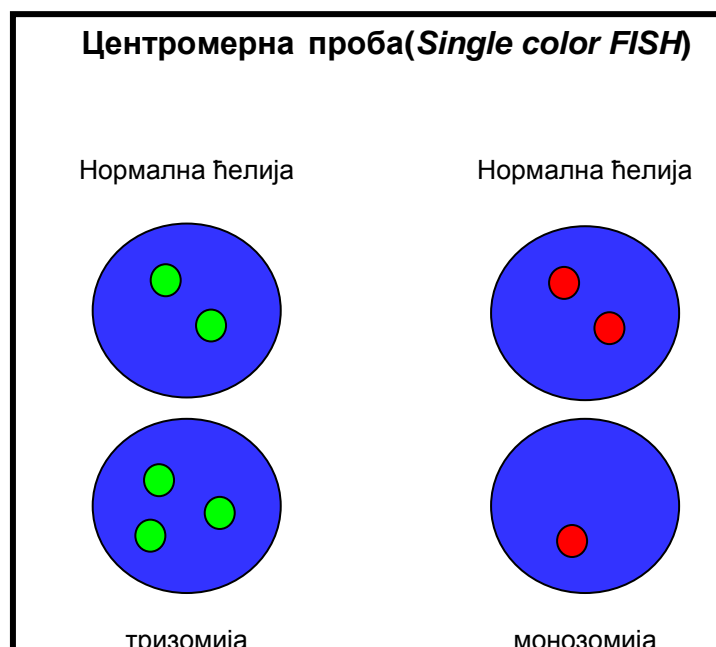
Имунохистохемија (*IHX*), је метод који се заснива на реакцији антиген антитело. Применом одговарајућих моноклонских антитела, специфичних за одређене врсте рецептора у једру, цитоплазми или мембрани, нормалне или малигне ћелије, могућа је визуелизација комплекса антиген – антитело, а самим тим и одређивање броја ћелија које су експримирале туморски антиген, као и интензитет експресије на ткивним узорцима фиксираним и укалупљеним у парафин. Анализа је обављена применом палете моноклонских антитела различитих произвођача и карактеристика и то: CD20, CD22, MUM1, CD19, CD45, CD10 и CD 79  $\alpha$ . (*DAKO, Glostrup, Danmark*).

За имунохистохемијско одређивање нивоа експресије, позитивности коришћена је гранична вредност за позитивност > од 30% (*engl. Cut off*), за *Bcl-2* и *Bcl-6* на имунохистохемијској анализи. *Ki-67* позитивност изражена је у процентима, број позитивних ћелија на 100 избројаних.

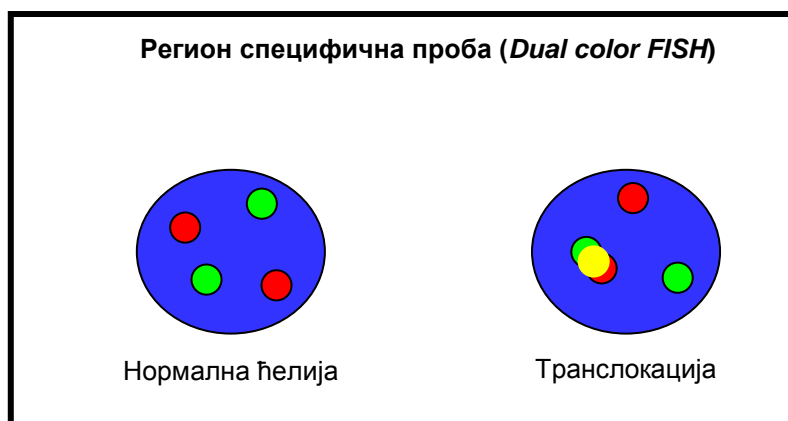
#### 3.3.2. Флуоресцентна *in situ* хибридизација

*FISH* је метода детекције појединих гена или чак делова гена (појединих секвенци). Ово испитивање примењујемо када нас занима да ли део хромозома (поједина секвенца у молекулу ДНК) може да хибридује, да створи дупли халикс са неком пробом, а проба је нека секвенца ДНК чије присуство нас интересује на хромозому, и обележена је флуоресцентном бојом. Када се ДНК денатурише утврђујемо да ли наша проба хибридује са денатурисаним комплетним хромозомом. Ако хибридује, то значи да та секвенца постоји на том хромозому, а ако не онда је та секвенца на хромозому изостала. На тај начин се бојењем утврђујемо присуство појединих секвенци на целом кариотипу. *FISH* је молекуларна цитогенетска техника која се заснива на хибридизацији одређене генске секвенце испитиваног хромозома и одговарајућег низа нуклеотида везаног за флуоресцентни маркер (проба). *In situ* хибридизација (*ISX*) је техника која омогућава детекцију нуклеинских киселина односно детекцију специфичних циљних секвенци унутар ћелије уз истовремено

очување ћелијске и ткивне морфологије. ИСХ се заснива на принципу комплементарности, тј. денатурирана проба ће се хибридувати тачно на комплементарну циљну секвенцу нуклеинске киселине (ДНК или РНК). Термин *in situ* значи “на месту”, што значи да се хибридизација одвија унутар ћелије само на месту где се циљна ДНК или РНК нормално и налази. Циљна регија може бити ген, хромозомска регија или цео хромозом. *FISH*–ом се може анализирати свеж ћелијски узорак, претходно фиксиран смешом метанола и сирћетне киселине, али и биоптирани материјал чуван у парафинским калупима који је најчешће фиксиран формалином. Материјал за анализу може се добити из узорака периферне крви, коштане сржи, ефузије перикарда, плеуре, перитонеума, ликвора, брисева слузница или биопсија лимфних чворова и солидних тумора. Није потребна култивација ћелија, па се резултати анализе могу добити за 24–48 сати. Значајно је да се методом могу визуализовати промене на хромозомима и када су ћелије у интерфази, тако да се могу анализирати генетске промене у обољењима са ниским митотским индексом. *FISH*–ом се могу открити нумеричке и структурне промене на хромозомима (делеције, инверзије и транслокације хромозома), идентификовати генетска промена код маркер хромозома и урадити генско мапирање. Анализа је високоспецифична, пошто се проба везује искључиво за одговарајући низ нуклеотида анализираних ДНК. Сензитивност ове методе је велика због могућности анализе великог броја ћелија (слика бр. 3 и бр.4).



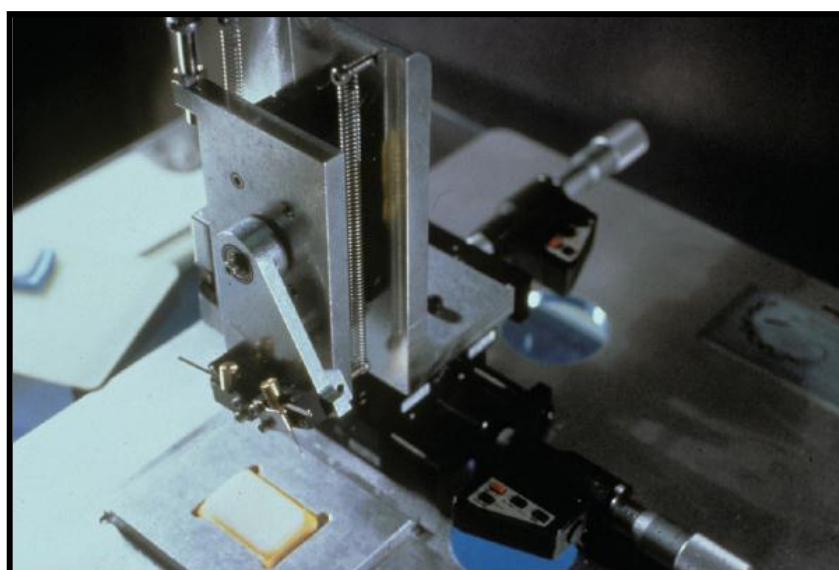
Слика бр.3. Схематски изглед *FISH – single color* позитиван налаз



Слика бр.4. Схематски изглед позитивног налаза – *dual color FISH*

Лажно позитивни резултати настају као последица лоше обраде препарата и не адекватне микроскопске анализе. Лажно негативни резултати могу се јавити ако постоји анеуплоидија, уколико је једро ћелије оштећено или долази до преклапања ћелија и прекривање дела генома једне ћелије. За разлику од конвенционалне цитогенетике и молекуларних метода *FISH* омогућава корелацију између генетске промене и морфологије ћелија.

На *H & E* бојеним плочицама одређивано је репрезентативно подручје тумора из којег је из парафинског блока узиман цилиндар ткива иглом дебљине 0,6 mm. Тако формиран ткивни цилиндри су пренесени у специјалан парафински блок, а читава технологија се назива технологија ткивних микрозона или ткивне мреже.(енгл. *tissue microarray technology-TMA*), слика бр. 5.



Слика бр. 5. Припрема парафинских калупа

Из овако припремљеног парафинског блока, сечени су ткивни пресеци дебљине 2  $\mu\text{m}$  и постављени на микроскопска стакла са позитивним наелектрисањем.



Слика бр. 6. Ткивни цилиндри у парафинском блоку и припремљени препарати

Ткивни исечци су депарафинисани у ксилолу и рехидрисани у опадајућим концентрацијама етанола (100%, 85%, 70%), а затим кувани у микроталасној рерни у 10 mM лимунској киселини  $\text{pH}$  6.0, у трајању 30 минута. Истовремена денатурација *FISH* проба и ДНК узорка изведена је на 77 °C, 3 минута, након чега је уследила хибридизација на 37°C, 20 сати. Хибридизација је изведена помоћу комерцијалних китова *BCL-2 Break Apart* и *C-MYC Break Apart FISH* пробе кит (*AbbottVysis, USA*). *BCL-2 FISH* проба обухвата 18q21 регион, директно обележен *Spectrum Green* и *Spectrum Orange* флуоресцентном бојом. *C-MYC- FISH* проба обухвата 8q24 регион који је, као и претходни, директно обележен *Spectrum Green* и *Spectrum Orange* флуоресцентном бојом. По завршетку хибридизације плочице су испиране у 2xSSC/0.3% NP-40 на 73°C, 2 минута и 2xSSC/0.3% NP-40 на собној температури, 1 минут. Микроскопска стакла, (слика бр.6), су анализирана помоћу DM 2500 флуоресцентног микроскопа (*Leica, Wetzlar Germany*) опремљеног појединачним и троструким *band pass* филтерима. Сликање флуоресцентних сигнала је рађено *Leica DFC 3000 G* флуоресцентном камером (*Leica, Wetzlar, Germany*), повезаном са *Leica CW 4000* програмом за обраду слика. Детекција реаранжмана *Bcl-2* и *c-Myc* гена одређивана је бројањем 100 или више интерфазних једара, за сваки од наведених гена. Доступно за адекватну анализу је било 62 узорка, 15 технички није адекватно обрађено, а у 13 узорка није био адекватан број

минимално 100 интерфазних једара за детекцију реаранжмана. На малом увећању микроскопа (10x) вршено је претраживање туморског поља, а затим објективом увећања (100x) бројани су фузиони (интактни региони *Bcl-2* и *c-Myc* гена), као и појединачни црвени и зелени (тзв. *разломљени*) сигнали за сваку појединачну ћелију. У једрима која су негативна на присуство *Bcl-2* и *c-Myc* реаранжмана, присутна су по два фузиона сигнала жуте боје. У једрима која су позитивна на присуство реаранжмана *Bcl-2* и *c-Myc* гена, присутно је по три или више фузионих сигнала или један фузиони, један црвени и један зелени сигнал. Резултат се сматрао позитивним уколико је >20% једара било позитивно на *Bcl-2* и/или *c-Myc* реаранжман.

### 3.4. Статистичка анализа података

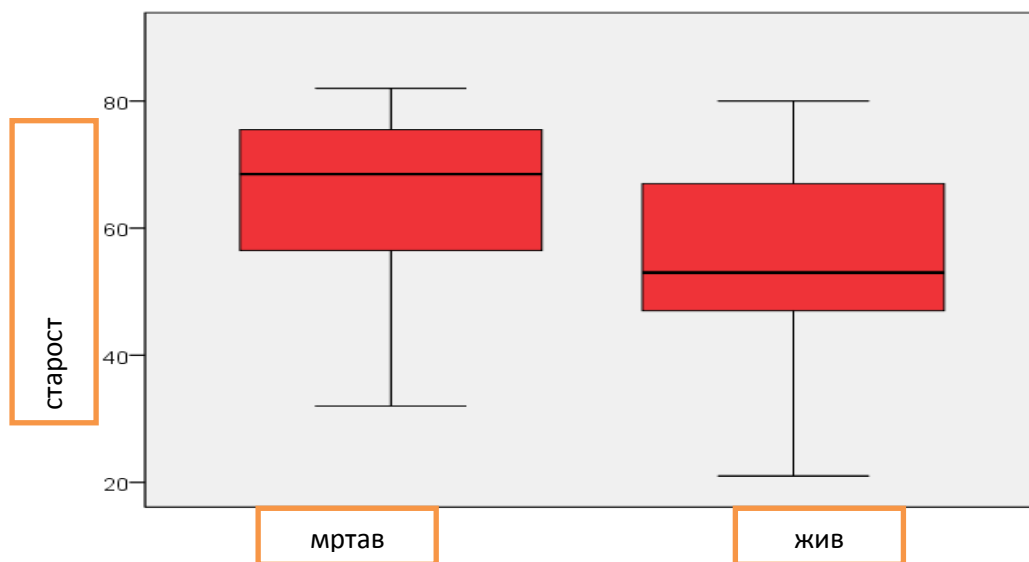
У циљу извођења неопходних статистичких тестирања, коришћен је статистички програмски пакет *SPSS for Windows (22.0)*. На почетку истраживања све варијабле описане су класичним дескриптивним методама статистике. Номиналне и ординалне варијабле описали смо расподелом учесталости њихових категорија. Мерне варијабле описане су класичним мерама централне тенденције, минималном и максималном вредношћу, аритметичком средином и стандардном девијацијом и медијаном. Приказ добијених резултата дат је табеларно и графички. За поређење атрибутивних обележја посматрања између испитаника са различитим исходом коришћен је *Pirson-ov*  $\chi^2$  тест (таблице контингенције). Код анализе вредности нумеричких обележја посматрања између посматраних група испитаника, избор теста зависио је од нормалности расподеле података. У случају нормалне расподеле података коришћен је *t*-тест, односно *Mann-Whitney U* тест у случају расподеле података различите од нормале. Нормалност расподеле података испитиван је *Koglomorov Smirnov*-им тестом. *Kaplan Majer*-овим кривама преживљавања праћен је исход код анализираних групе испитаника *Log Rank* тестом испитивана је разлика у преживљавању у односу на посматране факторе. *Cox*-овом регресионом анализом испитивани су предиктори преживљавања у овој групи испитаника. *ROC* кривама и површином испод њих одређивана је валидност постигнутих посматраних генских полиморфизама, у процени одговора на примењену терапију. Гранична вредност за прихватање радне хипотезе постављена је на  $p < 0.05$ .



## 4. РЕЗУЛТАТИ

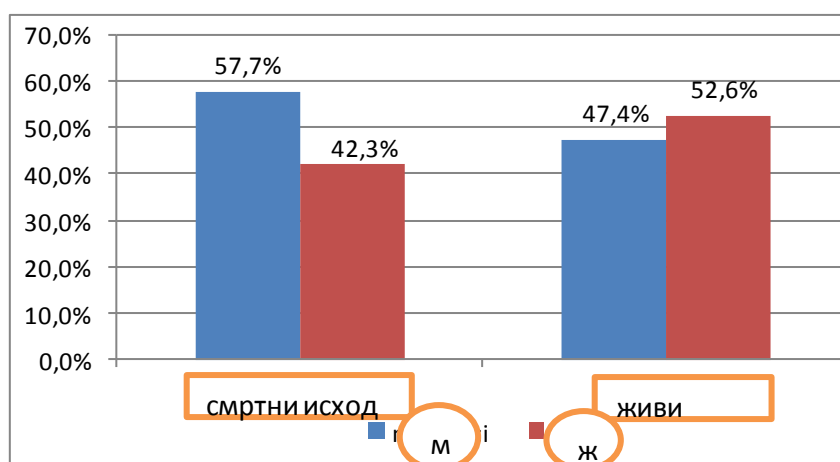
### 4.1. Анализа клиничких особености испитаника у моменту дијагностиковања

Ретроспективним истраживањем обухваћено је 90 оболелих од НХЛ ДБКЛ током шест година, просечне старости 68,5 година. Испитивану популацију је чинило 48 припадника мушког пола и 42 припаднице женског пола, дијагностиковани, лечени и праћени редовно током 90 месеци, до 1.јуна 2014.године. До краја посматраног периода било је 52 болесника са смртним исходом и 38 живих испитаника. Просечна старост испитаника у групи оболелих са смртним исходом била је 65,29 +/- 12,37 година док је у групи живих 55,11 +/- 13,91 година. Међугрупном анализом утврђујемо статистички значајну разлику у старости (*Mann Whitney* тест,  $p=0,001$ ), односно испитаници са смртним исходом били су значајно старији, (графикон бр.1).



Графикон бр.1. Утицај старости на преживљавање

Од 48 мушкараца, 30 је имало смртни исход, чинећи 57,7% ове групе са неповољним исходом, а 18 мушкараца је било живо на крају посматраног периода. Са неповољним исходом биле су 22 жене, чинећи 42,3% ове групе, док је 20 жена било живо до краја посматраног периода. Није утврђена статистички значајна разлика оболелих од НХЛ ДБКЛ преживелих и умрлих у односу на пол ( $\chi^2$  тест,  $p=0,332$ ). У обе групе, испитаници различитог пола су били приближно исто заступљени, (графикон бр.2).



Графикон бр. 2. Преживљавање оболелих од НХЛ ДБКЛ према полу

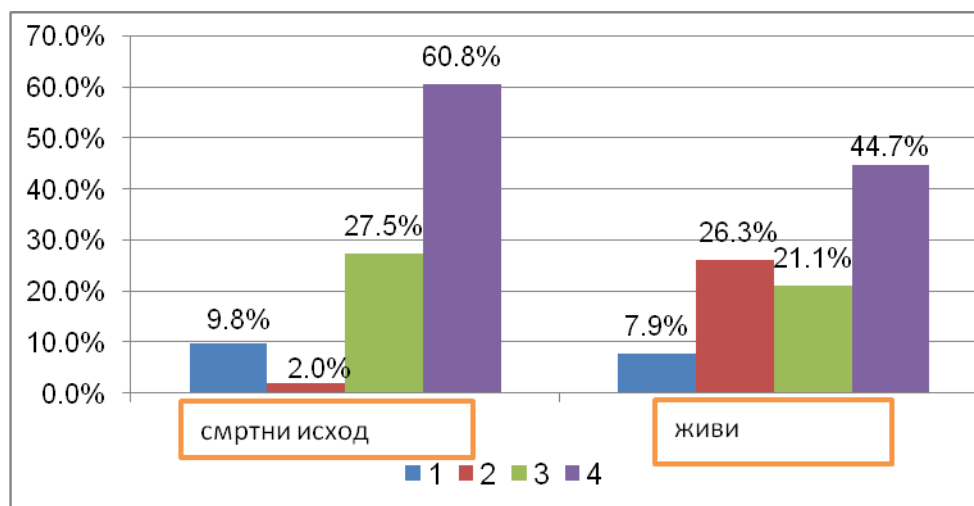
Између посматраних група испитаника а према исходу болести, уочена је статистички значајна разлика у клиничком стадијуму болести, одређеном по *Ann Arbor* класификацији ( $\chi^2$  тест,  $p=0,008$ ), (табела бр.10).

Клиничка обележја	Исход		Значајност	
	Мртви	Живи		
ИП/ризик n (%)	низак	4 (7,7%)	8 (21,1%)	<sup>b</sup> $p=0,003^*$
	Средње низак	11 (21,2%)	18 (47,4%)	
	Средње висок	31 (59,6%)	11(28,9%)	
	висок	6 (11,5%)	1 (2,6%)	
ECOG n (%)	0	18 (34,6%)	33 (86,8%)	<sup>b</sup> $p=0,000^*$
	1	15 (28,8%)	4 (10,5%)	
	2	12 (23,1%)	0 (0%)	
	3	5 (9,6%)	1 (2,6%)	
	4	2 (3,8%)	0 (0%)	
CS n (%)	1	5 (9,8%)	3 (7,9%)	<sup>b</sup> $p=0,008^*$
	2	1 (2,0%)	10 (26,3%)	
	3	14 (27,5%)	7 (21,1%)	
	4	31 (60,8%)	18 (44,7%)	
Екстранодалне локализ. n(%)	не	15 (28,8%)	17 (44,7%)	<sup>b</sup> $p=0,120$
	да	37 (71,2%)	21 (55,3%)	
Број екстранодалнихлокализација (Med, (min-max))		1 (1-3)	1 (1-2)	<sup>a</sup> $p=0,434$
Bulky n (%)	не	34 (66,7%)	27 (73,0%)	<sup>b</sup> $p=0,527$
	да	17 (33,8%)	10 (27,0%)	

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>Mann Whitney тест; <sup>b</sup> $\chi^2$  2-тест

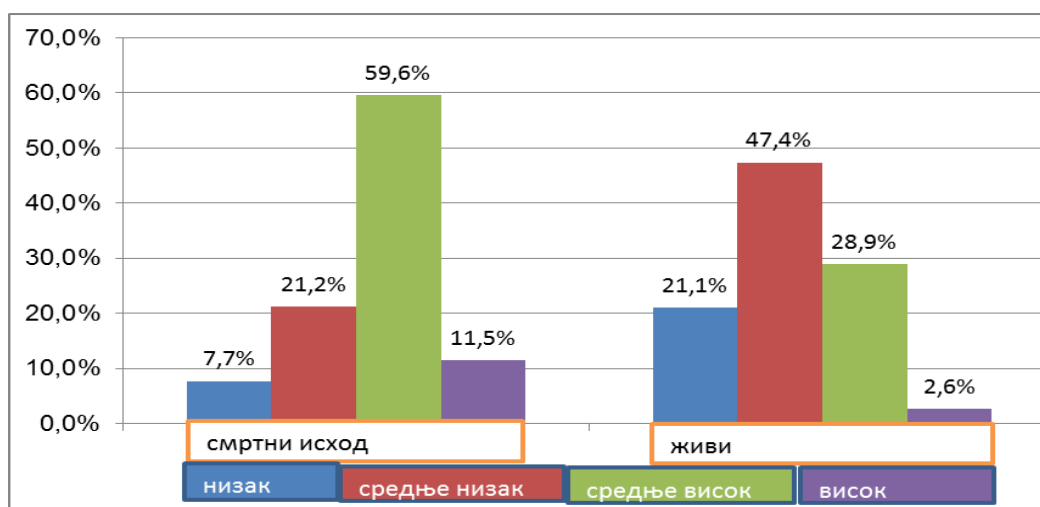
Табела бр. 10. Клинички стадијум болести, ИПИ, ECOG, екстранодална локализација и „Bulky“ форма болести у болесника са ДБКЛ- различитог исхода

Испитаници са смртним исходом били су у скоро 90% случајева у клиничком стадијуму III или IV, и то дупло више испитаника је било у IV клиничком стадијуму. У групи преживелих испитаника статистички значајно више испитаника је било у II клиничком стадијуму, посматрано у односу на испитанике са смртним исходом, али и статистички значајно мање оних у IV клиничком стадијуму, (графикон бр.3).



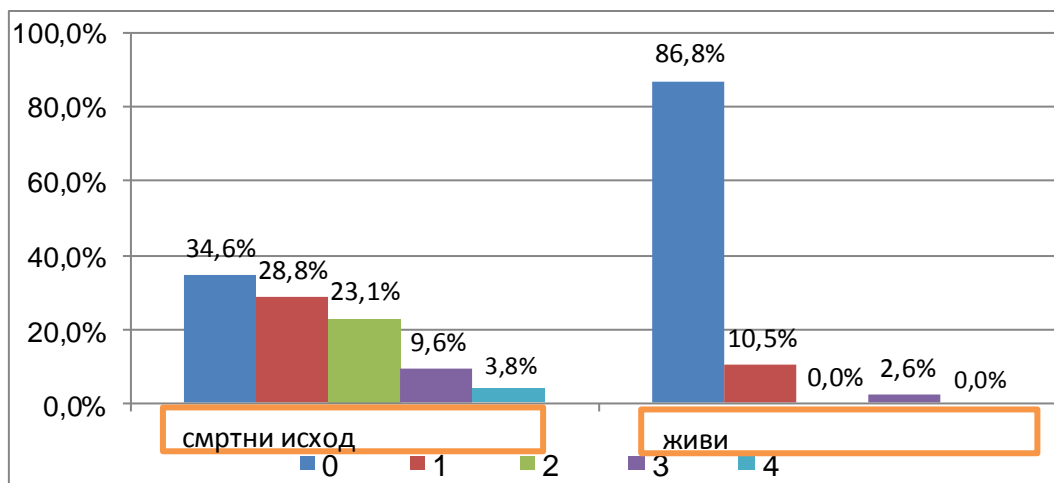
Графикон бр.3. Учесталост клиничких стадијума оболелих од ДБКЛ са различитим исходом болести

Између испитаника преживелих и оних са смртним исходом, уочена је статистички значајна разлика у ИПИ ризику, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,003$ ), (табела бр.10). Испитаници са лошим, односно смртним исходом, били су и са вишим ИПИ ризиком. Мање од 30% испитаника са смртним исходом имало је ИПИ ризик описан као низак и средње низак, док је око 70% преживелих испитаника било са тако описаним ризиком, (графикон бр.4).



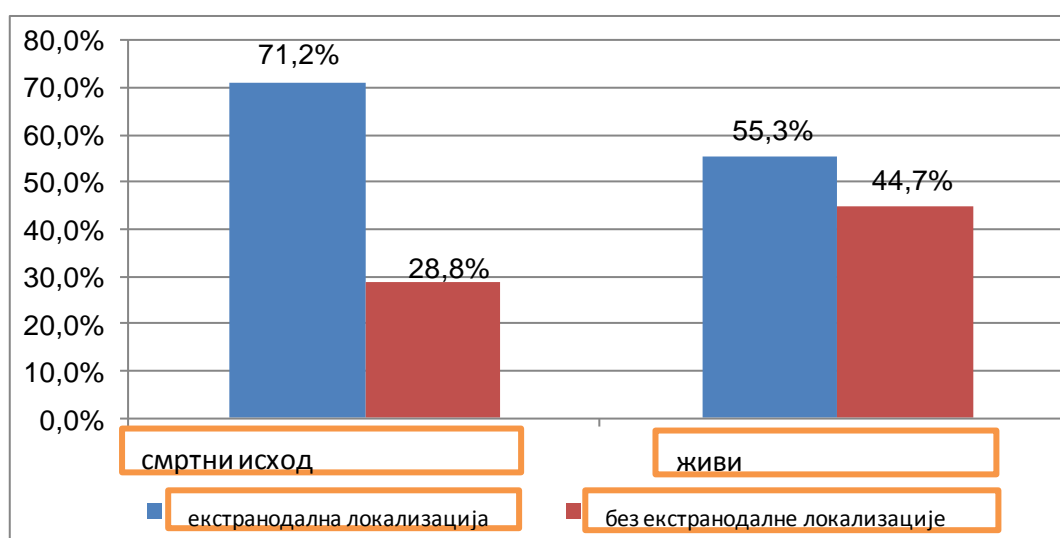
Графикон бр.4. Расподела ИПИ ризика у оболелих од ДБКЛ различитог исхода

Статистички значајан утицај на морталитет испитаника показао је и ECOG статус ( $\chi^2$  тест,  $p=0,000$ ), табела бр.10. Преживели испитаници у статистички значајно већем броју су били ECOG статуса 0, док су испитаници са смртним исходом били чешће ECOG статуса 1 и 2. ECOG статус 3 и 4, био је нешто чешћи у групи са смртним исходом, али редак у обе групе, (графикон бр.5).



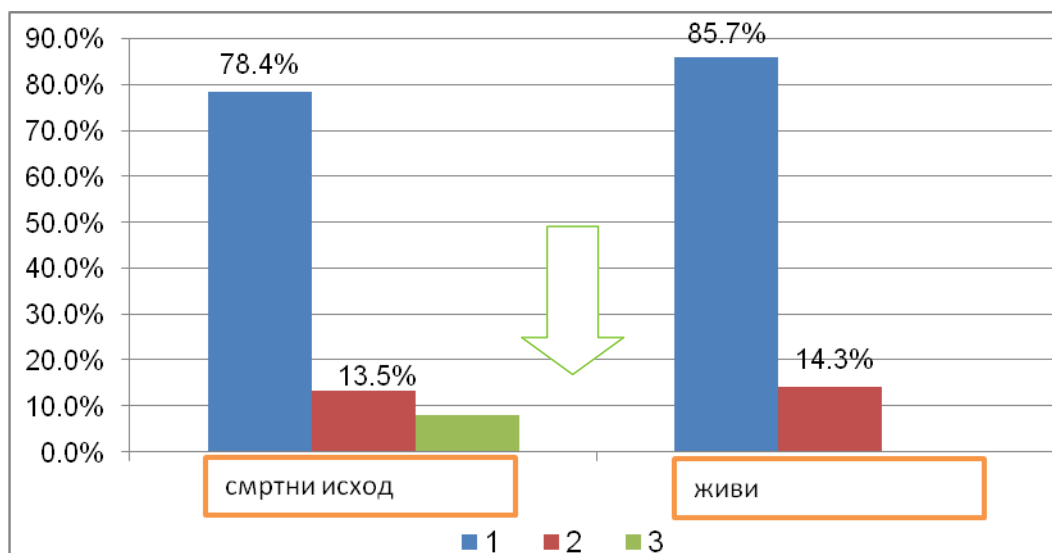
Графикон бр.5. ECOG статус код болесника са различитим исходом болести

Код испитаника са присутним екстранодалним локализацијама, није уочена статистички значајна разлика у њиховом броју посматрано у односу на исход, (*Mann Whitney* тест,  $p=0,434$ ), (табела бр.10), а приказ учесталости је на (графикону бр. 6).



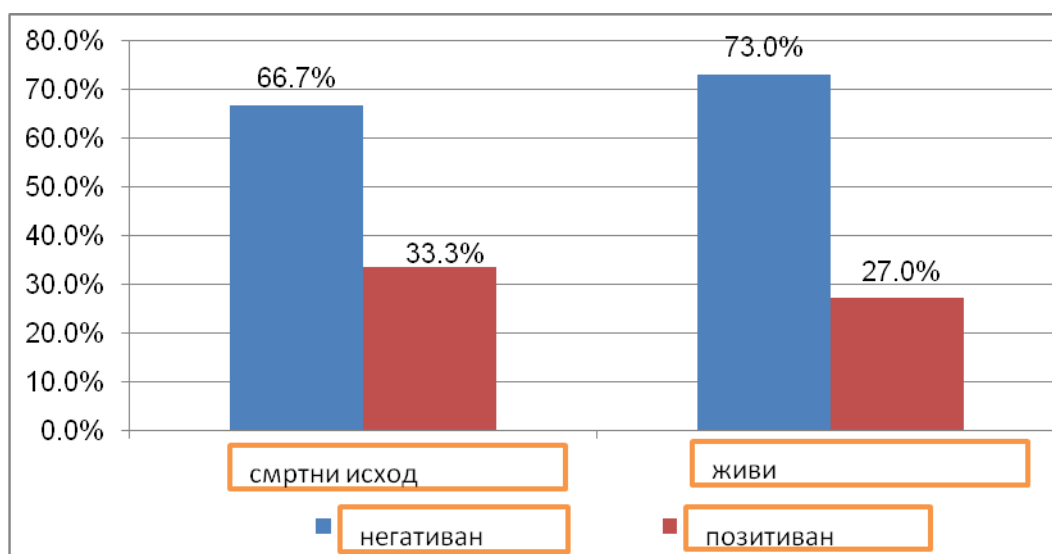
Графикон бр.6. Учесталост екстранодалне локализације код болесника са различитим исходом болести

У групи са смртним исходм једну екстранодалну локализацију имало је 78,4%, две локализације истовремено 13,5% а три 8,1% оболелих. Међу живим испитаницима једну локализацију је имало 85,7% а две 14,3% испитаника, и нико није био са три локализације, (графикон бр.7).



Графикон бр.7. Број екстранодалних локализација у испитаника са различитим исходом болести

Није уочена статистички значајна разлика у „Bulky“ позитивном и негативном статусу у односу на морталитет испитаника ( $\chi^2$  тест,  $p=0,527$ ), (табела бр.10). Код испитаника са оба посматрана исхода, испитаници са позитивним „Bulky“ статусом били су заступљени у једној трећини случајева, ( графикон бр.8).



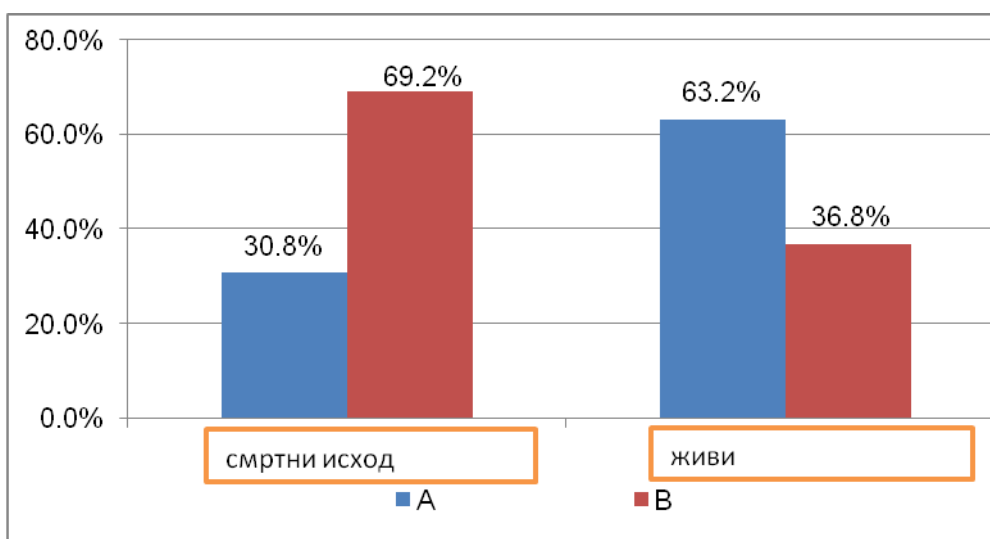
Графикон бр.8., „Bulky“ форма НХЛ ДБКЛ болесника различитог исхода болести

У групи испитаника са смртним исходом 9,8% је било у стадијуму I, 2,0% у стадијуму II 2,0%, стадијуму III чинило је 27,5%, док је 60,8% имало одмакли IV клинички стадијум. Припадници ове групе имали су ECOG статус 0 у 34,6%, статус означен са 1-28,8%, 2-23,1%, 3-9,6%, 4-3,8%. Екстранодална локализација у групи са смртним исходом утврђена је у 71,2% испитаника, а „*Bulky*“форма болести у 33,8%. ИПИ ризик у овој групи, низак имало је 7,7%, средње низак- 21,2%, док је средње висок ризик имало 59,6% и висок 11,5% оболелих од НХЛ ДБКЛ.

Анализа живих испитаника оболелих од НХЛ ДБКЛ показује клинички стадијум I у 7,9%, стадијум II код 26,3%, стадијум III у 21,1% док је у одмаклом IV клиничком стадијуму било 44,7% оболелих. У овој групи ECOG статус 0 имало је 86,8%, статус 1- 10,5%, статус 2 и статус 4 није имао нико од оболелих у овој групи, док је ECOG -3 имао само један оболели односно 2,6%. Екстранодална локализација у групи живих утврђена је код 55,3% оболелих, а „*Bulky*“форма болести у 27%. ИПИ ризик у овој групи, низак имало је 21,1%, средње низак 47,4%, средње висок 28,9% а висок само један болесник, односно 2,6%.

#### 4.1.1. Анализа Б симптоматологије оболелих од НХЛ ДБКЛ

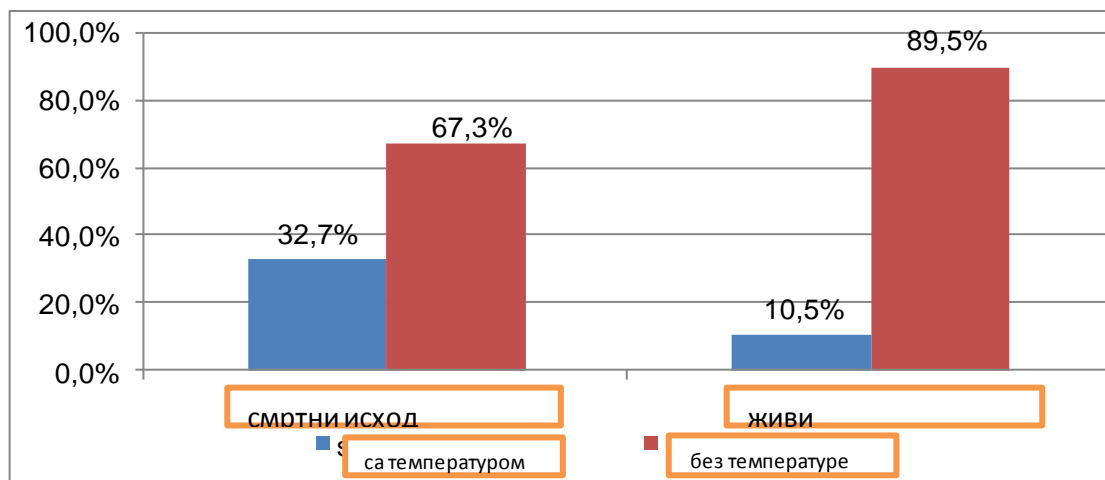
Анализом присуства и одсуства Б симптома у односу на исход болести, уочена је статистички значајна разлика у заступљености испитаника са присутним Б симптомима ( $\chi^2$  тест,  $p=0,002$ ). Анализом добијене разлике, уочавамо статистички значајно већу учесталост испитаника са Б симптомима у групи са смртним исходом, (графикон бр.9).



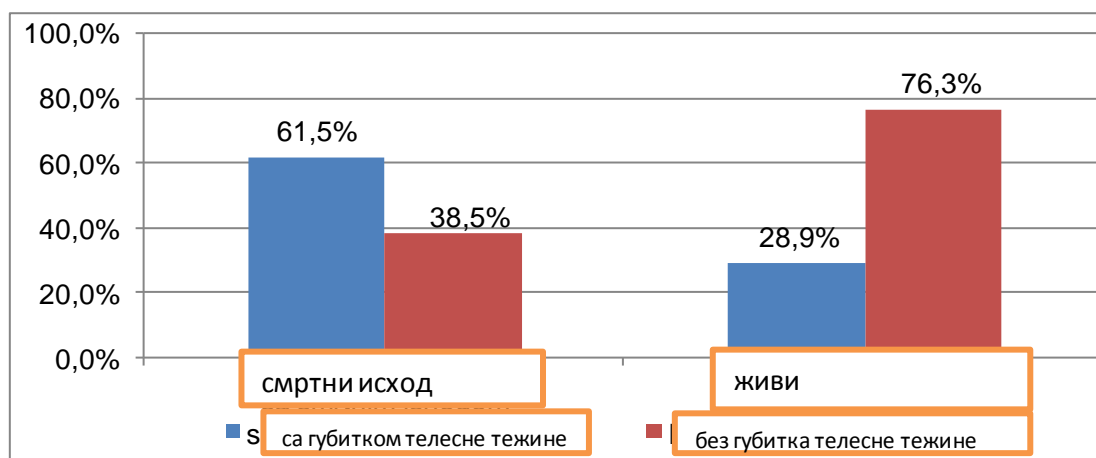
Графикон бр. 9. Учесталост Б симптома код оболелих од НХЛ ДБКЛ различитог исхода

Анализа постојања Б симптома: повишена телесна температура, губитак у телесној тежини већи од 10% за последњих шест месеци, презнојавање код различитог исхода болести показала је значајне разлике.

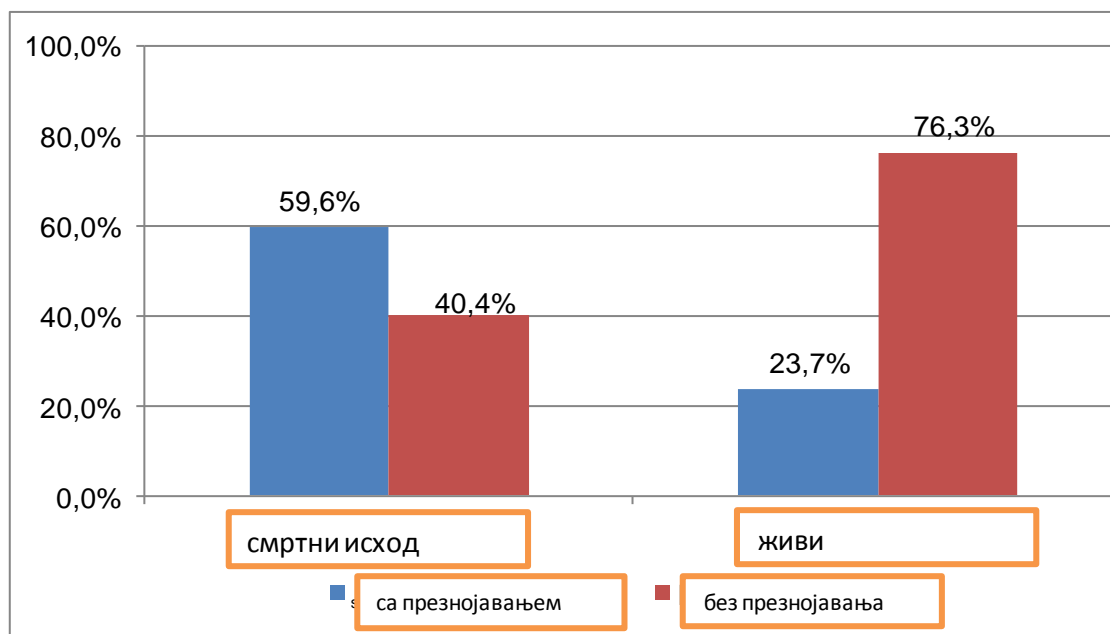
Између испитаника са смртним исходом и преживелих уочена је статистички значајна разлика у појави повишене телесне температуре, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,014$ ). Испитаници са смртним исходом скоро три пута чешће су имали температуру као симптом, него живи испитаници, (графикон бр.10). Испитаници са губитком у телесној тежини значајно су више били заступљени у групи са смртним исходом ( $\chi^2$  тест,  $p=0,002$ ). Губитак телесне тежине имало је упола мање преживелих испитаника, него они оболели са смртним исходом,(графикон бр.11). Презнојавање, као симптом, статистички значајно чешће се појављивало у групи са смртним исходом, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,001$ ). Два пута више испитаника са смртним исходом је имало овај симптом приликом постављања дијагнозе, (графикон бр. 12).



Графикон бр.10. Дистрибуција учесталости повишене телесне температуре код различитог исхода болести



Графикон бр.11. Дистрибуција учесталости губитка у телесној тежини код различитог исхода болести



Графикон бр.12. Дистрибуција учесталости презнојавања код различитог исхода болести

#### 4.1.2. Анализа коморбидитета оболелих од НХЛ ДБКЛ, различитог исхода

Између испитаника са смртним исходом и преживелих уочена је статистички значајна разлика у коморбидитету, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,020$ ), (табела бр.11).

Придружене болести n (%)	Исход		Значајност
	Мртви	Живи	
Без болести	13 (25,0%)	22 (57,9%)	
<i>Diabetes mellitus</i>	8 (15,4%)	1 (2,6%)	
<b>Кардиоваскуларне болести</b>	25 (48,1%)	13 (34,2%)	
Болести плућа	2 (3,8%)	0 (0%)	<sup>a</sup> $p=0,020^*$
Системске реуматске болести	2 (3,8%)	0 (0%)	
<i>Hepatitis</i>	1 (1,9%)	0 (0%)	
Друге болести	1 (1,9%)	2 (5,3%)	

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup> $\chi^2$  2-тест

Табела бр.11. Учесталост придружених болести испитиване популације оболелих од НХЛ ДБКЛ различитог исхода



Код испитаника са смртним исходом три четвртине испитаника имало је неки коморбидитет, док је у групи преживелих мање од половине испитаника било са неким коморбидитетом. Најчешћи коморбидитет у обе групе, било је постојање кардиоваскуларне болести. Око 15% испитаника са смртним исходом имало је дијабетес, док је свега око 3% живих испитаника било са овим коморбидитетом. Све остале придружене болести биле су забележене у појединачним случајевима.

