# Utjecaj genskih polimorfizama FcγRIIIa i FcγRIIa receptora te izražaja survivina i kaspaze-3 na prognozu bolesnika s difuznim B-velikostaničnim limfomom liječenih kombinacijom rituksimaba i kemot ...

**Mitrović, Zdravko**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:698191

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI




**Središnja medicinska knjižnica**

**Mitrović, Zdravko (2009)** ***Utjecaj genskih polimorfizama FcγRIIIa i FcγRIIa receptora te izražaja survivina i kaspaze-3 na prognozu bolesnika s difuznim B-velikostaničnim limfomom liječenih kombinacijom rituksimaba i kemoterapije po shemi CHOP*****. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/697

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Zdravko Mitrović**

# Utjecaj genskih polimorfizama FcγRIIIa i FcγRIIa receptora te izražaja survivina i kaspaze-3 na prognozu bolesnika s difuznim B-velikostaničnim limfomom liječenih kombinacijom rituksimaba i kemoterapije po shemi CHOP

# DISERTACIJA

**Zagreb, 2009.**

Disertacija je izrađena na Zavodu za hematologiju, Zavodu za patologiju i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof.dr. sc. Igor Aurer

Ovaj rad je posvećen prerano preminulom prof.dr. Marinu Noli.
Njegove ideje i predanost poslu neizmjerno su doprinijeli kvaliteti ove disertacije.
Počivao u miru, Marine!

Zahvaljujem svim kolegama koji su pomogli u nastanku ovog rada te svojoj obitelji na potpori i strpljenju.

# Sadržaj

SADRŽAJ....3
POPIS OZNAKA I KRATICA....5
**1. UVOD....7**
1.1. OBILJEŽJA DIFUZNOG B-VELIKOSTANIČNOG LIMFOMA....7
1.1.1. Povijest....7
1.1.2. Definicija i klasifikacija....7
1.1.3. Epidemiologija....8
1.1.4. Klinička obilježja DLBCL-a....8
1.1.5. Liječenje DLBCL-a....9
1.2. MEHANIZMI DJELOVANJA RITUKSIMABA....9
1.2.1. Citotoksičnost ovisna o protutijelima (ADCC) i FcγR receptori....10
1.2.1.1. Klinička istraživanja o povezanosti FcγRIIIa i FcγRIIa receptora i odgovora na terapiju rituksimabom....10
1.2.2. Citotoksičnost ovisna o komplementu (CDC)....11
1.1.3. Apoptoza....12
1.1.4. Povećanje kemosenzitivnosti....14
1.3. PROGNOSTIČKI FAKTORI KOD DIFUZNOG B-VELIKOSTANIČNOG LIMFOMA....14
1.3.1. Međunarodni prognostički indeks (IPI)....14
1.3.2. Biljezi diferencijacije i aktivacije limfomskih stanica kao prognostički parametri....15
1.3.3. Medijatori apoptoze....16
1.3.3.1. Bcl-2....16
1.3.3.2. Survivin....16
1.3.3.2. Kaspaza-3....17
1.3.4. CD43....17
1.3.5. Temeljne pretpostavke rada....18
**2. CILJEVI....19**
**3. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE....20**
3.1. BOLESNICI....20
3.1.1. Kriteriji uključivanja....20
3.1.2. Klinička obrada bolesnika....20
3.1.3. Liječenje i procjena odgovora....21
3.2. MATERIJALI I METODE....21
3.2.1. Molekularne metode....21
3.2.1.1. Polimorfizam FcγRIIIa-158V/F....21

3.2.1.2. Polimorfizam FcγRIIa-131H/R....23
3.2.2. Patohistološke metode....24
3.2.3. Statističke metode....25
3.3. ETIKA....26
**4. REZULTATI....27**
4.1. ZNAČAJKE I ISHODI SVIH BOLESNIKA....27
4.2. POVEZANOST POLIMORFIZAMA FcγRIIIa-158V/F I FcγRIIa-131H/R S ISHODOM BOLESNIKA....29
4.3. IMUNOHISTOKEMIJSKI BILJEZI....32
4.3.1. Biljezi aktivacije i diferencijacije, podjela na GC i non-GC podtipove....32
4.3.2. Bcl-2....33
4.3.3. Survivin....34
4.3.4. Kaspaza-3....35
4.3.5. CD43....37
4.4. MULTIVARIJANTNA ANALIZA....40
4.4.1. Logistička regresija....40
4.4.2. Coxova regresijska analiza....40
**5. RASPRAVA....42**
5.1. OSVRT NA REZULTATE LIJEČENJA, VELIČINU TUMORSKE MASE I KRITERIJE ODABIRA BOLESNIKA.... 42
5.2. FcγRIIIA-158V/F I FcγRIIA-131H/R POLIMORFIZMI....43
5.3. BILJEZI AKTIVACIJE I DIFERENCIJACIJE....45
5.4. BCL-2....46
5.5. APOPTOTSKI BILJEZI....47
5.5.1. Survivin....47
5.5.2. Kaspaza-3....48
5.5.3. Povezanost survivina, kaspaze-3, bcl-2 i djelovanje rituksimaba....48
5.6. CD43.... ..49
5.7. ZAKLJUČNE NAPOMENE U RASPRAVI....51
**6. ZAKLJUČCI....53**
**7. SAŽETAK....54**
**8. SUMMARY....55**
**9. LITERATURA....56**
**10. ŽIVOTOPIS....73**

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ABC - poput aktiviranih B-stanica, engl. activated B-cell-like
ADCC - citotoksičnost ovisna o protutijelima, engl. antibody dependent cellular cytotoxicity
CDC - citotoksičnost ovisna o komplementu, engl. complement dependent cytotoxicity
CHOP - akronim za terapiju ciklofosfamidom, doksorubicinom, vinkristinom i prednizonom
CI - interval pouzdanosti, engl. confidence interval
CNOP - akronim za terapiju ciklofosfamidom, mitoksantronom, vinkristinom i prednizonom
DLBCL - difuzni B-velikostanični limfom, engl. diffuse large B-cell lymphoma
ECOG - Eastern Oncology Cooperative Group
EFS - preživljenje bez događaja, engl. event-free survival
EPOCH - akronim za terapiju etopozidom, prednizonom, vinkristinom, ciklofosfamidom i doksorubicinom
FcγR - receptor za Fc fragment gama-globulina
F/F - fenilalanin/fenilalanin
F/V - fenilalanin/valin
FL - folikularni limfom
GC - obilježje germinativnog centra, engl. germinative center-like
HIV - virus humane imunodeficijencije, engl. human immunodeficiency virus
H/H - histidin/histidin
H/R - histidin/arginin
IAP - inhibitori apoptoze, engl. inhibitors of apoptosis
IPI - međunarodni prognostički indeks, engl. International Prognostic Index
KLL - kronična limfocitna leukemija
KR - kompletna remisija
LDH - laktat dehidrogenaza
NFκB - engl. nuclear factor kappa B
NHL - ne-Hodgkinov limfom
(n)KR - (nepotvrđena) kompletna remisija
non-GC - nema obilježje germinativnog centra
OS - ukupno preživljenje
p - vjerojatnost
PARP - poli-ADP-riboza polimeraza
PCR. - lančana reakcija polimeraze, engl. polymerase chain reaction
PMBL - primarni medijastinalni B-limfom
PS - opće stanje, engl. perforamnce status
R- - rituksimab-

R/R - arginin/arginin

SAD - Sjedinjene američke države

SNP - polimorfizmi u jednom nukleotidu, engl. single nucleotide polymorphisms

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

TMA - tkivno mikro-polje, engl. tissue microarray

TNF - čimbenik nekroze tumora, engl. tumor necrosis factor

V/F - valin/fenilalanin

V/V - valin/valin

# 1. Uvod

## 1.1. Obilježja difuznog B-velikostaničnog limfoma

### 1.1.1. Povijest ne-Hodgkinovih limfoma

Britanski patolog, Thomas Hodgkin, prvi je 1832. u svom djelu „On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen" opisao limfome (slika 1).[1]



**Slika 1.** Thomas Hodgkin

Kasnijom analizom njegovih uzoraka otkriveno je da od sedam uzoraka, tri su bila Hodgkinov limfom, a ostali su bili ne-Hodgkinovi limfomi (NHL), reaktivna upala ili tuberkuloza.[2] Zaslugom britanskog liječnika Samulela Wilksa koji je 30-ak godina kasnije, ne znajući za rad Thomasa Hodgkina, ponovno otkrio bolest, nastao je naziv Hodgkinova bolest.

Ne-Hodgkinovi limfomi su povijesno obuhvaćali sve one različite tipove malignih limfoma koji nisu imali patohistološka obilježja Hodgkinove bolesti. Novija povijest NHL-a zapravo je povijest različitih klasifikacija kojima se pokušavalo postići konzenzus između patologa i kliničara u cijelom svijetu. Napredak dijagnostike je s vremenom dovodio do pojave novih entiteta i pogleda na limfome što je opetovano nametalo potrebu za stvaranjem novih klasifikacija uzrokujući konfuzije i frustracije među patolozima i kliničarima. Tako su do pojave klasifikacije po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) 2001. godine, bile korištene: Rappaportova klasifikacija, Kielska klasifikacija, Lukes-Collinsova klasifikacija, Working Formulation klasifikacija, BNLI klasifikacija te REAL klasifikacija. [3]

### 1.1.2. Definicija i klasifikacija

Limfomi nastaju klonalnom proliferacijom zloćudne limfatične stanice. Najčešće su lokalizirani u limfnim čvorovima, no mogu se javiti i u ekstralimfatičkim organima ili kao proširena bolest s leukemijskom slikom. Prema klasifikaciji SZO iz 2001. godine, po svojim morfološkim, imunofenotipskim, genetičkim i kliničkim osobinama, razlikuju se tri temeljne skupine limfoidnih neoplazmi: B stanične, T i NK stanične, te Hodgkinov limfom.[4] Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL, engl. diffuse large B-cell lymphoma) čini oko trećine svih slučajeva NHL.

### 1.1.3. Epidemiologija

Prema podacima iz SAD-a, NHL je peti tumor po učestalosti kod žena, a šesti kod muškaraca te uzrokuje 3.4% od svih smrti uzrokovanih zlućudnim bolestima.[5] Učestalost iznosi 19.1 na 100,000 ljudi godišnje, viša je u muškaraca nego u žena (23.2 naspram 15.8 na 100,000 ljudi godišnje) i raste s dobi. Petogodišnje preživljenje za one dijagnosticirane između 1995. i 2001. iznosi 63%. Incidencija NHL-a bila je u značajnom porastu tijekom 70-ih i 80-ih godina prošlog stoljeća, a stabilizirala se tijekom 90-ih.[6] Razlozi za to nisu poznati i ne mogu se u potpunosti objasniti rastućom stopom infekcije virusom HIV-a (engl. human immunodeficiency virus) kao niti boljim dijagnostičkim mogućnostima ili promijenjenom klasifikacijom. Povezanost NHL-a s čimbenicima iz okoliša kao i s rizicima vezanim uz određena zanimanja nije sa sigurnošću utvrđena.[5] Međutim, šansa za pojavu NHL-a veća je u ljudi koji imaju anamnezu autoimune bolesti ili obiteljsku anamnezu hematološke zloćudne bolesti. Slično alergijama, veću šansu za razvoj limfoma imaju osobe čiji imunološki sustav nije u ranom djetinjstvu izvježban izlaganjem dovoljno jakom antigenskom stimulacijom: osobe boljeg imovinskog stanja, jedinci, najstarija djeca u obitelji, osobe koje nisu cijepljene protiv Haemophilusa influenze tipa B.[7] Uz sve navedeno, postoji povezanost određenih virusa kao što su HIV, Ebstein-Barrov virus ili Humani herpes virus 8 s određenim tipovima B-staničnog limfoma.[6] Distribucija B i T-staničnih limfoma varira obzirom na geografski položaj i klimu, tako da se od sjevera prema jugu Europe smanjuje učestalost B limfoma, a povećava učestalost T limfoma.[7] U krajevima s umjerenom klimom 85% slučajeva otpada na tumore B-stanične tumore.

U našoj zemlji, prema službenim podacima registra za rak, učestalost NHL-a u 2006. godini iznosi 10.9 na 100,000 stanovnika.[8] Podaci prikupljani od strane patologa i hematologa za 2007. godinu pokazuju da učestalost pojedinih podtipova NHL-a odgovara europskom prosjeku. [9]

### 1.1.4. Klinička obilježja DLBCL-a

Po svom kliničkom tijeku, DLBCL se ubraja u skupinu agresivnih limfoma, što znači da neliječen dovodi do letalnog ishoda kroz nekoliko mjeseci. Simptomi i klinički znakovi DLBCL-a mogu se podijeliti na one uzrokovane tumorskom masom te opće simptome. Simptomi uzrokovani tumorskom masom ovise o veličini i lokalizaciji. Oko 30% NHL-a prezentira se ekstranodalnom lokalizacijom.[10] Najčešće ekstranodalne lokalizacije DLBCL-a su probavni sustav (najčešće želudac), središnji živčani sustav, koža, testis, no zapravo se mogu javiti u bilo kojem organu. I tu postoji velika razlika u geografskoj distribuciji.[5,7,10]

Opći simptomi, tzv. B simptomi, su paraneoplastički simptomi uzrokovani otpuštanjem citokina iz tumorskih stanica ili stanica imunološkog sustava koje reagiraju na tumor.[7] Oni uključuju: vrućicu više od 38.5°C bez znakova infekcije, noćno znojenje koje je toliko izraženo da se bolesnik mora noću presvlačiti, gubitak na težini više od 10% u posljednjih 6 mjeseci te svrbež koji je tako izražen da bolesnik ima ekskorijacije.

### 1.1.5. Liječenje DLBCL-a

Od 70-ih godina prošlog stoljeća kada su antraciklini uvedeni u terapiju pa sve do početka ovog stoljeća nije bilo značajnijih napredaka u liječenju NHL-a. Kemoterapija po shemi CHOP (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon) bila je zlatni terapijski standard. Iako su tijekom godina iskušavane i različite intenzivirane inačice CHOP-a +/- autotransplanacija koštane srži, postignuto je poboljšanje ishoda samo kod dijela bolesnika (uglavnom mlađih i visokorizičnih) u odnosu na standardni CHOP koji je kurativan u oko 40% svih bolesnika.[11,12] U posljednjih nekoliko godina velike randomizirane studije su pokazale da dodatak rituksimaba CHOP-u poboljšava odgovor, preživljenje bez događaja (EFS, od engl. event-free survival) i ukupno preživljenje bolesnika (OS, od engl. overall survival) s DLBCL.[13-15] Danas je stoga R-CHOP prihvaćen kao novi terapijski standard u liječenju DLBCL-a, kako u mlađih tako i u starijih bolesnika.

## 1.2. Mehanizmi djelovanja rituksimaba

Rituksimab (u Europi pod tvorničkim imenom Mabthera®, Hoffmann-La Roche AG) je IgG1 kapa monoklonsko protutijelo usmjereno protiv CD20 antigena, molekule koja se nalazi samo na površini B-limfocita. Građen je od ljudske konstantne regije (Fc) i mišje varijabilne regije (Fv) što mu daje optimalna farmakokinetska svojstva.[16] Budući da CD20 normalno ne cirkulira slobodno u plazmi, ne odbacuje se niti internalizira, kao i da nije podložan regulaciji, predstavlja odličnu metu za ciljanu terapiju. Nije izražen na matičnim stanicama, ranim limfoblastima i zrelim plazma stanicama. Fiziološka uloga CD20 molekule nije poznata, smatra se da je važna za razvoj i diferencijaciju B-limfocita. Od 1997. godine kada je odobren u SAD za liječenje CD20 pozitivnih indolentnih limfoma u relapsu, njegova primjena se iz godine u godinu širom svijeta povećavala, a spektar kliničkih indikacija proširen je i na druge tipove B-staničnog limfoma. Rituksimab smanjuje broj CD20 stanica različitim mehanizmima: citotoksičnošću ovisnom o protutijelima (ADCC), citotoksičnošću

posredovanom komplementom (CDC), indukcijom apoptoze, a pojačava i citotoksičnu aktivnost nekih lijekova (povećanje kemosenzitivnosti) i radioterapije. Relativna važnost svakog od njih još uvijek se istražuje.