## 4.2. Претерапијске лабораторијске анализе крви у оболелих од НХЛ ДБКЛ

### 4.2.1. Анализа претерапијске крвне слике

Број леукоцита у болесника са смртним исходом био је  $8,75 \pm 5,81 \times 10^9$ , са распоном од  $3,5-36,3 \times 10^9$ , а у живих  $6,98 \pm 2,36 \times 10^9$  са распоном од  $3,1-14,2 \times 10^9$ . Међугрупном анализом није утврђена статистички значајна разлика у броју леукоцита између болесника са смртним исходом и живих, (*Mann Whitney* тест,  $p=0,345$ ). Анализом леукоцитарне формуле утврђена је средња вредност неутрофила у групи са смртним исходом  $5,14 \pm 3,35 \times 10^9$  и  $4,26 \pm 1,91 \times 10^9$  у живих испитаника, без статистички значајне међугрупне разлике, (*Mann Whitney* тест,  $p=0,396$ ). Лимфоцити су у групи са смртним исходом били  $2,04 \pm 1,99 \times 10^9$ , групи живих  $1,82 \pm 1,13 \times 10^9$ , без статистички значајне међугрупне разлике (*Mann Whitney* тест,  $p=0,402$ ). Средња вредност моноцита у групи са смртним исходом била је  $1,13 \pm 2,34 \times 10^9$ , а у групи живих  $0,77 \pm 0,69 \times 10^9$ , без статистички значајне међугрупне разлике (*Mann Whitney* тест,  $p=0,412$ ). Анализа броја еритроцита показала је средњу вредност у групи са смртним исходом  $3,74 \pm 0,64 \times 10^{12}$ , а у групи живих  $3,93 \pm 0,52 \times 10^{12}$ , без статистички значајне међугрупне разлике (*t*-тест;  $p=0,133$ ). Средња вредност MCV (*engl. Main Corpuscular Volume*)  $87,66 \pm 6,13$  fl у групи са смртним исходом, а у групи живих  $88,53 \pm 4,79$  fl, без статистички значајне разлике (*Mann Whitney* тест,  $p=0,772$ ). Вредности хемоглобина у болесника са смртним исходом биле су  $115,01 \pm 20,54$  g/l са распоном од 60-164 g/l, док је у групи живих средња вредност била  $129,21 \pm 15,80$  g/l са распоном од 93-166 g/l, а међугрупна анализа је показала статистички значајну међугрупну разлику (*t*-тест,  $p=0,001$ ), уз значајно ниже вредности у групи са смртним исходом. Вредности тромбоцита имале су средњу

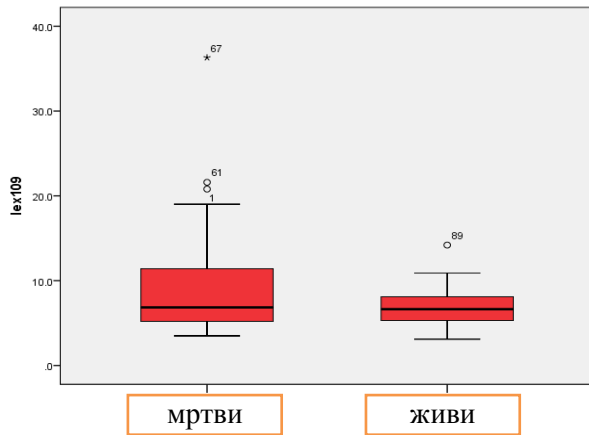
вредност у групи са смртним исходом од  $259,27 \pm 120,97 \times 10^9$ , а у групи живих  $265,92 \pm 104,08 \times 10^9$ , без статистички значајне разлике међугрупном анализом (*Mann Whitney* у тест,  $p=0,457$ ), (табела бр. 12).

Опште карактеристике	Исход		Значајност
	Мртви	Живи	
Леукоцити $\times 10^9$ ( $\bar{X} \pm SD$ (Med, min-max))	8,75 $\pm$ 5,81 (6,85; 3,5-36,3)	6,98 $\pm$ 2,36 (6,64; 3,1-14,2)	<sup>a</sup> $p=0,345$
Неутрофили ( $\bar{X} \pm SD$ (Med, min-max))	5,14 $\pm$ 3,35 (4,31; 0,51-17,62)	4,26 $\pm$ 1,91 (4,1; 1,24-11,0)	<sup>a</sup> $p=0,396$
Лимфоцити ( $\bar{X} \pm SD$ (Med, min-max))	2,04 $\pm$ 1,99 (1,36; 0,06-10,85)	1,82 $\pm$ 1,13 (1,50; 0,29-5,65)	<sup>a</sup> $p=0,402$
Моноцити ( $\bar{X} \pm SD$ (Med, min-max))	1,13 $\pm$ 2,34 (0,77; 0-16,8)	0,77 $\pm$ 0,69 (0,68; 0-4,1)	<sup>a</sup> $p=0,412$
Број еритроцита $\times 10^{12}$ ( $\bar{X} \pm SD$ (Med, min-max))	3,74 $\pm$ 0,64 (3,68; 2,30-5,35)	3,93 $\pm$ 0,52 (3,94; 3,0-5,12)	<sup>b</sup> $p=0,133$
Вредности хемоглобина g/l ( $\bar{X} \pm SD$ (Med, min-max))	115,01 $\pm$ 20,54 (113,5; 60-164)	129,21 $\pm$ 15,80 (129,55; 93-166)	<sup>b</sup> $p=0,001^*$
MCV ( $\bar{X} \pm SD$ (Med, min-max))	87,66 $\pm$ 6,13 (88,2; 69,5-100)	88,53 $\pm$ 4,79 (89,08; 75-96,6)	<sup>a</sup> $p=0,772$
Тромбоцити $\times 10^9$ ( $\bar{X} \pm SD$ (Med, min-max))	259,27 $\pm$ 120,97 (232,05; 57,5-651)	265,92 $\pm$ 104,08 (249,5; 83,4-525)	<sup>a</sup> $p=0,457$

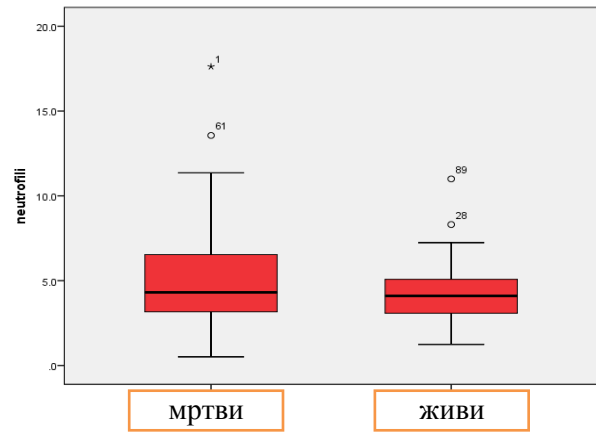
\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>*Mann Whitney U* тест; <sup>b</sup>t-тест;

Табела бр.12. Претерапијске вредности крвне слике у оболелих од НХЛ ДБКЛ

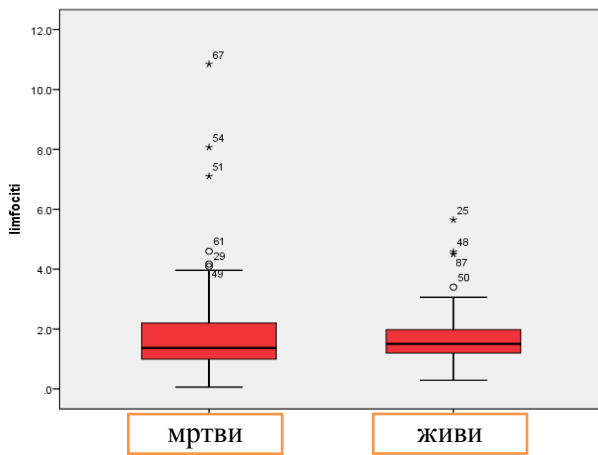
На графиконима приказани су крвни елементи анализирани пре примењене терапије, без статистички значајне разлике а у болесника са различитим исходом, (графикони од бр.13 до бр.19).



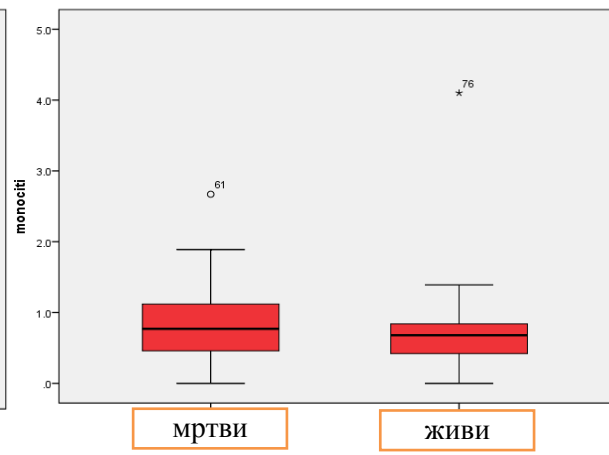
Графикон бр.13. Број леукоцита пре примењене терапије у односу на исход болести



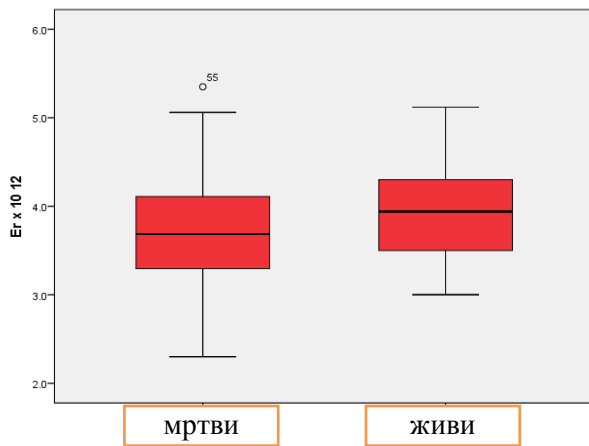
Графикон бр.14. Број неутрофила пре примењене терапије у односу на исход болести



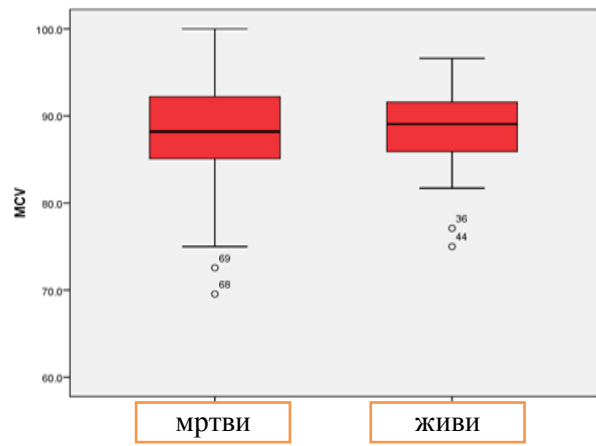
Графикон бр.15. Број лимфоцита пре примењене терапије у односу на исход болести



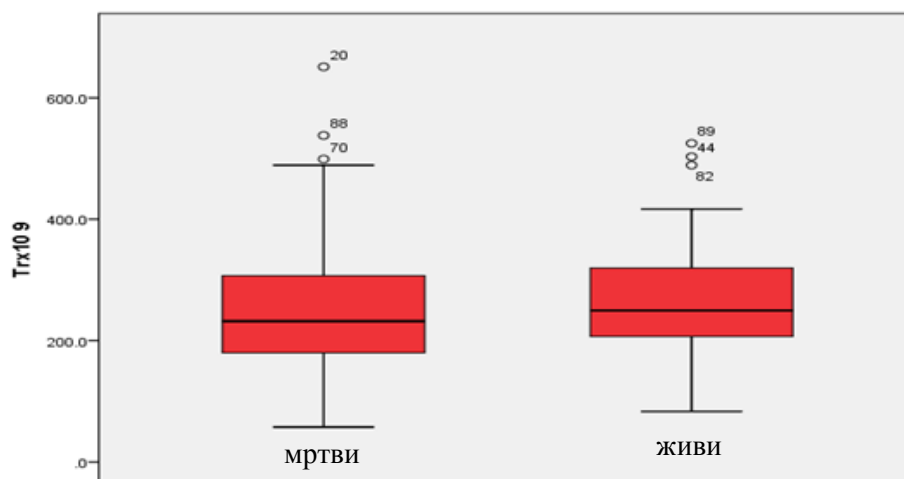
Графикон бр.16. Број моноцита пре примењене терапије у односу на исход болести



Графикон бр.17. Број еритроцита пре примењене терапије у односу на исход болести

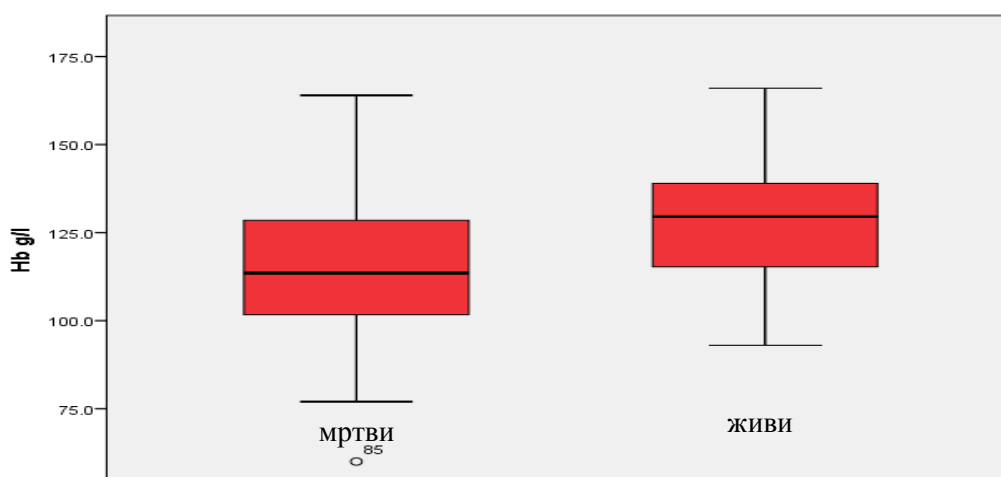


Графикон бр.18. Вредност MCV пре примењене терапије у односу на исход болести



Графикон бр.19. Број тромбоцита пре примењене терапије у односу на исход болести

У групи испитаника са смртним исходом вредност хемоглобина је била  $115,01 \pm 20,54 \text{ g/l}$  са распоном од  $60 \text{ g/l}$  до  $160 \text{ g/l}$ , у групи живих вредности су биле  $129,21 \pm 15,80 \text{ g/l}$  са распоном од  $93 \text{ g/l}$  до  $166 \text{ g/l}$ . Статистички значајна разлика утврђена је између вредности хемоглобина болесника са смртним исходом и живих болесника, односно статистички значајно су биле ниже претерапијске вредности хемоглобина у болесника са смртним исходом, (t- тест,  $p=0,001$ ), (графикон бр.20).



Графикон бр.20. Вредност хемоглобина пре примењене терапије у односу на исход болести

#### 4.2.2. Биохемијске анализе крви претерапијске

Средња вредности укупних протеина у групи са смртним исходом претретмански била је  $61,64 \pm 7,42 \text{ g/l}$ , а у групи живих  $67,00 \pm 6,67 \text{ g/l}$ , уз статистички значајно ниже вредности у грпи са смртним исходом (t- тест,  $p=0,001$ ), утврђена је и статистички значајна разлика у учесталости испитаника са вредностима укупних

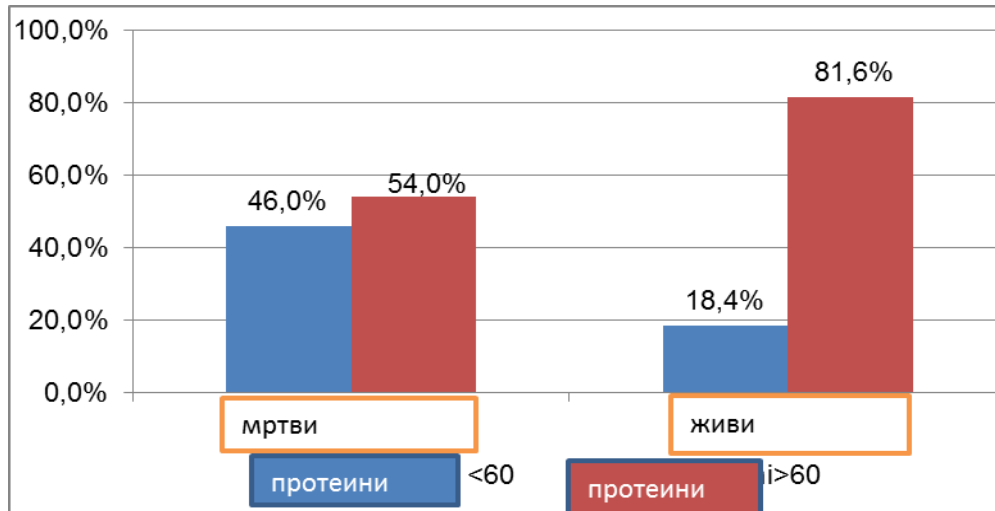
протеина мањим и већим од 60 g/l, ( $\chi^2$  тест, p=0,007) у зависности од исхода, (табела бр.13).

Биохемијски параметри	Исход		Значајност
	Мртви	Живи	
Укупни протеини (X $\pm$ SD (Med, min-max))	61,64 $\pm$ 7,42 (61; 51-77)	67,00 $\pm$ 6,67 (67,5; 51-81)	<sup>a</sup> p=0,001*
Укупни протеини <60g/l	23 (46,0%)	7 (18,4%)	<sup>b</sup> p=0,007*
n (%) >60g/l	27 (54,0%)	31 (81,6%)	
Албумини (X $\pm$ SD (Med, min-max))	32,98 $\pm$ 5,63 (32,5; 21-45)	37,37 $\pm$ 5,35 (37,5; 24-47)	<sup>a</sup> p=0,000*
Албумини <30g/l	16 (32,0%)	6 (15,8%)	<sup>b</sup> p=0,082
n (%) >30g/l	34 (68,0%)	32 (84,2%)	
AST (X $\pm$ SD (Med, min-max))	33,34 $\pm$ 24,21 (25,0; 11-120)	24,50 $\pm$ 15,35 (18,0; 9-87)	<sup>c</sup> p=0,023*
AST <40IU/l	40 (80,0%)	33 (86,8%)	<sup>b</sup> p=0,398
n (%) >40IU/l	10 (20,0%)	5 (13,2%)	
ALT (X $\pm$ SD (Med, min-max))	27,84 $\pm$ 23,12 (21,5; 7-151)	29,08 $\pm$ 21,44 (22,0; 9-121)	<sup>c</sup> p=0,717
ALT <40IU/l	42 (84,0%)	32 (84,2%)	<sup>b</sup> p=0,979
n (%) >40IU/l	8 (16,0%)	6 (15,8%)	
Гамма GT (X $\pm$ SD (Med, min-max))	64,43 $\pm$ 90,25 (32,0; 10-489)	35,87 $\pm$ 33,59 (26,0; 7-177)	<sup>c</sup> p=0,156
Гамма GT <30IU/l	29 (61,7%)	24 (77,4%)	<sup>b</sup> p=0,146
n (%) >30IU/l	18 (38,3%)	7 (22,6%)	
ALP (X $\pm$ SD (Med, min-max))	101,11 $\pm$ 98,82 (80,0; 45-658)	75,16 $\pm$ 34,34 (71,0; 24-206)	<sup>c</sup> p=0,309
ALP <100U/l	40 (85,1%)	27 (87,1%)	<sup>b</sup> p=0,805
n (%) >100U/l	7 (14,9%)	4 (12,9%)	
Ацидум урикум (X $\pm$ SD (Med, min-max))	374,33 $\pm$ 172,98 (318,0; 128-769)	266,40 $\pm$ 55,53 (250,0; 185-430)	<sup>c</sup> p=0,014*
Ацидум урикум <400umol/l	31 (63,3%)	29 (96,7%)	<sup>b</sup> p=0,001*
n (%) >400umol/l	18 (36,7%)	1 (3,3%)	
LDH (X $\pm$ SD (Med, min-max))	1081,06 $\pm$ 1099,88 (677,5; 130-5548)	536,74 $\pm$ 540,79 (345,0; 214-3020)	<sup>c</sup> p=0,000*
LDH <400U/l	15 (28,8%)	22 (57,9%)	<sup>b</sup> p=0,006*
n (%) >400U/l	37 (71,2%)	16 (42,1%)	

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>t- тест; <sup>b</sup> $\chi^2$ -тест; <sup>c</sup>Mann Whitney тест

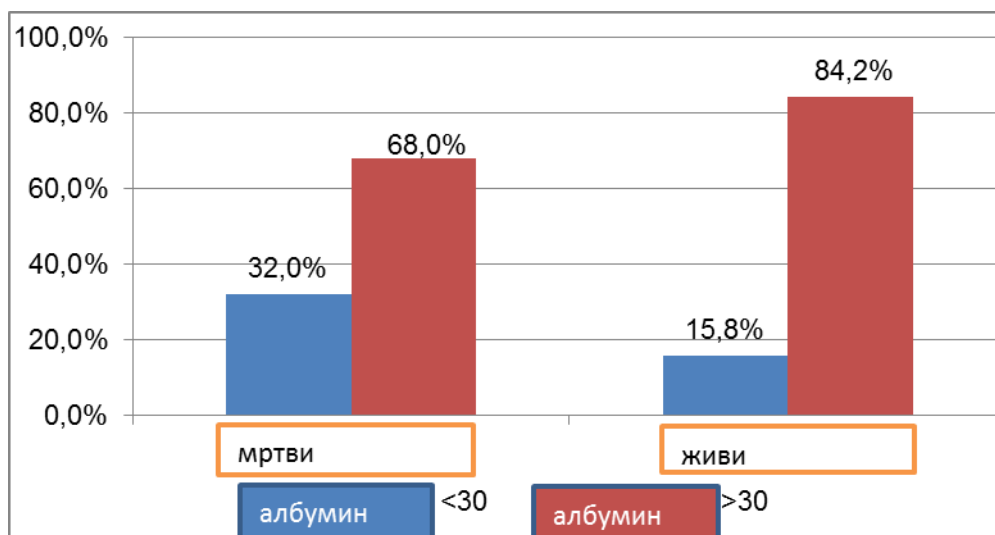
Табела бр.13. Вредности анализираних претерапијских биохемијских параметара

Статистички значајно веће вредности укупних протеина су у групи живих испитаника. Вредности протеина преко 60g/l имало је 54% испитаника у групи испитаника са смртним исходом и 81,6% у групи живих испитаника, (графикон бр. 21). Између анализираних група испитаника, није уочена статистички значајна разлика у учесталости испитаника са вредностима албумина мањим и већим од 30 g/l ( $\chi^2$  тест,  $p=0,082$ ), (графикон бр.22).



Графикон бр. 21. Расподела вредности укупних протеина у болесника са НХЛ ДБКЛ различитог исхода

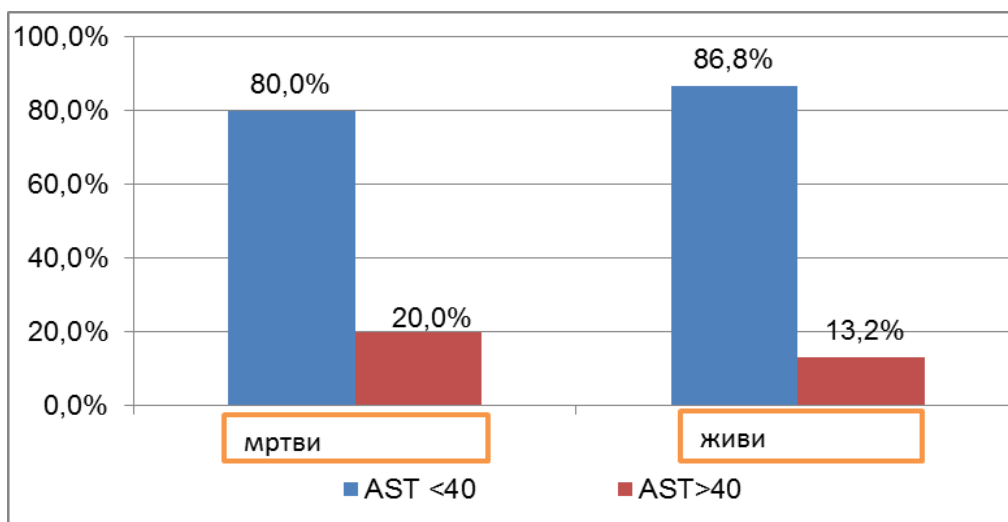
Просечне вредности албумина у групи живих испитаника су биле  $37,37 \pm 5,35$ g/l, са распоном од 24g/l до 47g/l и статистички значајно веће у односу на болеснике са смртним исходом, (t- тест,  $p=0,000$ ), (табела бр. 13).



Графикон бр. 22. Расподела вредности албумина у болесника са НХЛ ДБКЛ различитог исхода

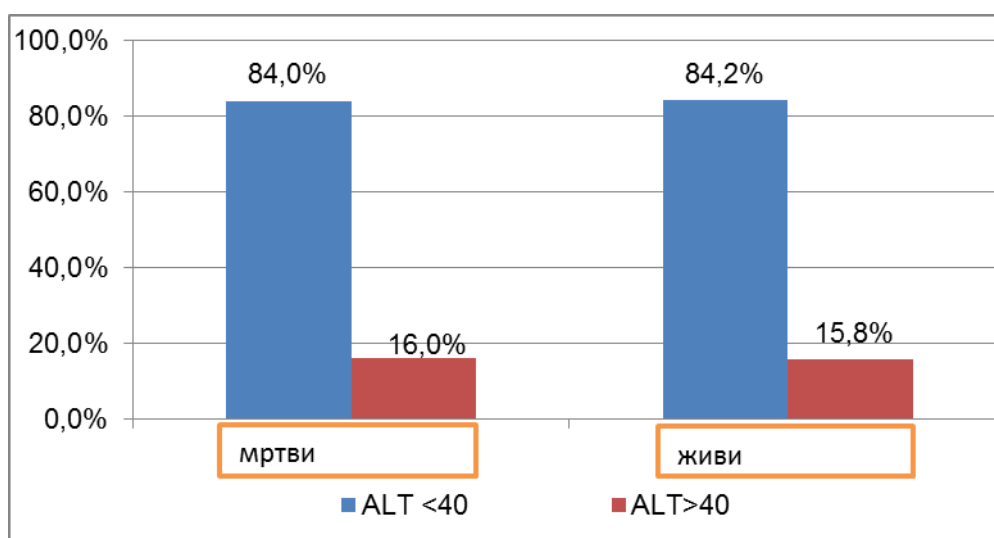
Између испитаника са смртним исходом и живих, уочена је статистички значајна разлика у просечним вредностима АСТ-а, (*Mann Whitney* тест,  $p=0,023$ ), и то

тако да су веће просечне вредности овог параметра измерене код испитаника са смртним исходом  $33,34 \pm 24,21$  IU/l са распоном од 11 IU/l до 120 IU/l. Анализом учесталости испитаника са вредностима овог параметра мањим и већим од 40 IU/l у односу на исход болести није показао статистички значајну разлику ( $\chi^2$  тест,  $p=0,398$ ), (графикон бр. 23).



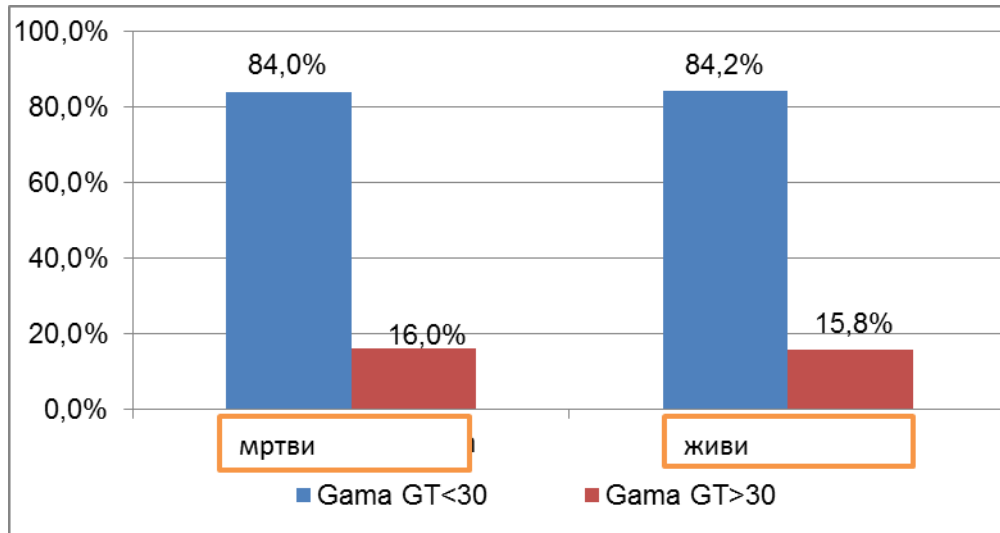
Графикон бр. 23. Расподела вредности AST-а у оболелих од НХЛ ДБКЛ а са различитим исходом

Просечне вредности ALT у групи оболелих са смртним исходом су биле  $27,84 \text{ IU/l} \pm 23,12$  IU/l, са распоном од 11 IU/l до 120 IU/l, а у другој групи  $29,08 \text{ IU/l} \pm 21,44$  IU/l, са распоном од 9 IU/l до 121 IU/l, без статистички значајне међугрупне разлике, (*Mann Whitney* тест,  $p=0,717$ ), (табела бр.13). Није утврђена статистички значајна разлика ни учесталости у односу на граничне вредности, веће и мање од 40 IU/l ( $\chi^2$  тест,  $p=0,979$ ) међу групама различитог исхода, (графикон бр.24).



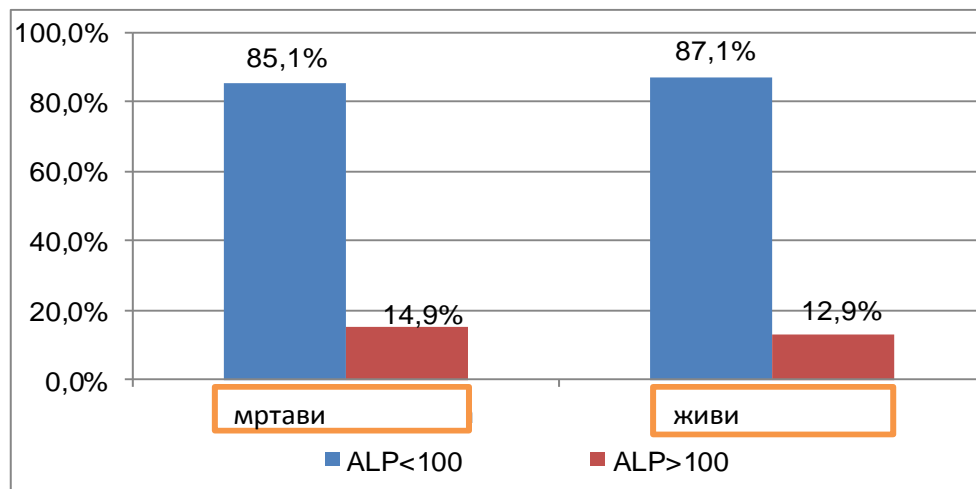
Графикон бр. 24. Расподела вредности ALT-а у оболелих од НХЛ ДБКЛ различитог исхода

Просечне вредности Гама-ГТ у групи са смртним исходом су биле  $64,43 \pm 90,25$  IU/l са распоном од 10-489 IU/l, а у групи живих  $35,87 \pm 33,59$  IU/l, са распоном од 7IU/l до 177 IU/l, без статистички значајне разлике између анализираних група (*Mann - Whitney* тест,  $p=0,156$ ), (табела бр.13). Није утврђена ни статистички значајна разлика у односу на граничне вредности Гама-ГТ а у групама различитог исхода, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,146$ ), (графикон бр.25).



Графикон бр. 25. Расподела вредности гама GT-а у болелих од НХЛ ДБКЛ различитог исхода

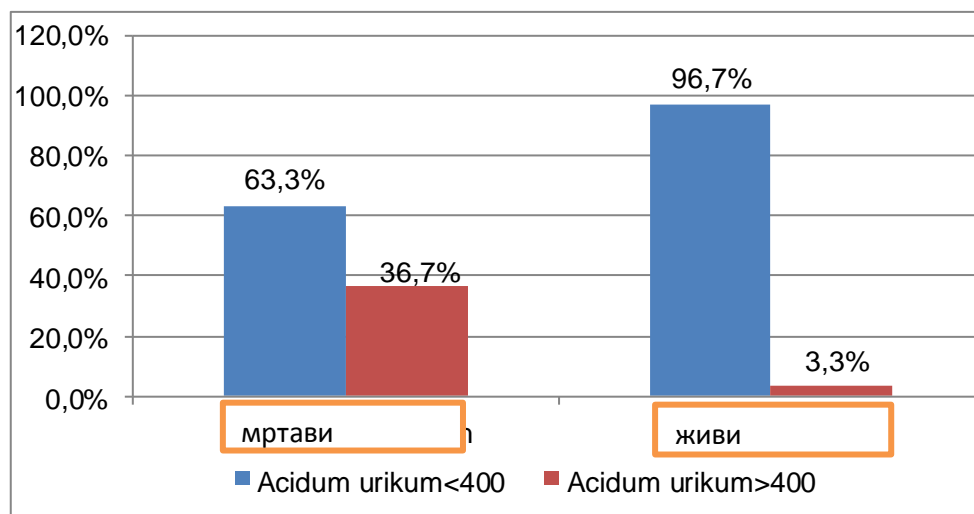
Алкална фосфатаза у групи оболелих са смртним исходом је била  $101,11$  U/l  $\pm 98,82$  U/l, са распоном од 45 U/l до 658 U/l, док је у групи живих била  $75,16$  U/l  $\pm 34,34$  U/l, са распоном од 24 U/l до 206 U/l, без статистичке значајности у међугрупној анализи (*Mann - Whitney* тест,  $p=0,309$ ), (табела бр.13). Није утврђена ни статистички значајна разлика у учесталости у односу на граничне вредности, у групама различитог исхода ( $\chi^2$  тест,  $p=0,805$ ), (графикон бр.26).



Графикон бр. 26. Расподела вредности ALP у оболелих од НХЛ ДБКЛ различитог исхода

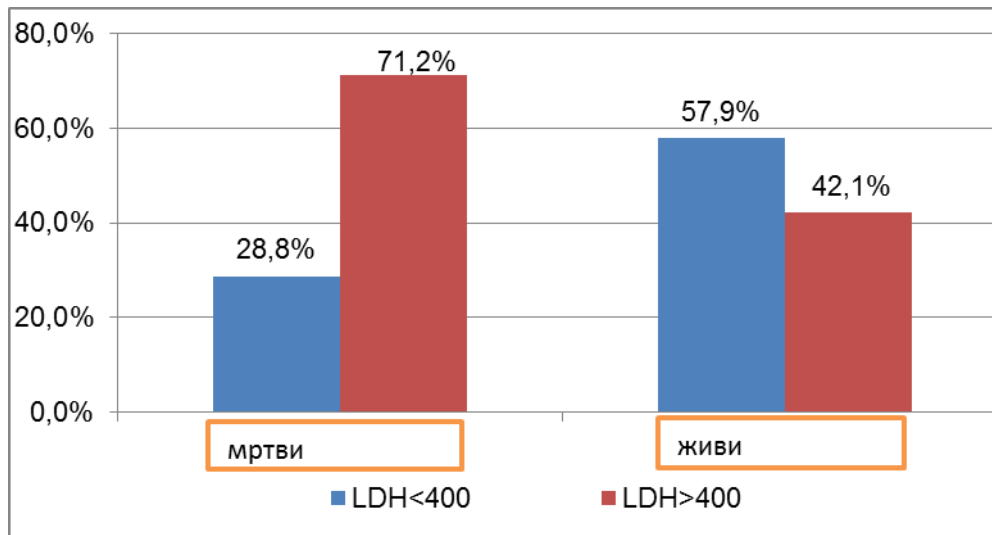


Анализом вредности мокраћне киселине (*acidum urikum*) у моменту постављања дијагнозе, између испитаника са смртним исходом и живих, уочена је статистички значајна разлика у просечним вредностима овог параметра, вредности су биле значајно веће у болесника са смртним исходом, (*Mann - Whitney* тест,  $p=0,014$ ), (табела бр. 13). Утврђена је статистички значајна разлика и у учесталости испитаника са вредностима мокраћне киселине мањим и већим од граничних вредности од 400  $\mu\text{mol/l}$ , ( $\chi^2$  тест,  $p=0,001$ ). Вредности мокраћне киселине преко 400  $\mu\text{mol/l}$  имало је 36,7% испитаника са смртним исходом и 3,3% живих испитаника, (графикон бр.27).



Графикон бр. 27. Расподела вредности *Acidum urikum* у оболелих од НХЛ ДБКЛ различитог исхода

Вредности LDH измерене у моменту постављања дијагнозе код живих испитаника и испитаника са смртним исходом, статистички су се значајно разликовале, (*Mann- Whitney* тест,  $p=0,000$ ), (табела бр.13). Статистички значајно веће вредности овог параметра измерене су код испитаника са смртним исходом. Између анализираних група оболелих, уочена је статистички значајна разлика и у заступљености испитаника са вредностима LDH мањим и већим од 400 U/l, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,006$ ). Око 70% испитаника са смртним исходом имало је вредности LDH веће од 400 U/l, док је овакве вредности LDH имало око 40% испитаника који су живи, (графикон бр.28).



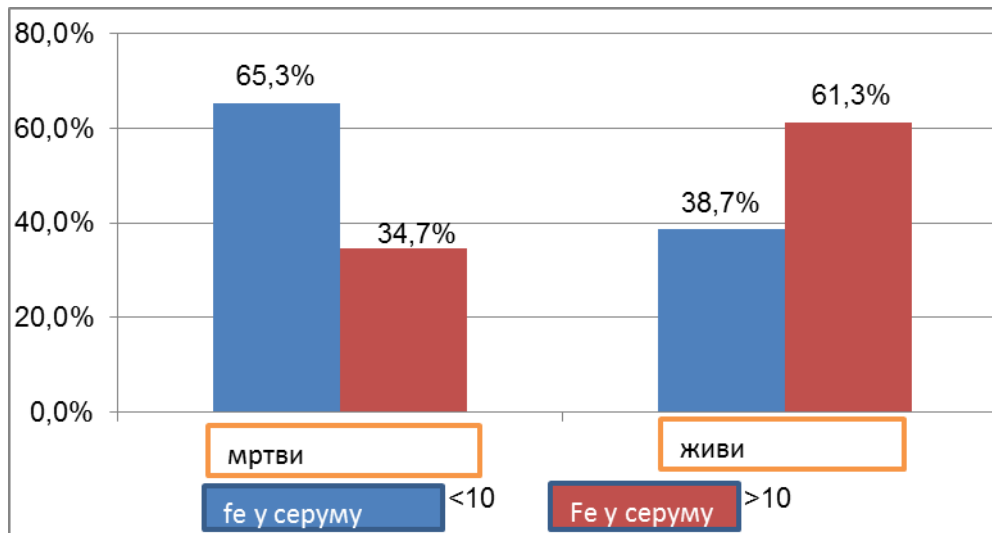
Графикон бр. 28. Расподела вредности LDH у оболелих од НХЛ ДБКЛ различитог исхода

Статистички значајна разлика, посматрано у односу на исход уочена је и код претерапијских вредности гвожђа у серуму, (табела бр.14).

<b>Гвожђе у серуму</b> <b>X<sub>±SD</sub></b> <b>(Med, min-max)</b>	9,3±6,97 7,20; 2-40	13,25±5,97 12,10; 2-25	p=0,002*/ Mann Whitney тест
<b>Гвожђе у серуму</b> <b>n (%)&lt;10umol/l</b>	32 (65,3%)	12 (38,7%)	p=0,020*/ χ <sup>2</sup> -тест;
<b>Гвожђе у серуму</b> <b>n (%)&gt;10umol/l</b>	17 (34,7%)	19 (61,3%)	
<b>Вредност гвожђа</b>	<b>мртви</b>	<b>живи</b>	<b>значајност.</b>

Табела бр. 14. Претерапијске вредности гвожђа у серуму оболелих, различитог исхода

Просечна вредност у групи живих је 13,25umol/l±5,97umol/l, са распоном од 2umol/l до 25umol/l. Код овог параметра статистички значајно веће вредности иницијално су измерене у групи живих испитаника, (*Mann - Whitney* тест, p=0,002). Узимајући граничне вредности вредност за овај параметар од 10umol/l, уочена је значајно већа учесталост испитаника са вредностима гвожђа у серуму већим од 10umol/l у групи живих испитаника (χ<sup>2</sup> тест, p=0,020), чак 61,3% живих има вредност гвожђа у серуму већу од граничне вредности, (графикон бр.29).



Графикон бр. 29. Расподела вредности *Fe* у серуму у оболелих од НХЛ ДБКЛ различитог исхода

#### 4.2.3. Биохуморални запаљенски синдром претерапијски

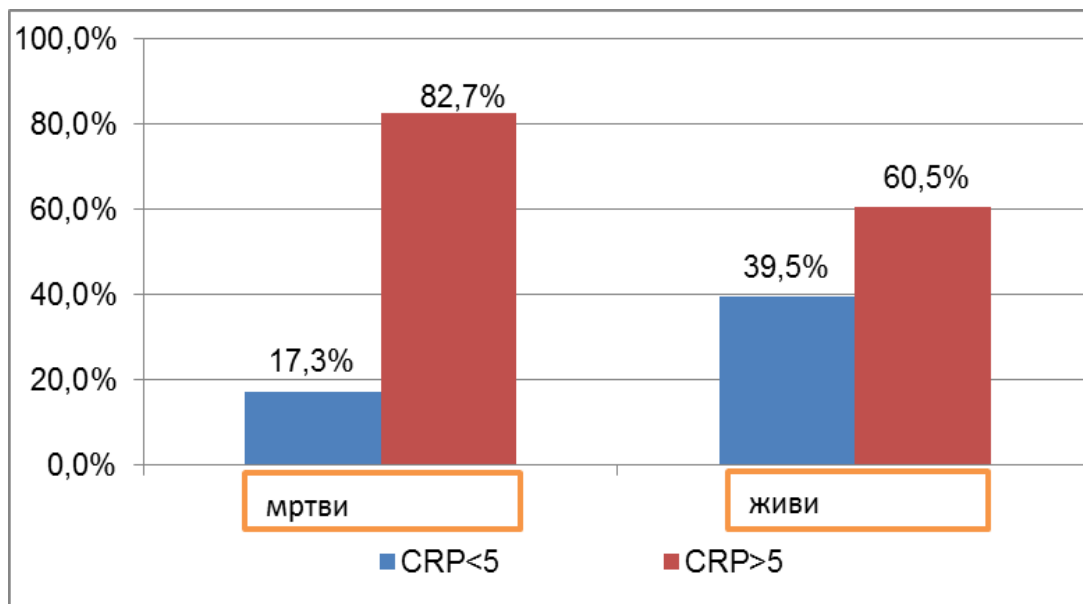
Вредности CRP-а, статистички значајно су се разликовале посматрано у односу на исход оболелих, (табела бр.15).