### 1.2.1. Citotoksičnost ovisna o protutijelima (ADCC) i FcγR receptori

ADCC je važan imunološki mehanizam u uništavanju unutarstaničnih patogenih mikroorganizama, ali i tumorskih stanica. Pretpostavka za njegovo djelovanje je postojanje efektorskih stanica koje se preko specifičnih receptora za Fc fragment gamaglobulina (FcγR) vežu na protutijelo i uništavaju ciljnu stanicu.[17] Do sada je otkriveno osam vrsta receptora: FcγRI, FcγRIIa,IIb,IIc i FcγRIIIa,IIIb. FcγRIIa i FcγRIIIa su aktivacijski receptori koji djeluju preko sustava tirozin kinaze, a sudjeluju u vezanju i aktivaciji efektorske stanice.[18] FcγRIIa (CD32) izražen je na makrofagima i neutrofilima, dok je FcγRIIIa (CD16) izražen na NK stanicama i makrofagima. Pokazano je da funkcionalni polimorfizmi gena (SNP) za FcγRIIa i FcγRIIIa utječu na ADCC. Genski polimorfizam koji dovodi do pojave valina (V) ili fenilalanina (F) na 158. mjestu slijeda aminokiselina receptora FcγRIIIa utječe na vezanje za protutijelo tako da homozigoti za valin (V/V) imaju veći afinitet za IgG1 nego homozigoti za fenilalanin (F/F).[19] Slično tome, polimorfizam gena za FcγRIIa receptor dovodi do pojave histidina (H) ili arginina (R) na 131. mjestu slijeda aminokiselina, a nositelji arginina (R/R, H/R) slabije vežu IgG protutijelo nego homozigoti za histidin (H/H).[20] Posljedice navedenih razlika učituju se kao povećana sklonost infekcijama ili nekim autoimunim bolestima u bolesnika s određenim FcγRIIIa i FcγRIIa fenotipom.[17,18]

#### *1.2.1.1. Klinička istraživanja o povezanosti FcγRIIIa i FcγRIIa receptora i odgovora na terapiju rituksimabom*

*Rituksimab kao monoterapija*

Najprije je pokazano da FcγRIIIa-158V/V genotip dovodi do boljeg molekularnog i kliničkog odgovora na monoterapiju rituksimabom u 49 bolesnika s prethodno neliječenim folikularnim NHL.[17] Nije nađena povezanost odgovora i FcγRIIa-131H/R polimorfizma. Potom su drugi autori na 87 bolesnika s folikularnim limfomom (FL) našli da su FcγRIIIa-158V/V genotip i FcγRIIa-131 H/H neovisno povezani s boljim odgovorom i trajanjem odgovora na rituksimab.[21] Povezanost FcγRIIIa-158 V/F polimorfizma i odgovora na rituksimab potvrđena je i kod bolesnika s makroglobulinemijom Waldenström.[22] Nasuprot tome, na 30 bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom (KLL) liječenih rituksimabom

nije nađena povezanost navedenih polimorfizama i odgovora na liječenje, čak je postojao trend lošijeg odgovora bolesnika s FcγRIIIa V/V genotipom.[23]

*Rituksimab u kombinaciji s CHOP-om*

Nije nađena povezanost između FcγRIIa i FcγRIIIa polimorfizama s odgovorom na terapiju i preživljenjen u bolesnika s folikularnim limfomom liječenih CHOP-om i rutuksimabom.[24,25]

Kod bolesnika s limfomom plaštene zone koji su liječeni kombinacijom kemoterapije po shemi HyperCVAD i rituksimaba, također nije nađeno povezanosti FcγRIIa i FcγRIIIa polimorfizama s ishodom.[26]

Nasuprot tome, u publikaciji korejskih autora nađeno je da je kod bolesnika s DLBCL FcγRIIIA-158 V/V fenotip povezan s većim postotkom remisija i bržim postizanjem odgovora na R-CHOP terapiju.[27] Međutim, nije bilo razlika u EFS i OS među pojedinim FcγRIIIa fenotipovima. FcγRIIA 131 H/R polimorfizam nije utjecao na ishod. Rezultate treba uzeti s rezervom obzirom na izuzetno mali broj bolesnika s FcγRIIIa-158 F/F fenotipom (6 od ukupno 113), a oni su imali značajno lošiji odgovor na terapiju u odnosu na druga dva fenotipa. K tome, treba uzeti u obzir i dokazane razlike među rasama u distribuciji pojedinih alela.[18]

### 1.2.2. Citotoksičnost ovisna o komplementu (CDC)

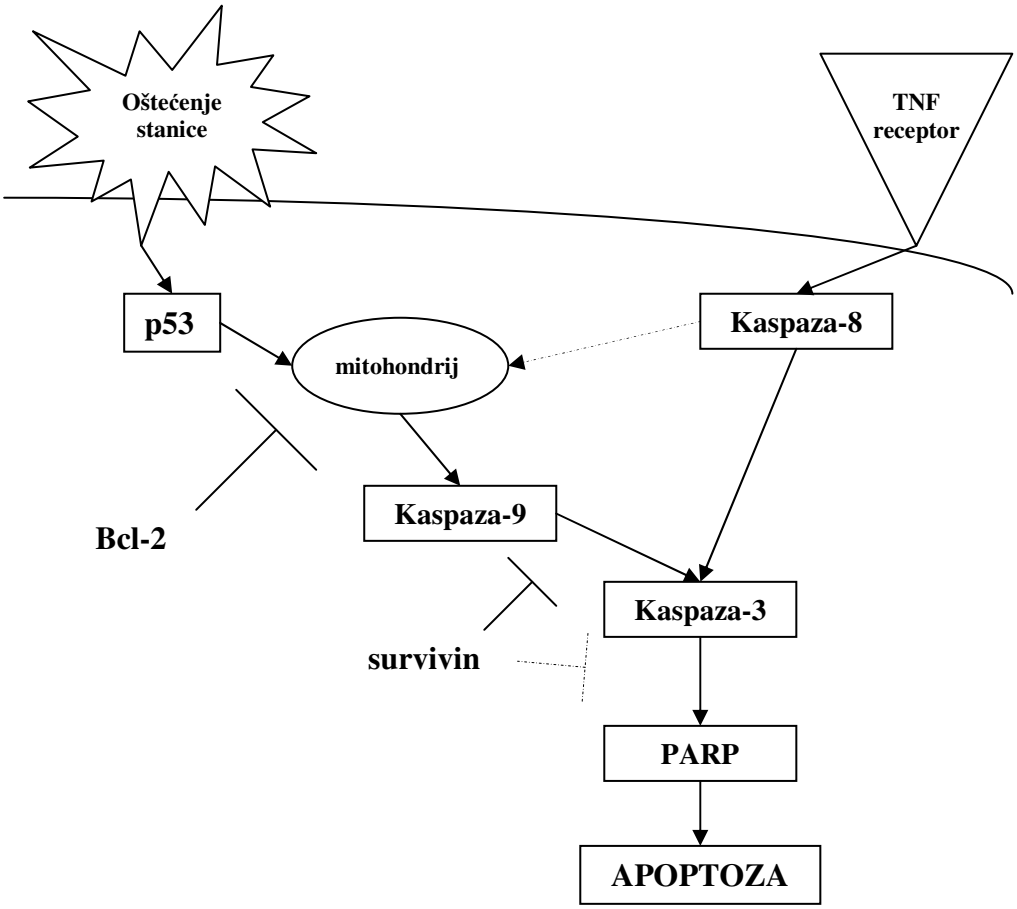
Rituksimab aktivira kaskadu komplementa, vežući C1q.[28] Ključna uloga komplementa u eliminaciji tumorskih stanica pokazana je „in vitro“ te „in vivo“ na miševima kojima je onemogućena aktivacija komplementa.[29,30] Nadalje, u bolesnika s KLL-om liječenih rituksimabom pokazana je aktivacija sustava komplementa neposredno nakon infuzije rituksimaba, što može objasniti i nuspojave vezane uz infuziju.[31] Skroman klinički odgovor na rituksimab, posebice kod KLL-a, pokušao se objasniti izražajem molekula koje inhibiraju komplement poput CD55 i CD59 te je pokazano da se njihovom blokadom pojačava osjetljivost na komplement.[29,32] Međutim, razina njihovog izražaja ne korelira s kliničkim odgovorom bolesnika liječenih rituksimabom.[33,34] Liza svježe izoliranih tumorskih stanica posredovana komplementom, za razliku od uništavanja tumorskih stanica rituksimabom putem ADCC-a i apoptoze, ponajprije ovisi o tipu limfoma: najjača je kod FL, umjerena kod DLBCL-a i limfoma plaštenih stanica, a najslabija kod KLL što korelira s različitom stopom odgovora na monoterapiju rituksimabom kod navedenih tipova limfoma.[35] Navedeni utjecaj CDC-a ponajprije ovisi o stupnju ekspresije CD20 na različitim tipovima NHL-a, koji je

najslabiji upravo kod CLL-a. [29,36] Zbog toga se dodavanjem svježe smrznute plazme kao izvora komplementa ili kombiniranjem s anti-CD52 protutijelom (alemtuzumab) učinak CDC-a pokušava pojačati.[37,38]

Međutim, za sada ne postoje pravi parametri kojima bi se procijenila klinička značajnost CDC-a. Većina istraživanja provedena je na modelima KLL-a i FL-a vezano uz monoterapiju rituksimabom, a podataka o ulozi komplementa kod bolesnika s DLBCL liječenih rituksimabom i kemoterapijom nema.