Параметри запаљења	Исход		Значајност
	Мртви	Живи	
Седиментација ( $X \pm SD$ (Med, min-max))	36,90 $\pm$ 31,99 (30; 2-150)	33,47 $\pm$ 43,26 (23; 3-250)	<sup>a</sup> p=0,195
Седиментација n (%)	<10 6 (11,5%)	9 (23,7%)	<sup>b</sup> p=0,127
	>10 46 (88,5%)	29 (76,3%)	
Фибриноген ( $X \pm SD$ (Med, min-max))	4,51 $\pm$ 1,51 (4,14; 2,18-10,80)	4,04 $\pm$ 0,93 (3,81; 2,76-6,90)	<sup>a</sup> p=0,121
Фибриноген n (%)	<4 19 (36,5%)	20 (54,1%)	<sup>b</sup> p=0,101
	>4 33 (63,5%)	17 (45,9%)	
CRP ( $X \pm SD$ (Med, min-max))	42,07 $\pm$ 57,27 (15,0; 0-308)	17,66 $\pm$ 38,36 (5,25; 1-218)	<sup>c</sup> p=0,001*
CRP n (%)	<5 9 (17,3%)	15 (39,5%)	<sup>b</sup> p=0,019*
	>5 43 (82,7%)	23 (60,5%)	
D-димер ( $X \pm SD$ (Med, min-max))	1145,40 $\pm$ 1011,18 (860; 0-4048)	420,35 $\pm$ 287,76 (340,0; 116-1200)	<sup>c</sup> p=0,000*
D-димер n (%)	<450 10 (20,4%)	19 (61,3%)	<sup>b</sup> p=0,000
	>450 39 (79,6%)	12 (38,7%)	

<sup>a</sup> Mann Whitney-тест, <sup>b</sup>  $\chi^2$ -тест

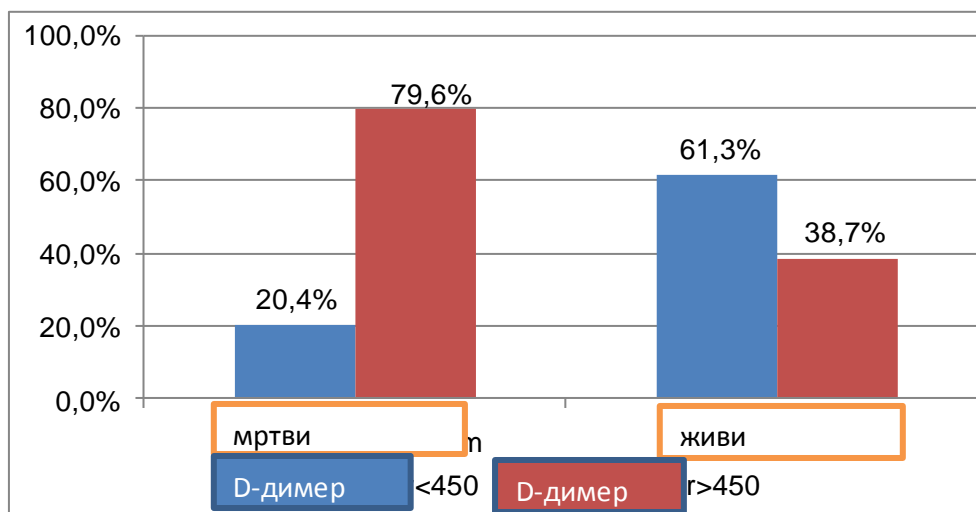
Табела бр.15. Претретманске вредности параметара запаљења у групама различитог исхода

Просечна вредност CRP-а групе болесника са смртним исходом била је  $42,07\text{mg/l} \pm 57,27\text{mg/l}$  са распоном од  $0\text{mg/l}$  до  $308\text{mg/l}$ , док су просечне вредности претретманске, у групи живих биле  $17,66\text{ mg/l} \pm 38,36\text{ mg/l}$  са распоном од  $1\text{mg/l}$  до  $218\text{mg/l}$ . Статистички значајно веће вредности овог параметра измерене су у групи са смртним исходом, (*Mann – Whitney* тест,  $p=0,001$ ). Статистички значајна разлика, уочена је и у учесталости испитаника са вредностима CRP-а већим од граничних вредности  $5\text{ mg/l}$ , и то тако да су високе вредности учесталије у групи са смртним исходом, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,019$ ), (графикон бр.30).



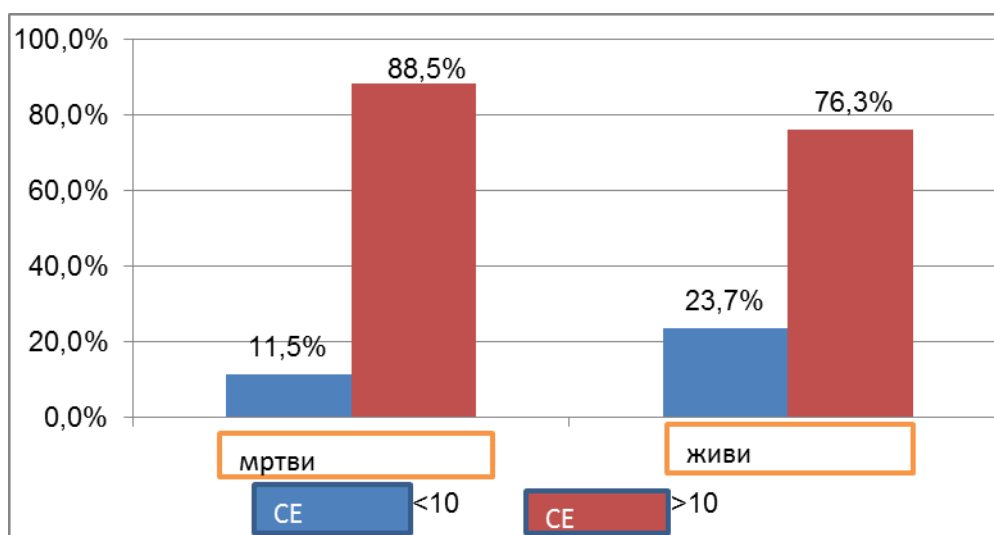
Графикон бр. 30. Приказ расподеле CRP- а у анализираних испитаника различитог исхода у односу граничне вредности

Просечне вредности претретманске D – димера у испитаника са смртним исходом биле су  $1145,40\text{ng/ml} \pm 1011,18\text{ng/ml}$ , са распоном од  $0\text{ng/ml}$ - $4048\text{ng/ml}$ , а просечне вредности у групи живих  $420,35\text{ng/ml} \pm 287,76\text{ng/ml}$ , са распоном од  $116\text{ng/ml}$  до  $1200\text{ng/ml}$ , те је утврђена статистички значајно већа вредност у групи са смртним исходом, (*Mann – Whitney* тест,  $p=0,000$ ), (табела бр.15). Статистички значајна разлика уочена је и у заступљености оболелих са вредностима D - димера мањим и већим од граничних вредности  $450\text{ ng/ml}$  и то тако да су у групи са смртним исходом испитаници са вредностима већим од  $450\text{ ng/ml}$  били статистички значајно више заступљени, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,000$ ), (графикон бр. 31).



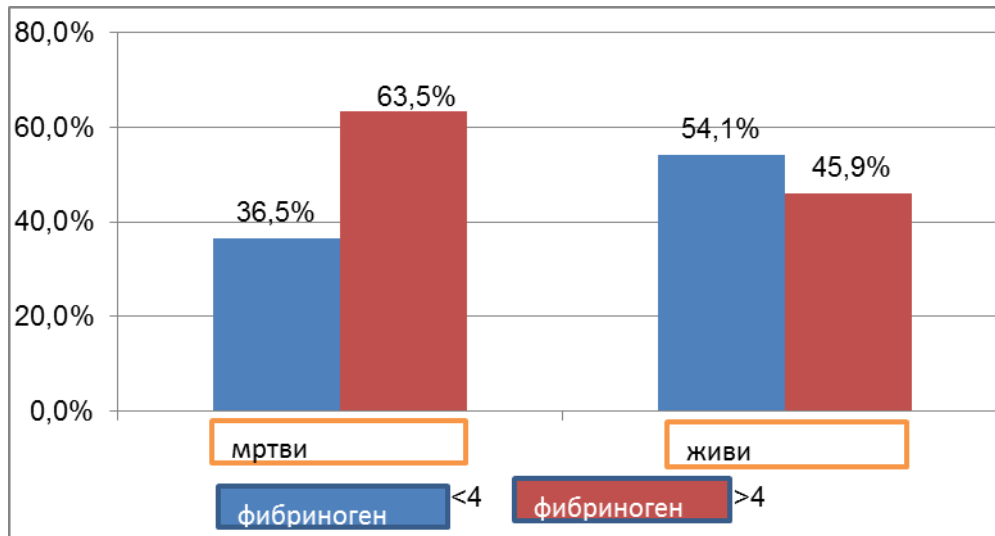
Графикон бр. 31. Учесталост D– димер-а у односу на граничне вредности у групама различитог исхода

Просечна вредност седиментације у првом сату у болесника са смрним исходом била је  $36,90\text{mm/h} \pm 31,99\text{mm/h}$ , са распоном од  $2\text{mm/h}$  до  $150\text{mm/h}$ . Међу живим испитаницима претретманске вредности седиментације биле су  $33,47\text{mm/h} \pm 43,26\text{mm/h}$ , са распоном од  $3\text{mm/h}$  до  $250\text{mm/h}$ . Посматрано у односу на исход, није уочена статистички значајна разлика у вредностима седиментације, (*Mann – Whitney* тест,  $p=0,195$ ), (табела бр.15). Није утврђена ни статистички значајна разлика у учесталости вредности седиментације у односу на граничне вредности од  $5\text{mm/h}$ , међу групама различитог исхода, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,127$ ), (графикон бр. 32).



Графикон бр. 32. Учесталост повишене седиментације у односу на граничне вредности у групама различитог исхода

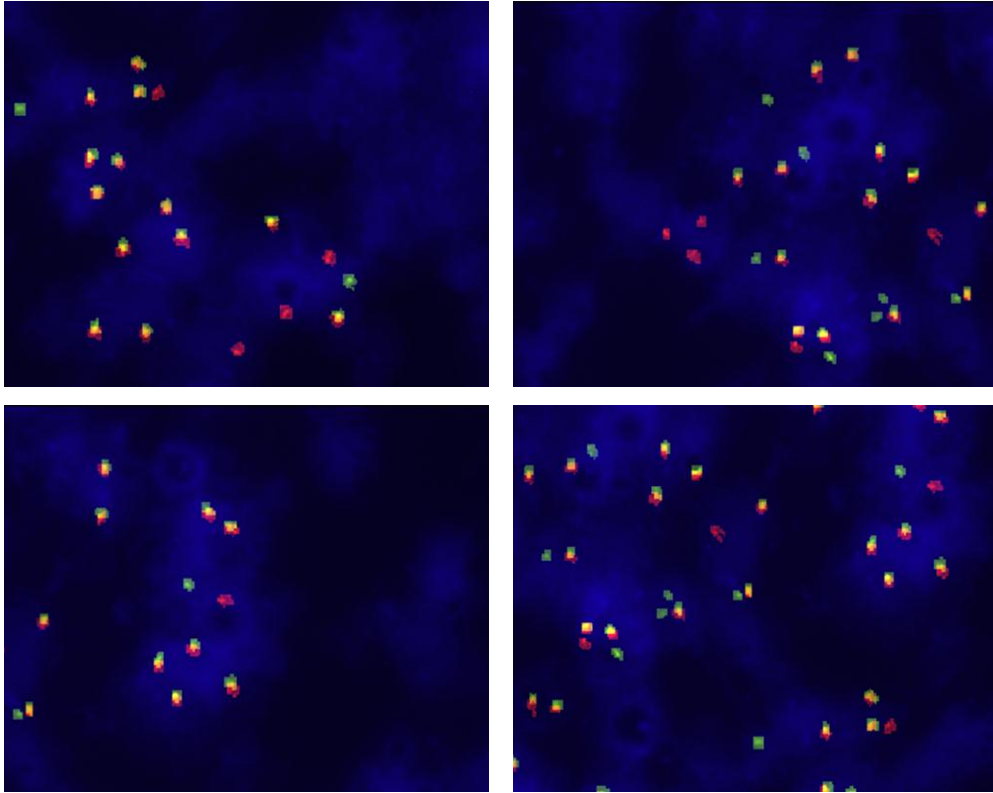
Просечне претретманске вредности фибриногена у групи болесника са смртним исходом биле су  $4,51\text{g/l} \pm 1,51\text{g/l}$ , са распоном од  $2,18\text{g/l}$  до  $10,8\text{g/l}$ . Просечне вредности у групи живих биле су  $4,04\text{g/l} \pm 0,93\text{g/l}$ , са распоном од  $2,76\text{g/l}$  до  $6,90\text{g/l}$ . Између испитаника са смртним исходом и живих, није уочена статистички значајна разлика у вредностима фибриногена, (*Mann - Whitney* тест,  $p=0,121$ ), (табела бр.15). Није утврђена ни разлика у заступљености овог параметра већег и мањег од граничне вредности од  $4\text{g/l}$  у посматраним групама ( $\chi^2$  тест,  $p=0,101$ ), (графикон бр.33).



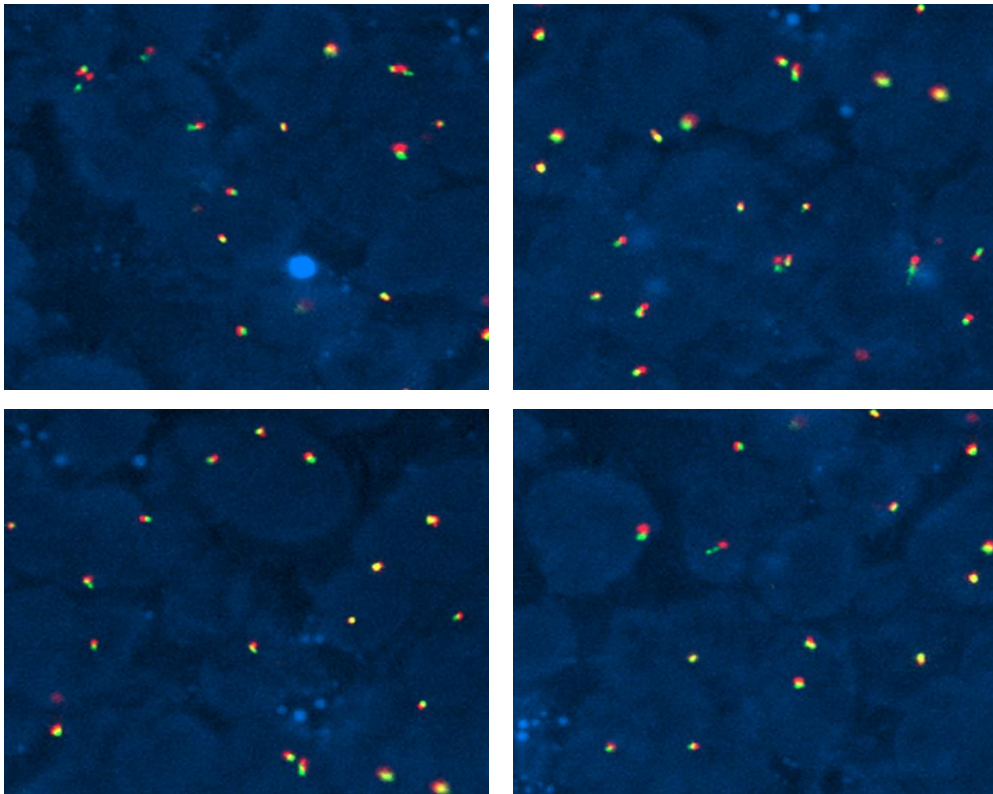
Графикон бр. 33. Учесталост повишеног фибриногена у односу на граничне вредности у групама различитог исхода

#### 4.3. Имунохистохемијска анализа и генски полиморфизам за *Bcl2* и *cMyc* утврђен *FISH*-ом

Доступно анализи *FISH*-ом било је 62 технички адекватна узорка, од којих је 33 испитаника било са смртним исходом, а 29 испитаника је било живо на крају посматраног периода од 90 месеци. *FISH* анализом утврђена је *Bcl2* позитивност код 48,5% испитаника са смртним исходом, а у 37,9% живих испитаника, (слика бр.7).



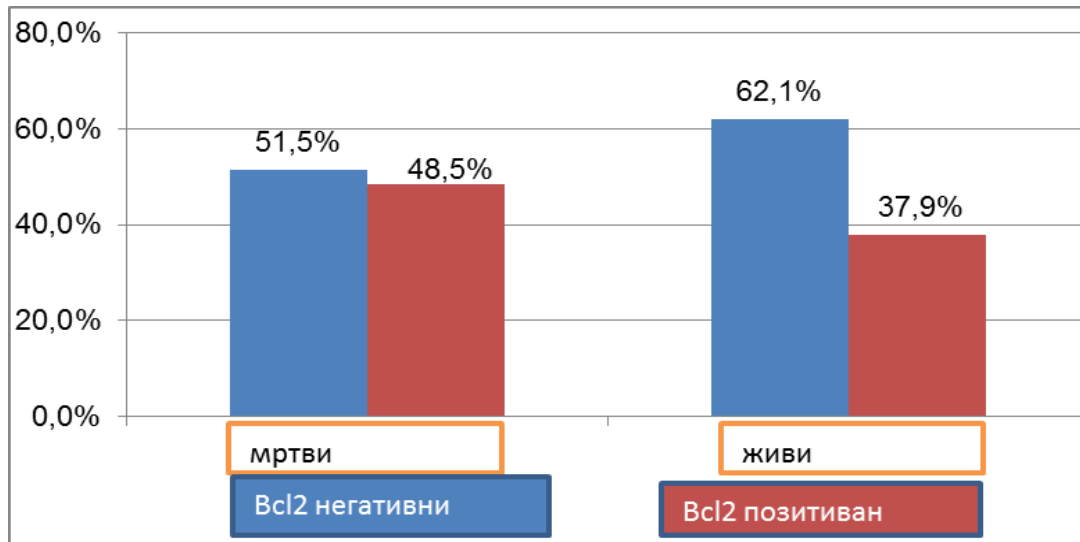
Слика бр.7. Анализирани узорци испитаника оболелих од НХЛ ДБКЛ који су *FISH/Bcl2* позитивни



Слика бр.8. Анализирани узорци оболелих од НХЛ ДБКЛ који су *FISH/Bcl2* негативни

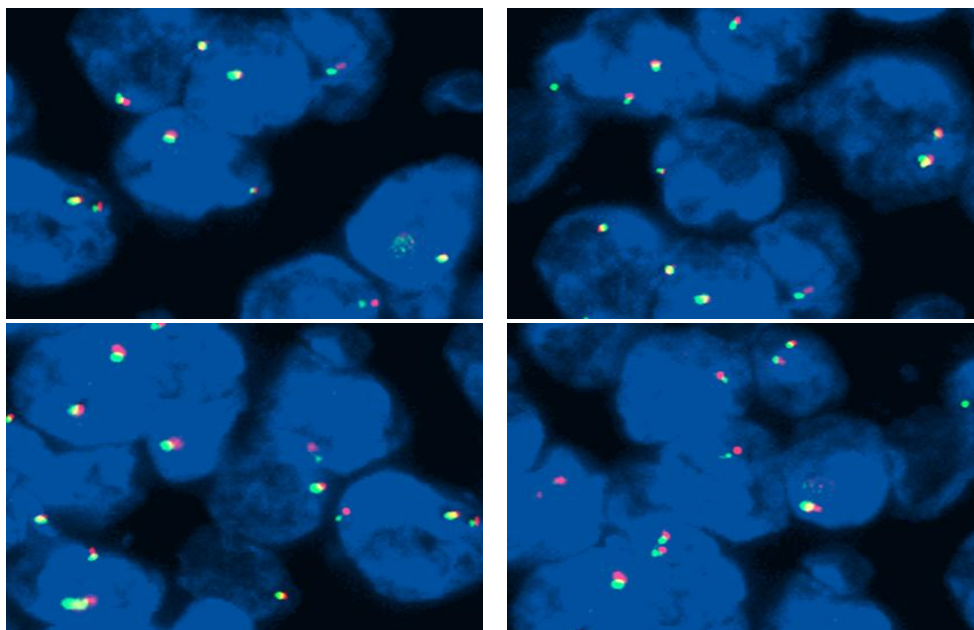


*Bcl2* негативних на *FISH* анализи било је 51,5% у групи са смртним исходом и 62,1% у групи живих испитаника, (слика бр. 8). Посматрано у односу на исход није уочена статистички значајна разлика у учесталости испитаника са *FISH Bcl2* позитивним налазом, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,403$ ), (табела бр.16). Тренд веће учесталости позитивног налаза овог параметра запажамо код испитаника са смртним исходом, (графикон бр. 34), слика позитивног налаза *Bcl2* на *FISH* приказан је на слици бр.7.



Графикон бр. 34. Учесталост *FISH/Bcl2* позитивности у групама различитог исхода

У испитиваној популацији *c-Myc* позитивност утврђена је у 14 болесника, односно у 42,4% испитаника са смртним исходом, док се позитиван налаз налази у 11 односно 37,9% живих испитаника. Слика позитивног налаза за *c-Myc* утврђен *FISH*-ом, међу оболелима приказан је на слици бр. 10.



Слика бр.9. Анализирани узорци оболелих од НХЛ ДБКЛ који су *FISH/ cMyc* негативни



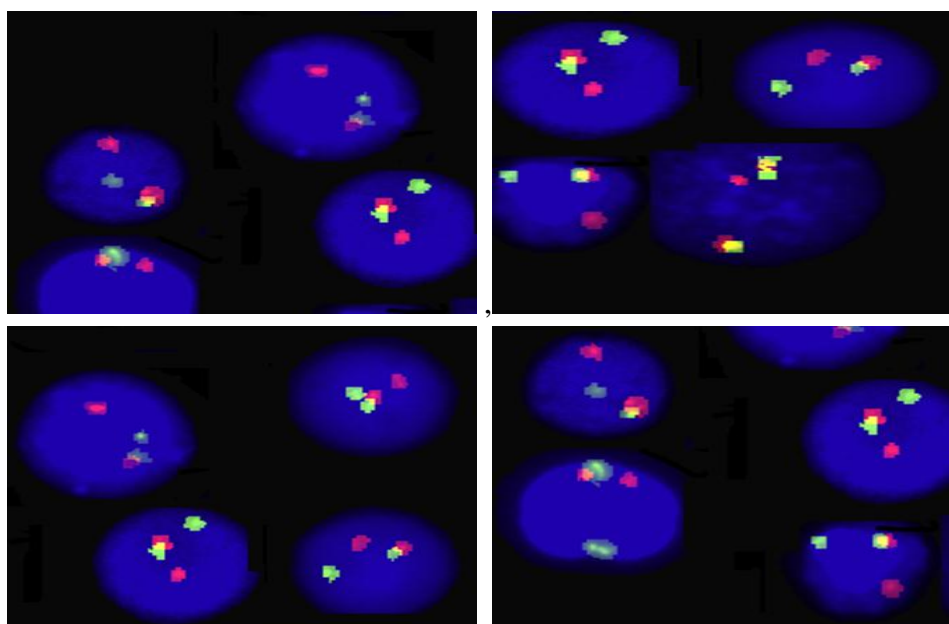
Између иситаника, са смртним исходом и живих, није уочена статистички значајна разлика ни са позитивним налазом *FISH cMyc*-а, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,719$ ), (табела бр.16).

Параметри ИИИ и FISH		Исход		Значајност
		Мртви	Живи	
<b>FISHbcl2</b> n (%)	Негативан	17 (51,5%)	18 (62,1%)	<sup>a</sup> p=0,403
	Позитиван	16 (48,5%)	11 (37,9%)	
<b>FISHmyc</b> n (%)	Негативан	19 (57,6%)	18 (62,1%)	<sup>a</sup> p=0,719
	Позитиван	14 (42,4%)	11 (37,9%)	
<b>Bcl2/ИИИ</b> n (%)	Негативан	12 (23,5%)	19 (50,0%)	<sup>a</sup> p=0,010*
	Позитиван	39(76,5%)	19 (50,0%)	
<b>Bcl6/ИИИ</b> n (%)	Негативан	31 (60,8%)	22 (59,5%)	<sup>a</sup> p=0,900
	Позитиван	20 (39,2%)	15 (40,5%)	
<b>Ki67 (X<math>\pm</math>SD (Med, min-max))</b>		30,75 $\pm$ 36,98 (0,80; 0,30-95,0)	31,92 $\pm$ 37,19 (0,96; 0,30-95,0)	<sup>b</sup> p=0,974
<b>Ki67</b> n (%)	<50%	32 (61,5%)	25 (65,8%)	<sup>a</sup> p=0,679
	>50%	20 (38,5%)	13 (34,2%)	

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup> $\chi^2$  2-тест; <sup>b</sup>Mann Whitney тест

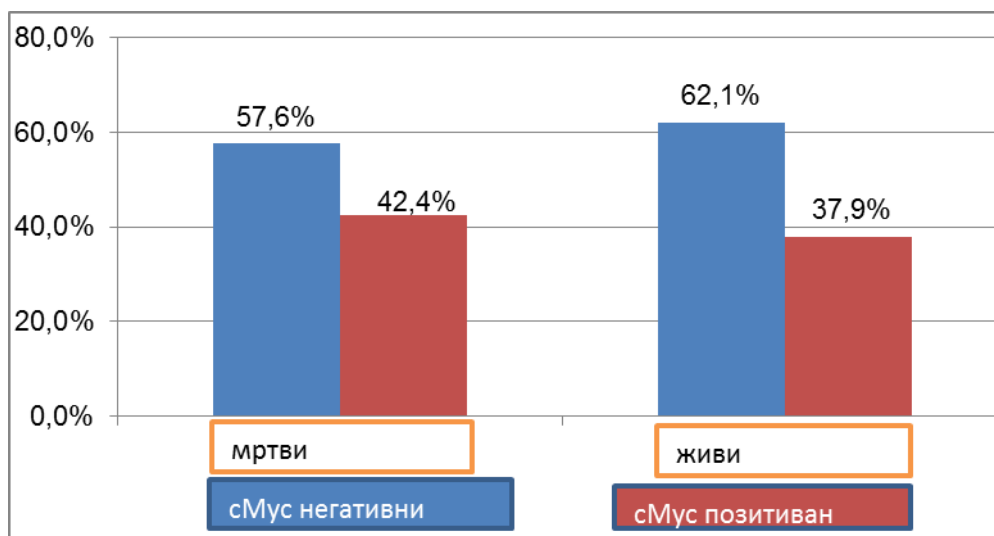
Табела бр.16. ИИИ и *FISH* анализа узоркованог ткива при постављању дијагнозе ДБКЛ

*FISH/cMyc* негативан налаз је утврђен у 19 узорака односно у 57,6% испитаника са леталним исходом, док је у групи живих испитаника било 18 односно 62,1% негативних за овај испитивани полиморфизам, (слика бр.9).



Слика бр.10. Анализирани узорци оболелих од НХЛ ДБКЛ који су *FISH/ cMyc* ПОЗИТИВНИ

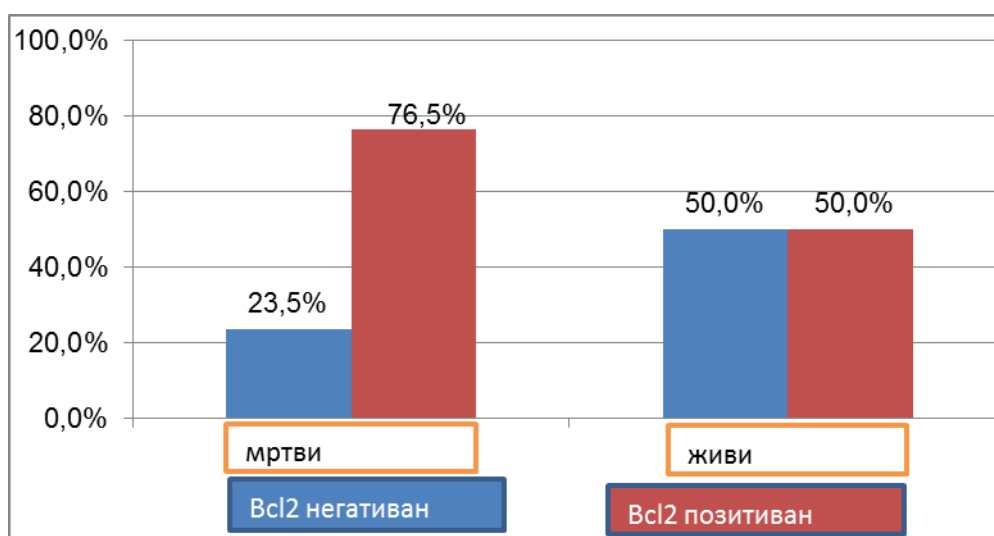
У обе анализиране групе испитаници са позитивним налазом овог параметра, били су приближно исто заступљени, (графикон бр. 35).



Графикон бр. 35. Учесталост *FISH/cMyc* позитивности у болесника са различитим исходом

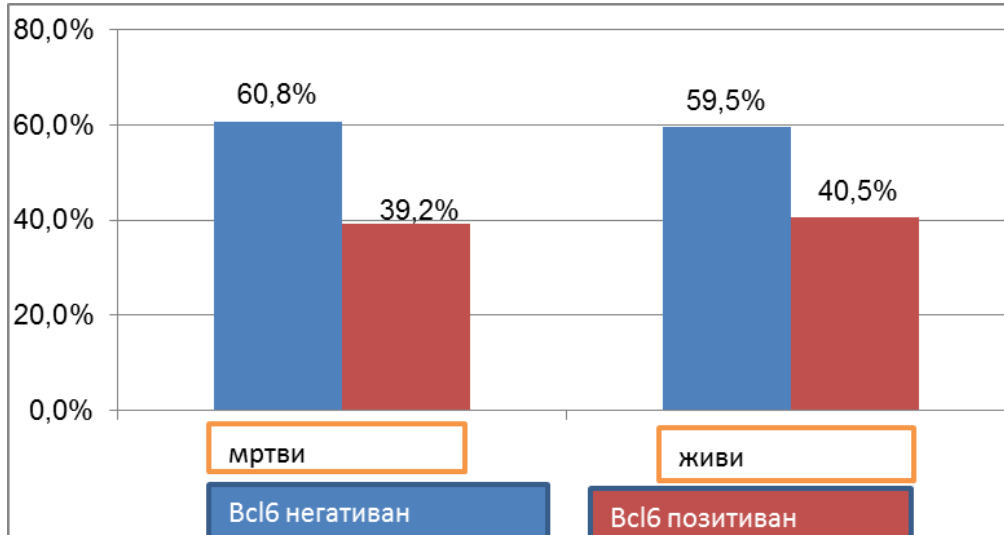
Имунохистохемијски анализирана *Bcl2* позитивност, утврђена је у 76,5% болесника са смртним исходом и у 50% живих испитаника. Међугрупна анализа показала је статистички значајно већу позитивност у болесника са лошим исходом, ( $\chi^2$ -тест,  $p=0,010$ ).

Испитаници са позитивним налазом *Bcl2/ИХХ*, статистички значајно више су били заступљени код испитаника са смртним исходом. Половина живих испитаника имала је позитиван налаз овог параметра и око три четвртине испитаника са смртним исходом, (графикон бр. 36).



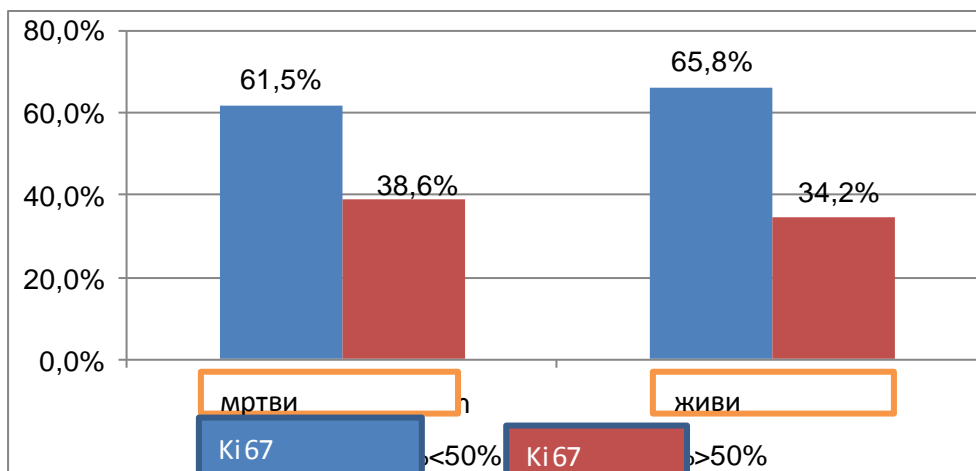
Графикон бр. 36. Учесталост *Bcl2* позитивности у болесника са различитим исходом анализирано ИХХ

Није уочена статистички значајна разлика у позитивном налазу *Vcl6/* ИХХ између испитаника са различитим исходом, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,900$ ), (табела бр.16). Испитаници са позитивним налазом били су приближно исто заступљени у групи умрлих и у групи живих испитаника и то са око 40%,( графикон бр.37).



Графикон бр. 37. Учесталост *Vcl6* позитивности у групама различитог исхода анализирано ИХХ

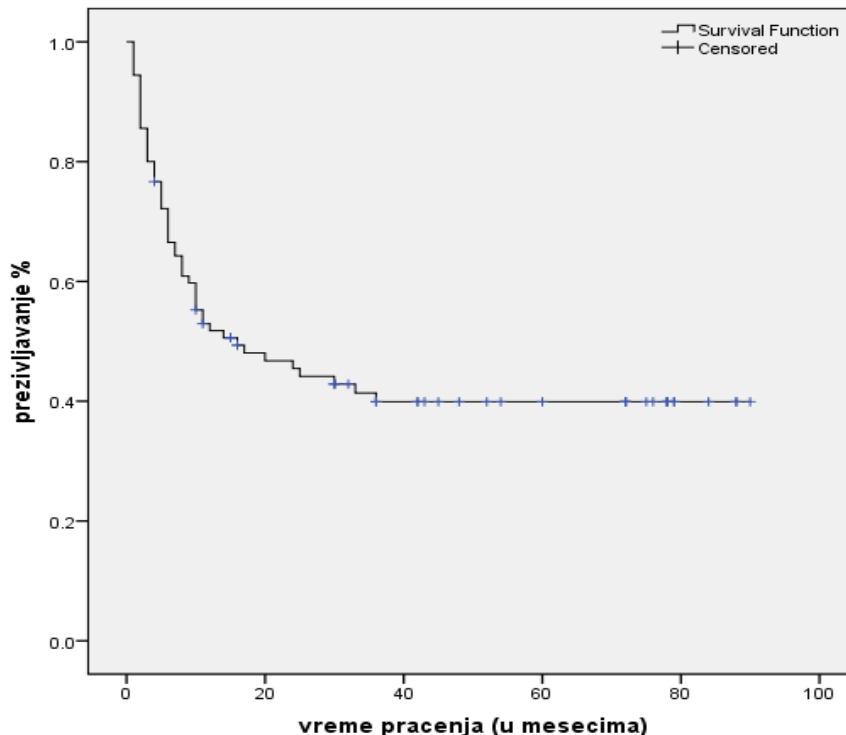
Посматрано у односу на исход, није уочена статистички значајна разлика у вредности *Ki-67*, (*Mann Whitney* тест,  $p=0,974$ ), као ни у учесталости испитаника са *Ki-67* мањим и већим од 50%, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,679$ ), (табела бр.16). И код живих и код испитаника са смртним исходом учесталост оболелих са *Ki-67* већим од 50% била је приближно иста. У групи живих 34,2% испитаника имало је вредност овог параметра преко 50%, а у групи умрлих њих 38,5%,( графикон бр.38).



Графикон бр. 38. Позитивност *Ki 67* узоркованог материјала у болесника различитог исхода

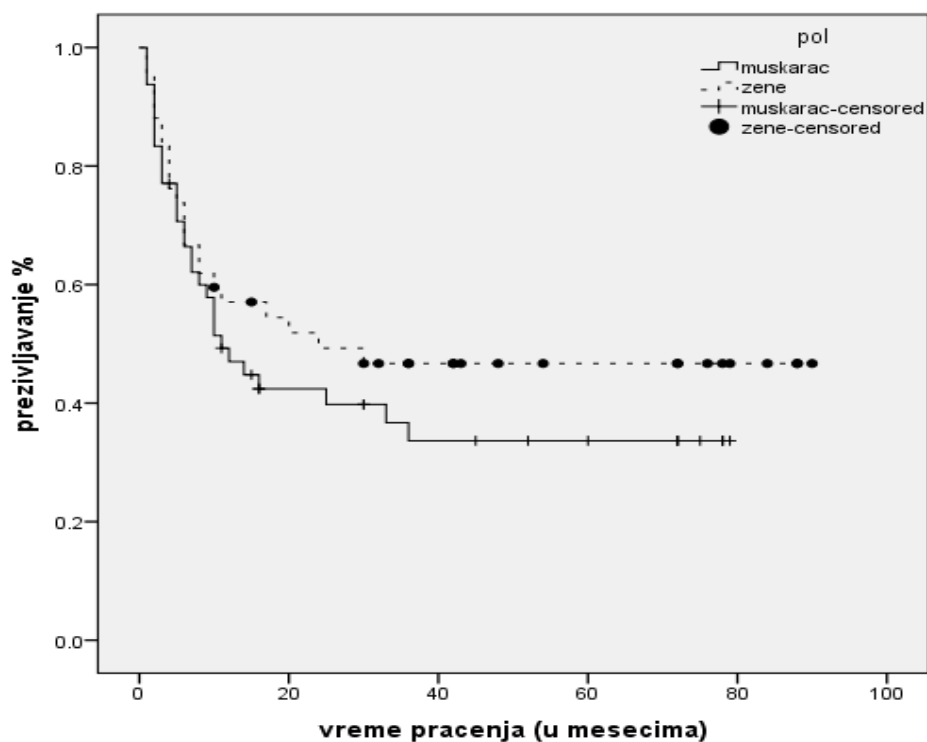
#### 4.4. Анализа преживљавања

Време праћења за посматрану групу испитаника износило је 90 месеци (7,5 година). Преживљавање на крају прве године износило је 51,8%, на крају друге 45,5%, на крају пете 39,9% и није се мењало до краја периода праћења, (графикон бр.39). Медијана преживљавања износила је 16 месеци (95% CI 1,88-30,12 месеци).



Графикон бр.39. Укупно преживљавање

Није уочена статистички значајна разлика у преживљавању испитаника различитог пола (*Log Rank* тест,  $p=0,303$ ), (графикон бр. 40). Једногодишње преживљавање код оболелих жена било је 73,8%, двогодишње 46,7% колико је остало до краја периода праћења који је износио 90 месеци. Преживљавање после годину дана за испитанике мушког пола било је 47%, после две године 42,4%, после три 33,6%, колико је остало до краја периода праћења који је за ову групу испитаника износио 79 месеци. Медијана преживљавања за мушкарце износила је 11 месеци а за жене 24 месеца.



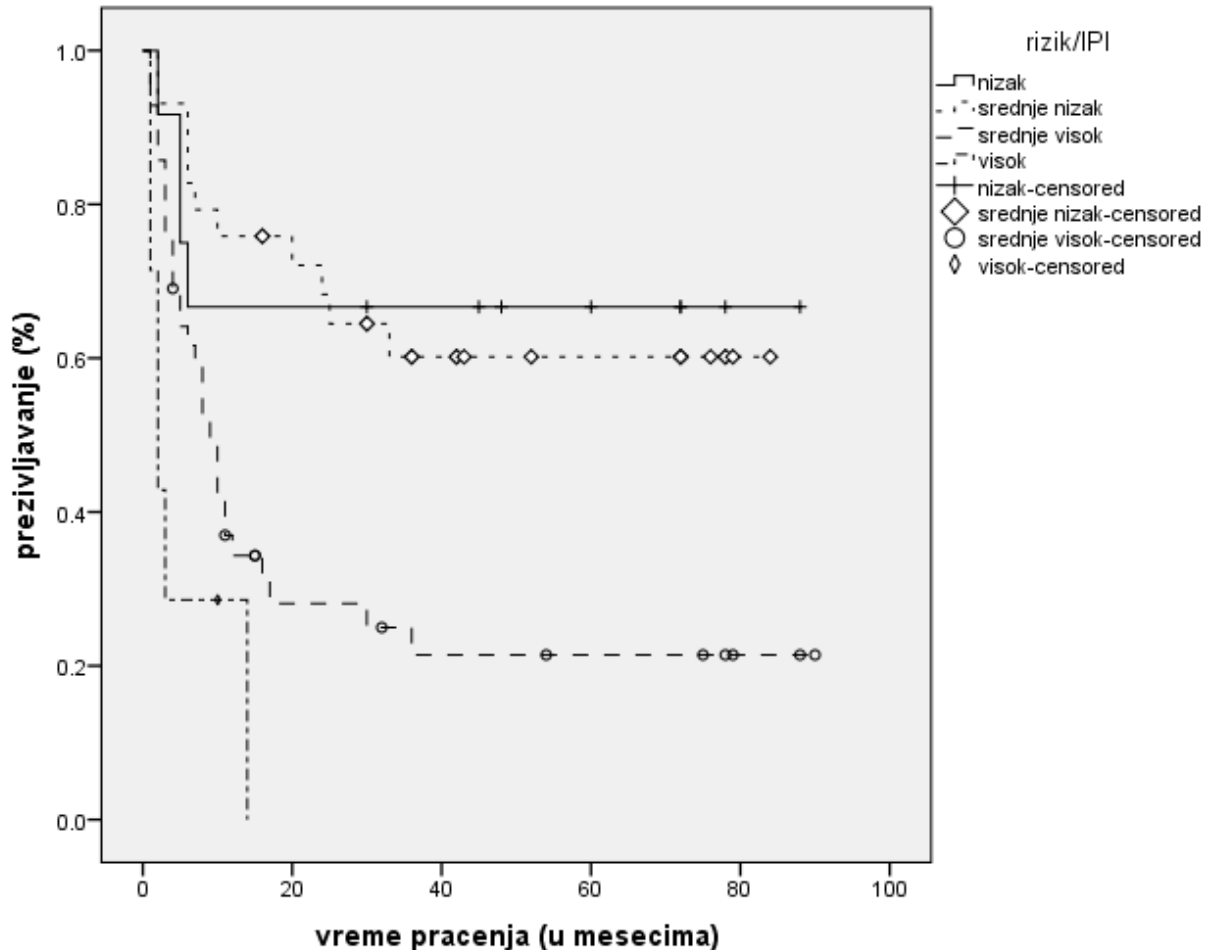
Графикон бр. 40. Преживљавање оболелих испитаника различитог пола

#### 4.4.1. Преживљавање у односу на ИПИ, перформанс статус болесника – ECOG и клинички стадијум

Преживљавање испитаника је анализирано *Log Rank* тестом. Преживљавање испитаника у односу на ИПИ ризик, статистички значајно се разликовало, ( $p=0,000$ ). Међугрупном анализом, статистички значајна разлика уочена је између испитаника са ниским и средње високим ризиком, ( $p=0,021$ ) и високим ризиком, ( $p=0,000$ ), између испитаника са средње ниским и ниским и испитаника са средње високим, ( $p=0,001$ ) и високим ( $p=0,000$ ) ризиком, док разлика у преживљавању између испитаника са средње ниским и ниским ризиком, ( $p=0,919$ ) и испитаника са средње високим и високим ризиком, ( $p=0,053$ ), није била статистички значајна.

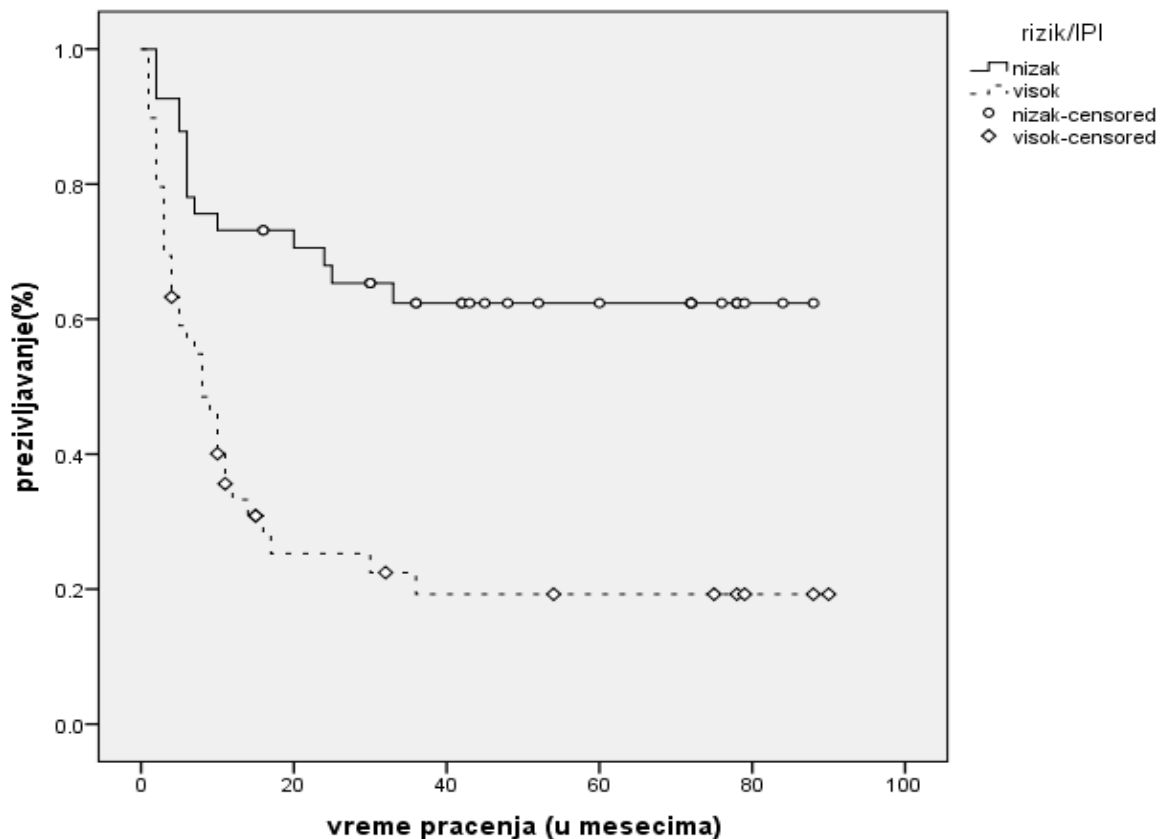
Једногодишње преживљавање испитаника са ниским ризиком било је 66,7% и тако је остало до краја периода праћења који је износио 88 месеци. Код испитаника са средње ниским ризиком, једногодишње преживљавање износило је 75,9%, двогодишње 68,3% петогодишње 60,2% и тако је износило до краја 84 месеца праћења. Код испитаника са средње високим ризиком, преживљавање после годину дана износило је

34,3%, после две године 28,1%, после пет година 21,4% и тако је остало до краја 90 месеци праћења. Једногодишње преживљавање за испитанике са високим ризиком било је 28,6%. Нико од испитаника са овим ризиком није живео дуже од 14 месеци, (графикон бр.41).