### 1.1.3. Apoptoza

Apoptoza ili programirana smrt stanice predstavlja složen fiziološki mehanizam međudjelovanja različitih proteina kojoj je krajnji cilj razgradnja i fagocitoza suvišnih ili oštećenih stanica bez pokretanja upalnog odgovora.[39] Dva su osnovna puta apoptoze: vanjski (posredovan receptorima) i unutarnji (mitohondrijski). Receptorski (vanjski) put apoptoze ide putem vanjskih receptora iz obitelji TNF (engl. tumor necrosis factor) i aktivacije kaspaze-8. Unutarnji put apoptoze ide preko mitohondrija i kaspaze-9. U konačnosti, oba puta dovode do aktivacije kaspaze-3 što rezultira aktivacijom PARP-a (poli-ADP-riboza polimeraza) i nukleosomalnom DNA fragmentacijom (slika 2). Osim što završaju aktivacijom kaspaze, unutrašnji i vanjski put apoptoze se isprepleću i na drugim razinama.




**Slika 2.** Pojednostavljena shema vanjskog i unutarnjeg puta apoptoze. Unutrašnji put apoptoze ide preko aktivacije p53 i mitohondrija što rezultira aktivacijom kaspaze-9. Vanjski put apoptoze ide preko „death" receptora iz obitelji TNF koji aktiviraju kaspazu-8. Oba puta dovode do aktivacije kaspaze-3 i u konačnosti apoptoze. Bcl-2 blokira unutarnji put apoptoze. Survivin (uz ostale proteine iz obitelji inhibitora apoptoze, IAP) blokira završni dio unutarnjeg apoptotskog puta (kaspazu-9), a moguće i kaspazu-3. Kratice su objašnjene u tekstu.

Na različitim staničnim linijama pokazano je da rituksimab vezanjem za CD20 receptor može izravno uzrokovati apoptozu, neovisno o komplementu i ADCC-u.[40-43] Međutim, izravni apoptoski učinak rituksimaba je skroman i vrlo varijabilan, ovisno o vrsti stanične linije na koju se primjenjuje.[44] Ipak, većina studija koja je ispitivala rituksimabom uzrokovanu apoptozu sugerira mitohondrijski put apoptoze koji završava aktivacijom kaspaze-9 i efektorske kaspaze-3.[40,41] Unutarstanični putevi kojima rituksimab dovodi do apoptoze, su vrlo heterogeni, međusobno isprepleteni i nepotpuno definirani. K tome, neki istraživači su eksperimentalno pokazali da rituksimab i neka druga anti-CD20 protutijela uzrokuju apoptozu i mehanizmima neovisnim o mitohondrijima i kaspazama.[42-44]

### 1.1.4. Povećanje kemosenzitivnosti

Većina citostatika uzrokuje apoptozu oštećujući genom stanice što dovodi do aktivacije p53 gena i posljedične aktivacije unutarnjeg, ali i vanjskog puta apoptoze.[39] „In vitro“ studijama pokazano je da rituksimab može pojačati citotoksično djelovanje nekih kemoterapeutika često korištenih u terapiji limfoma kao što su doksorubicin, fludarabin, cisplatina.[45-47] Molekularni mehanzimi kojima rituksimab dovodi do povećenja osjetljivosti na apoptozu izazvanu kemoterapijskim agensima uključuju različite molekule. Smatra se da oni u konačnosti dovode do inhibicije i smanjivanje izražaja antiapoptotskih proteina povezanih s bcl-2/bcl$_{-xL}$ anti-apoptoskim genima odnosno olakšavanja aktivacije vanjskog puta apoptoze.[48,49] Do sada poznati putevi bcl-2/bcl$_{-xL}$ uključuju inhibiciju p38 MAPK kinaze,[50] NF-κB sustava,[51] ERK ½ kinaze,[52] te AKT antiapoptoskog puta.[53] Klinički dokaz povećanja kemosenzitivnosti je značajno poboljšanje prognoze u bolesnika s bcl-2 pozitivnim limfomom liječenih R-CHOP-om u odnosu na one koji su liječeni samo CHOP-om.[54]

Nedavno je objavljeno da rituksimab uzrokuje povećanje i radiosenzitivnosti limfomskih stanica „in vitro“, mehanizmima ovisnima i neovisnima o kaspazi.[55]

## 1.3. Prognostički faktori kod difuznog B-velikostaničnog limfoma

### 1.3.1. Međunarodni prognostički indeks (IPI)

Na velikom broju bolesnika s agresivnim limfomima 1993. godine objavljen je prognostički indeks temeljen na dobi, općem stanju bolesnika (engl. performance status – PS), koncentraciji laktat dehidrogenaze (LDH), stadiju bolesti i broju ekstranodalnih regija zahaćenih limfomom.[56] I danas se IPI smatra zlatnim standardom s kojim se uspoređuju svi ostali potencijalni prognostički parametri.

**Tablica 1.** Međunarodni prognostički indeks (IPI)

| |
|---|
| Dob ≥ 60 godina |
| Stadij III ili IV |
| Povišen LDH |
| PS (ECOG) > 1 |
| Više od jedna ekstranodalna lokalizacija |

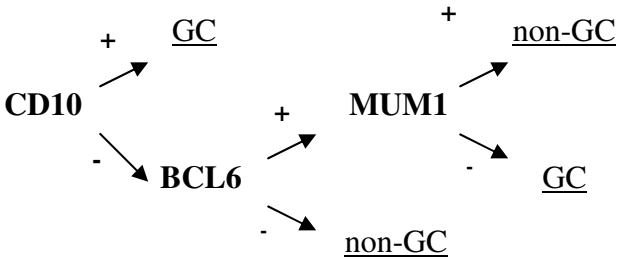
**Svaki navedeni parametar nosi 1 bod**

| Broj bodova (IPI score) | Prognoza (rizik) | 5-godišnje preživljenje |
|---|---|---|
| 0,1 | nizak rizik | 73% |
| 2 | nizak/srednji rizik | 51% |
| 3 | srednji/visok rizik | 43% |
| 4,5 | visok rizik | 26% |

### 1.3.2. Biljezi diferencijacije i aktivacije limfomskih stanica kao prognostički parametri

Razvojem tehnologije genskog čipa omogućeno je analiziranje velikog broja gena iz tumorskog tkiva te su ustanovljene tri podgrupe unutar DLBCL-a.[57-58] neovisne o IPI-u: GC (engl. germinal center like) podskupina koja ima ekspresiju gena sličnu limfocitima germinativnog centra, ABC (engl. activated B-cell like) podskupina koja ima ekspresiju gena kao aktivirani B-limfociti i najmanja, treća podskupina koja je vrlo heterogena. Navedene podskupine imaju prognostičko značenje neovisno o IPI-u, pri čemu GC-podskupina ima bolju prognozu, dok su ABC i treća podskupina povezani sa lošijim ishodom te se mogu promatrati jednistveno kao non-GC skupina.[57-59] Obzirom na tešku izvedivost i visoku cijenu takve metodologije, pokazano je da se i „običnom“ imunohistokemijskom analizom aktivacijskih i diferencijacijskih biljega DLBCL mogu podijeliti na prognostički povoljnu GC i nepovoljnu non-GC podskupinu. Najčešće korišteni biljezi su CD10, bcl6, MUM1 i u nekim studijama CD138.[60-67] Sve navedene studije su napravljene na uzorcima bolesnika koji nisu liječeni rituksimabom.

Najprihvaćenija je klasifikacija prema C.P.Hans (slika 3).[60]




**Slika 3.** Imunohistokemijsko određivanje podskupina DLBCL-a.

GC – obilježje germinativnog centra, non-GC – nema obilježja germinativnog centra.