Графикон бр.41. Преживљавање оболелих од ДБКЛ у зависности од ИПИ ризика

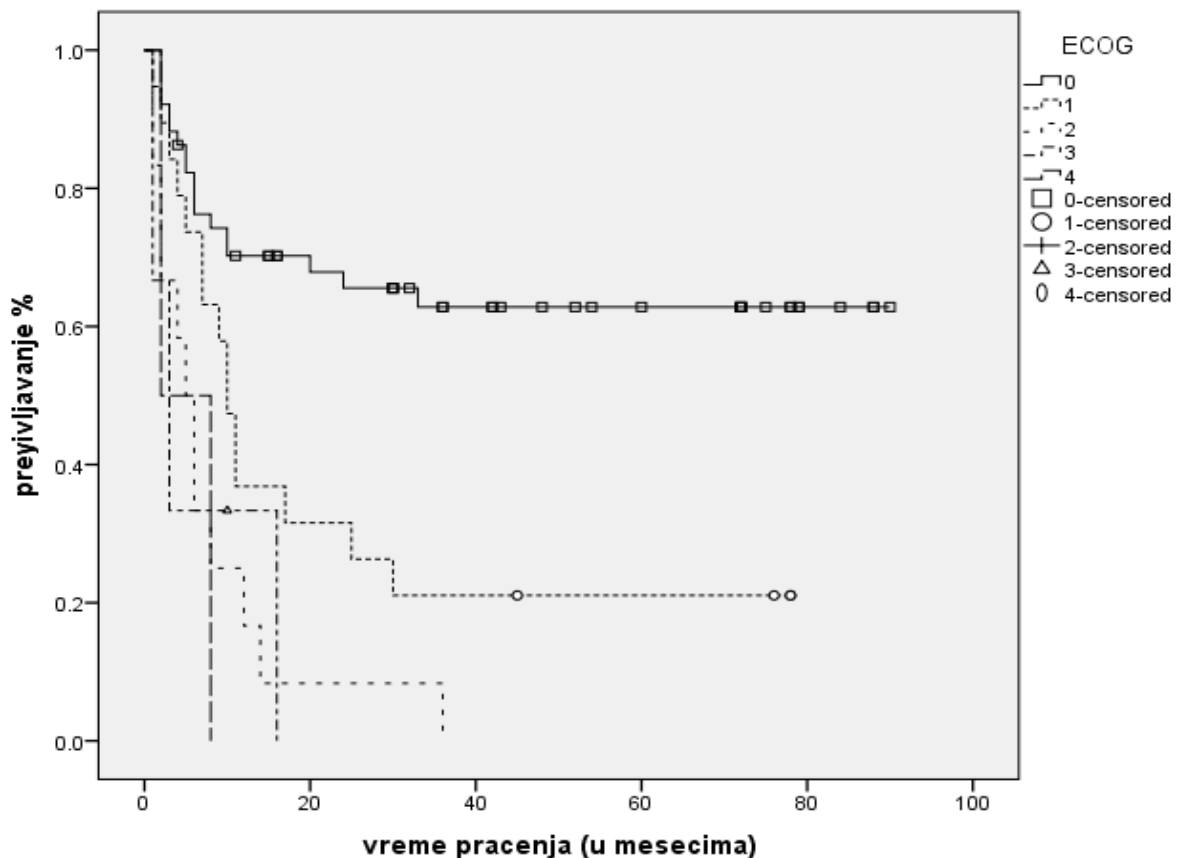
Прерасподелом испитаника у групе са ниским (низак и средње низак ризик) и високим ризиком (висок и средње висок ризик), уочена је статистички значајна разлика у преживљавању, ( $p=0,000$ ). Једногодишње преживљавање код испитаника са ниским ИПИ ризиком било је 73,2%, двогодишње 67,9%, петогодишње 62,5% колико је остало до краја периода праћења, који је за ову групу испитаника износио 88 месеци. Код испитаника са високим ИПИ ризиком преживљавање после годину дана било је 33,2%, после две године 25,3%, после три 19,2% и тако је било и на крају 90 месеци праћења, (графикон бр.42).



Графикон бр.42. Преживљавање болесника са високим и средње високим ИПИ у односу на преживљавање болесника са ниским и средње ниским ИПИ ризиком

Анализа преживљавања болесника у односу на перформанс статус учињена је *Log Rank* тестом. Уочен је статистички значајан утицај *ECOG* статуса на преживљавање испитаника ( $p=0,000$ ). Статистички најбоље преживљавање забележено је у групи испитаника са *ECOG* статусом 0, испитаници са овим статусом значајно дуже живе, и значајно су дуже живели у односу на испитанике са *ECOG* статусом 1 ( $p=0,003$ ), статусом 2 ( $p=0,000$ ), статусом 3 ( $p=0,000$ ) и статусом 4 ( $p=0,011$ ). Испитаници са *ECOG* статусом 1 имали су значајно различито преживљавање у односу на испитанике са *ECOG* статусом 2 ( $p=0,041$ ), док се нису статистички значајно разликовали од испитаника са *ECOG* статусом 3 ( $p=0,117$ ) и *ECOG* статусом 4 ( $p=0,092$ ). Између испитаника са *ECOG* статусом 2 и 3 није уочена статистички значајна разлика ( $p=0,959$ ), као ни између испитаника са *ECOG* статусом 2 и 4 ( $p=0,791$ ). Није уочена статистички значајна разлика ни између испитаника са *ECOG* статусом 3 и 4 ( $p=0,666$ ), (графикон бр 43). Испитаници са *ECOG* статусом 0, најдуже су праћени 90 месеци и у овој групи испитаника једногодишње преживљавање износило је 70,2%, двогодишње

65,5%, трогодшње 62,8% колико је било и на крају посматраног периода. Код испитаника са *ECOG* статусом 1, преживљавање после годину дана износило је 36,8%, после две године 31,6%, после три 21,1% колико је било и на крају периода праћења, који је за ову групу износио 78 месеци. У групи са *ECOG* статусом 2 преживљавање после годину дана износило је 16,7%, после две године 8,3%, док нико из ове групе испитаника није живео дуже од три године. Једногодишње преживљавање испитаника са *ECOG* статусом 3 било је 33,3%, а после 16 месеци 0%. Овај *ECOG* статус имало је шест испитаника и испитаник који је најдуже живео праћен је 16 месеци када је и егзитирао. *ECOG* статус 4 имало је два испитаника, један је испитаник умро после два месеца, а други после осам месеци, (графикон бр.43).



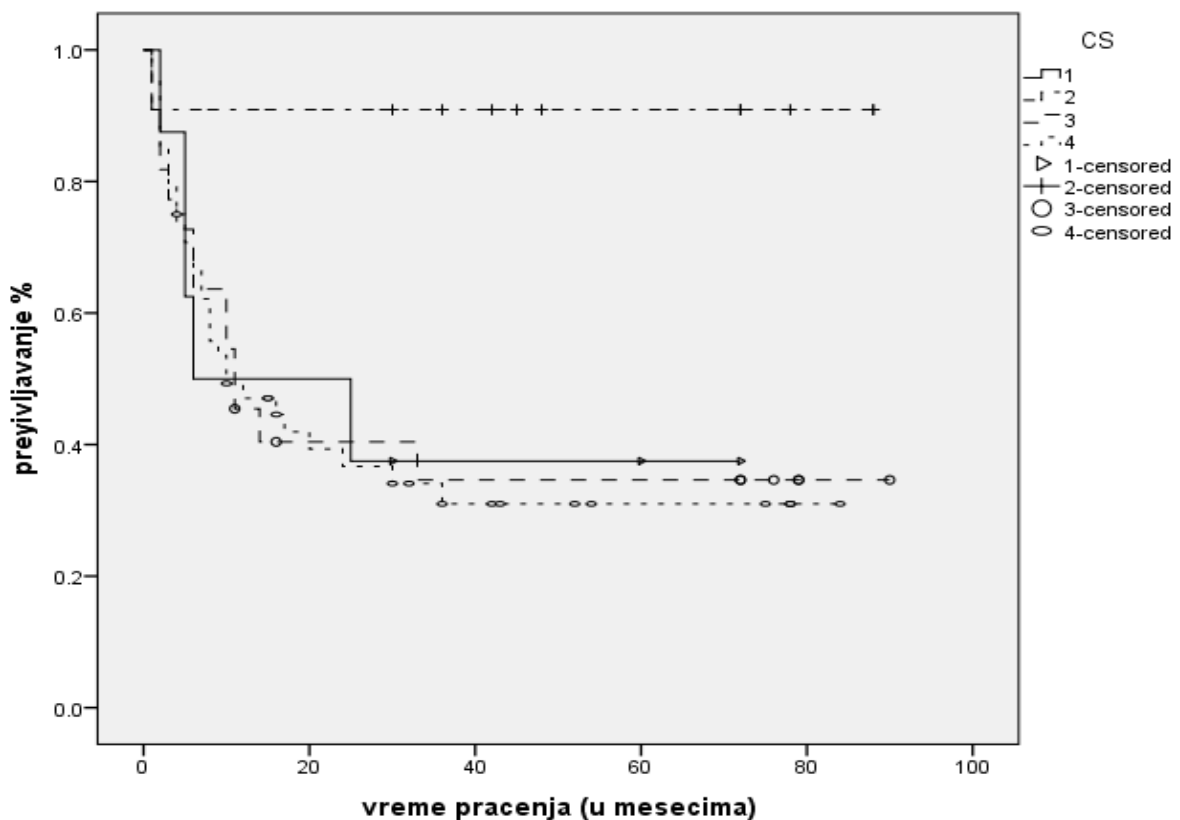
Графикон бр.43. Преживљавање болесника са различитим *ECOG* статусом у моменту постављања дијагнозе ДБКЛ

Статистичка анализа преживљавања болесника различитог клиничког стадијума учињена је *Log Rank* тестом. Између испитаника са различитим клиничким стадијумима уочена је статистички значајна разлика у преживљавању ( $p=0,030$ ). Анализом међугрупном, уочена је статистички значајна разлика између испитаника у



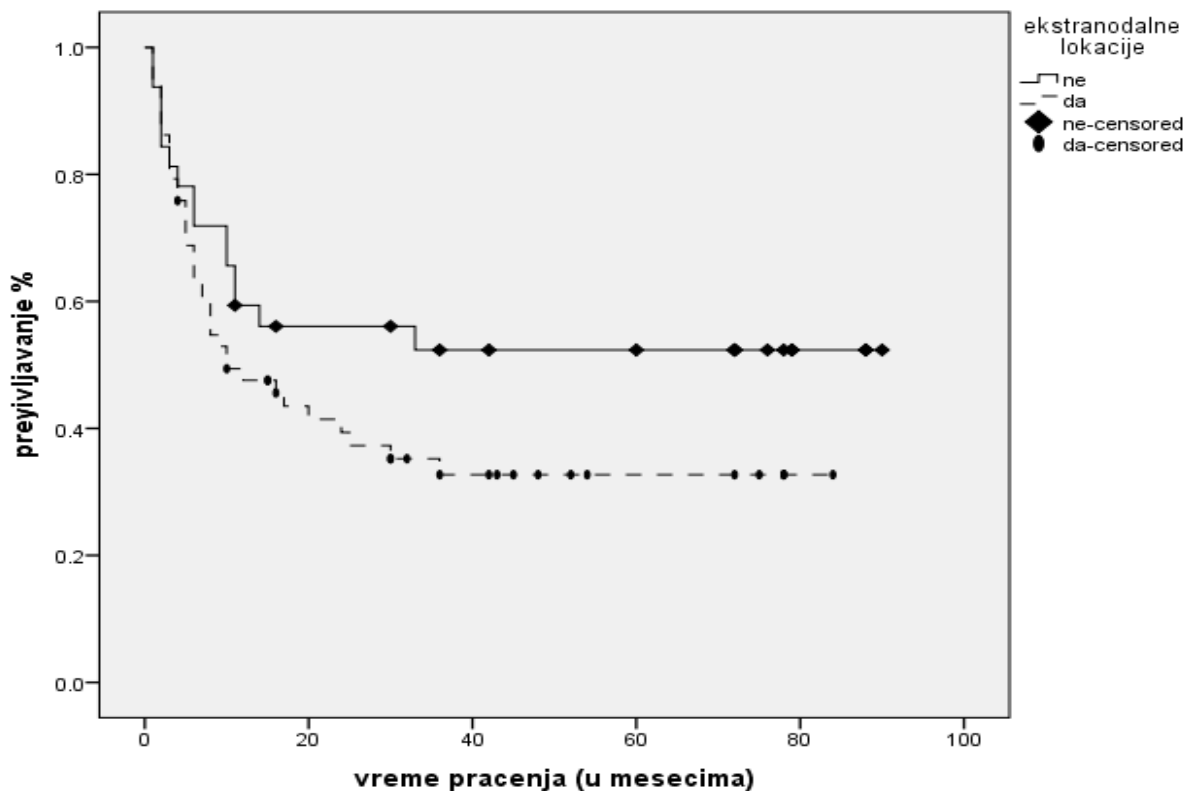
CS I (клинички стадијум први) и испитаника у CS II ( $p=0,022$ ), док између испитаника са CS I и CS III ( $p=0,948$ ) и CS IV ( $p=0,824$ ), разлика није била статистички значајна. Статистички значајна разлика уочена је и између испитаника са CS II и испитаника са CS III ( $p=0,007$ ) и CS IV ( $p=0,003$ ), док између испитаника са CS III и IV разлика није била значајна ( $p=0,889$ ).

Једногодишње преживљавање у групи са CS I било је 50% колико је било и двогодишње, док је трогодишње преживљавање износило 25% и није се мењало до краја периода праћења који је за ову групу износио шест година (72 месеца). Преживљавање после годину дана у групи испитаника са CS II било је 90,9% и није се мењало до краја периода праћења у трајању од 88 месеци. У групи испитаника са CS III једногодишње преживљавање износило је 45,5%, двогодишње 40,4%, трогодишње 34,6% колико је било и на крају периода праћења од 90 месеци. У групи са CS IV преживљавање после годину дана било је 47%, после две године 36,7%, после три 31% и није се мењало до краја периода праћења који је износио 88 месеци, (графикон бр. 44).



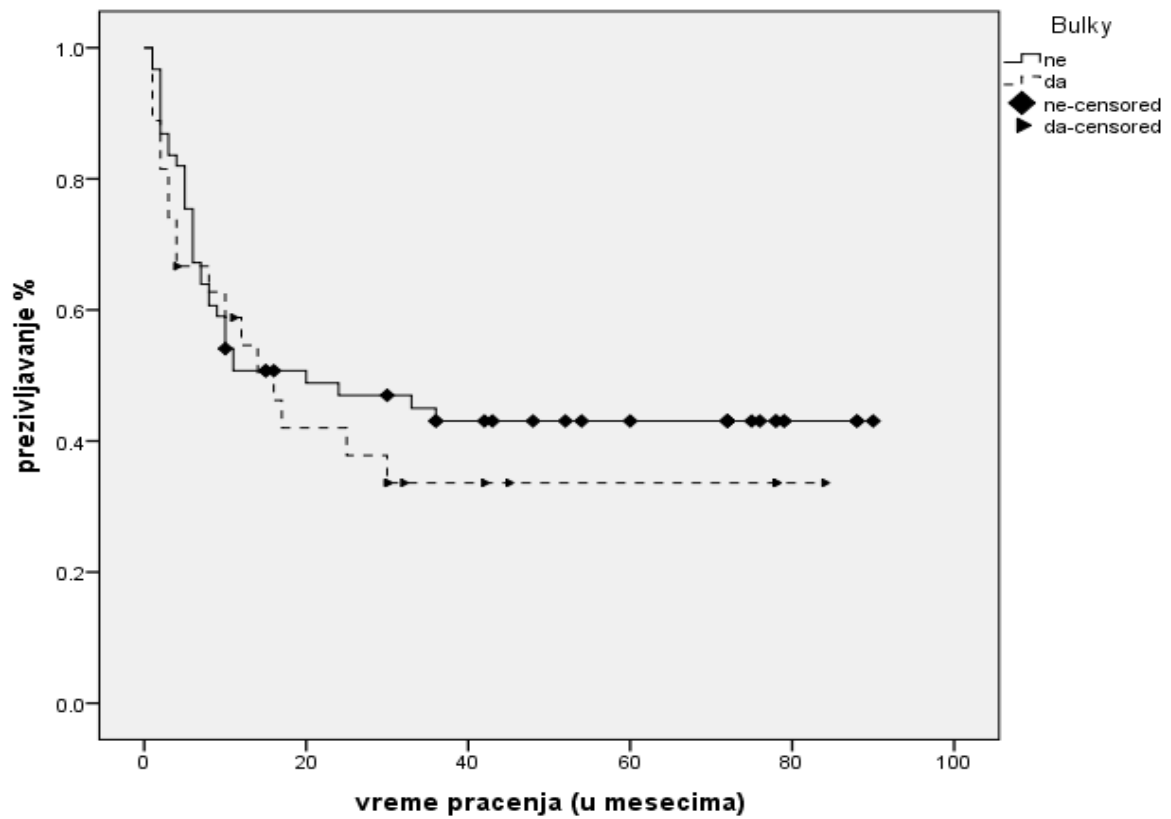
Графикон бр.44. Преживљавање болесника различитих клиничких стадијума ДБКЛ

Није уочен статистички значајно утицај присуства екстранодалних локализација болести на преживљавање испитаника (*Log Rank* тест,  $p=0,119$ ). Једногодишње преживљавање испитаника без екстранодалне локализације било је 59,4%, двогодишње 56,1%, трогодишње 52,3% колико је остало до краја периода праћења од 90 месеци. У групи са екстранодалном локализацијом болести, преживљавање после годину дана било је 47,6%, двогодишње 39,4%, трогодишње 32,7% колико је и остало до краја периода праћења који је за ову групу испитаника износио 84 месеца, (графикон бр.45).



Графикон бр. 45. Утицај екстранодалне локализације болести на преживљавање

Није нађена статистички значајна разлика у преживљавању испитаника са „*Bulky*“ формом болести и без ње (*Log Rank* тест,  $p=0,438$ ). У групи испитаника без „*Bulky*“ форме болести, преживљавање после годину дана износило је 50,7%, после две године 47%, после три 43% и није се мењало до краја деведесетомесечног периода праћења. Једногодишње преживљавање испитаника са „*Bulky*“ формом болести је било 54,6%, двогодишње 42%, трогодишње 33,6% колико је било и на крају периода праћења које је за ову групу испитаника износило 84 месеца, (графикон бр. 46).



Графикон бр. 46. Утицај „Bulky“ форме болести на преживљавање

#### 4.4.2. Преживљавање испитаника у односу на анализиранихе биохемијске параметре при дијагнози НХЛ ДБКЛ

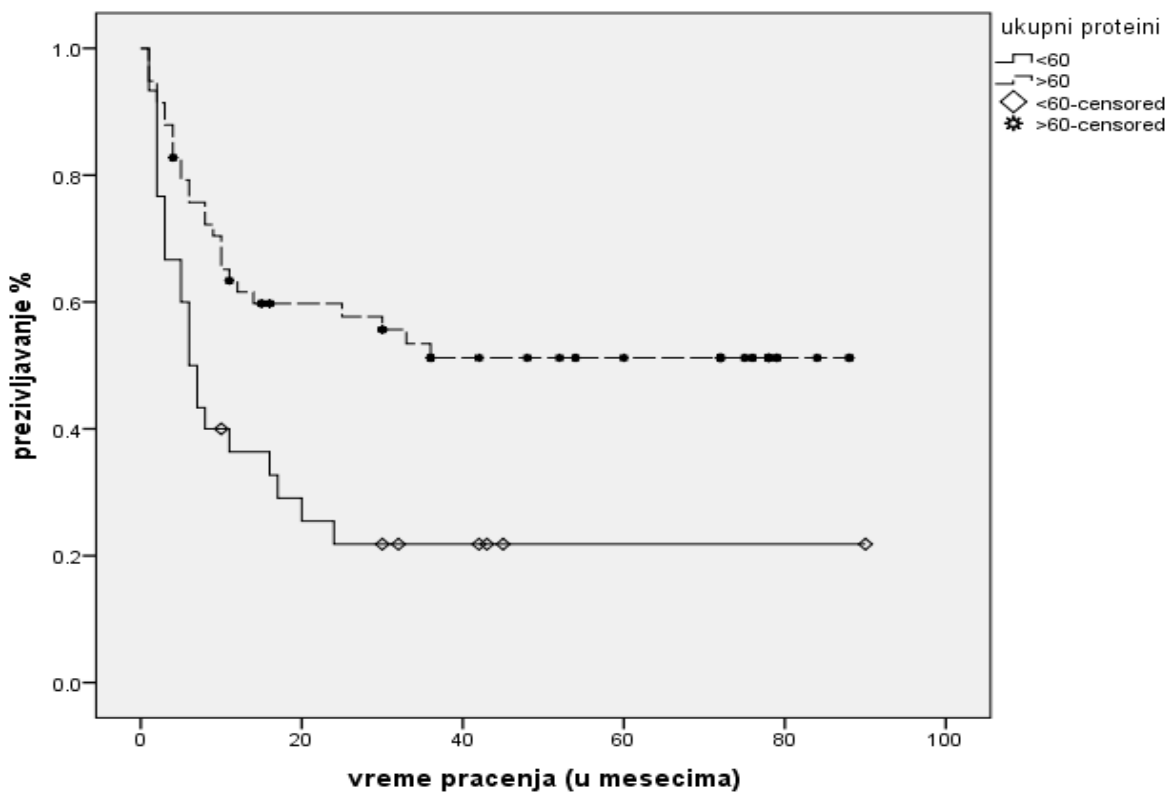
Уочена је статистички значајна разлика у преживљавању испитаника са вредностима укупних протеина мањим и већим од 60g/l, (*Log Rank* тест,  $p=0,002$ ), (табела бр.17).

Клиничка слика		Време праћења (у годинама)				Значајност
		Једна	Две	Три	На крају периода праћења	
Укупни протеини	<60	36,4%	21,8%	21,8%	21,8%	<sup>a</sup> p=0,002*
	>60	61,6%	59,8%	51,2%	51,2%	
Албумини	<30	35,8%	25,6%	25,6%	25,6%	<sup>a</sup> p=0,027*
	>30	58,6%	53,5%	45,9%	45,9%	
AST	<40	55,8%	49,8%	43,3%	43,3%	<sup>a</sup> p=0,262
	>40	38,1%	30,5%	30,5%	30,5%	
ALT	<40	55,0%	47,6%	41,2%	41,2%	<sup>a</sup> p=0,643
	>40	41,7%	41,7%	41,7%	41,7%	
Gama GT	<30	54,2%	49,8%	42,6%	42,6%	<sup>a</sup> p=0,108
	>30	43,2%	28,0%	22,4%	22,4%	
ALP	<100	51,7%	44,9%	37,3%	37,3%	<sup>a</sup> p=0,643
	>100	45,5%	34,1%	34,1%	34,1%	
Ацидум урикум	<400	61,3%	51,4%	44,9%	44,9%	<sup>a</sup> p=0,000*
	>400	10,5%	10,5%	5,3%	5,3%	
LDH	<400	70,3%	67,2%	57,4%	57,4%	<sup>a</sup> p=0,001*
	>400	38,5%	29,5%	27,3%	27,3%	

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>Log Rank тест

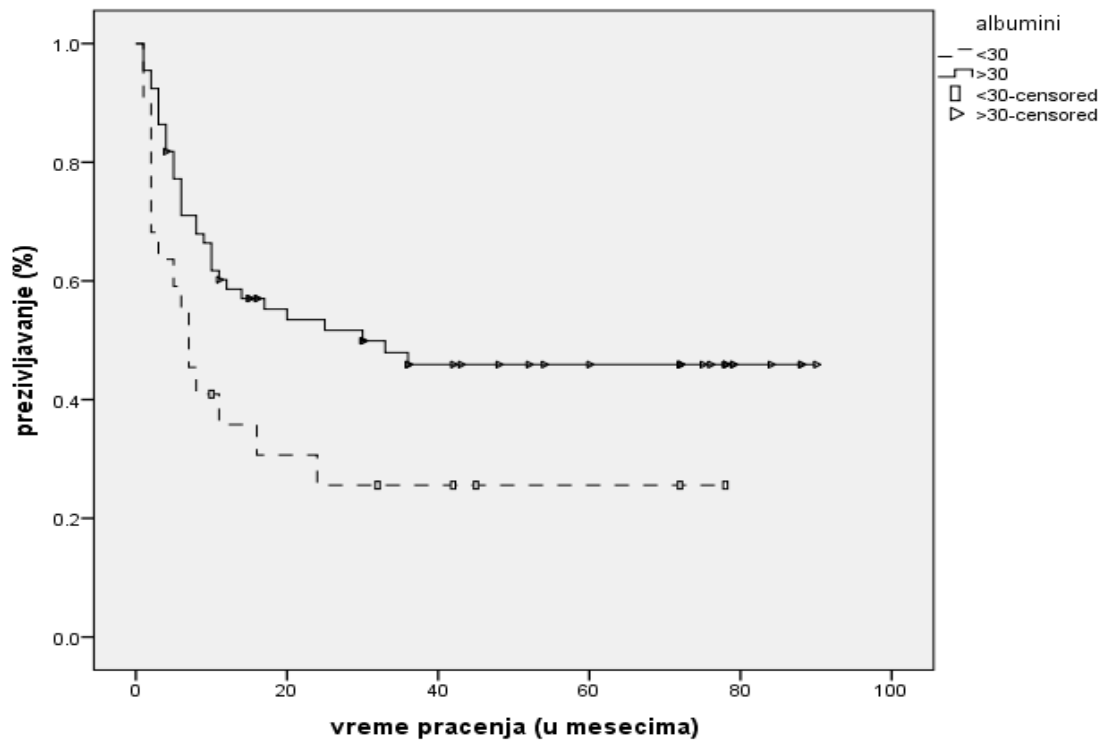
Табела бр. 17. Преживљавање болесника и биохемијски параметри

Преживљавање испитаника са вредностима укупних протеина мањим од 60g/l после годину дана износило је 36,4%, после две године 21,8% и није се мењало до краја периода праћења од 90 месеци. Једногодишње преживљавање испитаника са укупним протеинима већим од 60g/l износило је 61,6%, двогодишње 59,8%, трогодишње 51,2% и није се мењало у периоду до 88 месеци колико су најдуже праћени испитаници из ове групе, (графикон бр.47).



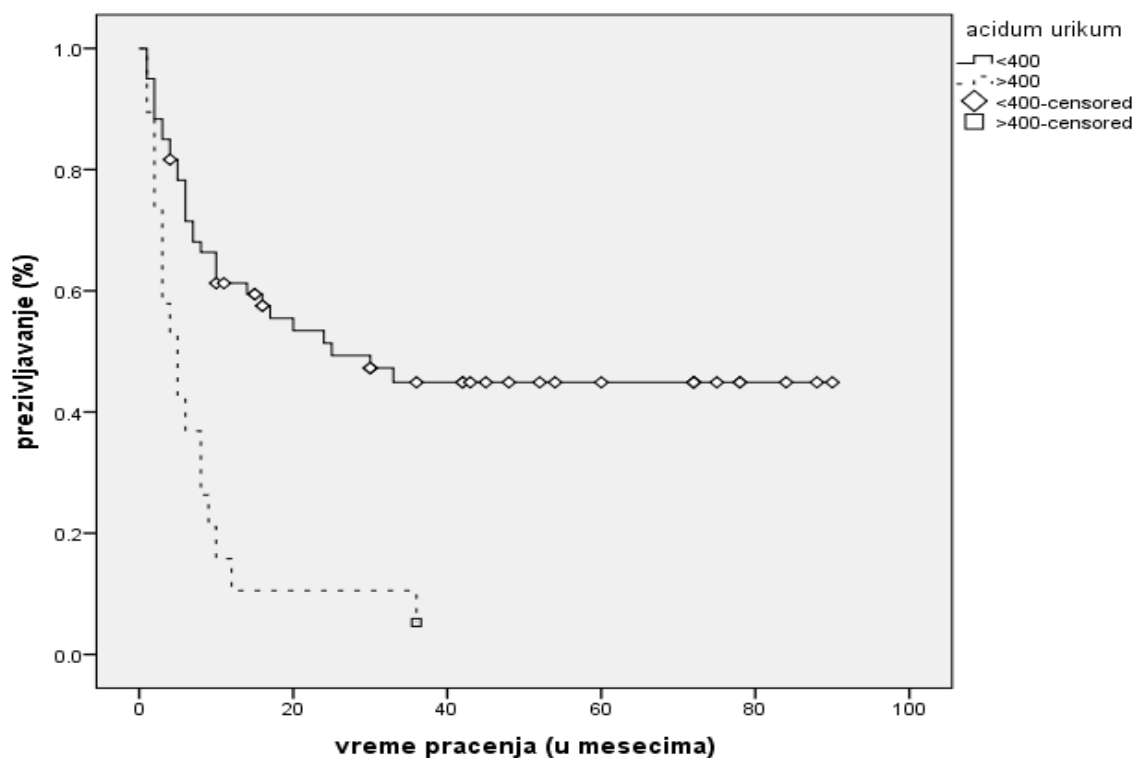
Графикон бр. 47. Утицај укупних протеина у серуму на преживљавање

Преживљавање испитаника са вредностима албумина мањим и већим од 30g/l, статистички значајно се разликовало, (*Log Rank* тест,  $p=0,027$ ), болесници са већим вредностима албумина су дуже живели, (табела бр.17). У групи оболелих са вредностима албумина мањим од 30g/l, једногодишње преживљавање износило је 35,8%, двогодишње 25,6% и није се мењало до краја периода праћења у трајању од 78 месеци. Код испитаника са албуминима већим од 30g/l, преживљавање после годину дана износило је 58,6%, после две године 53,5%, после три 45,9% и није се мењало у периоду до 90 месеци колико дуго су праћени оболели из ове групе, (графикон бр.48).



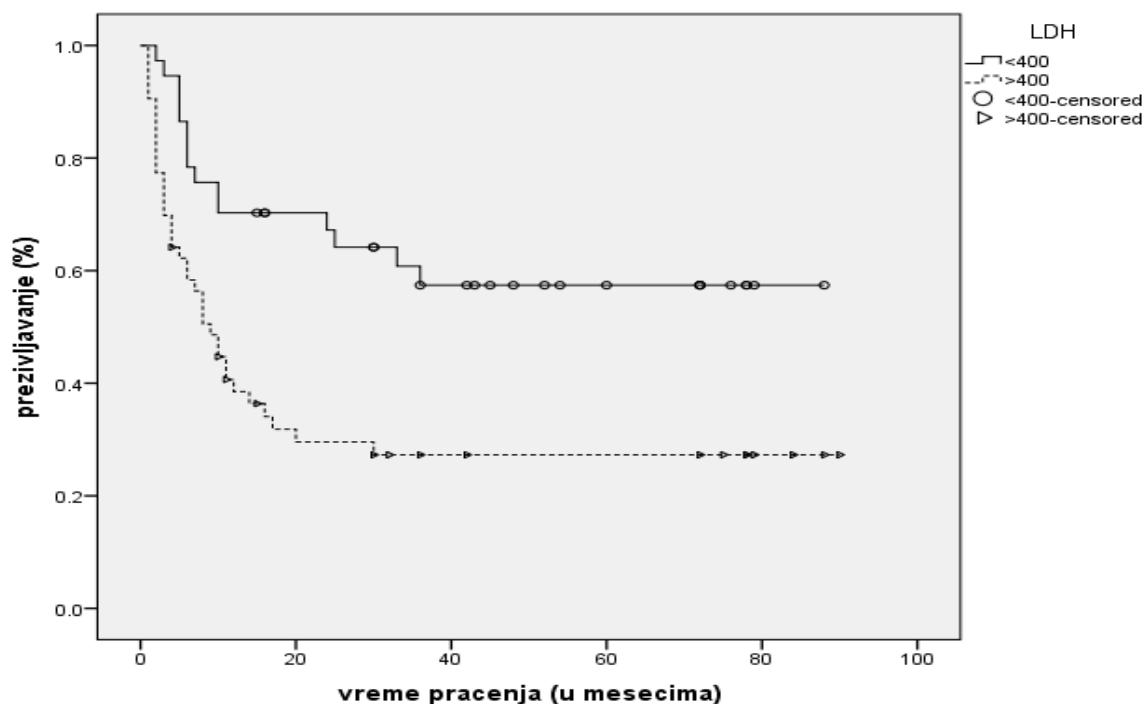
Графикон бр.48. Утицај вредности албумина на преживљавање

Вредности мокраћне киселине веће од 400  $\mu\text{mol/l}$  биле су статистички значајно лош прогностички фактор за преживљавање испитаника оболелих од дифузног крупноћелијског лимфома (*Log Rank* тест,  $p=0,000$ ), (табела бр.17). Преживљавање испитаника са вредностима овог параметра, мањим од 400  $\mu\text{mol/l}$ , после годину дана било је 61,3%, после две године 51,4%, после три године 44,9% и није се мењало до краја периода праћења од 90 месеци. Једногодишње преживљавање испитаника са вредностима мокраћне киселине преко 400 $\mu\text{mol/l}$ , било је 10,5%, колико је било и двогодишње, а трогодишње преживљавање у овој групи оболелих било је 5,3%. Најдуже време праћења у овој групи испитаника било је 36 месеци, (графикон бр. 49).



Графикон бр.49. Утицај вредности *Acidum uricum*-а на преживљавање

Статистички значајно краће преживљавање уочено је и код испитаника са вредностима LDH (лактат дехидрогеназа) већим од 400 U/l, (*Log Rank* тест,  $p=0,001$ ), (табела бр. 17). Једногодишње преживљавање испитаника са вредностима LDH мањим од 400 U/l било је до 70,3%, двогодишње 67,2%, трогодишње 57,4% колико је било и на крају периода праћења од 88 месеци. Преживљавање испитаника са вредностима LDH већим од 400 U/l, после годину дана износило је 38,5%, после две године 29,5%, после три године 27,3% и није се мењало до краја периода праћења од 90 месеци, (графикон бр.50).



Графикон бр. 50. Утицај LDH на преживљавање

Није уочена статистички значајна разлика у преживљавању испитаника са вредностима AST (*lat. Aspartat-aminotransferaza*) мањим и већим од 40 IU/l, (*Log Rank* тест,  $p=0,262$ ), (табела бр.17). Преживљавање испитаника са вредностима AST мањим од 40 IU/l, после годину дана износило је 55,8%, после две године 49,8%, после три 43,3% и на том нивоу је остало до краја периода праћења од 90 месеци. У групи оболелих са вредностима AST већим од 40 IU/l, једногодишње преживљавање износило је 38,1%, двогодишње 30,5%, и није се мењало до краја периода праћења од 84 месеца.

Између испитаника са вредностима ALT мањим и већим од 40 IU/l није уочена статистички значајна разлика (*Log Rank* тест,  $p=0,643$ ), (табела бр.17). Код испитаника са вредностима ALT мањим од 40 IU/l преживљавање после годину дана износило је 55%, после две године 47,6%, после три 41,2% и тако је било и после 90 месеци, колико су дуго испитаници праћени из ове групе. Једногодишње преживљавање испитаника са вредностима ALT већим од 40 IU/l износило је 41,7% и није се мењало до краја периода праћења од 78 месеци.

На преживљавање испитаника нису утицале ни вредности гама-GT, (*Log Rank* тест,  $p=0,108$ ), (табела бр.17). У групи оболелих са вредностима гама-GT мањим од 30 IU/l, једногодишње преживљавање износило је 54,2%, двогодишње 44,9%, трогодишње 37,3% и на том нивоу је остало до краја периода праћења од 88 месеци. Преживљавање



испитаника са вредностима гама-GT већим од 30 IU/l после годину дана износило је 43,2%, после две године 28%, после три 22,4% и није се мењало до краја периода праћења од 90 месеци.

Вредности ALP нису статистички значајно утицале на преживљавање посматраних испитаника, (*Log Rank* тест,  $p=0,643$ ), (табела бр. 17). Једногодишње преживљавање испитаника са вредностима ALP мањим од 100 U/l било је 51,7%, двогодишње 44,9%, трогодишње 37,3% колико је било и на крају деведесетомесечног периода праћења. У групи са вредностима ALP већим од 100 U/l, преживљавање после годину дана износило је 45,5%, после две године 34,1% и није се мењало до краја периода праћења од 84 месеца.

#### 4.4.3. Анализа повезаности генског полиморфизма, ИПИ ризика и преживљавања у испитаника са НХЛ ДБКЛ

Није уочена статистички значајна разлика у генском полиморфизму *FISH Bcl2*, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,492$ ) и *FISH cMyc*, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,426$ ) у односу на ИПИ ризик, (табела бр.18).

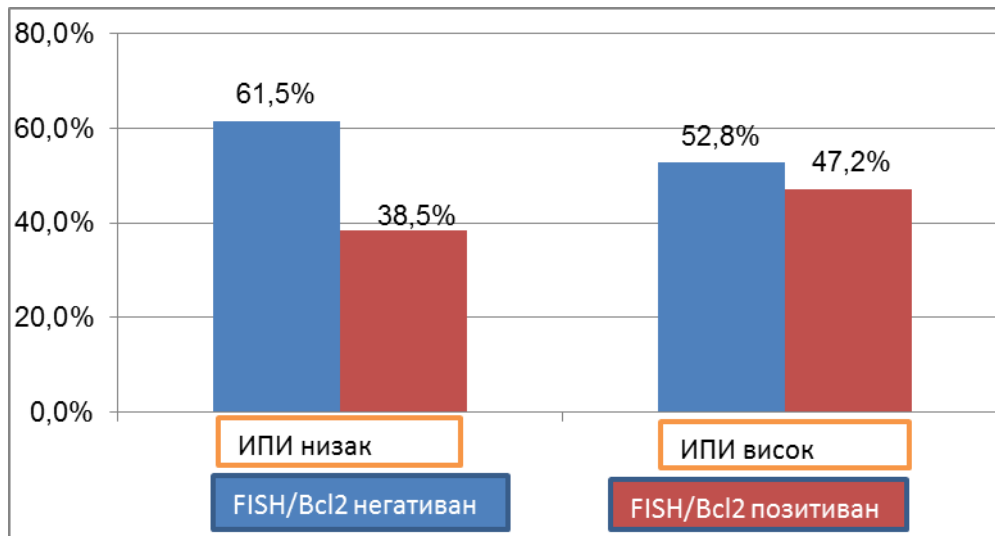
Генски полиморфизам		ИПИ ризик		Значајност
		Низак	Висок	
<b>FISHbcl2</b> n (%)	Негативан	16 (61,5%)	19 (52,8%)	<sup>a</sup> $p=0,492$
	Позитиван	10 (38,5%)	17 (47,2%)	
<b>FISHmyc</b> n (%)	Негативан	14 (53,8%)	23 (63,9%)	<sup>a</sup> $p=0,426$
	Позитиван	12 (46,2%)	13 (36,1%)	
	Оба позитивна	6 (23,1%)	7 (19,4%)	
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b> n (%)	Бар један позитиван	10 (38,5%)	13 (36,1%)	<sup>a</sup> $p=0,884$
	Оба негативна	10 (38,5%)	16 (44,4%)	

статистички значајна разлика; <sup>a</sup> $\chi^2$  2-тест;

Табела бр.18. Генски полиморфизам утврђен *FISH*-ом у болесника различитог ИПИ ризика

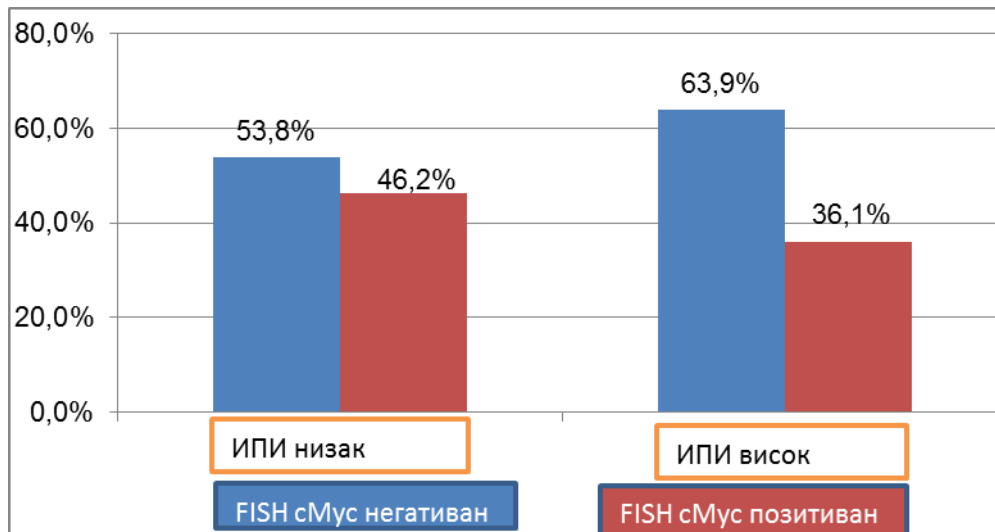
И у групи испитаника са високим и у групи испитаника са ниским ризиком нешто мање од половине испитаника имало је позитиван налаз и за *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*. Код

*FISH Bcl2* полиморфизма запажамо нешто већу учесталост испитаника са позитивним налазом за овај ген у групи болесника са високим ИПИ ризиком, (графикон бр. 51).



Графикон бр. 51. Учесталост *FISH/Bcl2* у болесника са ИПИ високим vs ниским ИПИ ризиком

Испитаници са позитивним налазом за *FISH cMyc* у нешто већем броју били су заступљени у групи са нижим ИПИ ризиком, (графикон бр.52).



Графикон бр. 52. Учесталост *FISH/cMyc* у болесника са ниским vs високим ИПИ ризиком

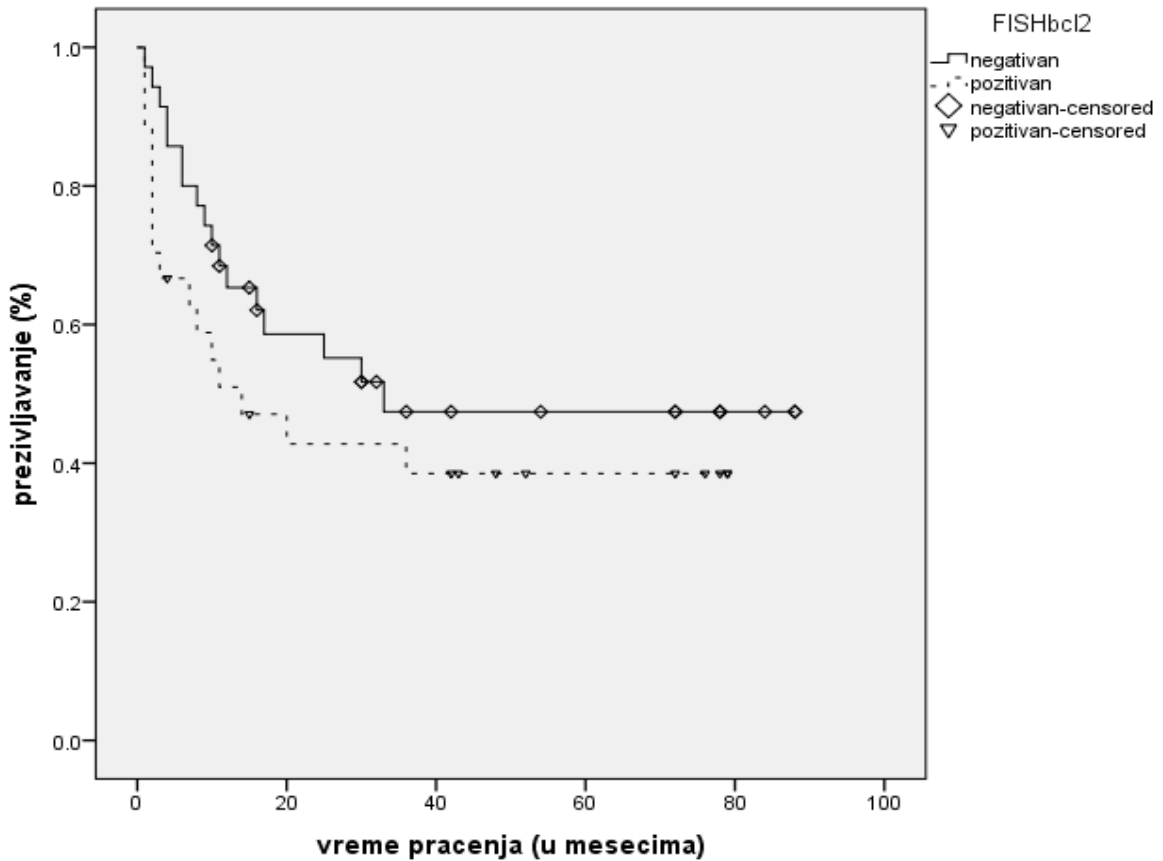
Није уочена статистички значајна разлика у преживљавању испитаника са *FISH Bcl2* позитивним и *FISH Bcl2* негативним налазом, (*Log Rank* тест,  $p=0,260$ ), (табела бр. 19). *FISH Bcl2* позитивних испитаника било је 27% односно 30%.

<i>FISH</i> и <i>IHH</i>		Време праћења (у годинама)				Значајност
		Једна	Две	Три	На крају периода праћења	
<b>FISHbcl2</b> n (%)	Негативан	65,3%	58,6%	47,4%	47,4%	<sup>a</sup> p=0,260
	Позитиван	51,0%	42,8%	38,5%	38,5%	
<b>FISHmyc</b> n (%)	Негативан	58,5%	51,4%	44,0%	44,0%	<sup>a</sup> p=0,900
	Позитиван	60,0%	52,0%	42,5%	42,5%	
<b>FISHbcl2+</b> <b>FISH myc</b> n (%)	Оба +	53,8%	38,5%	30,8%	30,8%	<sup>a</sup> p=0,431
	Бар један +	56,7%	56,7%	51,5%	51,5%	
	Оба -	64,9%	53,6%	41,7%	41,7%	
<b>Bcl2/IHH</b> n (%)	Негативан	67,6%	60,8%	60,8%	60,8%	<sup>a</sup> p=0,011*
	Позитиван	44,0%	37,7%	28,2%	28,2%	
<b>Bcl6/IHH</b> n (%)	Негативан	58,4%	48,3%	40,1%	40,1%	<sup>a</sup> p=0,610
	Позитиван	41,5%	41,5%	41,5%	41,5%	
<b>Ki67</b> n (%)	<50%	53,6%	49,5%	40,8%	40,8%	<sup>a</sup> p=0,524
	>50%	48,5%	38,7%	38,7%	38,7%	

Табела бр. 19. Анализа преживљавања болесника у односу на генски полиморфизам и пролиферативни индекс

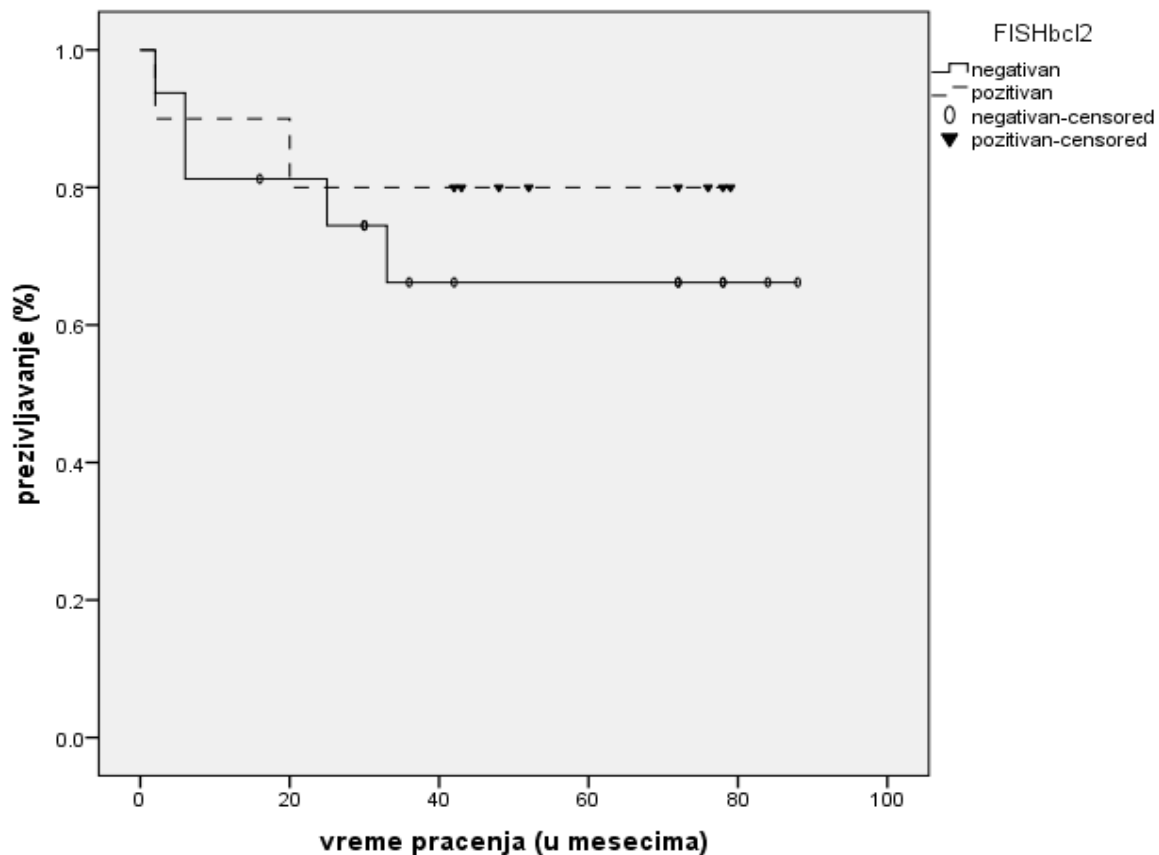
Једногодишње преживљавање испитаника са негативним *FISH Bcl2* било је 65,3%, двогодишње 58,6%, трогодишње 47,4% и није се мењало до краја осамдесетомесечног периода праћења. Медијана преживљавања за *FISH Bcl2* негативне испитанике износила је 33 месеца.

У групи оболелих са позитивним налазом *FISH Bcl2*, преживљавање после годину дана било је 51%, после две године 42,8%, после три 38,5% и тако је остало до краја седамдесет девето месечног периода праћења, (графикон бр.53). Код испитаника са *FISH Bcl2* позитивним налазом медијана преживљавања износила је 14 месеци (95% CI 3,62-46,38).



Графикон бр. 53. Утицај *FISH Bcl2* полиморфизма на преживљавање

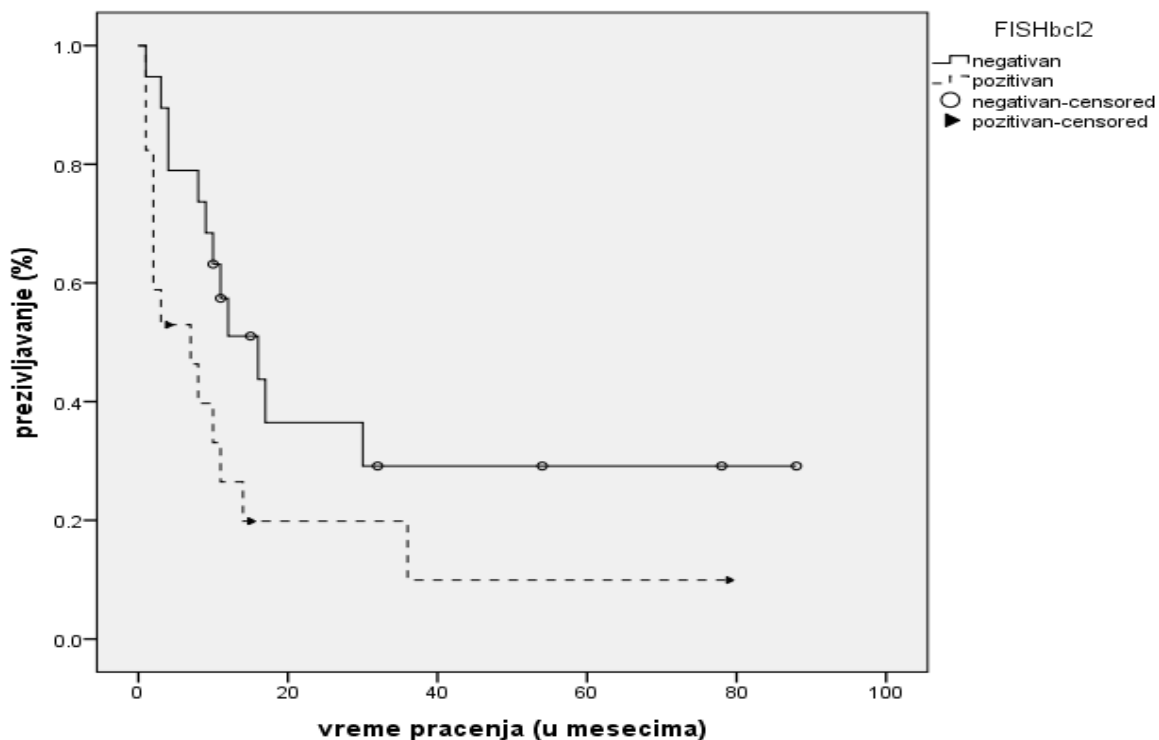
Анализом преживљавања испитаника са различитим налазом *FISH Bcl2* у односу на ИПИ висок и низак, није утврђена статистички значајна разлика ни у групи са ниским (*Log Rank* тест,  $p=0,522$ ), нити у групи са високим ИПИ ризиком (*Log Rank* тест,  $p=0,051$ ). У групи са ниским ИПИ ризиком, преживљавање испитаника са позитивним *FISH Bcl2*, после годину дана било је 90%, после две године 80% и није се мењало до краја периода праћења од седамдесет девет месеци. Једногодишње преживљавање испитаника са негативним налазом *FISH Bcl2* и ниским ИПИ ризиком било је 81,3% колико је било и двогодишње, а трогодишње преживљавање 66,2% и није се мењало до краја периода праћења од 88 месеци, (графикон бр.54).



Графикон бр. 54. Утицај резултата *FISH* анализе *Bcl2* на преживљавање код ниског ИПИ ризика

У подгрупи испитаника са високим ИПИ ризиком и *FISH Bcl2* негативним налазом, преживљавање после годину дана било је 51%, после две године 36,5%, после три године 29,2% и није се мењало до краја периода праћења од осамдесет осам месеци.

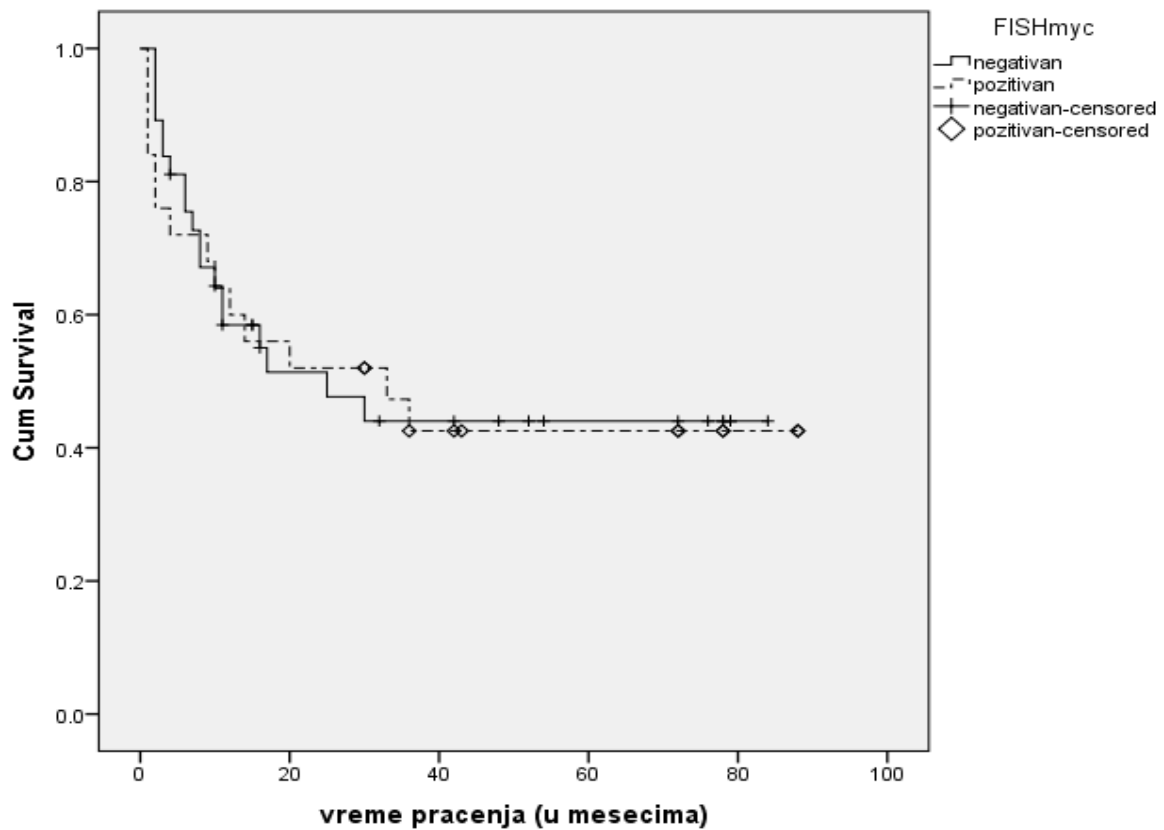
Једногодишње преживљавање оболелих са високим ИПИ ризиком и позитивним налазом *FISH Bcl2* било је 26,5%, двогодишње 19,9%, трогодишње 9,9% и није се мењало до краја седамдесет деветомесечног периода праћења, (графикон бр. 55).



Графиконбр. 55. Утицај резултата *FISH* анализе *Bcl2* на преживљавање код високог ИПИИ ризика

Статистички значајна разлика у преживљавању ових болесника, није уочена ни у односу на *FISH cMyc* налаз (*Log Rank* тест,  $p=0,900$ ), (табела бр.19). Позитивних *FISH cMyc* испитаника било је 25, односно 27,8%. Једногодишње преживљавање испитаника са негативним налазом било је 58,5%, двогодишње 51,4%, трогодишње 44% колико је било и после 84 месеца праћења. Медијана преживљавања за ову групу испитаника била је 25 месеци (95% CI 3,15-46,85).

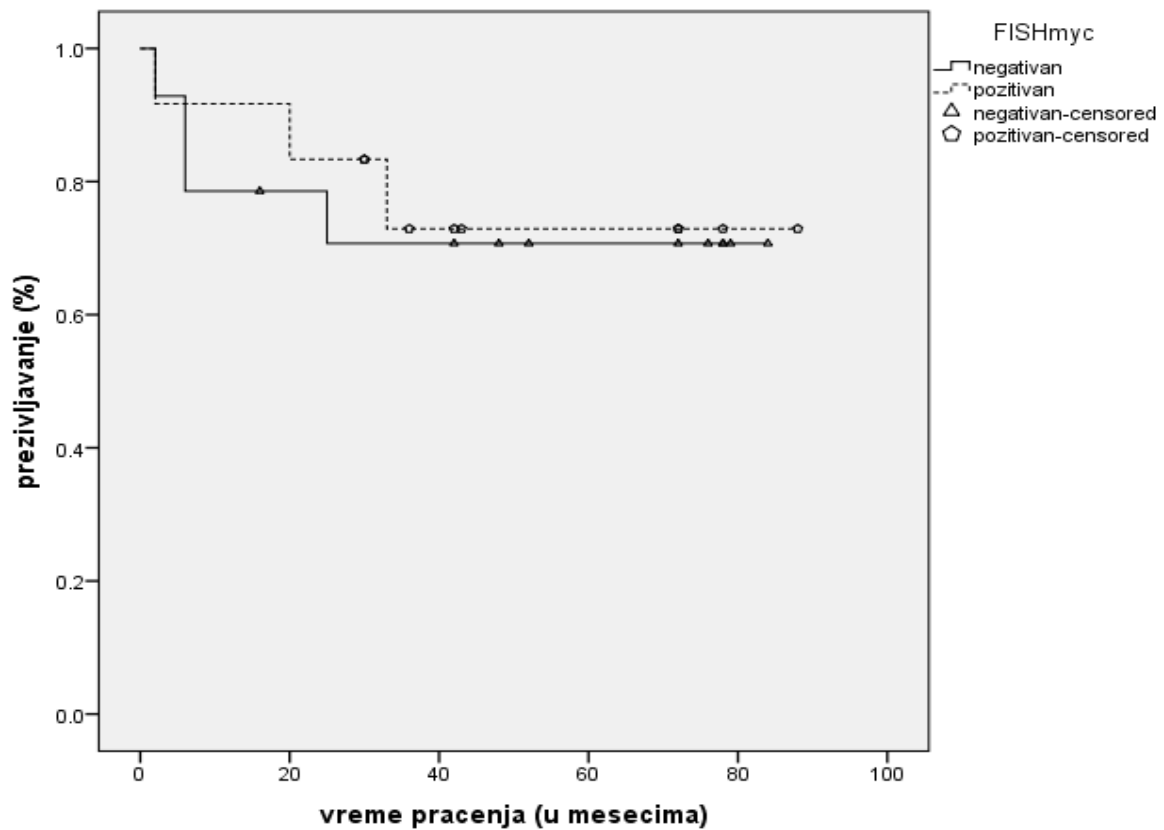
У групи са позитивним *FISH cMyc* налазом, преживљавање после годину дана било је 60%, после две године 52%, после три 42,5% колико је било и после 88 месеци праћења, (графикон бр.56). У групи *FISH cMyc* позитивних медијана преживљавања износила је 33 месеца (95% CI 0,50-65,50).



Графикон бр. 56. Утицај резултата *FISH* анализе *cMyc* на преживљавање

Посматрано у односу на ИПИ ризик и налаз *FISH cMyc*-а, статистички значајне разлике у преживљавању између оболелих, са позитивним и негативним налазом за овај ген није уочена ни у групи са ниским (*Log Rank* тест,  $p=0,798$ ), ни у групи са високим ИПИ ризиком (*Log Rank* тест,  $p=0,336$ ). Једногодишње и двогодишње преживљавање испитаника са ниским ИПИ ризиком и негативним *FISH cMyc* налазом било је 78,6%, трогодишње је износило 70,7% и није се мењало до краја 84 месеца праћења.

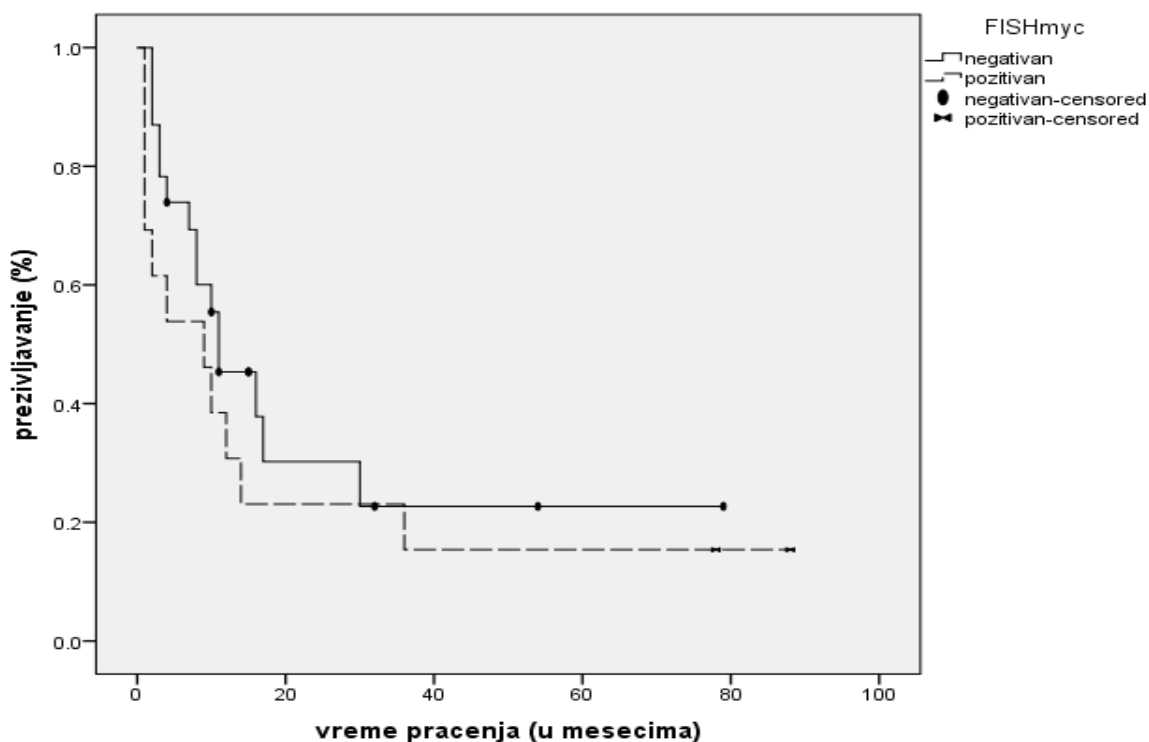
У групи оболелих са ниским ИПИ ризиком и позитивним *FISH c-Myc* налазом преживљавање после годину дана било је 91,7%, после две године 83,3%, после три 72,9% и толико је било и на крају осамдесет осмо месечног периода праћења, (графикон бр. 57).



Графикон бр.57. Утицај резултата *FISH cMyc* на преживљавање код ниског ИПИ ризика

Код испитаника са високим ИПИ ризиком и негативним налазом на *FISH cMyc*, преживљавање после годину дана износило је 45,4%, после две године 30,2%, после три године 22,7% а толико је било и после 79 месеци праћења. Једногодишње преживљавање испитаника са високим ИПИ ризиком и позитивним налазом на *FISH cMyc* било је 30,89%, двогодишње 23,1%, трогодишње 15,4% и толико је било после 88 месеци праћења, (графикон бр.58).

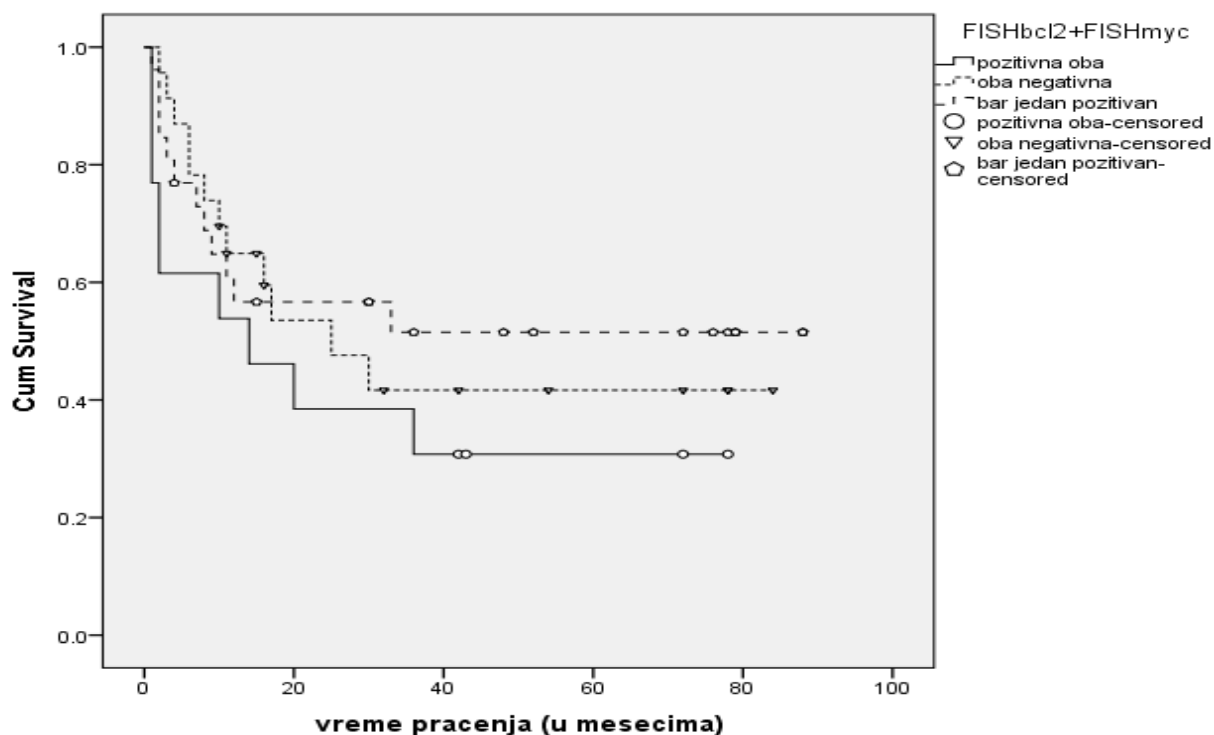




Графикон бр.58. Утицај резултата *FISH cMyc* на преживљавање код високог ИПИ ризика

Анализом испитаника са оба позитивна генска полиморфизма (*Bcl2* и *cMyc*) *FISH* анализом, са бар једним позитивним и са оба негативна налаза, није уочена статистички значајна разлика, (*Log Rank* тест,  $p=0,431$ ), (табела бр.19). Оба позитивна налаза и *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* имало је 13, односно 14,4% испитаника. У групи испитаника са оба позитивна генска полиморфизма *Bcl2* и *cMyc*, преживљавање после годину дана било је 53,8%, после две године 38,5%, после три 30,8% и толико је остало и на крају периода праћења од 78 месеци. Медијана преживљавања испитаника са оба позитивна налаза, била је 14 месеци (95%CI 0-35,14). Једногодишње и двогодишње преживљавање испитаника са позитивним или *FISH Bcl2* или *FISH cMyc*, било је 56,7%, трогодишње 51,5% колико је било и на крају периода праћења од 88 месеци. У овој групи испитаника медијана преживљавања није постигнута.

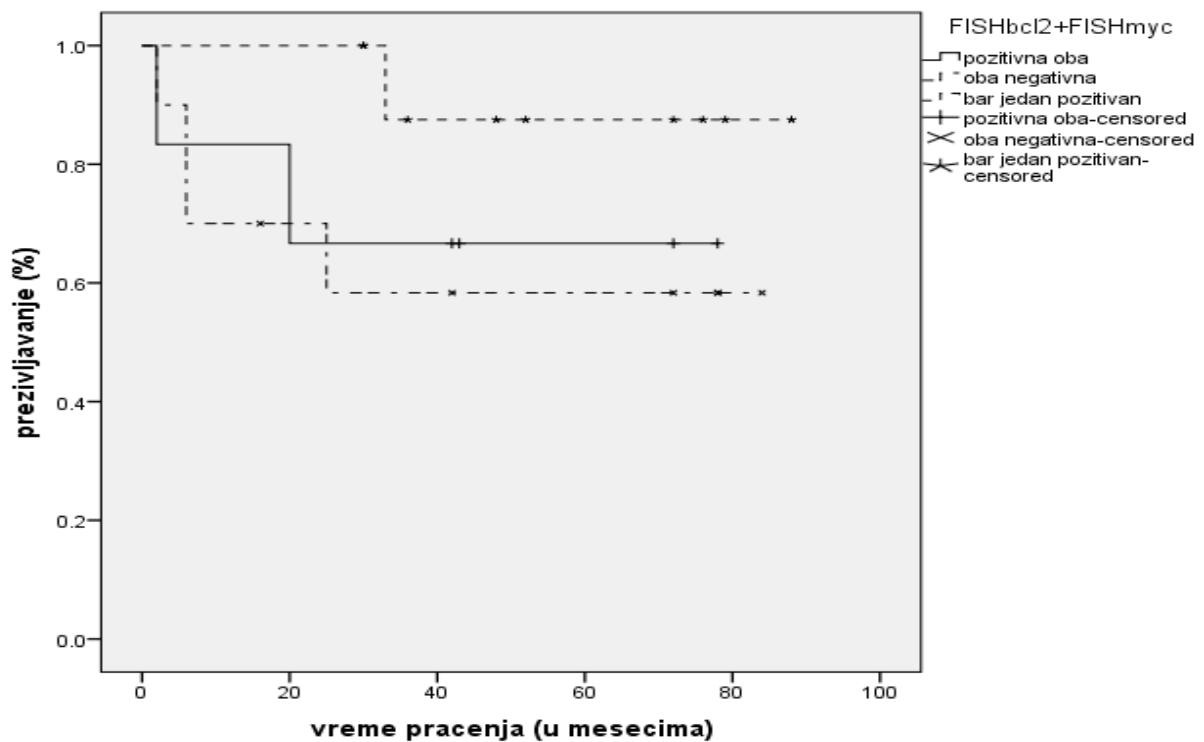
Код испитаника са оба негативна налаза и *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*, преживљавање после годину дана је износило 64,9%, после две године 53,6%, после три 41,7% и није се мењало до краја праћења од 84 месеца, (графикон бр. 59). Медијана преживљавања испитаника са оба негативна налаза била је 25 месеци (95%CI 7,63-42,37).



Графикон бр.59. Утицај резултата *FISH cMyc* и *Bcl2* на преживљавање

Статистички значајан утицај позитивног налаза на оба генска полиморфизма *Bcl2* и *cMyc* утврђених *FISH* – ом на преживљавање није уочен ни код испитаника са ниским ризиком (*Log Rank* тест,  $p=0,264$ ) ни код испитаника са високим ИПИ ризиком (*Log Rank* тест,  $p=0,121$ ).

У групи испитаника са оба позитивна полиморфизма *Bcl2* и *cMyc* и ниским ИПИ ризиком, једногодишње преживљавање било је 83,3%, двогодишње 66,7% и није се мењало до краја седамдесет осмо месечног периода праћења. Преживљавање испитаника са ниским ИПИ ризиком и негативним налазом на оба напред наведена генска полиморфизма, после годину дана и после две године износило је 70%, после три године 58,3% колико је било и после 84 месеца праћења. Једногодишње и двогодишње преживљавање испитаника са ниским ИПИ ризиком и бар једним позитивним полиморфизмом анализираних гена *FISH*–ом, било је 100%, трогодишње 87,5% и није се мењало до краја периода праћења од 88 месеци, (графикон бр. 60).

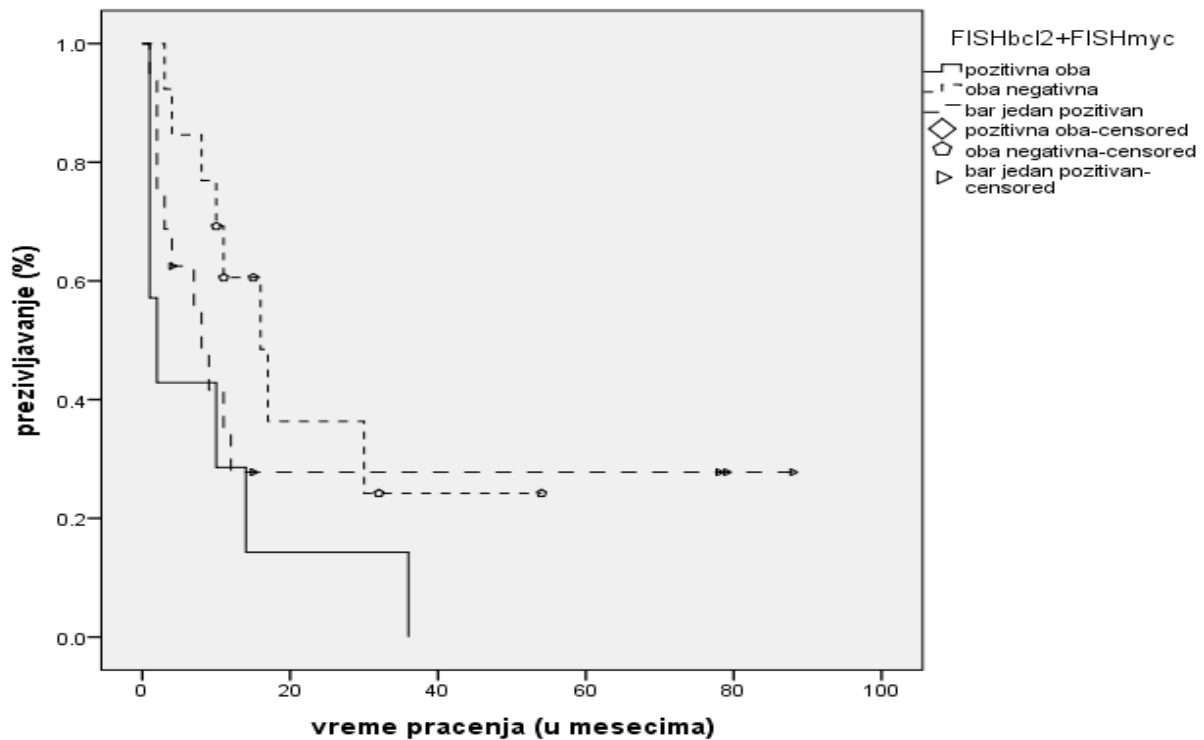


Графикон бр.60. Утицај резултата *FISH cMyc+FISH Bcl2* на преживљавање код ниског ИПИ ризика

Код испитаника са високим ИПИ ризиком и позитивним полиморфизмом *Bcl2* и *cMyc* утврђених *FISH*-ом, преживљавање после годину дана износило је 28,6%, после две године 14,3%, док нико од оболелих из ове групе није живео дуже од три године.

Једногодишње преживљавање испитаника са оба негативна налаза на *FISH*-у и високим ИПИ ризиком било је 60,6%, двогодишње 36,3%, трогодишње 24,2% колико је било и после 54 месеца праћења.

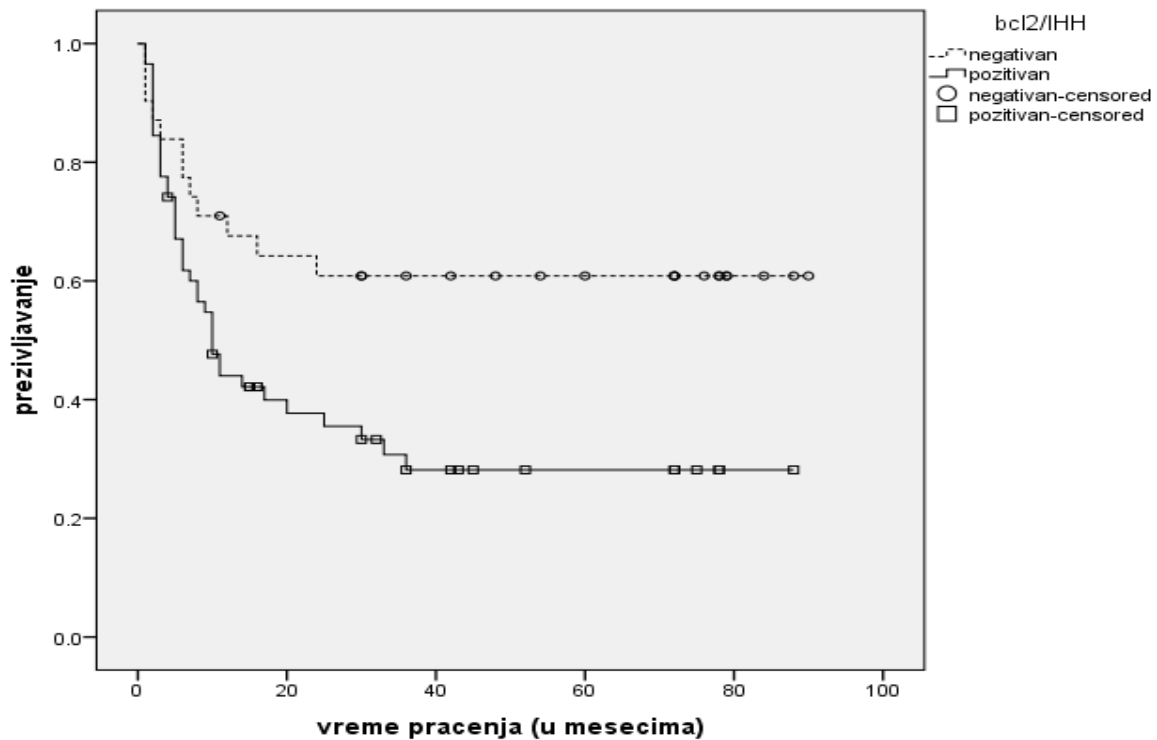
У групи са високим ризиком и са бар једним позитивним полиморфизмом *Bcl2* или *cMyc*/ утврђених *FISH* – ом, преживљавање после годину дана било је 27,8% и није се мењало до краја периода праћења од 88 месеци, (графикон бр.61).



Графикон бр.61. Утицај резултата *FISH cMyc* + *FISH Bcl2* на преживљавање код високог ИПИ ризика

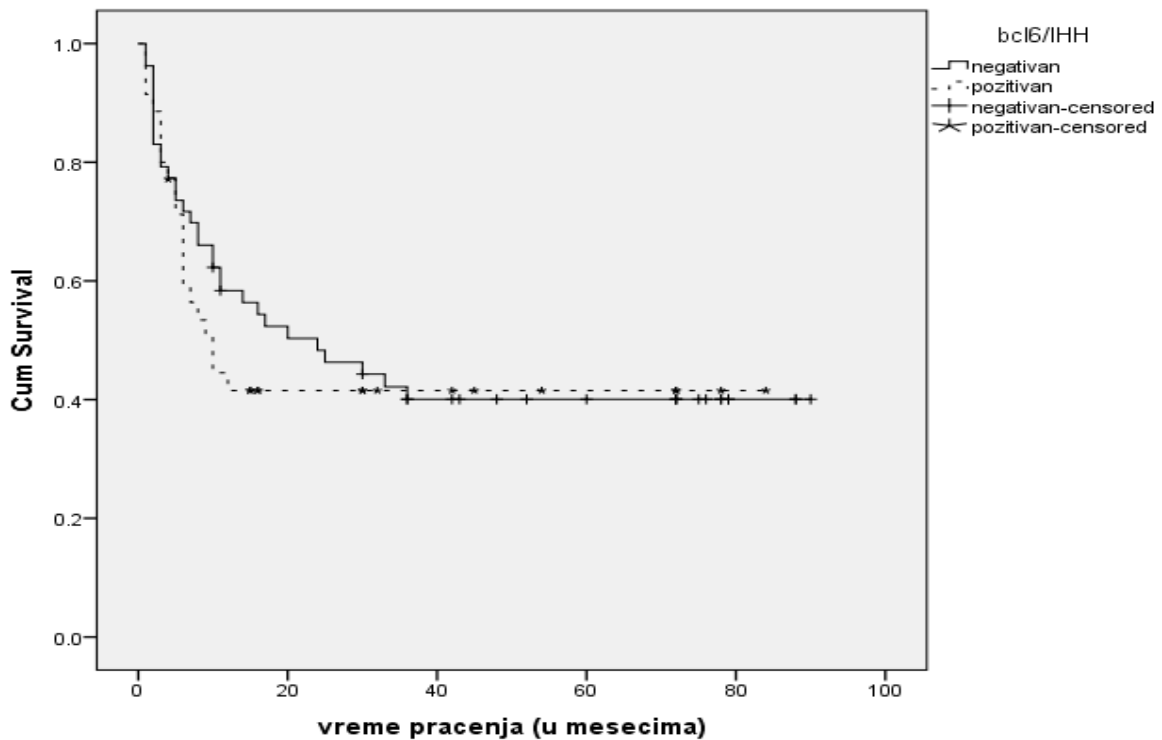
Између испитаника са позитивним и негативним налазом имунохистохемијске анализе за *Bcl2*, уочена је статистички значајна разлика у преживљавању, (*Log Rank* тест,  $p=0,011$ ), (табела бр.19). *Bcl2* ИХХ позитивних испитаника било је 58 односно 56,2%. Позитиван налаз на *Bcl2* имунохистохемијски, представља лош прогностички знак.

Једногодишње преживљавање испитаника са негативним налазом било је 67,6%, двогодишње 60,8% и није се мењало до краја периода праћења од 90 месеци и код ових испитаника није постигнута медијана преживљавања, обзиром да је током посматраног периода праћења више од половине испитаника преживело. У групи са позитивним налазом, преживљавање после годину дана било је 44%, после две године 37,7%, после три 28,2% колико је било и на крају периода праћења од 88 месеци, (графикон бр.62). Медијана преживљавања испитаника *Bcl2*/ ИХХ позитивних била је 10 месеци (95%CI 6,89-13,11 месеци).



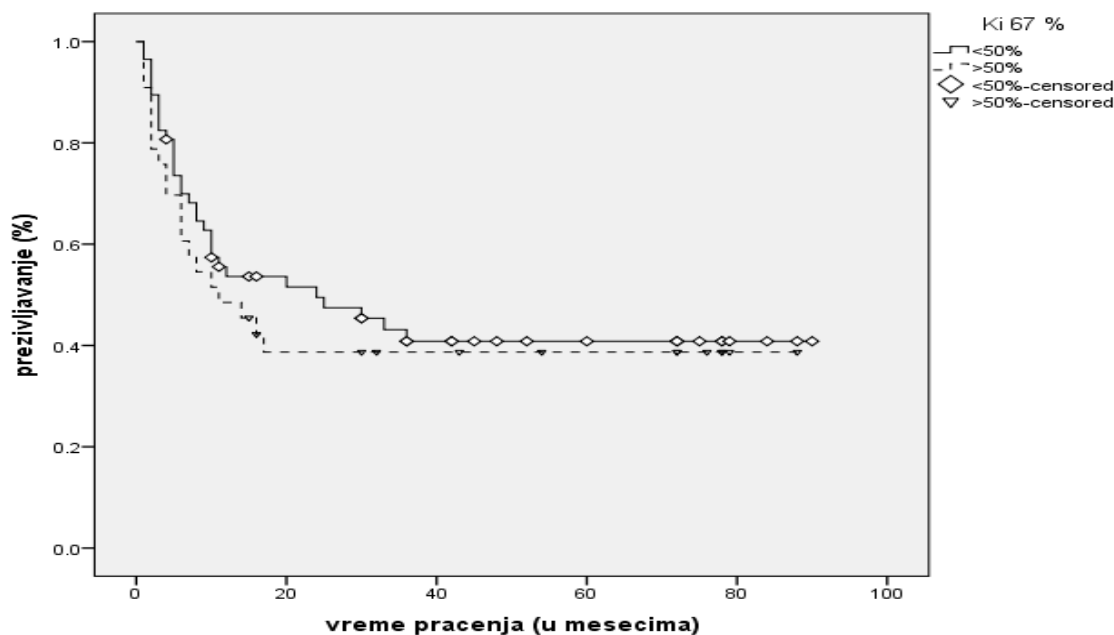
Графикон бр. 62. Утицај резултата *Bcl2*/ИХХ на преживљавање

Није уочен статистички значајан утицај позитивног налаза на анализе *Bcl6*/ИХХ на преживљавање испитаника оболелих од НХЛ ДБКЛ, (*Log Rank* тест,  $p=0,610$ ), (табела бр.19). Једногодишње преживљавање испитаника са негативним налазом је било 58,4%, двогодишње 48,3%, трогодишње 40,1% и није се мењало до краја деведесето месечног периода праћења. Код испитаника са позитивним налазом преживљавање после годину дана износило је 41,5% и није се мењало до краја 84 месеца праћења, (графикон бр. 63).



Графикон бр. 63. Утицај резултата *Vcl6/HH* на преживљавање

На преживљавање испитаника оболелих од НХЛ ДБКЛ, вредности *Ki67%*, нису статистички значајно утицале, (*Log Rank* тест,  $p=0,524$ ), (табела бр.19). Код испитаника са вредностима *Ki67%* мањим од 50%, једногодишње преживљавање било је 53,6%, двогодишње 49,5%, трогодишње 40,8% и није се мењало до краја периода праћења од 90 месеци. У групи оболелих са вредностима *Ki67%* већим од 50%, преживљавање после годину дана било је 48,5%, двогодишње 38,7% и није било промене до краја периода праћења од 88 месеци, (графикон бр. 64).