Da li je takva imunohistokemijska podjela na prognostički značajna i kod bolesnika liječenih kombinacijom rituksimaba i CHOP-a još uvijek nije jasno. [68,69]

### 1.3.3. Medijatori apoptoze

#### *1.3.3.1. Bcl-2*

Bcl-2 kao antiapoptotski protein igra važnu ulogu u razvoju i diferencijaciji B-limfocita. Njegova ekspresija u DLBCL je, u većini velikih studija na bolesnicima liječenim samo kemoterapijom, povezana s rezistencijom na kemoterapiju i lošijom prognozom.[70-72] No, neke studije nisu našle povezanost izražaja bcl-2 i ishoda.[60,73] Pojačan izražaj bcl-2 proteina u limfomima posljedica je kromosomske translokacije t(14,18)q(32:21) ili amplifikacije na 18q21 gdje se nalazi gen za bcl-2.[74] Nakon što je rituksimab pridodan standardnoj kemoterapiji, prognoza bolesnika s bcl-2+ DLBCL se značajno poboljšala, što je najprije pokazano na uzorcima velikog broja bolesnika iz randomizirane GELA studije.[54] Djelovanjem rituksimaba prevladava se antiapoptoski učinak posredovan bcl-2 što dovodi do povećanja osjetljivosti tumorskih stanica na djelovanje kemoterapije.[49] Bcl-2 ima značenje i kao meta ciljane terapije oblimersenom i sličnim lijekovima koji blokiraju transkripciju bcl-2 gena, ne samo u limfoma, nego i u drugim tumorima.[75]

#### *1.3.3.2. Survivin*

Pojačana aktivnost proteina inhibitora apoptoze (IAP, engl. inhibitors of apoptosis proteins) dovodi se u vezu s tumorskom rezistencijom. Trenutno je poznato ukupno 8 takvih proteina podijeljenih u 3 klase.[76] Survivin pripada u klasu 3 i njegova fiziološka uloga je vezanje na mikrotubule u G2/M fazi i omogućavanje mitoze, a druga uloga je prevencija apoptoze.[77] Putevi kojima blokira apoptozu nisu do kraja jasni, pretpostavlja se da sprečava aktivaciju kaspaze-9 djelujući na mitohondrijsku apoptotsku kaskadu, dok je mogućnost izravne inhibicije kaspaze-3 dvojbena.[78,79] Ne nalazi ga se u zdravim tkivima odraslih, ali je pojačano eksprimiran u različitim tumorima omogućavajući tumorskim stanicama izbjegavanje apoptoze i mitozu.[77,80] Posljedično tome, u većini solidnih tumora izražaj survivina je povezan s lošijom progonozom[81-84], no postoje i suprotni rezultati[85-87]. U limfoma plaštene zone, i u anaplastičnom limfomu, izražaj survivina je povezan s lošijom prognozom.[88-89] Prognostičko značenje izraženosti survivina u DLBCL ispitivano je u nekoliko studija.[73, 90-94] U nekima je survivin identificiran kao negativan prognostički biljeg[90-92], dok u drugima nije bilo utjecaja na prognozu[73,93,94]. Nema niti jednog istraživanja u kojem je prognostički utjecaj izraženosti survivina ispitivan u bolesnika s DLBCL liječenih kombinacijom rituksimaba i kemoterapije.

#### *1.3.3.3. Kaspaza-3*

Kaspaza-3 predstavlja završnu točku apoptotske kaskade u kojoj se spajaju unutrašnji i vanjski put apoptoze. Aktivacija kaspaze-3 aktivira citolitičke enzime u stanici i dovodi do smrti stanice. Prvi radovi su istraživali izražaj neaktivirane kaspaze-3 u različitim tipovima limfoma gdje je nađen pojačan izražaj u odnosu na folikularnu hiperplaziju.[95] Potom je nađeno da je u bolesnika s DLBCL od prognostičkog značenja ne stupanj, već način izraženosti kaspaze-3: difuzna prisutnost u citosolu povezana je s lošijim ishodom, nego lokalizirano nakupljanje, što se vidi kao točkasto obojenje.[96] Nešto noviji radovi nizozemske grupe autora pokazali su da razina aktivne kaspaze-3 u različitim tipovima limfoma korelira s očuvanošću apoptotskog puta i odgovorom na terapiju.[97,98] Međutim, zadnje objavljeni rad iste grupe autora na bolesnicima s DLBCL-om ima potpuno oprečan zaključak u pogledu prognostičkog značenja razine aktivne kaspaze-3.[99] Obzirom da je razina izražaja aktivne kaspaze-3 niska (medijan 3.5%) i da je običnim imunohistokemijskim bojenjem teško razlikovati tumorske od drugih apoptotičkih tjelešaca, što može bitno utjecati na rezultate, u ovom radu smo željeli provjeriti da li neaktivirana kaspaza-3 opisana u radu Donoughea i sur. ima prognostičko značenje na našoj skupini bolesnika liječenih rituksimabom.

### 1.3.4. CD43

CD43, poznat i kao leukosialin, je multifunkcionalni tip I glikoprotein izražen na većini hematopoetskih stanica.[100] Zbog izrazite O-glikozilacije ekstracelularnog dijela ubraja se u grupu mucina stanične površine.[101] Intracelularni dio molekule sudjeluje u provođenju signala, aktivira nekoliko signalnih puteva i sudjeluje u regulaciji aktivacije i proliferacije. CD43.[102-104] Međutim, fiziološka uloga CD43, iako ekstenzivno istraživana, zapravo je još uvijek kontroverzna. Zbog svog rigidnog ekstracelularnog dijela koji blokira interakciju između stanica, smatran je negativnim regulatorom funkcije T-limfocita.[105,106] Međutim, novije studije su pokazale da je CD43 ligand za endotelsku molekulu E-selektin i migraciju na mjesta upale.[107,108] Osim toga, CD43 ima dualnu ulogu u sazrijevanju T-stanica, potičući[109] ili blokirajući apoptozu[110]. Kod B-limfocita njegova uloga također nije jasna. Poznato je da je važan za sazrijevanje B-staničnih prekursora u koštanoj srži.[111] Nije poznato ima li neku ulogu u kasnijim stadijim razvoja B-limfocita. Naime, zrele plazma stanice i B-limfociti u sluznici probavnog sustava također izražavaju CD43, međutim, zreli B-limfociti u periferiji ne izražavaju CD43.[112,113] Zbog toga je CD43 u kombinaciji sa CD20 koristan za razlikovanje B-staničnog NHL od limfocitne hiperplazije.[114] Učestalost izraženosti CD43 je vrlo različita u

različitim tipovima NHL. Između 16% i 28% DLBCL-a je CD43 pozitivno, no njegovo eventualno prognostičko značenje nije poznato.[115,116] Na maloj seriji bolesnika s okularnim ekstranodalnim limfomom marginalne zone pokazana je povezanost ekspresije CD43 i lošijeg ishoda.[117]

### 1.3.5. Temeljne pretpostavke rada

Obzirom da je rituksimab nedvojbeno poboljšao preživljenje bolesnika s DLBCL za oko 10-15%,[13-15] postavlja se pitanje koji od navedenih mehanizama djelovanja rituksimaba je najznačajniji za takav učinak. To pitanje nema samo akademsko značenje, nego i kliničko, budući da značajan dio bolesnika ne reagira niti na kombinaciju rituksimaba i kemoterapije te u konačnosti oko 40% bolesnika ipak umire od DLBCL. Boljim poznavanjem mehanizama djelovanja i rezistencije na rituksimab moglo bi se pokušati pojačati njegovo djelovanje odnosno dizajnirati nove, još potentnije, inačice anti-CD20 protutijela. Istraživanja na uzorcima bolesnika koja objedinjavaju genetičke karakteristike bolesnika (FcγR polimorfizmi) i faktore vezane uz tumor (imunohistokemijski biljezi) u kombinaciji s klinički pokazateljima (IPI) ključna su za bolje razumjevanje mehanizama djelovanja lijeka, jer svi ti elementi zajedno uvjetuju uspjeh liječenja. Vezano uz sve ranije navedeno, može se pretpostaviti:

- polimorfizmi FcγRIIIa i FcγRIIa receptora nisu povezani s odgovorom na terapiju R-CHOP-om kod bolesnika s DLBCL tj. ADCC posredovan FcγR nije značajan mehanizam djelovanja rituksimaba u ovoj skupini bolesnika.
- izražaj kaspaze-3 u limfomskim stanicama povoljno utječe na prognozu bolesnika jer je odraz očuvanog apoptotskog puta u tumorskim stanicama, važnog za djelovanje rituksimaba i kemoterapije.
- izražaj survivina utječe nepovoljno na prognozu jer koči apoptozu posredovanu rituksimabom i kemoterapijom.
- podjela na GC i non-GC podtip nema prognostičkog značenja kod bolesnika liječenih R-CHOP-om.
- CD43 je nepovoljan prognostički biljeg.