Графикон бр. 64. Утицај резултата Ki67%/ ИХХ на преживљавање

#### 4.4.4. Анализа терапијског одговора и преживљавања

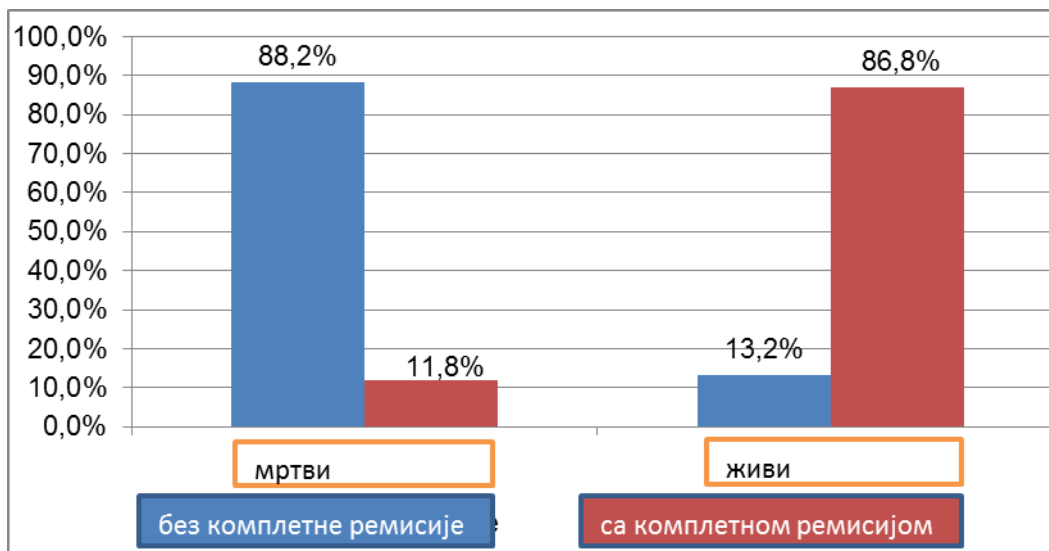
Учесталост болесника са комплетном ремисијом статистички значајно се разликовао између испитаника са смртним исходом и преживелих ( $\chi^2$  тест,  $p=0,000$ ), (табела бр.20).

Odgovor na terapiju		Ishod		Značajnost
		Mrtvi	Živi	
<b>Комплетна ремисија</b>	<b>ne</b>	45 (88,2%)	5 (13,2%)	<sup>b</sup> $p=0,000^*$
	<b>da</b>	6 (11,8%)	33 (86,8%)	
<b>Парцијална ремисија</b>	<b>ne</b>	48 (92,3%)	37 (97,4%)	<sup>b</sup> $p=0,301$
	<b>da</b>	4 (7,7%)	1 (2,6%)	
<b>Рефрактерна на терапију</b>	<b>ne</b>	11 (21,2%)	37 (97,4%)	<sup>b</sup> $p=0,000^*$
	<b>da</b>	41 (78,8%)	1 (2,6%)	
<b>Радио терапија</b>	<b>ne</b>	46 (88,5%)	33 (86,8%)	<sup>b</sup> $p=0,817$
	<b>da</b>	6 (11,5%)	5 (13,2%)	

\*статистички значајна разлика; <sup>b</sup> $\chi^2$ -test;

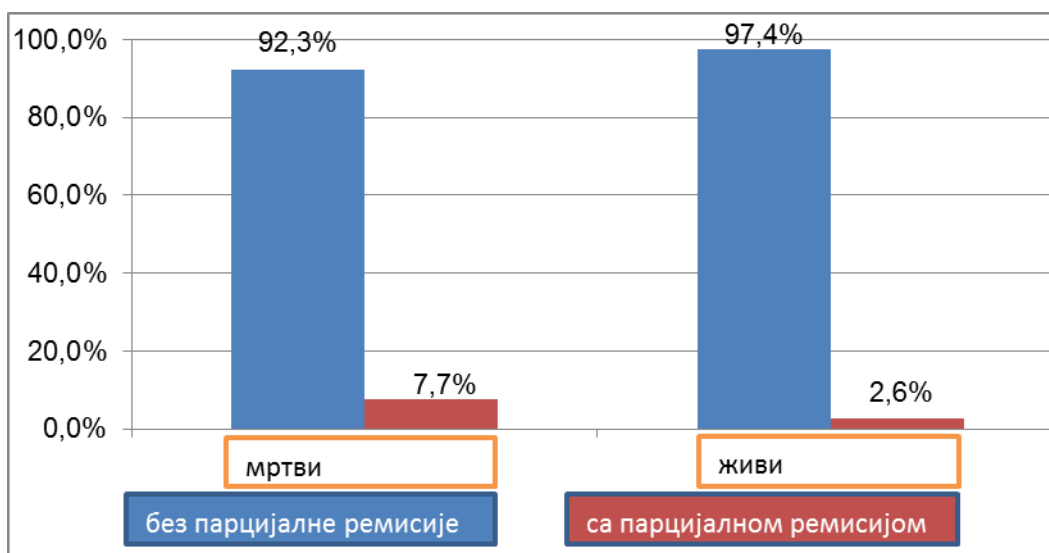
Табела бр.20. Одговор на терапију између оболелих са различитим исходом

Комплетна ремисија постигнута је код 86,8% преживелих испитаника а код 11,8% испитаника са смртним исходом, (графикон бр. 65).



Графикон бр.65. Учесталост комплетне ремисије након примене прве терапијске линије у болесника са различитим исходом

Између анализираних група испитаника није уочена статистички значајна разлика у учесталости испитаника са парцијалном ремисијом, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,301$ ), (табела бр.20). У обе групе, испитаника парцијалну ремисију имало је мање од 10% испитаника, (графикон бр.66).



Графикон бр. 66. Парцијална ремисија болести након примене прве терапијске линије у болесника са различитим исходом

Између анализираних група испитаника уочена је статистички значајна разлика у појави рефрактерности на терапију, ( $\chi^2$ тест,  $p=0,000$ ), (табела бр.20). Испитаници са смртним исходом значајно су чешће били рефрактерни на терапију. 78,8% испитаника

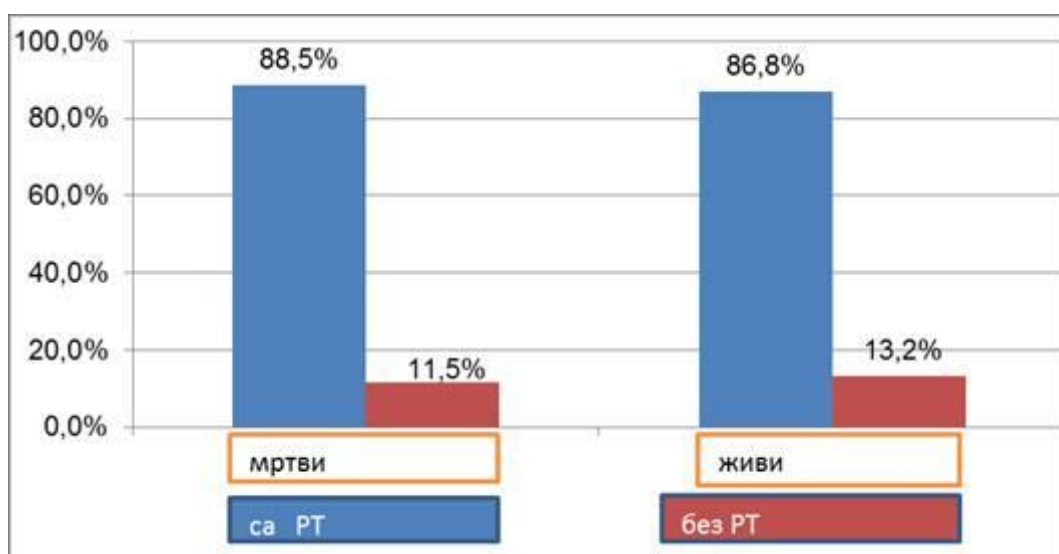


са смртним исходом било је рефрактерно на терапију прве линије и свега 2,6% у групи преживелих, (графикон бр. 67).



Графикон бр. 67. Учесталост рефрактерности на прву терапијску линију у болесника различитог исхода

Између испитаника оболелих од НХЛ ДБКЛ са различитим исходом било је оних који су поред имунохемотерапије третирани и локалном зрачном терапијом. Статистичком анализом болесника са различитим исходом, није уочена значајна разлика у заступљености испитаника код којих је спровођена зрачна терапија, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,817$ ), (табела бр.20). У групи са смртним исходом РТ је имало 11,5% испитаника, а у групи преживелих 13,2%, (графикон бр.68).



Графикон бр. 68. Заступљеност зрачне терапије у групама испитаника са различитим исходом уз имунохемотерапију

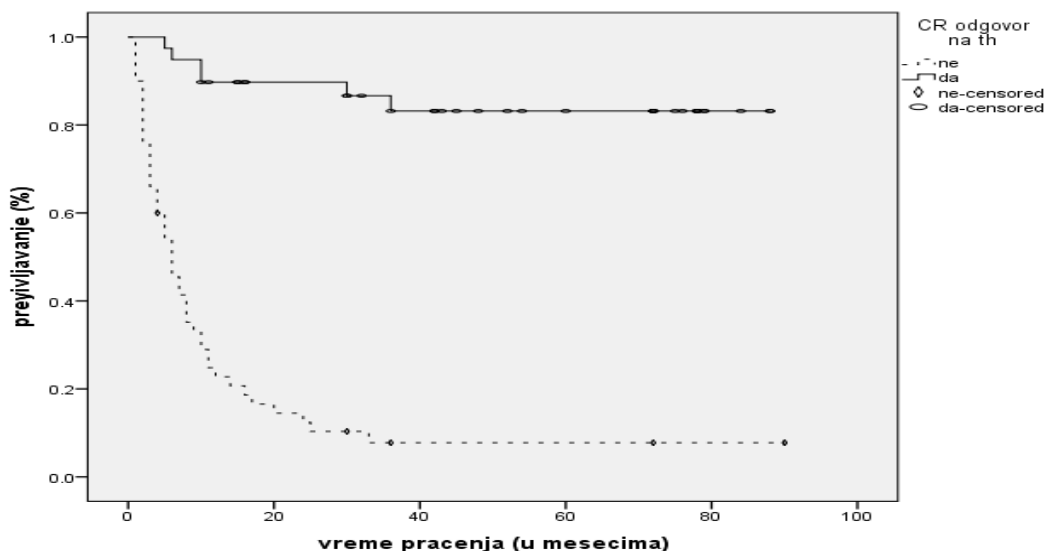
Између испитаника код којих је постигнута комплетна ремисија и оних код којих то није, уочена је статистички значајна разлика у преживљавању (*Log Rank* тест,  $p=0,000$ ), (табела бр.21).

Одговор на терапију		Време праћења (у годинама)				Значајност
		Једна	Две	Три	На крају периода праћења	
<b>Комплетна ремисија</b>	<b>не</b>	22,8%	12,4%	7,8%	7,8%	<sup>a</sup> $p=0,000^*$
	<b>да</b>	89,7%	89,7%	83,2%	83,2%	
<b>Парцијална ремисија</b>	<b>не</b>	51,3%	45,8%	41,3%	41,3%	<sup>a</sup> $p=0,637$
	<b>да</b>	60,0%	40,0%	20,0%	20,0%	
<b>Рефрактерност на терапију</b>	<b>не</b>	85,3%	83,1%	75,4%	75,4%	<sup>a</sup> $p=0,000^*$
	<b>да</b>	12,4%	0,025%	0,0%	0,0%	
<b>Радиотерапија</b>	<b>не</b>	47,5%	43,2%	39,8%	39,8%	<sup>a</sup> $p=0,396$
	<b>да</b>	81,8%	63,6%	45,5%	45,5%	
<b>Хирушка терапија</b>	<b>Не</b>	50,1%	43,5%	39,9%	39,9%	<sup>a</sup> $p=0,758$
	<b>Да</b>	56,5%	51,4%	40,0%	40,0%	

статистички значајна разлика; <sup>a</sup>*Log Rank* тест

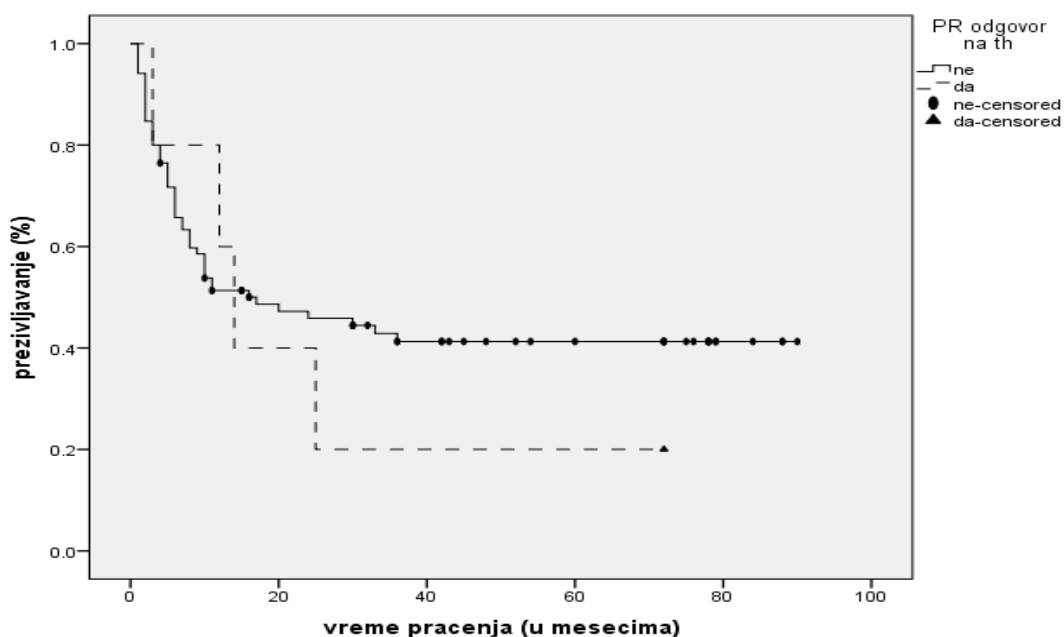
Табела бр.21. Упоредна анализа преживљавање болесника са различитим одговором на терапију, адјувантном РТ и хирушком терапијом

Код испитаника без комплетне ремисије преживљавање после годину дана, износило је 22,8%, после две године 12,4%, после три 7,8% и није се мењало до краја периода праћења од 90 месеци. У групи са комплетном ремисијом, једногодишње преживљавање износило је 89,7%, колико је било и двогодишње. Трогодишње преживљавање за ову групу износило је 83,2% и није се мењало до краја периода праћења који је износио 88 месеци, (графикон бр. 69).



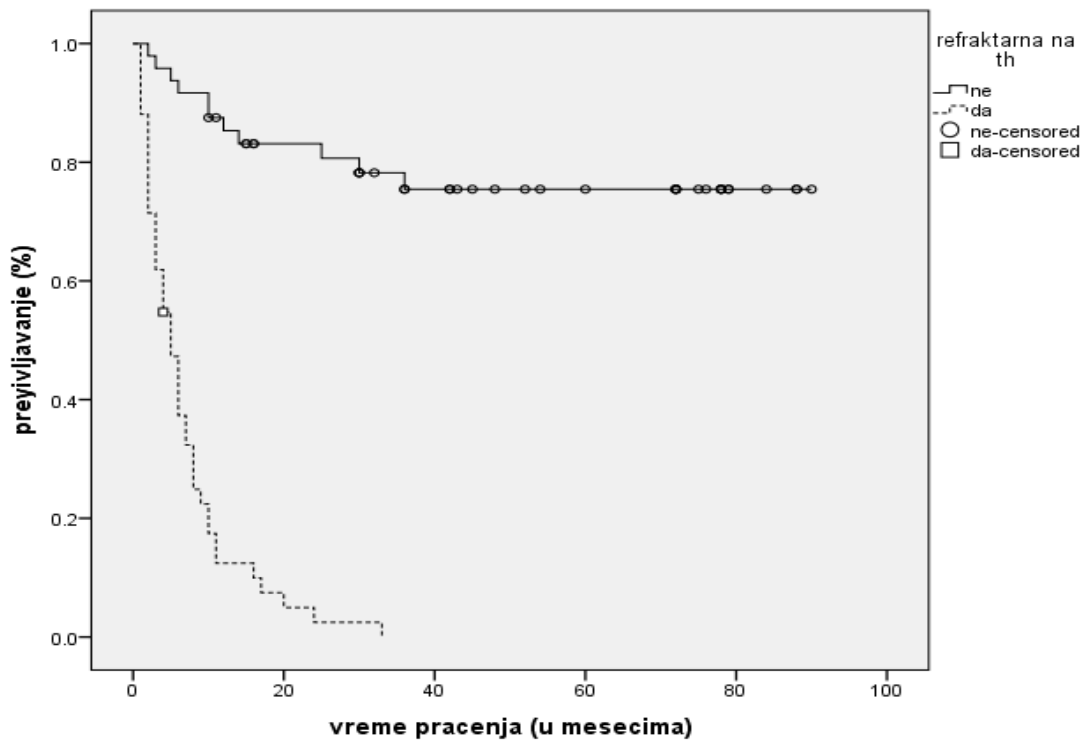
Графикон бр.69. Утицај комплетне ремисије на преживљавање

Није уочена статистички значајна разлика у преживљавању испитаника са и без парцијалне ремисије, (*Log Rank* тест,  $p=0,637$ ), (табела бр. 21). Једногодишње преживљавање испитаника без комплетне ремисије износило је 51,3%, двогодишње 45,8%, трогодишње 41,3% и на том нивоу је остало до краја деведесетомесечног праћења. Преживљавање после годину дана код испитаника са парцијалном ремисијом било је 60%, после две године 40%, после три 20% и није се мењало до краја шестогодишњег периода праћења, (графикон бр.70).



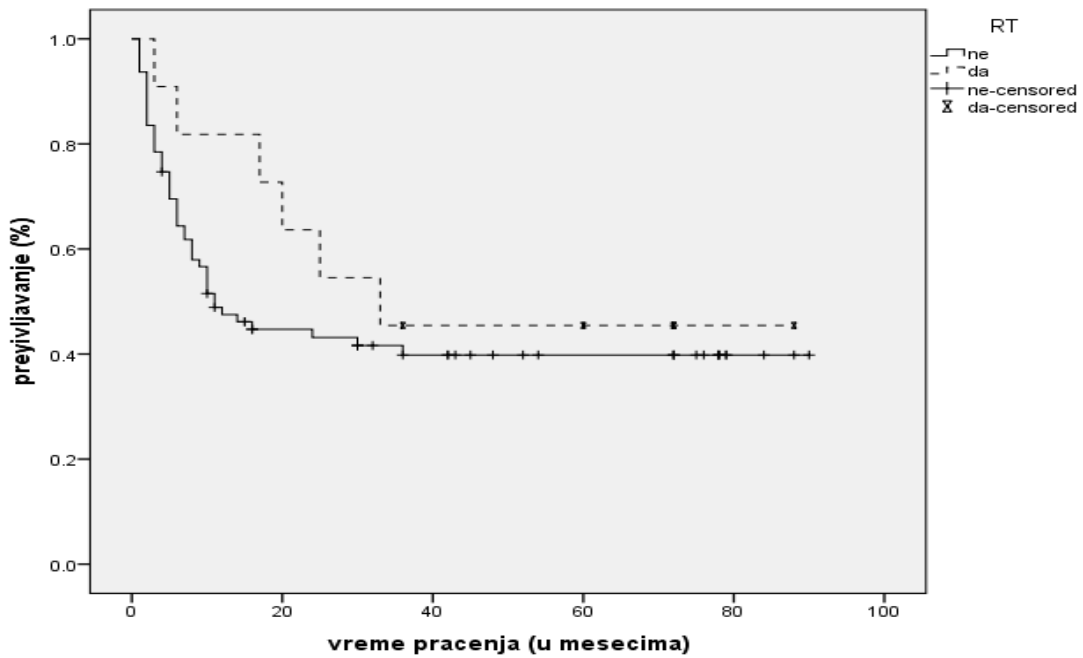
Графикон бр. 70. Утицај постигнуте парцијалне ремисије након примене прве терапијске линије на преживљавање

Испитаници рефрактерни на терапију имали су статистички значајно краће преживљавање од испитаника који су имали било какав одговор на примењено лечење, (*Log Rank* тест,  $p=0,000$ ), (табела бр. 21). Код испитаника који нису били рефрактерни на терапију, једногодишње преживљавање износило је 85,3%, двогодишње 83,1%, трогодишње 75,4% и није се мењало до краја деведесетомесечног периода праћења. Код испитаника рефрактерних на терапију преживљавање после годину дана имало је 12,4%, после две године 0,025% док нико из ове групе испитаника није живео дуже од 33 месеца, (графикон бр. 71).



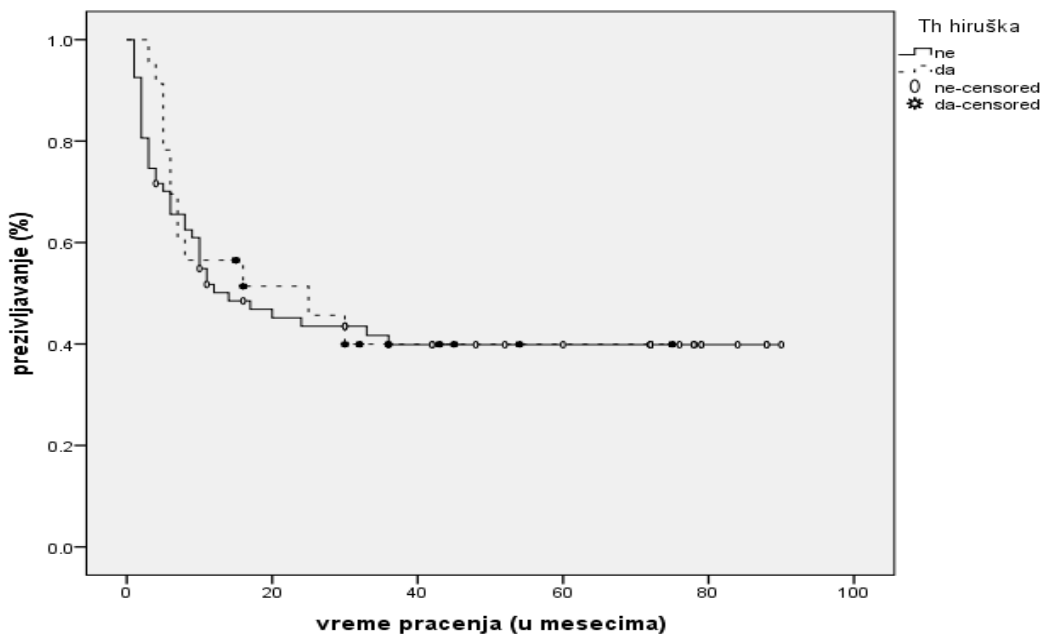
Графикон бр. 71. Преживљавање у болесника који су рефрактерни на прву терапијску линију

Није уочен статистички значајан утицај примене зрачне терапије на преживљавање испитаника, (*Log Rank* тест,  $p=0,396$ ), (табела бр. 21). Код испитаника без радиотерапије, једногодишње преживљавање износило је 47,5%, двогодишње 43,2%, трогодишње 39,8% и није се мењало до краја периода праћења које је износило 90 месеци. У групи са радиотерапијом, преживљавање после годину дана износило је 81,8%, после две године 63,6%, после три 45,5% и тако је остало до краја периода праћења од 88 месеци, (графикон бр. 72).



Графикон бр. 72. Утицај комбинације, хемиотерапија + радиотерапија на преживљавање болесника

Није уочена статистички значајна разлика између испитаника са и без хирушке интервенције, (*Log Rank* тест,  $p=0,758$ ), (табела бр. 21). У групи без хирушке интервенције једногодишње преживљавање износило је 50,1%, двогодишње 43,5%, трогодишње 39,9%, колико је било и на крају деведесетомесечног периода праћења, (графикон бр.73).



Графикон бр.73. Утицај комбинације хирушка интервенција + хемиотерапија на преживљавање

## 5. COX-OVA РЕГРЕСИОНА АНАЛИЗА ПРЕЖИВЉАВАЊА

Cox-овом униваријантном регресионом анализом, испитиван је утицај свих фактора на преживљавање. Овом анализом издвојени су статистички значајни фактори, који су даље тестирани Cox-овом мултиваријантном анализом, ради издвајања фактора са независним дејством на преживљавање. Униваријантном Cox-овом анализом израчунаван је и релативни ризик ( $\exp(B)$ ) који нам показује колико пута су испитаници код којих је присутан патолошки налаз, посматраног фактора, под већим ризиком за лошије преживљавање, односно под ризиком за лошију прогнозу и већим ризиком за нежељеним исходом.

Старост, ИПИ, LDH, перформанс – ECOG статус, комплетна ремисија, рефрактерност на терапију, број леукоцита, вредност хемоглобина, укупни протеини, албумини, AST, гама GT, алкална фосфатаза, мокраћна киселина, *Bcl2* одређен имунохистохемијски, симптоми болести, постојање температуре, губитак у телесној тежини, презнојавање, CRP, D- димер и гвожђе у серуму су фактори који су се издвојили као статистички значајни, униваријантном Cox-овом регресионом анализом. Ови фактори ушли су у мултиваријантну Cox-ову анализу. Овом анализом као предиктори преживљавања показали су се :*ECOG*, комплетна ремисија, рефрактерност на терапију, *Bcl2/ИХХ* и CRP.

Мултиваријантном Cox-овом анализом издвојени су независни фактори, од утицаја су на преживљавање без обзира на присуство других фактора.

Релативни ризик добијен мултиваријантном анализом показује колико су пута испитаници са већим *ECOG* статусом, без комплетне ремисије, рефрактерни на терапију, са *Bcl2/ИХХ* налазом позитивним и са већим вредностима CRP-а под већим ризиком од смртог исхода,(табела бр. 22) и (табела бр.23).

Посматрани фактори ризика	Униваријантна		Мултиваријантна	
	#expВ (95% CI)	Значајност	expВ (95% CI)	Значајност
Старост	1,052 (1,027-1,077)	p=0,000*	1,042 (0,998-1,088)	p=0,059
Пол	0,754 (0,434-1,308)	p=0,315	/	/
Ризик ИПИ	2,283 (1,537-3,390)	p=0,000*	0,959 (0,458-2,008)	p=0,911
ЛДХ	2,557 (1,396-4,681)	p=0,002*	1,000 (0,999-1,000)	p=0,108
ЕСОГ	1,811 (1,451-2,261)	p=0,000*	1,620 (1,044-2,514)	p=0,031*
CS	1,313 (0,959-1,798)	p=0,089	/	/
Екстранодалне локализације	1,592 (0,872-2,906)	p=0,130	/	/
Vulky	1,253 (0,699-2,245)	p=0,449	/	/
CR	0,071 (0,030-0,171)	p=0,000*	0,130 (0,024-0,696)	p=0,017*
PR	1,271 (0,458-3,530)	p=0,645	/	/
Рефрактерност на терапију	14,939 (7,027-31,759)	p=0,000*	4,946 (1,170-20,901)	p=0,030*
Радиотерапија	0,697 (0,297-1,636)	p=0,407	/	/
Леукоцити	1,052 (1,000-1,107)	p=0,050*	1,426 (0,802-2,537)	p=0,227
Неутрофили	1,051 (0,969-1,140)	p=0,232	/	/
Лимфоцити	1,073 (0,903-1,275)	p=0,423	/	/
Моноцити	1,085 (0,952-1,238)	p=0,223	/	/
Еритроцити	0,668 (0,415-1,074)	p=0,096	/	/
Хемоглобин	0,974 (0,961-0,986)	p=0,000*	0,991 (0,960-1,023)	p=0,574
МСV	0,989 (0,939-1,042)	p=0,678	/	/
Тромбоцити	1,000 (0,998-1,002)	p=0,978	/	/
Укупни протеини	0,432 (0,247-0,758)	p=0,003*	1,004 (0,914-1,102)	p=0,937
Албумини	0,522 (0,287-0,948)	p=0,033*	1,044 (0,916-1,190)	p=0,521
АСТ	1,014 (1,002-1,025)	p=0,021*	1,002 (0,967-1,037)	p=0,933
АЛТ	1,192 (0,558-2,544)	p=0,650	/	/
Гама-ГТ	1,003 (1,000-1,007)	p=0,037*	1,002 (0,994-1,010)	p=0,625
АЛП	1,005 (1,002-1,008)	p=0,004*	1,004 (0,998-1,010)	p=0,241
<i>Acidumurikum</i>	3,223 (1,775-5,851)	p=0,000*	1,000 (0,998-1,003)	p=0,808
Седиментација(СЕ)	1,999 (0,852-4,689)	p=0,111	/	/
Фибриноген	1,491 (0,847-2,624)	p=0,166	/	/
<i>bcl2FISH</i>	1,470 (0,741-2,913)	p=0,270	/	/
<i>ctycFISH</i>	1,045 (0,522-2,090)	p=0,901	/	/
<i>bcl2IHH</i>	2,231 (1,163-4,279)	p=0,016*	2,885 (1,051-7,920)	p=0,041*
<i>bcl6IHH</i>	1,155 (0,656-2,031)	p=0,618	/	/
<i>Ki67%</i>	1,195 (0,683-2,089)	p=0,533	/	/

\*статистички значајно; #релативан ризик

Табела бр. 22. Уни и мултиваријантна Соx-ова регресија анализе утицаја посматраних фактора на преживљавање

Посматрани ризик Фактори ризика	Униваријантна		Мултиваријантна	
	#expВ (95%CI)	Значајност	#expВ (95%CI)	Значајност
Хирушка терапија	0,908 (0,484-1,702)	p=0,763	/	/
Присутни симптоми (А/В)	2,425 (1,334-4,409)	p=0,004*	2,619 (0,255-4,409)	p=0,418
Температура	2,246 (1,245-4,052)	p=0,007*	1,240 (0,380-4,041)	p=0,721
Губитак у телесној тежини	2,215 (1,259-3,898)	p=0,006*	0,576 (0,121-2,739)	p=0,488
Презнојавање	2,464 (1,407-4,314)	p=0,002*	1,240 (0,380-4,041)	p=0,721
CRP	2,675 (1,299-5,510)	p=0,008*	1,008 (1,000-1,015)	p=0,038*
Д-димер	3,454 (1,716-6,951)	p=0,001*	1,000 (1,000-1,001)	p=0,086
Гвожђе у серуму	0,500 (0,277-0,904)	p=0,022*	0,989 (0,911-1,073)	p=0,787

\*статистички значајно; #релативан ризик

Табела бр. 23. Уни и мултиваријантна Соx-ова регресија анализе утицаја посматраних фактора на преживљавање



## 6. ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ И ОДГОВОР НА ТЕРАПИЈУ: КОМПЛЕТНА РЕМИСИЈА

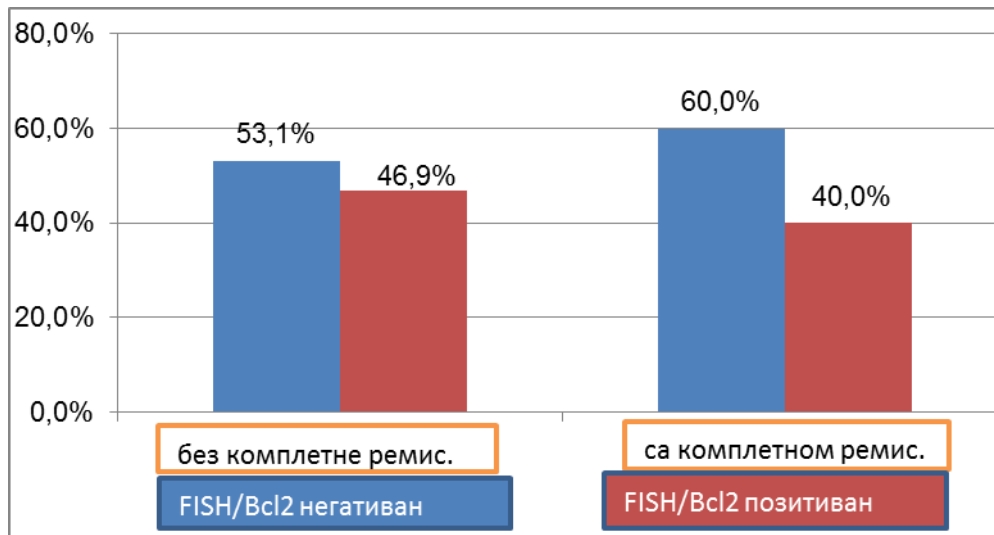
Није уочена статистички значајна разлика у учесталости испитаника са комплетном ремисијом између испитаника са различитим генским полиморфизмом *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*, (табела бр. 24). Између испитаника са и без комплетне ремисије није уочена статистички значајна разлика у учесталости оболелих са присутним *FISH Bcl2* генским полиморфизмом ( $\chi^2$  тест;  $p=0,585$ ), (табела бр.24).

Параметри генске анализе		Комплетна ремисија		Значајност
		не	да	
<b>FISHbcl2</b> n (%)	Негативан	17 (53,1%)	18 (60,0%)	<sup>a</sup> p=0,585
	Позитиван	15 (46,9%)	12 (40,0%)	
<b>FISHmyc</b> n (%)	Негативан	18 (56,3%)	19 (63,3%)	<sup>a</sup> p=0,570
	Позитиван	14 (43,8%)	11 (36,7%)	
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b> c n (%)	Оба позитивна	7 (21,9%)	6 (20,0%)	<sup>a</sup> p=0,600
	Оба негативна	10 (31,3%)	13 (43,3%)	
	Бар један позитиван	15 (46,9%)	11 (36,7%)	
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b> c n (%)	<b>FISHbcl2+FISHmyc</b>	7 (21,9%)	6 (20,0%)	<sup>a</sup> p=0,704
	Оба негативна	10 (31,3%)	13 (43,3%)	
	само <b>FISHbcl2</b>	10 (31,3%)	6 (20,0%)	
	само <b>FISHmyc</b>	5 (15,6%)	5 (16,7%)	

статистички значајна разлика; <sup>a</sup> $\chi^2$ -тест;

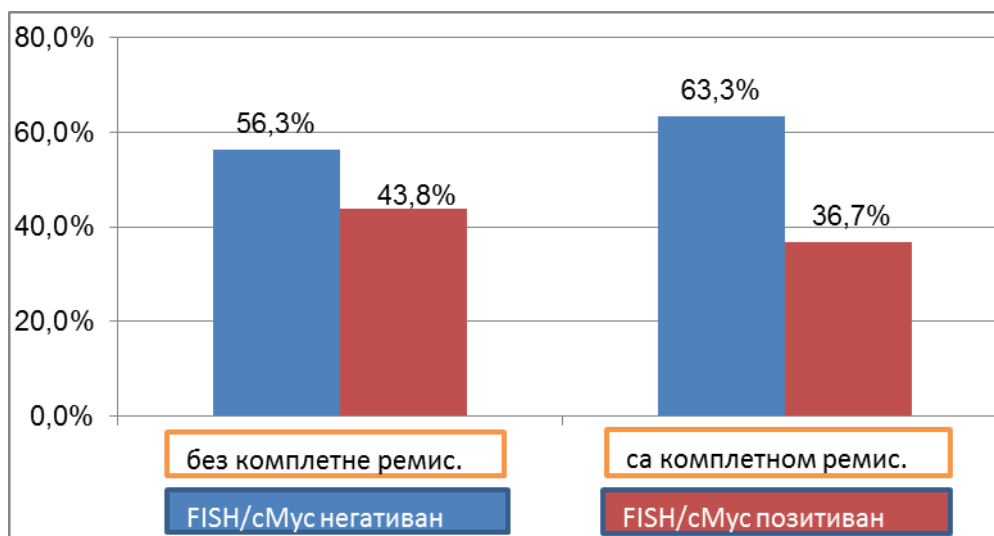
Табела бр. 24. Генски полиморфизам и комплетна ремисија

У групи са постигнутом комплетном ремисијом и у групи болесника без комплетне ремисије, нешто мање од половине испитаника било је *FISH Bcl2* позитивно, (графикон бр.74).



Графикон бр. 74. Учесталост *FISH Bcl2* позитивности у болесника са различитим исходом а постигнутом комплетном ремисијом

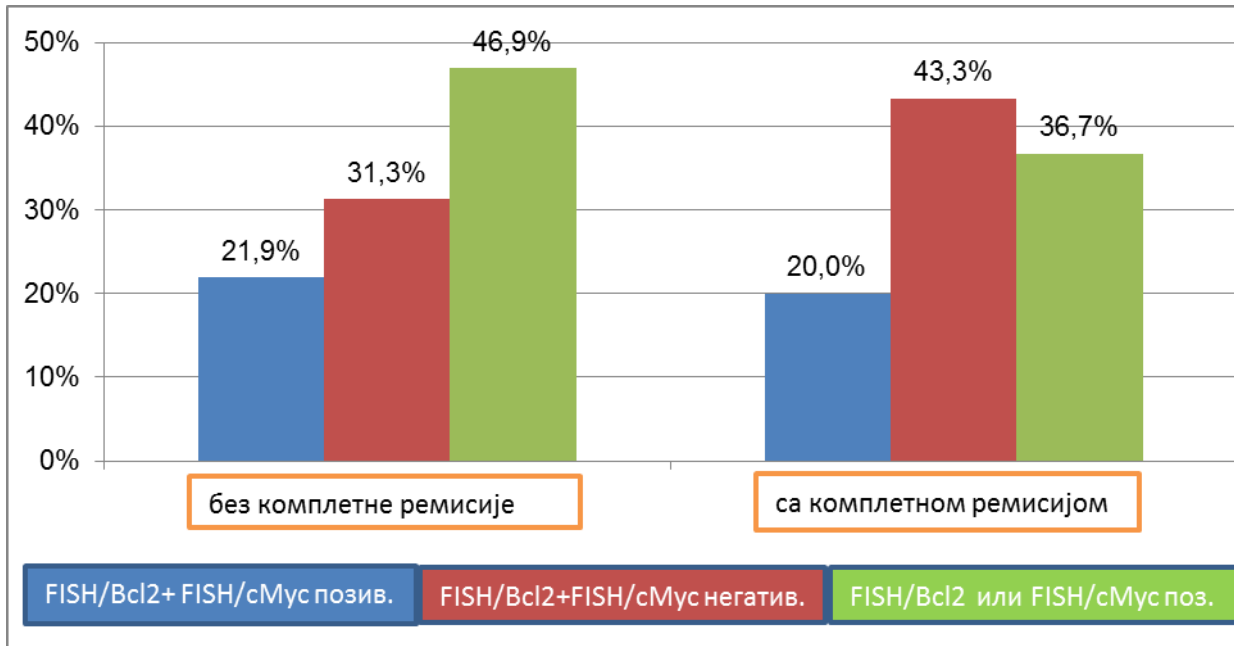
Појава комплетне ремисије није се статистички значајно разликовала између испитаника *FISH cMyc* позитивних и негативних ( $\chi^2$  тест,  $p=0,570$ ), (табела бр. 24). У обе посматране групе испитаника са и без комплетне ремисије позитиван *FISH cMyc* имало је око 40% испитаника, (графикон 75).



Графикон бр. 75. Учесталост *FISH cMyc* позитивности у болесника са постигнутом комплетном ремисијом

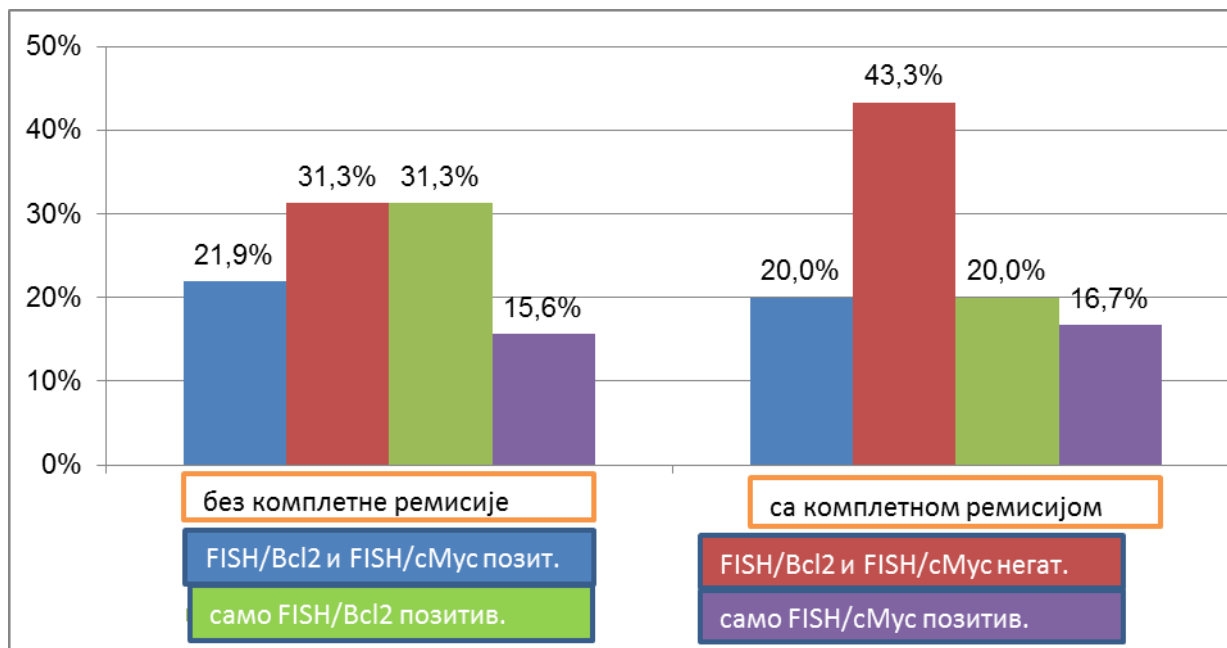
Учесталост испитаника са присутна оба полиморфизма *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*, са присутним бар једним полиморфизмом и са оба негативна *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* налаза, није се статистички значајно разликовао посматрано у односу на постизање комплетне ремисије ( $\chi^2$  тест,  $p=0,600$ ), (табела бр. 24). Оба полиморфизма имало је око 20% испитаника у групи са и без комплетне ремисије, нешто више испитаника са бар

једним полиморфизмом било је заступљено у групи са комплетном ремисијом, док су испитаници и са *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* негативним налазом били нешто више заступљени у групи са комплетном ремисијом 43,3%, него у групи без комплетне ремисије 31,3%, (графикон бр. 76).



Графикон бр. 76. Учесталост *FISH Bcl2* + *FISH cMyc* у болесника са комплетном ремисијом

Посматрано у односу на постизање комплетне ремисије, статистички значајна разлика није уочена ни у заступљености испитаника са оба позитивна *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* налаза, са оба негативна налаза, са присутним само *FISH Bcl2* позитивним налазом и са присутним само *FISH cMyc* позитивним налазом ( $\chi^2$  тест,  $p=0,704$ ), (табела бр. 24). Нешто већа учесталост само *FISH Bcl2* позитивних испитаника 31,3% уочена је код испитаника без постигнуте комплетне ремисије, него у испитаника са комплетном ремисијом 20%, (графикон бр.77).



Графикон бр. 77. Учесталост удружена и појединачна *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* у болесника са и без комплетне ремисије

### 6.1. Сензитивност и специфичност генског полиморфизма у предикцији постизања комплетне ремисије

Анализа посматраних генских полиморфизама имала је за циљ одређивање сензитивности и специфичности сваког параметра, како би се одредила њихова валидност при процени ризика одговора на примењену терапију у смислу постизања комплетне ремисије, парцијалне ремисије или могуће појаве рефрактерности на терапију.

За сваки од ових полиморфизама *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*, као и за комбинацију оба одређивана је сензитивност и специфичност, (табела бр. 25).

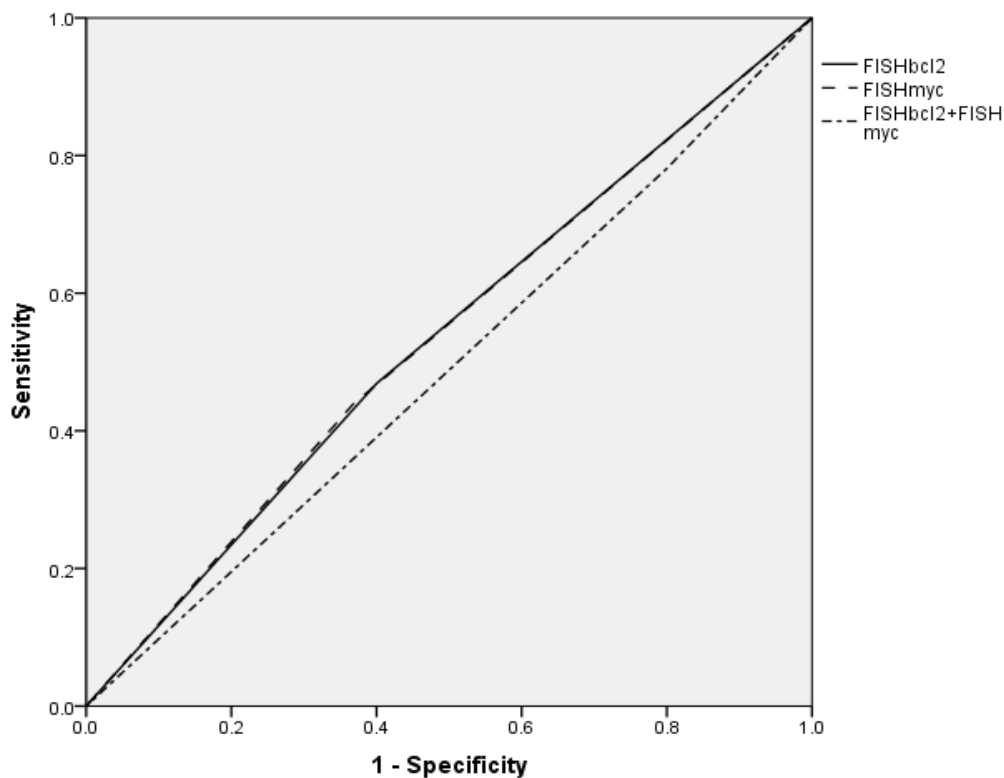
Генски полиморфизми	Сензитивност	Специфичност	Површина испод ROC криве (95% CI) (AUC)*
<b>FISHbcl2</b>	0,469	0,600	0,534 (0,390-0,679)
<b>FISHmyc</b>	0,438	0,633	0,535 (0,391-0,680)
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b>	0,462	0,510	0,491 (0,346-0,635)

\*AUC-Area under the Curve

Табела бр. 25. Валидност посматраних генских полиморфизама и постизање комплетне ремисије

Сензитивност у нашем случају представља вероватноћу непостизања комплетне ремисије код испитаника са присутним генским полиморфизмом. Она нам служи као показатељ могућности рађене имунохистохемије да открије испитанике са комплетном ремисијом на примењену терапију. У нашем случају сензитивност забележена код присутна оба полиморфизма као и сензитивност позитивног *FISH Bcl2* или *FISH cMyc* налаза, била је приближно иста и износила је око 45%, (табела бр. 25).

Специфичност теста овде представља вероватноћу постизања комплетне ремисије у групи испитаника без присутног генског полиморфизма. Иначе она је добра као показатељ могућности параметара да издвоји испитанике код којих је вероватна комплетна ремисија. Код свих посматраних параметара специфичност је била релативно мала, што значи да одсуство посматраних фактора ризика не значи и појаву комплетне ремисије. Специфичност је била приближно иста и код присутног и *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* генског полиморфизма и износила је око 60%, док је била најмања код присутна оба генска полиморфизма, (графикон бр. 78).



Графикон бр.78. ROC криве – комплетна ремисија

## 7. ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ И ОДГОВОР НА ТЕРАПИЈУ: ПАРЦИЈАЛНИ ОДГОВОР

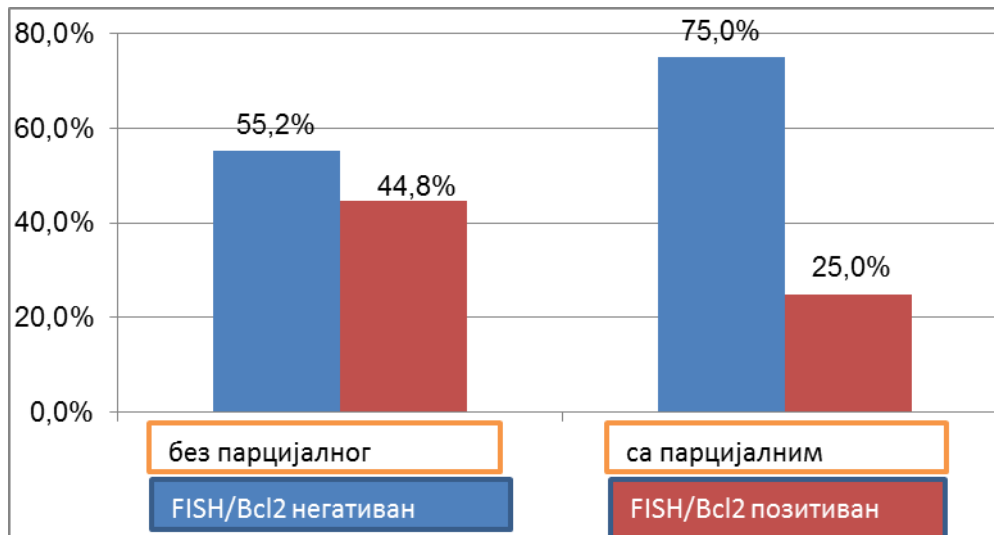
Парцијални одговор на примењену терапију имало је 4 испитаника. Није уочена статистички значајна разлика у учесталости испитаника са парцијалним одговором између испитаника са негативним и позитивним *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*, (табела бр. 26).

Генски полиморфизам		Парцијални одговор		Значајност
		не	да	
<b>FISHbcl2</b> n (%)	Негативан	32 (55,2%)	3 (75,0%)	<sup>a</sup> p=0,439
	Позитиван	26 (44,8%)	1 (25,0%)	
<b>FISHmyc</b> n (%)	Негативан	35 (60,3%)	2 (50,0%)	<sup>a</sup> p=0,683
	Позитиван	23 (39,7%)	2 (50,0%)	
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b> n (%)	Оба позитивна	12 (20,7%)	1 (25,0%)	<sup>a</sup> p=0,772
	Оба негативна	21 (36,2%)	2 (50,0%)	
	Бар један позитиван	25 (43,1%)	1 (25,0%)	
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b> n (%)	<b>FISHbcl2+FISHmyc</b>	12 (20,7%)	1 (25,0%)	<sup>a</sup> p=0,822
	Оба негативна	21 (36,2%)	2 (50,0%)	
	Само <b>FISHbcl2</b>	15 (25,9%)	1 (25,0%)	
	Само <b>FISHmyc</b>	10 (17,2%)	0 (0%)	

\*статистички значајна разлика;<sup>a</sup>χ<sup>2</sup>-тест;

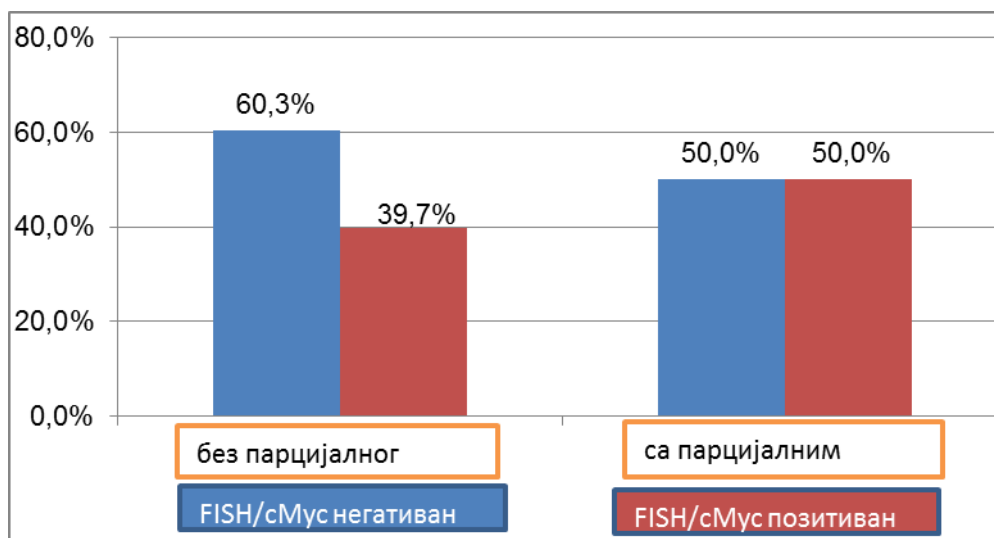
Табела бр. 26. Генски полиморфизам на *FISH*-у и парцијални одговор

Учесталост оболелих са присутним *FISH Bcl2* генским полиморфизмом, између испитаника са и без парцијалне ремисије, није се статистички значајно разликовала (χ<sup>2</sup> тест, p=0,439), (табела бр. 26). У групи испитаника са постигнутим само парцијалним одговором *FISH Bcl2* позитивних било је 25%, док је код осталих испитаника *FISH Bcl2* позитивних испитаника било 44,8%, (графикон бр. 79).



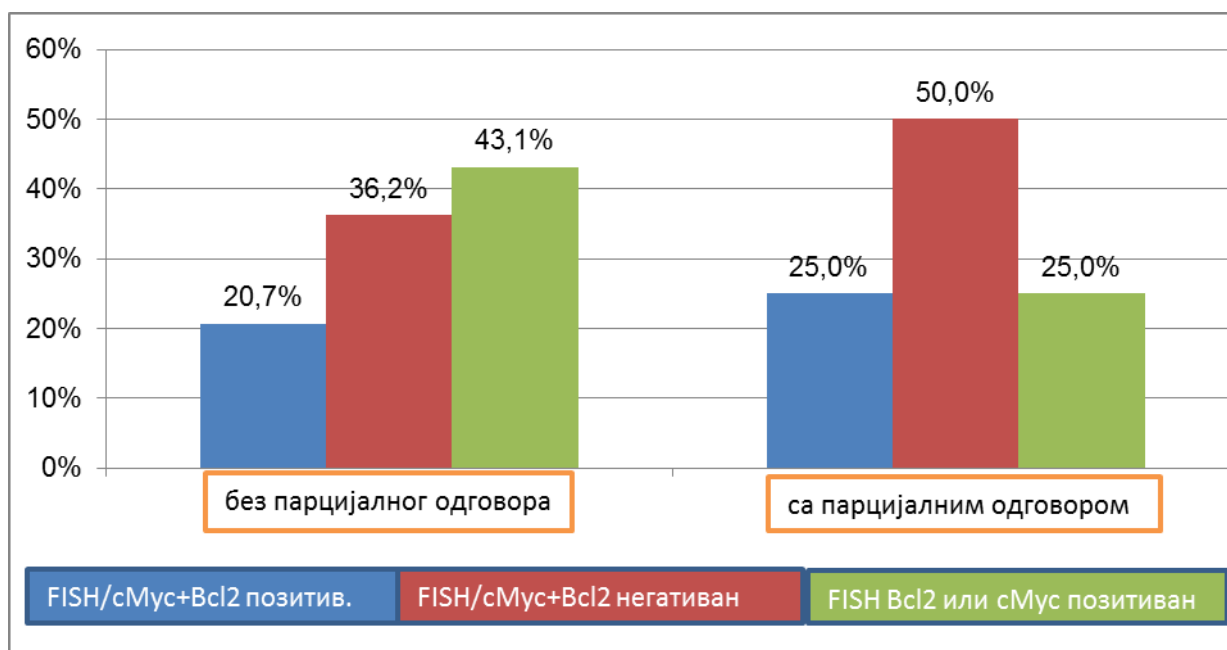
Графикон бр. 79. Учесталост *FISH Bcl2* у испитаника са парцијалним одговором

Између испитаника *FISH cMyc* позитивних и негативних није уочена статистички значајна разлика у појави парцијалног одговора ( $\chi^2$  тест,  $p=0,683$ ), (табела бр. 26). У групи са парцијалним одговором на примењену терапију половина испитаника било је *FISH cMyc* позитивна док је у групи преосталих испитаника, *FISH cMyc* позитивно било њих 40%, (графикон бр. 80).



Графикон бр.80. Учесталост *FISH cMyc* у испитаника са парцијалним одговором

Учесталост испитаника са присутна оба полиморфизма *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*, са присутним бар једним полиморфизмом и са оба негативна *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* налаза, није се статистички значајно разликовала посматрано у односу на постизање само парцијалног одговора на примењену терапију ( $\chi^2$  тест,  $p=0,772$ ), (табела бр. 26).

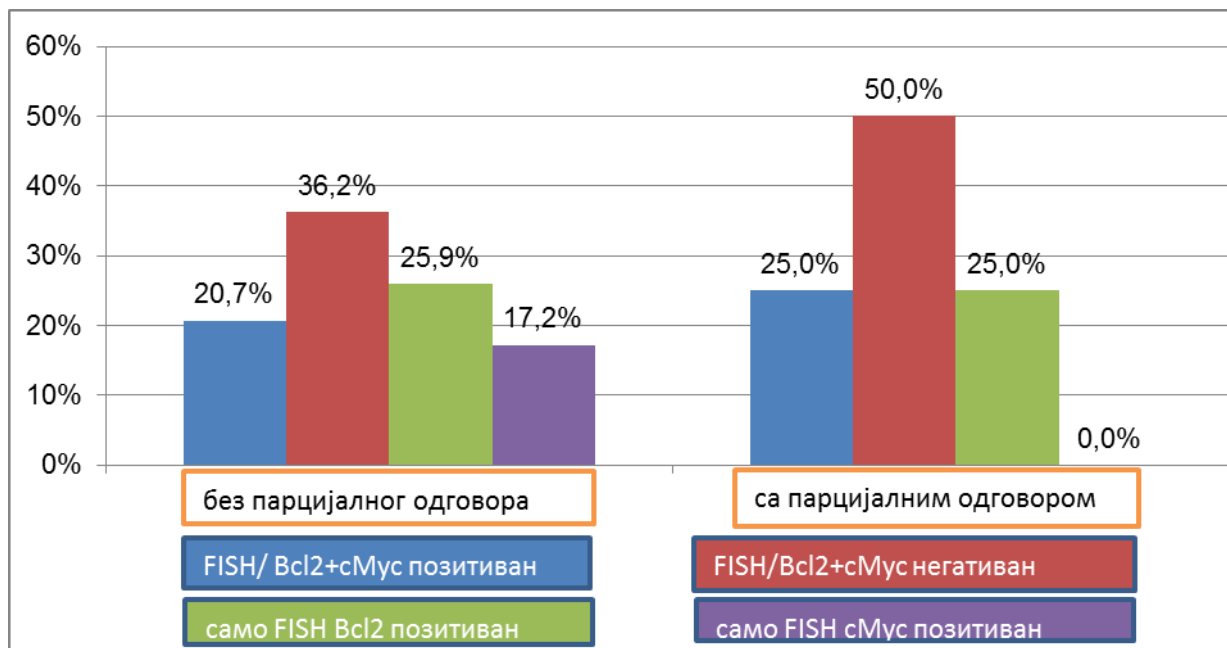


Графикон бр.81. Учесталост *FISH cMyc* и *FISH Bcl2* у испитаника са парцијалним одговором

Оба полиморфизма имало је око 25% испитаника из групе са парцијалним одговором, половина испитаника из ове групе било је са *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* негативним налазом а само један полиморфизам имало је 25% испитаника. У преосталој групи испитаника, највише је било оболелих са бар једним полиморфизмом 43,1%, најмање испитаника имало је оба полиморфизма 20,7%, а бар један полиморфизам имала је трећина оболелих из ове групе,( графикон бр. 81).

Посматрано у односу на постизање парцијалног одговора, статистички значајна разлика није уочена, статистички значајна разлика није уочена ни у заступљености испитаника са оба позитивна *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* налаза, са оба негативна налаза, са присутним само *FISH Bcl2* позитивним налазом и са присутним само *FISH cMyc* позитивним налазом ( $\chi^2$  тест,  $p=0,822$ ), (табела бр. 26). У групи са парцијалним одговором није било испитаника који су само *FISH cMyc* позитивни, (графикон бр. 82).





Графикон бр.82. Учесталост удружене и појединачне позитивности за *FISH cMyc* и *FISH Bcl2* у испитаника са парцијалним одговором

### 7.1. Сензитивност и специфичност генског полиморфизма у предикцији постизања парцијалног одговора

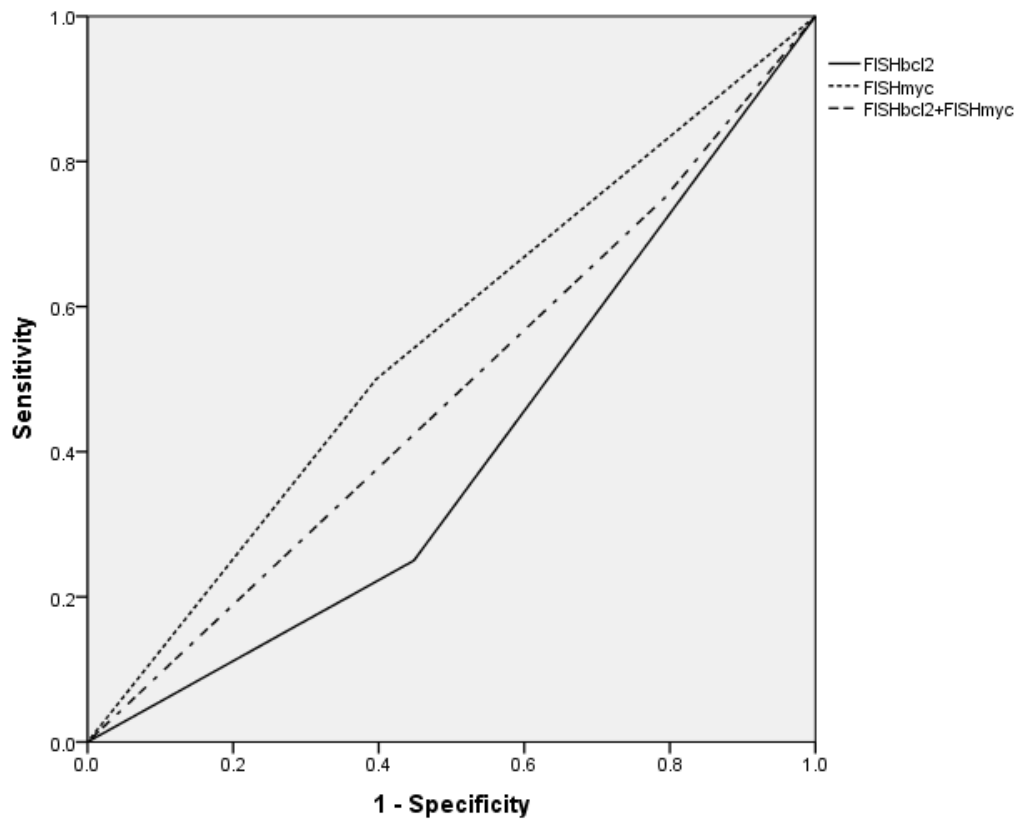
За сваки од ових полиморфизама *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*, као и за комбинацију оба одређивана је сензитивност и специфичност, (табела бр. 27).

Генски полиморфизми	Сензитивност	Специфичност	Површина испод ROC криве (95% CI) (AUC)*
<b>FISHbcl2</b>	0,250	0,552	0,401 (0,128-0,674)
<b>FISHmyc</b>	0,500	0,603	0,552 (0,256-0,848)
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b>	0,781	0,207	0,478 (0,178-0,779)

*AUC*-Area under the Curve

Табела бр. 27. Валидност посматраних генских полиморфизама и постизање само парцијалног одговора

Добијене вредности сензитивности и специфичности указују нам на малу валидност посматраних генских полиморфизама у предвиђању појаве парцијалног одговора на примењену терапију, што је делимично и последица чињенице да је само четири испитаника, из посматране групе оболелих од лимфома а са пратећим генским полиморфизмом, имало парцијални одговор на примењену терапију, (графикон бр. 83).



Графикон бр. 83. ROC крива – парцијални одговор

## 8. ГЕНСКИ ПОЛИМОРФИЗАМ И ОДГОВОР НА ТЕРАПИЈУ - РЕФРАКТЕРНОСТ НА ТЕРАПИЈУ

Није уочена статистички значајна разлика у учесталости оболелих, а рефрактерних на терапију, у односу на негативан и позитиван налаз за *Bcl2* и *cMyc* анализираних *FISH* методом, (табела бр. 28).

Параметри <i>FISH</i> анализе		Рефрактерност на терапију		Значајност
		не	да	
<b>FISHbcl2</b> n (%)	Негативан	23 (63,9%)	12 (46,2%)	<sup>a</sup> p=0,165
	Позитиван	13 (36,1%)	14 (53,8%)	
<b>FISHmyc</b> n (%)	Негативан	21 (58,3%)	16 (61,5%)	<sup>a</sup> p=0,800
	Позитиван	15 (41,7%)	10 (38,5%)	
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b> n (%)	Оба позитивна	7 (19,4%)	6 (23,1%)	<sup>a</sup> p=0,681
	Оба негативна	15 (41,7%)	8 (30,8%)	
	Бар један позитиван	14 (38,9%)	12 (46,2%)	
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b> n (%)	<b>FISHbcl2+FISHmyc</b>	7 (19,4%)	6 (23,1%)	<sup>a</sup> p=0,474
	Оба негативна	15 (41,7%)	8 (30,8%)	
	Само <b>FISHbcl2</b>	7 (19,4%)	9 (34,6%)	
	Само <b>FISHmyc</b>	7 (19,4%)	3 (11,5%)	

\*статистички значајна разлика; <sup>a</sup>χ<sup>2</sup>-тест;

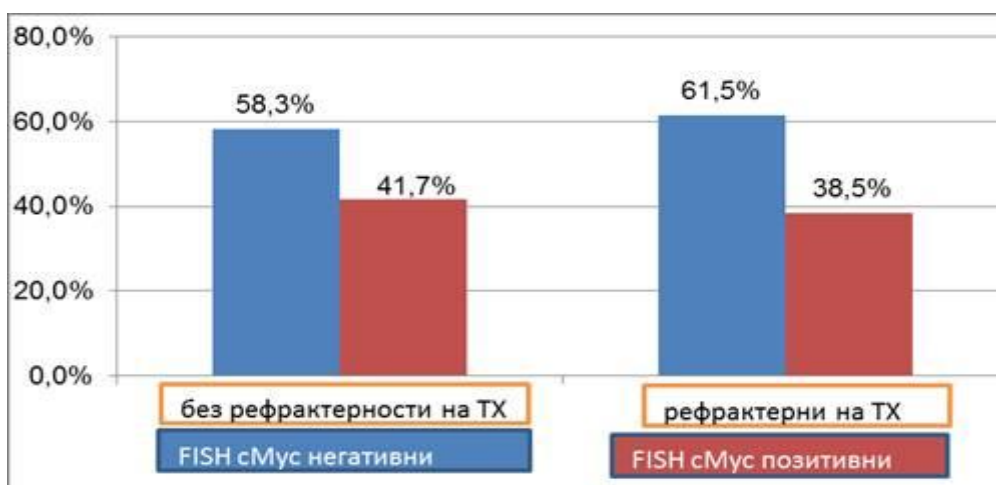
Табела бр. 28. *FISH* анализа *Bcl2* и *cMyc* и рефрактерност на терапију



Графикон бр. 84. FISH Bcl2 учесталост међу испитаницима рефрактерним на терапију

Између испитаника рефрактерних и не рефрактерних на терапију, није било статистички значајне разлике у учесталости FISH-ом утврђеног Bcl2 генског полиморфизма, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,165$ ), (табела бр.28). У групи испитаника рефрактерних на терапију FISH Bcl2 позитивних било је нешто мало више од половине оболелих, док је код осталих испитаника FISH Bcl2 позитивних испитаника било 36,1%. На основу добијених резултата, запажамо тренд нешто веће учесталости FISH Bcl2 позитивних испитаника у групи рефрактерних на терапију.

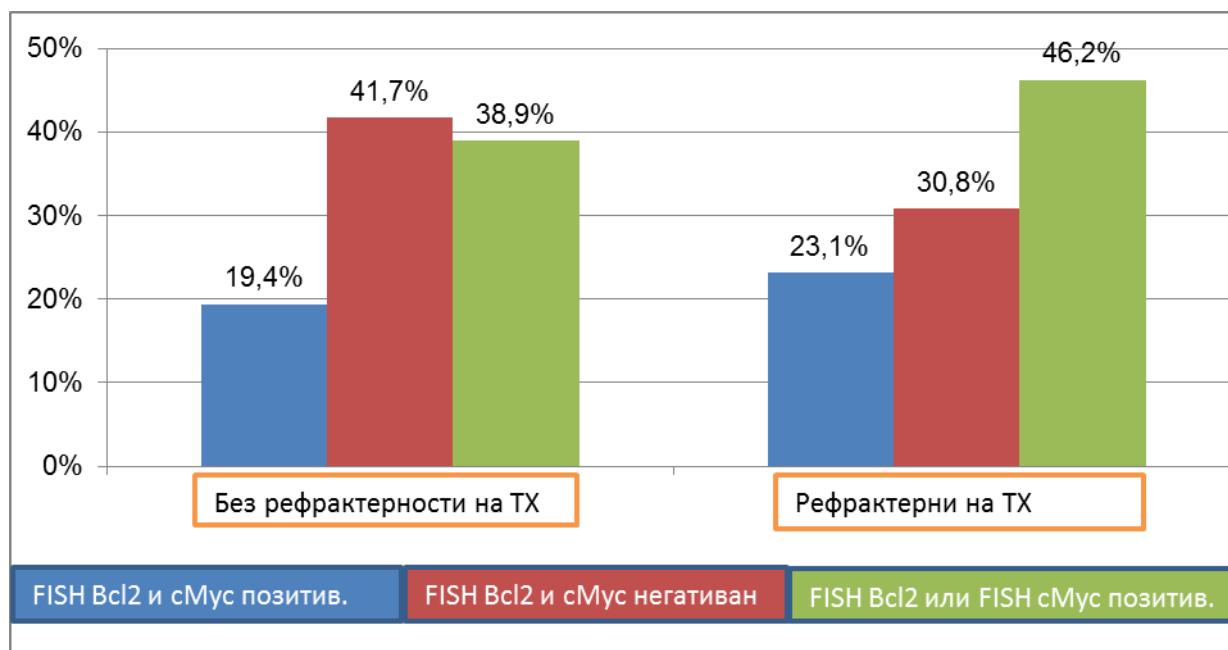
Између испитаника FISH cMyc позитивних и негативних није уочена статистички значајна разлика у односу на појаву рефрактерности оболелих на терапију ( $\chi^2$ -тест,  $p=0,800$ ), (табела бр. 28). У обе групе испитаника, оболели са позитивним FISH cMyc налазом, били су приближно исто заступљени, (графикон бр.85).



Графикон бр. 85. Учесталост FISH cMyc међу испитаницима рефрактерним на терапију

Учесталост испитаника са присутна оба полиморфизма *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*, са присутним бар једним или са негативна оба генска полиморфизма *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*-а, није се статистички значајно разликовала, посматрано на појаву рефрактерности на терапију ( $\chi^2$  тест,  $p=0,681$ ), (табела бр. 28). Оба полиморфизма имало је око 20% испитаника из групе оболелих који су имали неки одговор на примењену терапију, док је у групи рефрактерних било нешто више 23,1%. Нешто више испитаника са бар једним полиморфизмом било је заступљено у групи рефрактерних на терапију 46,2%, док је у групи са било каквим одговором на терапију било 38,9%.

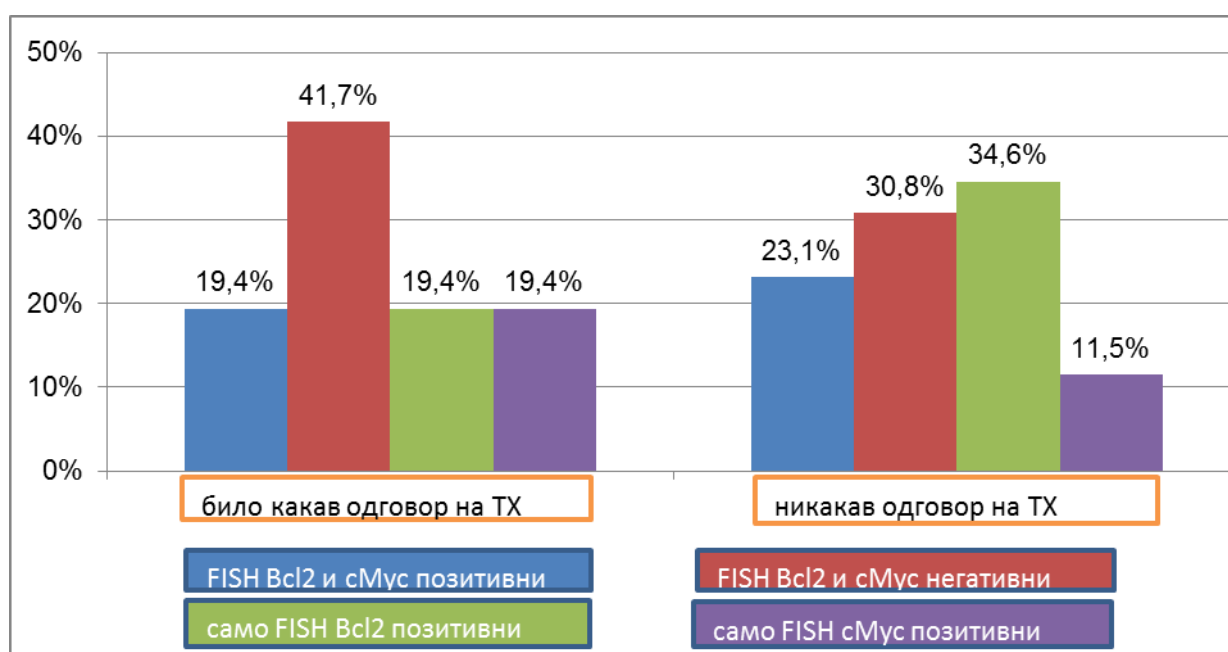
Испитаници који су били негативни за *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* више су били заступљени у групи са постигнутим неким одговором на примењену терапију 41,7%, док је у групи рефрактерних учесталост негативног налаза за генски полиморфизам *Bcl2* и *cMyc* била 30,8%, (графикон бр.86).



Графикон бр. 86. Учесталост *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* међу испитаницима рефрактерним на терапију

Посматрано у односу на појаву рефрактерности на терапију, статистички значајна разлика није уочена ни у заступљености испитаника са оба позитивна *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* налаза, са оба негативна налаза, са присутним само *FISH Bcl2* позитивним налазом и са присутним само *FISH cMyc* спозитивним налазом ( $\chi^2$  тест,  $p=0,474$ ), (табела бр. 28).

Анализом болесника са било каквим одговором на терапију (комплетна ремисија и парцијална ремисија) у односу на болеснике који су (одговор мањи од парцијалне ремисије, без прогресије или са прогресијом), утврдили смо да су *FISH cMyc* позитивни испитаници били више заступљени у групи са неким одговором на терапију- 19,4%, док је *FISH Bcl2* позитивних испитаника било више у групи без одговора на терапију 34,6%. Одсуство оба генска полиморфизма било је учесталије у групи са било каквим одговором 41,7% у односу на оне који су били без одговора 30,8%. Позитивност за оба генска полиморфизма била је учесталија у групи болесника без одговора 23,1%, у односу на оне са одговором 19,4%, (графикон бр. 87).



Графикон бр. 87. Учесталост *FISH Bcl2* и *cMyc* међу испитаницима са било каквим, односно никаквим одговором на терапију

### 8.1. Сензитивност и специфичност генског полиморфизма у предикцији рефрактерности на терапију

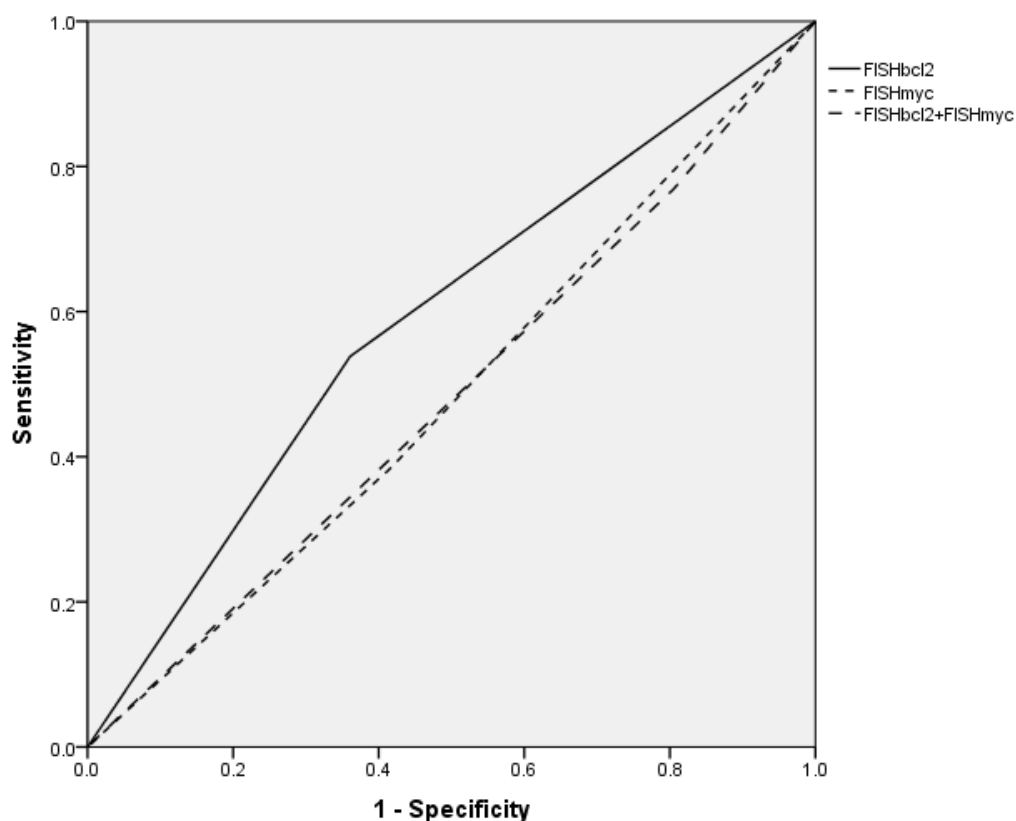
За сваки од ових полиморфизама *FISH Bcl2* и *FISH cMyc*, као и за комбинацију оба одређивана је сензитивност и специфичност у предикцији рефрактерности на терапију, (табела бр.29).

Генски полиморфизам	Сензитивност	Специфичност	Површина испод ROC криве (95% CI) (AUC)*
<b>FISHbcl2</b>	0,538	0,639	0,589 (0,444-0,734)
<b>FISHmyc</b>	0,385	0,583	0,484 (0,337-0,631)
<b>FISHbcl2+FISHmyc</b>	0,462	0,592	0,482 (0,335-0,629)

*AUC-Area under the Curve*

Табела бр. 29. Валидност посматраних генских полиморфизама и рефрактерност на терапију

И у случају предикције рефрактерности на терапију добијене вредности сензитивности и специфичности указују нам на малу ваљаност посматраних генских полиморфизама у предвиђању појаве рефрактерности на терапију, (графикон бр. 88).



Графикон бр.88. ROC криве рефрактерности на терапију

## 9. ДИСКУСИЈА

Дифузни Б крупноћелијски лимфом представља најчешћи подтип нехочкинских лимфома, чинећи око 40% свих до сада описаних лимфома (23). По неким истраживањима он обухвата до 30% не хочкинових лимфома у развијеним земљама запада, а чини већи проценат чак до 50% у земљама у развоју и неразвијеним земљама. ДБКЛ је болест свих узраста, али најчешће се јавља у старосној доби између 65 и 69 године. (114). Многи болесници са НХЛ ДБКЛ постижу дугу ремисију, али око трећине болесника релапсира након прве терапијске линије ритуксимаб + хемотерапијски протокол, а лимфом је чак у 30% случајева непосредни узрок смрти (115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122). Дијагноза болести се поставља анализом хирушког биоптата и детаљним хистопатолошким и имунохистохемијским анализама узорка. Неопходно је утврдити степен проширености болести, на основу одређивања клиничког стадијума према *Ann Arbor* класификацији. За даље планирање терапије, данас је од великог значаја утврђивање и индекса ризика – ИПИ, као и *ECOG* перформанс статуса за сваког болесника посебно. На презентацији око 80% болесника има узнапредовалу болест у трећем или четвртном клиничком стадијуму али и тада, основни циљ лечења ДБКЛ, јесте постизање излечења у што већем проценту. Хемиотерапија има главну улогу као терапијски избор, док радиотерапија у лечењу ДБКЛ има превасходно палијативни карактер. Болест се јавља у свим узрастима, али старосна медијана је 64 године. Бележи се нешто већа учесталост у мушкараца него у жена (у односу 1,2:1), по резултатима *Anderson JR* и сарадника (123).

У литератури се наводи и чешће обољевање припадника мушког пола са односом и до 1:1,5 по истраживању од 2001.године *Manns* –а и сарадника (124). У нашој студији није утврђена статистички значајна разлика међу половима, али је утврђена статистички значана разлика у старосној доби између испитаника са различитим исходом. Испитаници са леталним исходом били су старости од 32 до 82 године са просечном старошћу од 68,5 година, док је у групи живих старосна доб била од 21 до 80 година, са просечном старошћу од 53,0 године. Наше истраживање показује нешто старију популацију оболелих од НХЛ ДБКЛ, у односу на литерарне податке, а при том не прати ни литерарно наведени однос обољевања међу половима. У овој



студији утврђује се доминација високог клиничког стадијума на презентацији међу оболелима, а у испитаника са смртним исходом чак 90% је у клиничком стадијуму три или четири. У групи живих испитаника доминирају болесници у другом клиничком стадијуму. Претходно наведено, одговара налазима у литератури који потичу са са неких других географских простора.

Један од најважнијих клиничких предиктора преживљавања у болесника са ДБКЛ је ИПИ који подразумева године болесника, клинички стадијум болести утврђен по *Ann Arbor* класификацији, вредност серумске лактат дехидрогеназе, перформанс статус и број екстранодалних места, сврставајући болесника у групу ниског, средње ниског, средње високог и високог ИПИ ризика. Студије које су следиле потврдиле су валидност прогностичког значаја ИПИ индекса у болесника са НХЛ ДБКЛ (125, 126, 127).

Не двосмислену предиктивну улогу у исходу испитаника у нашој студији имао је такође ИПИ ризик. Између испитаника преживелих и оних са смртним исходом уочена је статистички значајна разлика у ИПИ ризику. Испитаници са смртним исходом имали су виши ИПИ ризик. У нашем истраживању добијене су статистички значајне разлике између испитаника са ниским и испитаника са средње високим ИПИ ризиком и високим ризиком, између испитаника са средње ниским и испитаника са средње високим и високим ризиком, док разлика у преживљавању са средње ниским и ниским ризиком и испитаника са средње високим и високим ризиком није била статистички значајна. Једногодишње преживљавање за испитанике са високим ризиком било је 28,6% и нико од испитаника са овим ризиком није живео дуже од 14 месеци. Наши резултати су у сагласности са литерарним који утврђују да је најрелевантнији прогностички алгоритам - ИПИ ризик, базирајући се на клиничким и биохемијским параметрима (128).

*ECOG* перформанс статус је један од прогностичких параметара који предиктивно показује исход болести. Утврђује се приликом постављања дијагнозе болесника и одређује његово кондиционо стање. Овом студијом смо утврдили да је висок *ECOG* директно повезан са лошим исходом новооболелих од НХЛ ДБКЛ без обзира на примењени исти третман. Повезаност коморбидитета и преживљавања је независан лош предиктор преживљавања оболелих од ДБКЛ показала је наша студија као и студија коју је извео *Charlson*, а свака дисфункција органа односно коморбидитет повезан је и са годинама (129). Функционална скала, као што је *ECOG - Zibrod skor* –

објављена је 1982.године и показује високу корелацију са лошим исходом болести, што смо потврдили и међу болесницима у овој студији. Ова скала носи име по *C. Gordon Zubrod*-у који ју је начинио са опсегом од 0 до 5. Нула (0) – репрезентује одлично стање док - 5 означава смрт, и у употреби је за процену код болесника са различитим врстама малигнитета (130). Статистички значајан утицај на морталитет показао је и *ECOG* статус, живи болесници су у значајно већем броју били *ECOG* статуса 0, док у групи испитаника са смртним исходом чеће су били *ECOG* статуса 1 и 2. *ECOG* статус 3 и 4, био је чешћи у болесника са смртним исходом. Анализом утицаја примарно нодалне и екстранодалне локализације болести међу нашим испитаницима дошло се до закључка да те варијабле немају утицаја на прогнозу болести и укупно преживљавање болесника (131).

Присуство или одсуство „*Bulky*“ форме болести није показало статистички значајну разлику посматрано у односу на морталитет испитаника. Позитиван „*Bulky*“ статус био је заступљен у једној трећини случајева у обе исходишно посматране групе болесника. У литератури у *MinT* студији присуство „*Bulky*“ форме болести је лош прогнозни параметар (132). Код болесника са присутним Б симптомима (презнојавање, повишена температура и губитак у телесној тежини већи од 10% за последњих шест месеци) је утврђено, посматрано у односу на исход, статистички значајна разлика у заступљености испитаника са Б симптомима, у односу на оне који симптоматологију немају. Овом студијом смо утврдили већу статистички учесталост испитаника са Б симптоматологијом у групи са смртним исходом. Претходно наведено је у корелацији са литералним подацима, а посебно са две велике студије *GELA* и *MinT* (132, 133).

Учињеним испитивањем биохемијских параметара у нашој студији смо утврдили да вредности седиментације, фибриногена, алкалне фосфатазе, ALT, гама GT немају предиктиван значај на исход болести. Учињена анализа комплетне крвне слике, анализа леукоцита и леукоцитарне формуле, као и броја тромбоцита није показала статистички значајну разлику у посматраним испитаника са различитим исходом.

Анализа LDH у болесника са различитим исходом показала је статистички значајну разлику као лош прогнозни параметар, значајно су биле више вредности LDH у болесника са леталним исходом. Претходно је потврђено и у ранијим студијама, као предиктивно лош параметар (131, 132, 134)

Као лош прогнозни параметар у нашем истраживању се издвајају и: CRP, D – димер, мокраћна киселина, гвожђе у серуму и ниска вредност хемоглобина, показујући високо статистички значајну разлику између оболелих од НХЛ ДБКЛ са леталним исходом и живих испитаника. Све претходно наведене анализе су узорковане претретмански у моменту постављања дијагнозе.

## 9.1. Значај Ki-67

Ki-67 је нуклеарни протеин блиско повезан са пролиферацијом. Пролиферативна фракција детектована имунохистохемијским маркером Ki-67 се креће од 40% до преко 90% код оболелих од ДБКЛ. У нашем узорку експресија Ki-67 је била је са распоном од 30% до 95%. Висок пролиферативни индекс установљен имунохистохемијском анализом Ki-67 је углавном повезан са лошијом прогнозом болести. Са друге стране висок пролиферативни индекс чини лимфом остетљивијим на терапију. У нашем испитивању није утврђена корелација вредности пролиферативног индекса са исходом. Није уочена статистички значајна разлика у вредностима Ki67, између групе са леталним исходом и живих испитаника, а није утврђена статистички значајна разлика између испитаника са вредностима учесталости Ki67% мањим и већим од 50%. И код живих и код испитаника са смртним исходом учесталост оболелих са Ki-67 већим од 50% била је приближно иста. У групи живих 34,2% испитаника имало је вредност овог параметра преко 50%, а у групи умрлих њих 38,5%, испитивано 90 оболелих. *Miller* и сарадници су на 60 оболелих испитивали повезаност експресије Ki-67 и прогнозе и закључили да је експресија Ki-67 преко 80% повезана са лошијом прогнозом (135).

Нашом студијом нисмо доказали да у оболелих од НХЛ ДБКЛ, вредности Ki67% веће и мање од 50%, статистички значајно утицале на преживљавање. Значај пролиферативне активности је контраверзан, по неким студијама висока пролиферативна активност била је знак лоше прогнозе *Jerkmen* и сарадници, по некима знак добре прогнозе *Hasselblom* и сарадници. Нека истраживања су показала као и наше, на пример *Lianos* и сарадници да вредност пролиферације, Ki 67 није имала утицај на прогнозу оболелих од НХЛ ДБКЛ (136, 137, 138). *Colomo* и сарадници током испитивања 128 болесника такође нису пронашли корелацију експресије Ki-67 и прогнозе (139). *DNA microarray* технологија омогућава испитивање експресије хиљада гена одједном. Пун потенцијал *microarray* технологије се још не зна. *Array* генске

скспресије и квантитативни *PCR* за анализу експресије многобројних гена се за сада не користе рутински у клиничкој пракси. Разлози су што захтевају свеже узорке тумора, пуно рада, добро обучено особље и скупо је.

## 9.2. Значај *Bcl2*

Транслокације  $t(14;18)(q32;q21)/Bcl-2$  реаранжман се региструје код 15-20% болесника са ДБКЛ. Већина ових Дифузних Б Крупноћелијских лимфома настаје трансформацијом из Фоликуларних лимфома, а код већине су присутне и додатне цитогенетске аберације укључујући 17p13/p53 (140). Програмирану ћелијску смрт или апоптозу контролише скуп гена којима се ефикасно одстрањују непотребне или оштећене ћелије. Апоптоза је неопходна за одржавање хомеостазе организма, одстрањење штетних ћелија спречавајући разна обољења међу којима су малигне болести најзначајније. Поремећена функција неког од гена који учествује у апоптози може довести до бесмртности ћелија, те неконтролисаног бујања и раста малигнућ ћелија и настанка тумора. *Bcl2* протеин има антиапоптотско дејство и регулише све главне типове ћелијске смрти, апоптозу, некрозу и аутофагију. *Bcl2* је први ген "против смрти" који је откривен, означивши нову еру у истраживању ћелијске смрти (141).