# 2. Ciljevi

Cilj ovog rada je utvrditi vrijednost pojedinih prognostičkih parametara u bolesnika s DLBCL liječenih R-CHOP-om:

- FcγRIIIA 158 V/F i FcγRIIA 131 H/R genskih polimorfizama.
- izražaj molekula uključenih u apoptozu: kaspaza-3, survivin te bcl-2 na limfomskim stanicama.
- procjena prognostičkog značenja izražaja pojedinih biljega tijekom B-stanične diferencijacije na limfomskim stanicama (CD10, bcl 6, MUM1) i imunohistokemijske podjele na GC i non-GC podtip prema Hansovoj te korelacija s gore navedenim parametrima.
- utjecaj izražaja CD43 na stanicama limfoma.

Pored znanstvenog doprinosa, rezultati ove studije mogli bi imati i praktičnu važnost za planiranje individualnog terapijskog pristupa bolesniku. U bolesnika s nepovoljnim prognostičkim biljezima mogla bi se pokušati poboljšati prognoza intenziviranjem terapije, npr. primjenom autologne transplantacije matičnih krvotvornih stanica u prvoj liniji terapije. Obrnuto, bolesnici s vrlo povoljnim prognostičkim karakteristikama mogli bi biti liječeni manje intenzivnom i toksičnom terapijom čime bi se mogla smanjiti učestalost kasnih komplikacija.

# 3. Bolesnici, materijali i metode

## 3.1. Bolesnici

### 3.1.1. Kriteriji uključivanja

U istraživanje su uključeni bolesnici kojima je histološki dijagnosticiran DLBCL u razdoblju od 2001. do 2006. godine, a liječeni su u KBC Zagreb ili KB Dubrava.

Uključni kriteriji

- prethodno neliječen, histološki dijagnosticiran nodalni ili ekstranodalni DLBCL.
- stadij II-IV ili IE.
- planirano liječenje s najmanje 4 ciklusa R-CHOP-a.
- provedeno liječenje rituksimabom i kemoterapijom po shemi CHOP ili sličnom (CNOP, EPOCH) koja sadrži citostatik iz skupine antraciklina.

Isključni kriteriji

- HIV pozitivni bolesnici.
- kompozitni limfom ili transformirani indolentni limfom.
- inicijalno zahvaćanje središnjeg živčanog sustava.
- bolesnici koji nisu liječeni rituksimabom odnosno nisu dobivali antracikline u terapiji.

Svi bolesnici su pismeno dali suglasnost za uzimanje uzorka krvi za PCR analizu i korištenje dijagnostičkih patohistoloških uzoraka za potrebe istraživanja. U studiju je ukupno uključeno 60 bolesnika.

### 3.1.2. Klinička obrada bolesnika

Standardna obrada bolesnika uključuje anamnezu uz evidenciju B simptoma. Fizikalni pregled uključuje uzimanje standardnog internističkog statusa bolesnika uz mjerenje palpabilnih limfnih čvorova u dvije dimenzije u dostupnim regijama (vrat, supraklavikularne regije, aksile, prepone i eventualno ostale palpaciji dostupne regije zahvaćene limfomom) te procjenu općeg stanja bolesnika (performance status prema ECOG-u). Laboratorijska obrada uključuje sedimentaciju, kompletnu krvnu sliku te biokemijske parametre uključivo i LDH, kako bi se mogao izračunati IPI. Za procjenu proširenosti bolesti, kod svih bolesnika je učinjen i CT grudnog koša, trbuha i male zdjelice te biopsija kosti.[118] Na osnovu tih podataka

bolesnicama je procijenjen stadij bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji i veličina tumorske mase.[119] Zbog relativno malog broja bolesnika, bolesnici su svrstani u dvije skupine prema IPI-u: bolesnici s povoljnom prognozom (IPI 0-2) i bolesnici s nepovoljnom prognozom (IPI 3-5).

### 3.1.3. Liječenje i procjena odgovora

Ovisno o stadiju bolesti, IPI-u, veličini tumorske mase, općem stanju i dobi, bolesnicima je planirano liječenje s 4 do 8 ciklusa terapije po shemi R-CHOP (52 bolesnika). Tri bolesnika sa smanjenom srčanom funkcijom su liječeni R-CNOP-om (umjesto doksorubicina dobivali su mitoksantron). Pet bolesnika iz jedne bolnice je liječeno po shemi R-EPOCH. Nakon trećeg ciklusa terapije te nakon zadnjeg ciklusa učinjena je procjena odgovora na liječenje, prema standardnim kriterijima.[120] U slučaju solitarne ostatne tumorske mase nakon kemoterapije, bolesnici su podvrgnuti zračenju zahvaćene regije, a potom je ponovno učinjena evaluacija bolesti. Bolesnici koji nisu postigli kompletnu remisiju, odnosno oni kod kojih je došlo do progresije bolesti za vrijeme liječenja ili ponovne pojave bolesti nakon završetka liječenja (relaps), liječeni su drugom linijom terapije. Kod bolesnika mlađih od 60 godina, druga linija terapije uključuje i autolognu transplantaciju koštane srži. Iznimno, kod dvije mlade bolesnice s velikom tumorskom masom, autologna transplantacija učinjena je u prvoj liniji terapije.

## 3.2. Materijali i metode

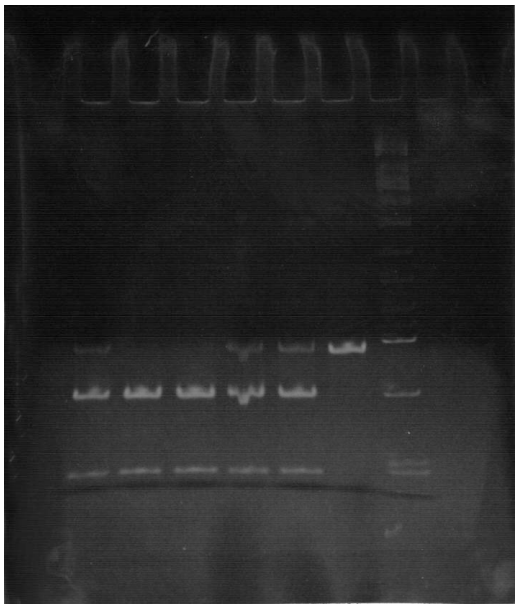
### 3.2.1. Molekularne metode

Bolesnicima se prilikom rutinskog vađenja krvi za laboratorijske pretrage dodatno uzimala još jedna epruveta (oko 3ml krvi) za molekularnu analizu. Iz tog uzorka se metodom isoljavanja izolirala DNA.[121] Analize polimorfizama receptora za Fc fragment izvođene su pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR, engl. polymerase chain reaction) sa specifičnim početnicama (primerima) koje amplificiraju fragment genoma u kojem se nalazi mjesto polimorfizma. Sve analize su učinjene u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb - Laboratorij za molekularnu dijagnostiku.

#### *3.2.1.1. Polimorfizam FcγRIIIa-158V/F*

Određivanje navedenog polimorfizma učinjeno je prema metodi Koene-a i sur. (ref.)

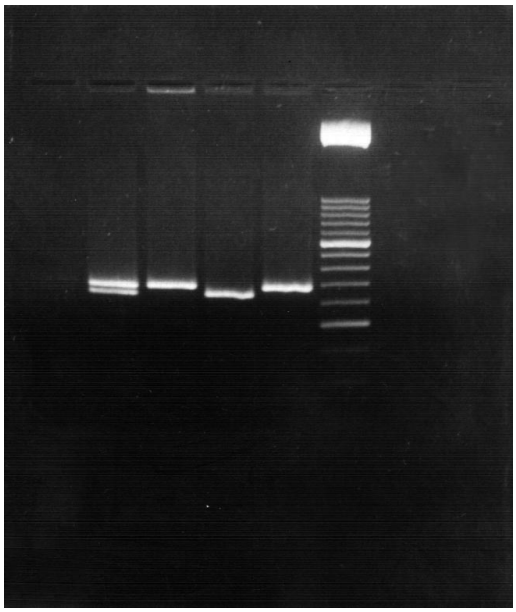
Početnice sekvenci 5'-ATATTTACAGAATGGCACAGG-3' i 5'-GACTTGGTACCCAGGTTGAA-3' (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka) su korištene kako bi se umnožio fragment veličine 1,2 kb koji sadržava mjesto polimorfizma. Za prvi PCR korišteno je 1,25µg DNA, 200 ng svake početnice, 200µM svakog deoksiribonukeotidnog trifosfata (nukleotida) (Roche, Penzberg, Njemačka) i 0.25µl *Taq* DNA polimeraze (Roche, Indianapolis, USA) prema preporuci proizvođača. Prvi PCR se sastojao od 10 minuta na 95°C, potom 35 ciklusa (svaki se sastojao od slijedećih koraka: 1 minuta na 95°C, 1.5 minuta na 57°C i 1.5 minuta na 72°C), i naposlijetku 8 minuta na 72°C kako bi se postigla potpuna ekstenzija. Za drugi PCR korišene su početnice sekvenci 5'-ATCAGATTCGATCCTACTTCTGCAGGGGGCAT-3' i 5'-ACGTGCTGAGCTTGAGTGATGGTGATGTTCAC-3' (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka) koje su umnožavale fragment veličine 94 parova baza i stvarale mjesto za restrikciju enzimom *Nla*III samo na FcγRIIIa-158V alelu. Za navedeni PCR je korišteno 1µl umnožene DNA, 150 ng svake početnice, 200 µM svakog nukleotida i 0,25µl *Taq* DNA polimeraze. Prvi ciklus se sastojao od 5 minuta na 95°C, potom 35 ciklusa (svaki se sastojao od slijedećih koraka: 1 minuta na 95°C, 1 minuta na 64°C i 1 minuta na 72°C), i naposlijetku 9,5 minuta na 72°C kako bi se postigla potpuna ekstenzija. Umnožena DNA (10µl) je tada podvrgnuta digestiji s 1µl *Nla*III enzima (New England Biolabs, Hitchin, Velika Britanija) na 37°C preko noći kroz 12 sati. Drugi dan je učinjena elektroforeza na 10% poliakrilamidnom gelu uz upotrebu etidij bromida kako bi se razdvojeni fragmenti vidjeli pod ultraljubičastim svjetlom. Kod bolesnika FcγRIIIa-158 F/F genotipom vidi se samo jedna nedigestirana linija (engl. band) od 94 para baza. Kod heterozigota, FcγRIIIa-158 V/F, vide se tri linije s po 94, 61 i 33 para baza. Kod homozigota, FcγRIIIa-158 V/V, vide se dvije digestirane linije od 61 i 33 para baza (slika 4).



**Slika 4.** Prikazana je PCR analiza V/F polimorfizama (s lijeva na desno): na stupcima 1,4 i 5 vidljive su sve tri linije - V/F heterozigoti; na stupcima 2 i 3 vide se dvije (digestirane linije) - V/V homozigoti; na stupcu 6 vidi samo jedna, nedigestirana linija – F/F homozigot. Stupac 7 je biljeg za određivanje veličine fragmenata.

### *3.2.1.2. Polimorfizam FcγRIIa-131H/R*

Određivanje FcγRIIa-131H/R polimorfizama učinjeno je prema metodi Liang-a i sur. Kako bi se umnožilo mjesto koje sadržava polimorfizam, korištene su dvije početnice sekvenci 5'-GGAAAATCCCAGAAATTCTCGC-3' i 5'-CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG-3' (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka). Za PCR je korišten volumen od 50µl s 1,25 µg DNA, 170 ng svake početnice, 200 µM svakog nukleotida, 0,25µl Taq DNA polimeraze, uz pufer dobiven od proizvođača i fiziološku otopinu. Prvi ciklus se sastojao od 3 minute na 95°C, potom 35 ciklusa (svaki se sastojao od slijedećih koraka: 15 sekundi na 95°C, 30 sekundi na 55°C i 40 sekundi na 72°C), i naposlijetku 7 minuta na 72°C kako bi se postigla potpuna ekstenzija. Umnožena DNA (7 µl) je potom digestirana s 2 µl BstUI enzima (New England Biolabs) na 60°C kroz 12 sati. Potom je učinjena elektroforeza na 3% agaroza gelu uz upotrebu etidij bromida i vizualizaciju pod ultraljubučastim svjetlom. Kod bolesnika s FcγRIIa-131H/H genotipom na gelu se vidi linija s 337 parova baza, dok je kod bolesnika s FcγRIIa-131 R/R prisutna linija od 316 parova baza. Heterozigoti FcγRIIa-131 H/R su imali obje linije (slika 5).

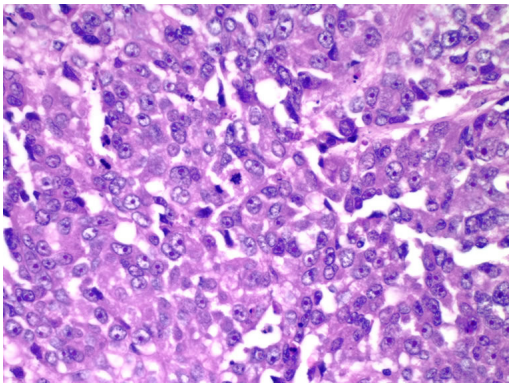


**Slika 5.** Prikazana je PCR analiza H/R polimorfizama (s lijeva na desno): na stupcu 1 vidljive su dvije linije - H/R heterozigoti; na stupcima 2 i 4 vidi se samo nedigestirana linija - H/H homozigoti; na stupcu 3 vidi samo jedna, digestirana linija – R/R homozigot. Stupac 5 je biljeg za određivanje veličine fragmenata.

### 3.2.2. Patohistološke metode

Sva imunohistokemijska bojenja izvedena su na Zavodu za patologiju KBC-a Zagreb, na dijagnostičkom patohistološkom materijalu. Dijagnoza DLBCL-a u svih bolesnika je postavljena od strane iskusnih hematopatologa u KBC Zagreb i/ili KB Merkur i dodatno revidirana od strane prof.dr. Marina Nole.

**Slika 6.** Difuzni velikostanični B-limfom. Vidljive su krupne, polimorfne limfomske stanice s izraženim nuklolima. Bojanje hemalun & eosinom, povećanje 40x.



Iz parafinskih blokova su napravljeni rezovi debljine 4µm. Rezovi su na uobičajen način obojeni hemalaunom i eosinom (slika 6) te imunohistokemijski na CD20 (klon L26, razrjeđenje 1:200, Dako, Glostrup, Danska), CD3 (klon PC3/188A, razrjeđenje 1:50, Dako, Glostrup, Danska), MUM1 (klon MUM1p, razrjeđenje 1:25, Dako, Glostrup, Danska), Bcl-6 (klon PG-B6p, razrjeđenje 1:10, Dako, Glostrup, Danska), CD10 (klon 56C6, razrjeđenje

1:30, Novocastra, Newcastle, Velika Britanija), CD43 (klon DF-T1, razrjeđenje 1:25, Dako, Glostrup, Danska), survivin (lot DYX06, razrjeđenje 1:300, R&D Systems, Minneapolis, SAD) i kaspazu-3(CPP32) (klon: JHM62, razrjeđenje 1:25, Abcam, Cambridge, Velika Britanija). Dodatno su CD43+ uzorci obojeni i na ciklin D1 (klon SP4, razrjeđenje 1:25, Neomarkers, Freemont, SAD), kako bi se i na taj način isključilo eventualno postojanje limfoma plaštenih stanica te CD5 (klon 4C7, razrjeđenje 1:50, Novocastra, Newcastle, Velika Britanija). Za navedene biljege je korištena tehnika vrućinom potaknutog dobivanja protutijela nakon deparafinizacije. Rezovi su stavljeni u mikrovalnu pećnicu na $+95^0$C, 700W kroz 15 minuta, te u otopinu etilen diamin tetraoctene kiseline (EDTA) 1 mM pH 8.0, uz manje modifikacije za pojedina protutijela, ovisno o uputi proizvođača. Za vizualizaciju izražaja biljega, nakon prijanjanja protutijela i inkubacije primarnih protutijela, postupak je dovršen u instrumentu Dako ES koristeći diaminobenzidin imunoperoksidazni kit (DakoCytomation, Denmark). Za bcl-2, bcl-6, CD10, MUM1, CD43 i survivin pozitivnim rezultatom smatran je nalaz specifičnog izražaja u više od 30% tumorskih stanica. Za imunohistokemijsku podjelu na GCB i non-GCB korišten je algoritam prema Hansovoj i suradnicima (poglavlje 1.3.2, slika 3).[60] Kod survivina je promatrana samo nuklearna pozitivnost. Rezultat imunohistokemijskog bojenja na kaspazu-3 interpretiran je prema ranije opisanom radu.[96] Evaluiran je citoplazmatski pozitivitet te točkasti naspram difuznog uzorka bojenja. Bojanje na kaspazu evaluirano je semikvantitativno prema udjelu obojenih tumorskih stanica: 0 – < 25% pozitivnih tumorskih stanica , 1 - 25%-50% pozitivnih tumorskih stanica, 2 – 50%-75% pozitivnih tumorskih stanica, 3 - > 75% pozitivnih tumorskih stanica.