*Bcl-2* као антиапоптотски протеин игра важну улогу у развоју и диференцијацији Б лимфоцита. Његова експресија у ДБКЛ је, у већини великих студија на болесницима лечених хемиотерапијом, повезана са резистенцијом на хемиотерапију и лошијом прогнозом (72, 142). Једна од генских лезија која је повезана са прогресијом и лошим исходом различитих тумора је генска амплификација. У ДБКЛ је утврђено присуство амплификације *REL*, *MYC*, *BCL-2*, *GLI*, *CDK4*, као и амплификација *MDM2* гена која је повезана са унапредовалим клиничким стадијумом у моменту постављања дијагнозе. (143). Студије профила генске експресије су потврдиле да постоје молекуларно различите подгрупе унутар ДБКЛ које имају различит исход након терапије са антрациклинским протоколима (144). После увођења имунотерапије – ритуксимаб је придодат стандардној хемиотерапији у НХЛ ДБКЛ, а прогноза болесника са *Bcl-2+* дифузним Б крупноћелијским лимфомом се значајно поправила, што је најпре показано на узорцима великог броја болесника из рандомизиране *GELA* студије (145). *Muris* и сарадници током истраживања на 71 болеснику, повезали су експресију *Bcl2* са лошијом прогнозом, *Berglund* и сарадници анализирајући 161 болесника, а *Sjo* и сарадници анализирајући 108 болесника повезали су експресију *Bcl2* такође са лошијом

прогнозом (146, 147, 148). *Mounier* и сарадници су дошли до закључка да употреба *Rituximab*-а омогућује успешност терапије и код болесника са *Bcl2* експресијом (149, 150). *Wilson* и сарадници су истраживањем на 140 болесника, утврдили да додатак ритуксимаба стандардном протоколу *CHOP* поништава негативан прогностички утицај *Bcl2* позитивности (151). Многа истраживања су показала лош прогностички ефекат експресије *Bcl2* и пре и након увођења ритуксимаба у терапију. Учињеним нашим истраживањем нисмо утврдили значајну разлику у преживљавању и исходу болести, новодијагностикованих болесника од ДБКЛ у којих је *FISH* анализом утврђен генски полиморфизам t(14;18) односно утврђена позитивност или негативност *Bcl2*, иако је учесталост *FISH*-ом детектоване *Bcl2* позитивности била учесталија у групи болесника са лошим исходом, али без статистичке значајности, а сви су третирани имунохемотерапијом. Није утврђена статистички значајна разлика у преживљавању *Bcl2* позитивне и негативне групе болесника нодалне локализације НХЛ ДБКЛ ни у испитивању *Young-HaOh* и сарадника (152). Међутим *Bcl 2* позитивни болесници утврђени класичном имунохистохемијом показали су значајно статистички лошије преживљавање у нашем испитивању у односу на негативне болеснике. *Bcl2* позитивност имунохистохемијски утврђена је у 58 болесника, чинећи 56,2% испитаника. Позитиван налаз у наших испитаника представља лош прогностички знак. Једногодишње преживљавање *Bcl2* негативних испитаника било је 67,6%, двогодишње 60,8% и није се мењало до краја периода праћења од 90 месеци, а код ових испитаника није постигнута медијана преживљавања, обзиром да је током посматраног периода праћења више од половине болесника преживело. Али у групи са позитивним налазом преживљавање после годину дана је било 44%, после две године 37,7%, после три 28,2% колико је било и на крају периода праћења од 88 месеци. Медијана преживљавања испитаника *Bcl2/ИХХ* позитивних била је 10 месеци (95% CI 6,89-13,11 месеци).

### **9.3. Значај *Bcl6/ ИХХ* позитивности**

У нашој студији није утврђен статистички значајан утицај позитивног налаза на *Bcl6/ИХХ* на преживљавање испитаника оболелих од НХЛ ДБКЛ. Једногодишње преживљавање испитаника са негативним налазом је било 58,4%, двогодишње 48,3%, трогодишње 40,1% и није се мењало до краја деведесето месечног периода праћења. Код испитаника са позитивним налазом преживљавање после годину дана износило је 41,5% и није се мењало до краја 84 месеци праћења. Наши резултати су у сагласности

са резултатима *Colomo* и сарадника који током испитивања 128 болесника нису пронашли повезаност експресије *Bcl6* са прогнозом (139). Нека истраживањима су показала да је позитивна експресија *Bcl6* повезана са бољом прогнозом, на пример истраживање *Berglund*-а и сарадника (153). *Bcl-6* је транскрипциони фактор на N-терминалној *POZ* домена а ген је локализован на позицији 3q27 на крају хромозома. *FISH*-ом се детектује транслокација t(3;14). *Bcl-6* се нормално експримира у многим ткивима, али у Б ћелијама је углавном ограничен на Б ћелије Герминативног Центра. У герминативном центру *Bcl-6* игра улогу репресије транскрипције многих таргет гена који учествују у апоптози, одговоран је за оштећење ДНК, контролу ћелијског циклуса, пролиферацију и диференцијацију (154, 155, 156). Важне директне мете измењеног *Bcl6* су *Bcl-2*, *TP53*, *IRF4* и *BLIMP-1* који касније постају неопходни у сазревању, односно матурацији плазма ћелија (157, 158). Хромозомска преуређења која захватају *Bcl6* ген се јављају у различитим процентима. Када су у питању ДБКЛ, промене на нивоу *Bcl 6* се јављају у од 49 – 61% болесника, али се транслокација повезана са *Bcl-6* може наћи и у неких фоликуларних лимфома, чак и неки Б лимфоми маргиналне зоне. *Bcl6* ген је ген инхибитор транскрипције, а утиче на ћелијски циклус преко великог броја других гена (159). У *Mitelman date base* наводи се само 8% од свих испитаника са ДН (*c-MYC*+/*BCL6*+), а подаци су врло дискутабилни јер је прекид лоциран на хромозому 3, који се често током анализе изгуби. Свакако постојање *Bcl6*+ је од важности због губитка сопствене функције и индиректног учешћа у патологији лимфома.

#### 9.4. Значај *cMyc*

Транслокација t(8;14)(q24;q23), *c-Myc* (*MYC*) промотер за *immunoglobulin heavy chain* (*IGH*) је прва транслокација детектована у лимфоидним неоплазмама (160). Ова транслокација се може идентификовати и у *Burkitt*-овом лимфому, посебно у ендемским случајевима, 30–50% неклассификованих Б ћелијских лимфома који су по особинама између дифузног Б крупноћелијског лимфома и *Burkitt* лимфома и у малом проценту Дифузних Б крупноћелијских лимфома без посебних карактеристика (*engl. not otherwise specified - NOS*). У серијама неселектованих Дифузних Б Крупноћелијских лимфома, реаранжман *Myc* гена се открива у 5 до 10% случајева (70, 72, 161, 162, 163, 164). Учесталост генског полиморфизма *cMyc* у нашој ретроспективној неселективној серији новооболелих од ДБКЛ из узорка при постављању дијагнозе било је 25, односно 27,8%, што је учесталије него што се у литератури описује, а највероватније је последица високе пролиферативности и високог клиничког стадијума. У групи са

позитивним *FISH c-Myc* налазом, преживљавање после годину дана било је 60%, после две године 52%, после три 42,5% колико је било и после 88 месеци праћења. За ову групу испитаника медијана преживљавања износила је 33 месеца (95%CI 0,50-65,50).

Једногодишње преживљавање испитаника са негативним *FISH c-Myc* налазом било је 58,5%, двогодишње 51,4%, трогодишње 44%, колико је било и после 84 месеца праћења. Медијана преживљавања ове групе испитаника била је 25 месеци (95%CI 3,15-46,85).

Статистички значајна разлика у преживљавању између ове две групе наших испитаника, није уочена. Анализирајући *FISH c-Myc* позитивне испитанике ниског и високог интернационалног прогностичког индекса није показало статистички значајну разлику у преживљавању у нашој студији у праћеном периоду од 90 месеци. Наши резултати нису у сагласности са онима који се наводе у литератури.

Аутори *Savage KJ*- анализирајући 245 биопсија, а са *FISH*-ом позитивних 35 односно 14%, наводи да је *Myc* позитивна транслокација повезана са лошијим преживљавањем. *Rimsza LM* са колегама анализирајући 36 различитих гена у НХЛ ДБКЛ-у показује да постојање *Myc* транслокације, доводи до лошег исхода и лошег укупног преживљавања у болесника лечених са *R-CHOP*, постављајући питање оптималног третмана ових високо ризичних болесника (70, 71, 165). *Alexandar Tzankov* са сарадницима, наводи да су сви типови *Myc* реаранжмана повезани са лошијим преживљавањем, јер 20 од 39 је умрло, медијана преживљавања је била 42 месеца, што у поређењу са 98 од 393 умрлих међу онима који су без *Myc* реаранжмана, медијана у овој групи није достигнута. Испитаници са *Myc* реаранжманом који имају и висок ниво *Myc* протеина су високо ризични независно од ИПИ ризика. Показало се да истовремено постојање и *Bcl2* полиморфизма, амплификује лошу прогнозу, за разлику од постојања *Bcl6* позитивности. Нашим испитивањем је такође показано да постојање генског реаранжмана *cMyc*, утврђеног *FISH*-ом није у корелацији са ИПИ ризиком, заправо није у корелацији са групом високог односно ниског ризика (166).

Претходно описане су појединачне (*engl. singl mutation*), генске промене. Генске анализе у НХЛ ДБКЛ су показале постојање и више реаранжмана истовремено. Постојање *Bcl2* и *c-Myc* мутације истовремено, описује се као двострука мутација (*engl. Double –Hit mutation*). Ово је најчесталија двострука мутација и чини 62% свих *DH* мутација у лимфомима у *Mitelman database*.

У нашем истраживању *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* имало је 13, односно 14,4% испитаника. У групи оболелих са оба позитивна генска полиморфизма преживљавање после годину дана било је 53,8%, после две године 38,5%, после три године 30,8% и толико је било и на крају периода праћења од 78 месеци. Медијана преживљавања испитаника са оба позитивна налаза била је 14 месеци (95%CI 0-35,14).). Наши резултати су у сагласности са литерарним резултатима медијане *Over Survival* са других простора на којима је она од 0,2 до 1,5 година односно од 2 месеца до 18 месеци (167, 168, 169, 170, 171, 172). У групи испитаника који су *FISH Bcl2* и *cMyc* позитивни и ниским ИПИ ризиком, једногодишње преживљавање је било 83,3%, двогодишње 66,7% и није се мењало до краја периода праћења од 78 месеци. Код испитаника са високим ИПИ ризиком и позитивним налазом *FISH Bcl2* и *FISH cMyc* геном, преживљавање после годину дана износило је 28,6%, после две 14,3%, док нико од оболелих из ове групе није живео дуже од три године. Статистички значајан утицај када су оба позитивна генска реаранжмана *FISH Bcl2* и *c-Myc* на преживљавање није уочен ни код испитаника са ниским нити код испитаника са високим ИПИ ризиком. Испитаници код којих није детектован нити један генски реаранжман имали су медијану преживљавања од 25 месеци (95%CI 7,63-42,37), преживљавање након годину дана било је 64,9%, после две године 53,6%, после три 41,7% и није се мењало до краја праћења од 84 месеца.

Учесталост од 14,4% у нашем испитивању учињена на микроерејима флуоресцентном *in situ* хибридизацијом, нешто је већа, него истим начином утврђивана учесталост *Double –Hit mutation* у студијама неселектованих ДБКЛ као што је и наша. *Obermann* са сарадницима 2009.године изналази на 220 /1(0%), *Copie-Bergman* и сарадници 2009.године 71/0 (0%), *VanImhorff* и сарадници 2006.године 59/3 (5%), док *Savage* са сарадницима 2009.године од 117/3 (2%) (173, 174, 175, 176).

У литератури се наводи различита учесталост „*Double –Hit* “НХЛ ДБКЛ, тако да *Tina Marie Green* са коауторима, идентификује 11/189 болесника односно 11% болесника са ДН и са лошим исходом, а слично наводе и друге студије потврђујући лоше клиничке и прогнозне карактеристике у оваквих болесника (71, 172, 177, 178). Висока експресија имунохистохемијски утврђене позитивности *Bcl-2* и *cMyc* повезана је такође са лошом прогнозом (179). Различита учесталост дијагностикованих „ *Double –Hit* “НХЛ ДБКЛ-а расте последњих деценија, посебно после 1994. године, до када се бележила учесталост до 3%. У периоду између 1980.године до 2009.године од 804 ДБКЛ / 109 су били *Double –Hit* лимфоми, док је само 12 од 445 ДБКЛ презентовано за



период до 1995.године. Заправо претходно наведено је вероватно последица пораста интересовања за лимфоме, измењене класификације, а такође и побољшаних техника генске анализе. *DNA microarray* технологија омогућава испитивање експресије хиљада гена одједном. Пун потенцијал *microarray* технологије се још незна. *Array* генске експресије и квантитативни *PCR* за анализу експресије многобројних гена се за сада не користе рутински у клиничкој пракси. Разлози су следећи: захтевају свеже узорке тумора, пуно рада, добро обучено особље и скупо је.

Анализом терапијског одговора испитаника који су третирани имунохемотерапијом по протоколу *RCHOP* у 6 или 8 циклуса на 21 дан, показали смо да се постизање комплетне ремисије, односно одсуства болести између болесника са смртним исходом и живих значајно разликује. У испитиваној популацији комплетна ремисија постигнута је код 86,8% живих испитаника и код 11,8% испитаника са смртним исходом у периоду праћења од 90 месеци, а то је у складу са литерарним подацима и великим студијама *GELA* и *MinT*. Публиковани радови *Green-a* и сарадника и *Johnson-a* и сарадника указују да популација оболелих од ДБКЛ –а карактерисана експресијом *cMyc* и *Bcl-2* протеина истовремено, утврђено класичном имунохистохемијом, показује лошију прогнозу ако су третирани стандардним протоколом-*rituximab+CHOP (R-CHOP)*. Можда упозоравајући на потребу трагања за алтернативним третманом путем студија за овакве болеснике. Тим пре што је *cMyc* протеин експресија повезана са *cMyc* транслокацијом, па све *cMyc* протеин позитивне болеснике треба тестирати на *cMyc* транслокацију *FISH* анализом (180, 181).

Трагајући за предикторима од којих зависи терапијски одговор, односно постозање комплетне ремисије терапијом прве линије, испитивањем смо утврдили да постоји статистичка значајност утицаја клиничког стадијума болести по *Ann Arboru* и Интернационалног Прогнозног Ризика (ИПИ) на укупан терапијски одговор. Међугрупном анализом се показало да је бољи прогнозни фактор нижи клинички стадијум први или други, а лошији трећи и четврти, што је утврђено и великим студијама *GELA* и *MinT*. Анализом постизања комплетне ремисије и утврђеног ИПИ ризика међу нашим испитаницима, утврђена је висока међузависност. Испитаници са ниским ИПИ ризиком су постигли комплетну ремисију у 92,9%, са средње ниским ИПИ ризиком комплетна ремисија остварена је у 81,8%, а у оних са средње високим ризиком комплетна ремисија постигнута је у 69,2% испитаника, што је сагласности са литералним подацима (49, 115).

## 10. ЗАКЉУЧЦИ

На основу учињеног истраживања дошли смо до следећих закључака:

1. Генски полиморфизам *Bcl-2+* и *cMyc+*, како појединачни тако и удружени, немају утицаја на терапијски одговор и укупно преживљавање у болесника са Дифузним Б крупноћелијским лимфомом третираних стандардном имунохемотерапијом.
2. Код болесника са ДБКЛ, лечених имунохемотерапијом, исход лечења није у корелацији са генским полиморфизмом *Bcl-2+* и *cMyc+* утврђених *FISH*-ом како појединачно, тако ни удружено (*енгл.: Double Hit*)
3. Истовремено постојање *cMyc+* и *Bcl-2+* не показују корелацију са ИПИ ризиком.
4. ИПИ скор не може бити предиктор одлуке о обавезном тестирању на генски полиморфизам, и тиме омогућити индивидуалан терапијски приступ без непотребног исцрпљивања болесника стандардном терапијом прве линије.
5. Статистички не постоји разлика у исходу болести и укупном преживљавању између оболелих од Дифузног Б крупноћелијског лимфома који је *Bcl-2+* на *FISH*-у (*енгл: single mutation*), у односу на оне који су *Bcl-2-*, нити постоји разлика у исходу и укупном преживљавању болесника са Дифузним Б крупноћелијским лимфомом који је *cMyc+* на *FISH*-у (*енгл: single mutation*) у односу на болеснике који су *cMyc-*.
6. Постојање *cMyc+* и *Bcl-2+* истовремено (*енгл: Double Hit Mutation*) показује лошији одговор на терапију у односу на *cMyc-* и *Bcl2-* Дифузне Б Крупноћелијске лимфоме, али без статистички утврђене значајности.
7. Постоји разлика у учесталости *Bcl2+* утврђеног *FISH*-ом (висок ИПИ ризик 47,2% vs. низак ИПИ ризик 38,5%) али без статистичке значајности међугрупном анализом ( $\chi^2$  тест,  $p=0,492$ ).
8. Постоји разлика у учесталости *cMyc+* утврђених *FISH*-ом (висок ИПИ ризик 36,1% vs низак ИПИ ризик 46,2%) али без статистичке значајности међугрупном анализом, ( $\chi^2$  тест,  $p=0,426$ ).

9. Упоредна анализа прогнозног значаја двоструких мутација (енгл: *Double Hit mutation*) и ИПИ скора није показала статистички значај на преживљавање ни код испитаника са ниским ризиком ( $\chi^2$  тест,  $p=0,264$ ) ни код испитаника са високим ИПИ ризиком ( $\chi^2$  тест,  $p=0,121$ ). У групи испитаника са оба позитивна полиморфизма *Bcl2* и *cMyc* и ниским ИПИ ризиком, једногодишње преживљавање било је 83,3%, двогодишње 66,7% и није се мењало до краја периода од 78 месеци праћења.
10. Код испитаника са високим ИПИ ризиком и позитивним полиморфизмом *Bcl2* и *cMyc* утврђених *FISH*-ом, преживљавање после годину дана износило је 28,6%, после две године 14,3%, док нико од оболелих из ове групе није живео дуже од три године.
11. Испитаници рефрактерни на терапију имали су статистички значајно краће преживљавање од испитаника који су имали било какав одговор на примењено лечење, нико из ове групе испитаника није живео дуже од 33 месеца. Статистичком анализом није утврђена корелација постојања генских мутација и рефрактерности на терапију у овој студији. И у случају предикције рефрактерности на терапију добијене вредности сензитивности и специфичности указују нам на малу ваљаност посматраних генских полиморфизама у предвиђању појаве рефрактерности на терапију.
12. Резултати молекуларних анализа морају се корелирати са клиничким, морфолошким и имунохистохемијским информацијама.
13. Постизање комплетне ремисије или одсуства болести, након примене прве терапијске линије (имунохемотерапије) није зависило од присуства тестираних генских мутација, како појединачно тако ни удружено.

Све претходно наведено, сугерише да постоји истовремено више механизма који условљавају да једна трећина болесника и поред примењене терапије, умире од Дифузног Б крупноћелијског лимфома.

## 11. ПОПИС ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА

НХЛ ДБКЛ – нехочкинов дифузни Б крупноћелијски лимфом

CS – клинички стадијум (*engl. Clinical stage*)

СНОР – акроним за терапију циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном

ECOG – Eastern Oncology Cooperative Group

FISH – флуоросцентна *in situ* хибридизација

ИНС - Класична имунохистохемија (*engl. Immuno histochemistry classic-IHC*)

GCB – тип ДБКЛ порекла лимфоцита герминативног центра (*engl. germinalcenter-like*)

NK - урођено-убилачке ћелије (*natural killer*)

NKT - урођено-убилачке Т ћелије

GEP – *gene expression profiling*

ИПИ – Међународни прогностички индекс (*engl. International Prognostic Index*)

LDH – лактат дехидрогеназа

AST – аспартата трансминаза

Гама GT – гама глутамат трансминаза

ALP – алкална фосфатаза

IL - интерлеукин (*interleukin*)

OS – укупно преживљавање (*engl. Overall survival*)

CR – комплетна ремисија (*engl. Complite Remission*)

PR – парцијална ремисија (*engl. Partial Remission*)

RD – рефрактерна болест (*engl. Refracterio Disease*)

p – вероватноћа

R – ритуксимаб

WHO – Светска Здравствена Организација (*eng. World Helph Organisation*)

TMA – *engl. tissue microarray*

Пребацити граничну вредност – *енгл. Cut off*

## 12. ЛИТЕРАТУРА

1. Louis Rosenfeld. Thomas Hodgkin: Morbid Anatomist & Social Activist. Madison Books, Lanaham; 1993.
2. Rappaport H, Winter W, Hicks E. Follicular lymphoma A reevaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on survey of 253 cases. *Cancer*, 1956;9: 792-821.
3. Lukes R, Collins R. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*, 1974; 34: 1488-1503.
4. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B cell lymphoma. *N Engl J Med*, 2002; 346:25-31.
5. Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, et al: Lymphoma Classification –The Gap Between Biology and Clinical Management Is Closing. *Blood*, 1996; 88:4085-4094.
6. Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al: Molecular subtypes of diffuse large B –cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105: 36-43.
7. Swerdlow SH. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer: WHO of tumors of Haematopoetic and Lymphoid Tissues. World Health Organization Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2008.
8. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, 2008; 359:2313–2323.
9. Mihaljević B. New trends in non-Hodgkin's lymphoma diagnostics. In: Milenković P, editor. *New trends in Hematology*. Belgrade: Udruženje hematologa Jugoslavije; 2002; 287–299.
10. Lenz G and Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*, 2010; 362:1417–1429.
11. Rodriquez M, Cabanillas F, Deisseroth A: Non-Hodgkin Lymphoma. In: *Hematology A Problem –Oriented Approach*, Williams & Wilkins, Baltimore 1996, 325-337.
12. Clarke CA, Glaster Sl. Chaging incidence of non Hodgkin lymphomas in the United States. *Cancer*, 2002; 94:2105-20123.

13. Marković-Denić Lj, Živković S, Šipetić S. Umiranje od Malignih Hemopatija u Centralnoj Srbiji. *Acta Fac Med NAISS*, 2002; 19(2) : 88-99.
14. Nathan D. Montgomery, and Yuri Fedoriw. Pathology Consultation on Intermediate-to-Large B-Cell Lymphomas *Am J Clin Pathol*, 2014; 3:305-317.
15. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*, 2011; 43:830–837.
16. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis Re, et al. Distinct types of diffuse large B cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 2000; 403: 6769-6773.
17. Nogai H, Dorken B, and Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 2011; 29:1803–1811.
18. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009, 523-531.
19. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Melanoma. 2011;V 2: Accessed March 28, 2011. Available at [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/nhl.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nhl.pdf).
20. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 1997; 89:3909-3918.
21. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M i sur. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*, 2007; 109:1857-1861.
22. Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non – Hodgkin’s lymphoma. *Oncogene*, 2004; 23: 38-43.
23. Wu XC, Andrews P, Chen VW, et al. Incidence of extranodal non- Hodgkin’s lymphomas among whites, blacks, and Asian /Pacific Islanders in the United States: anatomic site and hystology differences. *Cancer Epidemiol*, 2009;33(5): 337-346.
24. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*, 1998; 9:717-720.
25. Clarke CA, Glaser SL. Chaging incidence of non Hodgkin lymphomas in United states. *Cancer*, 2002; 94: 2105-2123.

27. Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, Salaverria I, Puig X, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol*, 2004; 22: 3498-3506.
28. Dave BJ, Nelson M, Pickering DL, Chan WC, Greiner TC, et al. Cytogenetic characterization of diffuse large cell lymphoma using multi-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002; 132: 125-132.
29. Lossos IS. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2005; 23: 6351-6357.
30. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2006; 24: 995-1007.
31. Vafa O, Wade M, Kern S, et al. C-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: A mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell*, 2002; 9:1031–1044.
32. Sehn LH. A decade of R-CHOP. *Blood*, 2010; 116: 2000–2001.
33. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2008; 26:4587–4594.
34. Fisher RI, Longo DL, DeVita JR, et al: Long – term follow –up of ProMACE-Cyta BOM in non-Hodgkin’s lymphomas. *Ann Oncol*, 1991; 2 (suppl 1): 33.
35. Marcus R, Hagenbeek A. The therapeutic use of rituximab in non –Hodgkin ‘s lymphoma. *Eur J Haematol*, 2007; 67: 5-14.
36. Mitrović Z. Aurer I. Rituximab u lečenju B – staničnih ne Hodgkinovih limfoma. *Lijec Vjesn*, 2006; 128: 36-42.
37. Coiffier B, Best HJ, Omnes JC, Hornberger JC. Cost-Effectiveness of Rituximab in Treatment of Diffuse Large B cell lymphoma. *Oncology*, 2002; 16 (Suppl 2): 16-17.
38. Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ, Dror Michaelson M, Mitsiades CS, Goss PE, Ryan DP, Ramachandra S, Richardson PG, Supko JG, Wilson WH. Antineoplastic agents. Section IX: Chemotherapy of neoplastic diseases. Chapter 51. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11<sup>th</sup> ed. New York: The McGraw-Hill Companies Inc., 2006; 1315-1403.

39. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 1994; 83: 435-445.
40. Artron G, Waiter H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*, 2004; 104: 2635-2642.
41. Grillo-López AJ. Rituximab (Rituxan/MabThera):the first decade(1993–2003). *Expert Rev Anticancer Ther*, 2003; 3(6):767–779.
42. Czuczman M, Weaver R, Alkuzweny B, et al. Prolonged clinical and molecular remission in patients with low-grade or follicular non Hodgkin's lymphoma treated with rituximab plus CHOP chemotherapy: 9-year follow –up. *J Clin Oncol*, 2004; 22: 4711-4716.
43. Hidemann W, Kneba M, Dreyling M, et al. Fronte –line therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome of patients with advanced stage follicular lymphomas as compared to CHOP alone-results of prospective randomised study of German low grade lymphoma study group (SLSG). *Blood*, 2005;106: 3725-3732.
44. Marcus R, Imre K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first –line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood*, 2005; 105: 1417-1423.
45. Czuczman M, Grillo-Lopez AJ, White CA,et al: Progression – Free Survival After six Years (Median) Folloe up of the First Clinical Trial of Rituximab / CHOP Chemoimmunotherapy. *Oncology*, 2002; 16 (Suppl 2): 9-10.
46. Advani RH, Chen H, Habermann TM, et al. Eastern Cooperative Group; Cancer and Leukemia Group B; Southen west Oncology Group. Comparision of conventional prognostic indices in patients older than 60 years with diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP in the US Intergroup Study (ECOG 4494,GALGB 9793): consideration of age greater than 70 years in an elderly prognostic index (E-IPI).*Br J Haematol*, 2010; 151(2): 143-151.
47. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, et al. Six versus eight cycles of bi –weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with agresive CD20+ B-cell lymphomas:A randomised controlled trial (RICO-VER-60). *Lancet Oncol*, 2008; 9(2): 105-110.



48. Pfreundschuh M, Trumper L, Osteoborg A, et al. CHOP- like chemotherapy plus rituximab versus CHOP –like chemotherapy alone in younger patients with good-prognosis diffuse large B cell lymphoma: A randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MinT) Group. *Lancet Oncol*, 2006; 7 (5): 379-391.
49. Gao G, Liang X, Jiang J, Zhou X, Huang R, Chu Z, Zhan Q. A systematic review and meta-analysis of immunochemotherapy with rituximab for B cell non Hodgkin's lymphoma. *Acta Oncol*, 2010; 49 (1): 3-12.
50. Mihaljević B, Sretenović S, Janković S, Anđelić B, Jaković B, Milicic B, et al. Long term results of CHOP-CHOPlike chemotherapy  $\pm$  rituximab in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Leukemia and Lymphoma, East and West Together. Leukemia Research, Clinical and Laboratory Studies*, 2007; 31 (Supp 2): PO59.
51. Mihaljević B, Anđelić B, Jaković Lj, Janković S, Sretenović A, Bila J, et al. The influence of international prognostic score and bulky disease in patients with primary mediastinal B sclerosing lymphoma treated with immunochemotherapy, *Leukemia and Lymphoma, East and West Together. Leukemia Research, Clinical and Laboratory Studies*, 2007; 31 (Supp 2): PO60.
52. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, et al. Distant types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 2000; 403: 503-511.
53. Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, et al. Clinico-pathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica*, 2009; 94(7): 935-943.
54. Chuang SS, Ye H, Du MQ, et al. Histopathology and immunohistochemistry in distinguishing Bur-kitt lymphoma from diffuse large B-cell lymphoma with very high proliferation index and with or without a starry-sky pattern: a comparative study with EBER and FISH. *Am J Clin Pathol*, 2007; 128(4): 558-564.
55. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, et al. Lymphoma/leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for large B-cell lymphoma. *New Eng J Med*, 2002; 346: 1937-1947.
56. Shipp Ma, Rossa KN, Tamayo P, Weng AP, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*, 2002; 8(1): 68-74.

57. Hans CP, Weisenburg DD, Greiner TC, Gascoyne RD, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 2004; 103: 275-282.
58. Kluin P, Schuurin E. Molecular cytogenetics of lymphoma: where do we stand in 2010? *Histopathology*, 2011; 58(1): 128–144.
59. Siebert R. Mature B- and T-cell neoplasms and Hodgkin lymphomas. In: Heim S, Mitelman F, eds. *Cancer Cytogenetics*. New York, NY: Wiley-Blackwell; 2009.
60. Siebert R, Rosenwald A, Staudt LM, Morris SW. Molecular features of B-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol*, 2001;13(5): 316-324.
61. Tzankov A, Zlobec I, Went P, et al. Prognostic immunophenotypic biomarker studies in diffuse large B cell lymphoma with special emphasis on rational determination of cut-off scores. *Leuk Lymphoma*, 2010; 51:199–212.
62. Hyo R, Tomita N, Takeuchi K, et al. The therapeutic effect of rituximab on CD5 positive and CD5 negative diffuse large B cell lymphoma. *Hematol Oncol*, 2010; 28: 27-32.
63. Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ i sur. Building an outcome predictor model for diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*, 2004;164:613-622.
64. Linderoth J, Jerkeman M, Cavallin-Stahl E, Kvaloy S, Torlakovic E. Immunohistochemical expression of CD23 and CD40 may identify prognostically favorable subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: A Nordic Lymphoma Group Study. *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 722-728.
65. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*, 2009; 15: 5494–5502.
66. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2005; 106: 1770-1777.
67. Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M i sur. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol*, 2008; 19:1921-1926.
68. Niitsu N, Okamoto M, Miura I, et al. Clinical Significance of 8q24/c-MYC translocations in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Sci*, 2009; 100: 233-237.

70. Zhang HW, Cheng NL, Chen ZW, Wang JF, et al. Clinical Impact of t(14;18) in Diffuse Large B-cell Lymphom. *Chin J Cancer Res*, 2011; 23(2):160-164.
69. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Onco*, 2007; 25:579–586.
71. Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E i sur. Clinical Relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 1998; 92:3152-3162.
73. Gualco G, Weiss LM, Harrington WJ, Bacchi CE. Nodal diffuse large B-cell lymphomas in children and adolescents: immunohistochemical expression patterns and c-MYC translocation in relation to clinical outcome. *Am J Surg Pathol*, 2009; 33: 1815-1822.
70. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*, 2006; 8:141–151.
74. Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell*, 2012; 149: 22–35.
75. Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, et al. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PloS one*, 2012; 7: e33813.
76. Kim S, Kim H, Kang H, Kim J, et al. Clinical significance of cytogenetic aberrations in bone marrow of patients with diffuse large B-cell lymphoma: prognostic significance and relevance to histologic involvement. *J Hematol Oncol*, 2013; 6:76.
77. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 1990; 348: 334-336.
78. Gotow T, Shibata M, Kanamori S, et al. Selective localization of Bcl-2 to the innermitochondrial and smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells. *Cell Death Differ*, 2000; 7: 666-674.
79. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*, 2009; 122: 437-441.
80. Petros AM, Medek A, Nettlesheim DG, et al. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 3012-3017.
81. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 1997; 90: 244-251.

82. De Paepe P, De Wolf-Peeters C. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogenous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia*, 2007; 21: 37-43.
83. Uccella S, Placidi C, Marchet S i sur. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*, 2008; 49: 1321-1328.
84. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, et al. BCL2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 2012; 26: 1383-1390.
85. Summers KE, Goff LK, Wilson AG. i sur. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 2001; 19: 420-424.
86. Jager U, Bocskor S, Le T, et al. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood*, 2000; 95: 3520-3529.
87. Wilson KS, Sehn LH, Berry B, et al. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2007; 48: 1102-1109.
88. Pero R, Palmieri D, Abgrisano T, et al. POZ-, AT-hook-, and zinc finger-containing protein (PATZ) interacts with human oncogene B cell lymphoma 6 (BCL6) and is required for its negative autoregulation. *J Biol Chem*, 2012; 287: 18308-18317.
89. Parekh S, Polo JM, Shaknovich R, et al. BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. *Blood*, 2007; 110: 2067-2074
90. Basso K, Dalla-Favera R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol*, 2010; 105: 193-210.
91. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*, 2000; 13(2): 199-212.
92. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*, 2004; 432: 635-639.

93. Basso K, Saito M, Sumazin P, et al. Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood*, 2010;115: 975-984.
94. Ueda C, Akasaka T, Ohno H. Non-immunoglobulin/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma: prognostic implications. *Leuk Lymphoma*, 2002; 43:1375-1381.
95. Tiong Ong S, Le Bean MM. Chromosomal abnormalities and molecular genetics of Non-Hodgkins lymphoma. *Seminars in Oncology*, 1998; 25: 447-460.
96. Ahmad A, Groshong JS, Matta H, et al. Kaposi's sarcoma associated herpesvirus – encoded viral FLICE inhibitory protein (vFLIP) K13 cooperates with Myc to promote lymphoma in mice. *Cancer Biol Ther*, 2010;10(10):1033-1040.
97. Bubman D, Guasparri I, Ceserman E. Deregulation of c-Myc in primary effusion lymphoma by Kaposi's sarcoma herpesvirus latency-associated nuclear antigen. *Oncogene*, 2007; 26(34): 4979-4986.
98. Van Rhee F, Stone K, Szmania S, Barlogie B. Castelman disease in the 21st century: an update of diagnosis, assessment and therapy. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2010; 8(7): 486-498.
99. Seliem RM, Griffith RC, Harris NL, et al. HHV-8+,EBV+ multicentric plasmoblastic microlymphoma in an HIV+ man: The spectrum of HHV 8+ lymphoproliferative disorders expands. *Am J Surg Pathol*, 2007; 31(9): 1439-1445.
100. Rowe M, Kelly GI, Bell AI, Rickinson AB. Burkitt's lymphoma : the Rosetta Stone deciphering Epstein Barr virus biology. *Semin Cancer Biol*, 2009; 19(6): 377-388.
101. Salles G, de Jong D, Xie W, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: A study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood*, 2011; 117:7070–7078.
102. Tapia G, Lopez R, Muñoz-Mármol AM, et al. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology*, 2011; 59: 672–678.
103. Friedberg WJ. Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, 2012; 30(28): 3439-3443.
104. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, et al. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-

- cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia*, 2008; 22: 2226–2229.
105. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*, 2009; 114: 3533–3537.
  106. Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, et al. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res*, 2003; 9:2133–2139.
  107. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, et al. Immunofluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: A GELA study. *J Clin Oncol*, 2009; 27:5573–5579.
  108. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: The critical factors associated with survival. *Blood*, 2009; 114: 2273–2279.
  109. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 2010; 34: 327–340.
  110. Li S, Lin P, Fayad LE, et al. B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH&BCL2/t(14;18)(q32;q21): An aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Mod Pathol*, 2012; 25: 145–156.
  111. Bea S, Zettl A, Wright G, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*, 2005; 106: 3183–3190.
  112. Klapper W, Kreuz M, Kohler CW, et al. Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2012; 119: 1882–1887.
  113. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, 2001; 51(1): 15-36.

114. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 2002; 346:235-242.
115. Pfreundschuh M. CHOP intensification: not yet state of the art. *Lancet Oncol* 2013; 14: 445-447.
116. Delarue R, Tilly H, Mounier N, et al. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 2013; 14: 525-533.
117. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trumper L, et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*, 2011; 12: 1013-1022.
118. Tilly H, Dreyling M. Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2009; 20(4): 110-112.
119. Mounier N, Heutte N, Thieblemont C, et al. Ten-year relative survival and causes of death in elderly patients treated with R-CHOP or CHOP in the GELA LNH-985 trial. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2012; 12: 151-154.
120. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2006; 24: 3121-3127.
121. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*, 2005; 23: 5027-5033.
122. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*, 1998; 9: 717-720.
123. Manns A, Sqambati M: Epidemiology and pathogenesis of lymphoid malignancies. In: *Annual of lymphoid Malignancies*, Martin Dunitz, London, 2001, 1-15.
124. A predictive model for aggressive non- Hodgkin 's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factor Project. *N Engl J Med*, 1993; 329(14): 987-994.

125. Nicolaides C, Fountzilias G, Zoumbos N, et al. Diffuse large cell Lymphomas: identification of prognostic factors and validation of the International non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Index. A Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Oncology*, 1998; 55(5):405-415.
126. Wilder RB, Rodriguez MA, Medeiros LJ, et al. International prognostic index- based outcomes for diffuse large B cell lymphomas. *Cancer*, 2002; 94(12): 3083-3088.
127. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*, 2011; 28:2373-2380.
128. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*, 1987; 40(5): 373-383.
129. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 1982; 5 (6): 649-655.
130. Coiffier B, Feugier P, Sebban C, et al. Long term results of the GELA study, R-CHOP vs CHOP in elderly patients with diffuse large B – cell lymphoma. *Blood*, 2004; 104: 388.
131. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, et al. Randomised intergroup trial of first line treatment for patients <60 years with diffuse large B –cell non – Hodgkin's lymphoma (DLBCL) with a CHOP – like regimen with or without the anti-CD20 antibody rituximab - early stopping after the first interim analysis. *J Clin Oncol*, 2004; 22: 6500.
132. Feuger P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma; a study by the Groupe de l'Etude des lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*, 2005; 23: 4117-4126.
133. Lal A, Bhargava Y, Vaziri I, Rizvi NB, Sadaf A, Sartajuddin S, et al. Extranodal non-Hodgkin's lymphomas--a retrospective review of clinico-pathologic features and outcomes in comparison with nodal non-Hodgkin's lymphomas. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2008; 9(3):453-458.
134. Miller TP, Grogan TM, Dahlborg S, Spier CM, Braziel RM, Banks PM, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-



- Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood*, 1994; 83(6): 1460-1466.
135. Jerkmen M, Anderson H, Dictor M, Kvaloy S, et al. Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patients with diffuse large B cell lymphoma; Nordic Lymphoma group study. *Ann Haematol*, 2004; 83(7): 414-419.
  136. Hasselblom S, Ridell B, Sigurdardottir M, Hansson U, et al. Low rather than high Ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2008; 49(8): 1501-1509.
  137. Lianos M, Alvarez-Arguelles H, Aleman R, Oramas J, et al. Prognostic significance of Ki 67 nuclear proliferative antigen, Bcl2 protein, and p53 expression in follicular and diffuse large B cell lymphoma. *Med Oncol*, 2001; 18(1): 15-22.
  138. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 2003; 101:78–84.
  139. Lo Coco F, Gaidiano G, Louie DC, et al. p53 mutation are associated with histological transformation of follicular lymphoma. *Blood*, 1993; 82: 8-14.
  140. Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*, 2008; 111(7): 3322-3330.
  141. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res*, 2011; 17: 7785–7795.
  142. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, et al. Chromosomal and gene amplification diffuse large B cell lymphoma. *Blood*, 1998; 92: 234- 240.
  143. Soures AJ, Levenson DJ, Boghaert RE, Ackler LS, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 2013; 19: 202–208.
  144. Alas S, Emmanouilides C, Bonavida B. Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res*, 2001; 7: 709-723.

145. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*, 2006;208(5):714-23.
146. Sjö LD, Poulsen CB, Hansen M, Møller MB, et al. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: Identification of prognostic subgroups. *Eur J Haematol*, 2007; 79(6): 501-507.
147. Vilella L, López-Guillermo A, Montoto S, Rives S, Bosch F, Perales M et al. Prognostic features and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma who do not achieve a complete response to first-line regimens. *Cancer*, 2001; 91(8):1557-62.
148. Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, et al. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol*, 2014; 165: 382–391.
149. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Reyes F, et al. Estimating the impact of rituximab on bcl-2-associated resistance to CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*, 2006; 91(5): 715-716.
150. Wilson KS, Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald CA, Gill KK, et al. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2007; 48(6): 1102-1109.
151. Young-Ha Oh and Chan-Kum Park. Prognostic Evaluation of Nodal Diffuse Large B Cell Lymphoma by Immunohistochemical Profiles with Emphasis on CD138 Expression as a Poor Prognostic Factor. *J Korean Med Sci*, 2006; 21(3): 397-405.
152. Berglund M, Thunberg U, Amini RM, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol*, 2005; 18(8): 1113-1120.
153. Lopez-Guillermo A, Colomo L, Jimenez M, et. al. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J Clin Oncol*, 2005; 23(12):2797-804.
154. Bubman D, Guasparri I, Ceserman E. Deregulation of c-Myc in primary effusion lymphoma by Kaposi's sarcoma herpesvirus latency –associated nuclear antigen. *Oncogene*, 2007; 26(34):4979-4986.

155. Dupin N, Diss TL, Kellam P, et al. HHV -8 is associated with a plasmablastic variant of Castelan disease that is linked to HHV -8 positive plasmablastic lymphoma. *Blood*, 2000; 95(4): 1406-1412.
156. Van Rhee F, Stone K, Szmania S, et al. Castelman disease in the 21 st century: an update of diagnosis, assessment and therapy. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2010; 8:486-498.
157. Seliem RM, Griffith RC, Harris NL, et al. HHV-8+, EBV+ multicentric plasmoblastic microlymphoma in an HIV+ man: The spectrum of HHV 8+ lymphoproliferative disorders expands. *Am J Surg Pathol*, 2007; 31(9): 1439-1445.
158. Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas pathogenesis and classification. *Blood*, 2013; 122: 3884–3891.
159. Boerma EG, Siebert R, Kluin PM, et al. Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. *Leukemia*, 2009; 23: 225–234.
160. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, et al. German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia*, 2008; 22: 2226–2229.
161. Niitsu N, Okamoto M, Miura I, et al. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. *Leukemia*, 2009; 23: 777–783.
162. Valera A, Lopez-Guillermo A, Cardesa-Salzman T, Climent F, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*, 2013; 98(10): 1554-1562.
163. Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology*, 2008; 53:205–217.
164. Rimsza LM, Leblanc ML, Unger JM, et al. Gene expression predicts overall survival in paraffin-embedded tissues of diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*, 2008; 112: 3425–3433.

165. Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, Visco C, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Modern Pathology*, 2014; 27: 958-971.
166. Le Gouill S, Talmant P, Touzeau, et al. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-Myc rearrangement. *Haematologica*, 2007; 92(10): 1335-1342.
167. Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, et al. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica*, 2009; 94(7): 935-943.
168. Nitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. *Leukemia*, 2009; 23(4): 777-783.
169. Kanungo A, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis. *Mod Pathol*, 2006; 19(1): 25-33.
170. Snuderi M, Kolman Ok, Chen YB, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC clinical rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 2010; 34(3): 327-340.
171. Johnson Na, Savage KJ, Luskovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the clinical factors associated with survival. *Blood*, 2009; 114(11): 2273-2279.
172. Oberman EC, Csato M, Dirnhofer S, Tzankov A. Alterations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *J Clin Pathol*, 2009; 62(8):754-756.
173. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, et al. Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B cell lymphoma treated with RCHOP: a GELA study. *J Clin Oncol*, 2009; 27(33): 5573-5579.
174. Van Imhoff GW, Boerma EJ, van der Holt B, et al. Prognostic impact of germinal center associated proteins and chromosomal breakpoints in poor risk diffuse large B cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2006; 24(25): 4135-4142.

175. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: The critical factors associated with survival. *Blood*, 2009; 114: 2273 - 2279.
176. Tibiletti MG, Martin V, Bernasconi B, et al. BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: A multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Hum Pathol*, 2009; 40: 645–652.
177. Aukema SM, Siebert R, Schuurung E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*, 2011; 117: 2319–2331.
178. Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*, 2012; 30: 3460-3467.
179. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*, 2012; 30: 3460–3468.
180. Green TM, Nielsen O, de Stricker K, et al. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 2012; 36: 612–619.