### 3.2.3. Statističke metode

Promatrani ishodi su odgovor na liječenje, preživljenje – EFS i OS. EFS se računa od prvog dana primjene prvog ciklusa terapije do događaja: neuspjeha liječenja (progresija bolesti; započinjanje nekog drugog, neplaniranog, anti-limfomskog, liječenja; relaps bolesti; smrt od bilo kojeg uzroka) ili do zadnje kontrole. OS se računa od prvog dana primjene prvog ciklusa terapije do dana smrti ili do zadnje kontrole. Za usporedbu značajki bolesnika koristio se Pearsonov $\chi^2$ test odnosno Fisherov $\chi^2$ test, ovisno o broju bolesnika i frekvenciji očekivanih ishoda. Mann-Whitneyev test je korišten za neparametrijske podatke. Trajanje najboljeg odgovora i preživljenje bolesnika prikazano je Kaplan-Meierovom metodom.[122] Za usporedbu preživljenja između pojedinih skupina i podskupina, upotrebljavao se log-rank test. Za procjenu prediktivne vrijednosti pojedinih parametara korištena je logistička regresija (kod procjene odgovora na terapiju) i Coxova regresijska analiza (za preživljenje). $\chi^2$ test je

korišten za procjenu povezanosti (korelacije) između kvalitativnih pokazatelja. Od opisnih varijabli (deskriptora) korišten je medijan i 95% intervali pouzdanosti (engl. „confidence interval“ – CI). Statistički značajnom smatrana je vrijednost $p < 0.05$ kod koje je odbacivana nul-hipoteza o normalnoj raspodjeli.

Statistička analiza je učinjena upotrebom licenciranog statističkog programa Statistica® (verzija 7.1, StatSoft Inc. Tulsa, SAD).

## 3.3. Etika

Istraživanje je odboreno od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb (Ur. br. 01-520/2-1-2005) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta (Ur.broj 04-1356-2007). Svi bolesnici su potpisali informirani pristanak. Identitet bolesnika bio je zaštićen.

Istraživanje je dio znanstvenih projekata potpomognutih od Ministarstva znanosti obrazovanja i športa Republike Hrvatske: „Dijagnostika i liječenje limfoma“ i „CD43 – prognostički biljeg za predviđanje ishoda oboljelih od limfoma“ čiji su voditelji prof. dr Igor Aurer odnosno dr. sc. Ivana Ilić.

# 4. Rezultati

## 4.1. Značajke i ishodi svih bolesnika

Značajke svih 60 bolesnika i odgovor na liječenje prikazan je u tablici 2. Nakon provedene terapije, kompletnu remisiju (KR) i nepotvrđenu kompletnu remisiju (nKR) je postiglo ukupno 49 (82%) bolesnika. Osam od njih je kasnije doživjelo relaps bolesti.

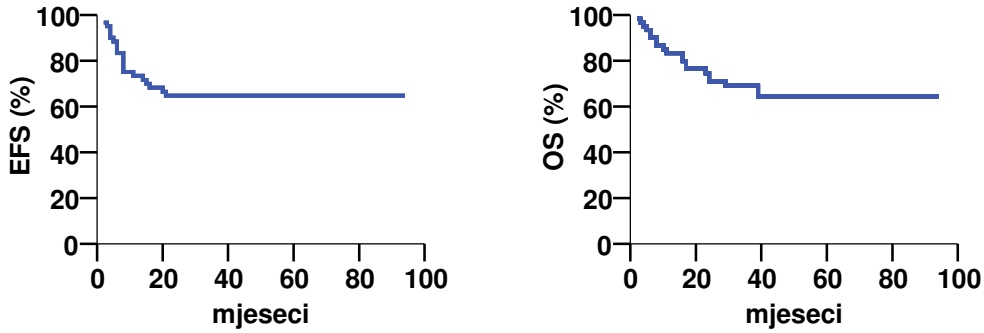
**Tablica 2.** Značajke bolesnika i odgovor na liječenje

| Značajka | Broj bolesnika (%) (n = 60) |
|---|---|
| Demografske značajke | |
| dob (medijan, raspon) [godine] | 48,5 (17-75) |
| muški spol | 34 (57) |
| Značajke bolesti | |
| stadij III i IV | 32 (53) |
| starost ≥ 60 godina | 17 (28) |
| opće stanje bolesnika (PS po ECOG-u) > 1 | 26 (43) |
| povišen LDH | 38 (63) |
| > 1 ekstranodalna zahvaćenost | 21 (35) |
| najveća tumorska masa > 5cm | 37 (65)* |
| međunarodni prognostički indeks (IPI) | |
| 0 do 2 | 34 (57) |
| 3 do 5 | 26 (43) |
| Odgovor na liječenje | |
| kompletna remisija (KR) i nepotvrđena KR | 49 (82) |
| parcijalna remisija; stabilna/progresivna bolest | 11 (18) |
| relaps nakon postignute (n)KR | 8 |

* za troje bolesnika nije bilo podataka o veličini najveće tm. mase

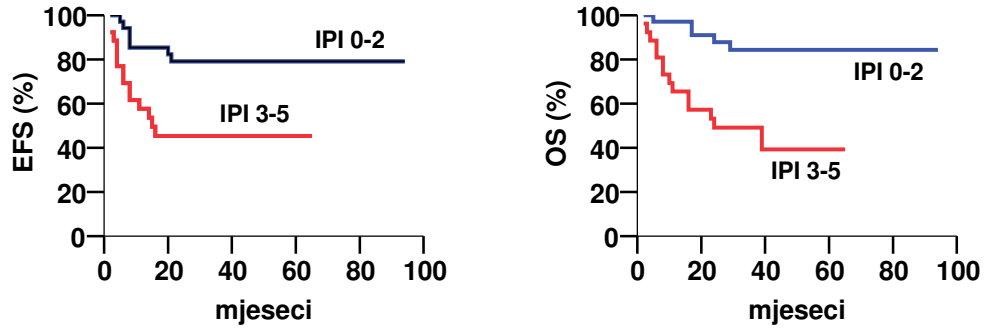
Nakon medijana praćenja od 35 mjeseci za živuće bolesnike, dvogodišnje preživljenje bez događaja (EFS) bilo je 64%, a dvogodišnje ukupno preživljenje (OS) 71% (slika 7).

**Slika 7.** EFS i OS svih bolesnika




Bolesnici su potom svrstani prema IPI-u u prognostički povoljnu skupinu (IPI 0-2) i prognostički nepovoljnu skupinu (IPI 3-5). Očekivano, bolesnici s visokim IPI imali su statistički lošije dvogodišnje preživljenje u odnosu na one s nižim IPI: EFS (45% vs. 79%, p = 0.003) i OS (49% vs. 88%, p = 0.001) (slika 8). Također, odgovor na terapiju u bolesnika s IPI 3-5 bio je lošiji u odnosu na one s IPI 0-2 (65% vs. 94% za (n)KR, p = 0.004).

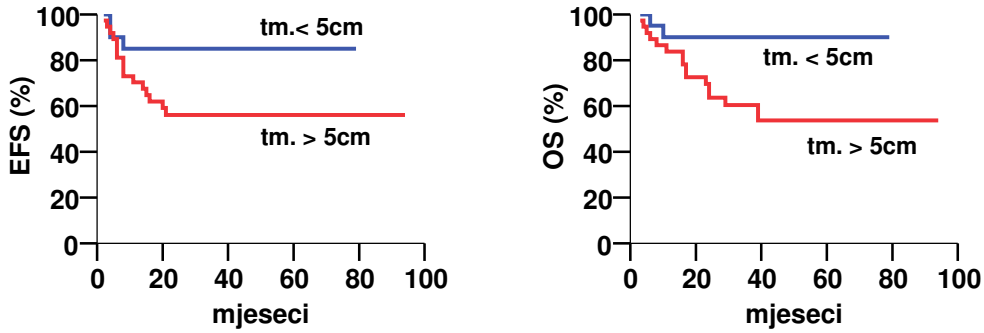
**Slika 8.** EFS i OS bolesnika prema IPI




Dodatno, analizirani su ishodi obzirom na najveću tumorsku masu. Obzirom da u literaturi nema konsenzusa o granici između tumora koji nisu ili jesu velike mase, analizirane su tri uobičajene vrijednosti od 5cm, 7.5cm i 10cm. Nije bilo razlike u odgovoru na terapiju obzirom na niti jednu od navedenih vrijednosti. No, u pogledu preživljenja, bolesnici s najvećom tumorskom masom preko 5cm imali statistički značajno lošije dvogodišnje preživljenje u odnosu na one s tumorom manjim od 5cm: EFS (56% vs. 85%, p = 0.045) te OS (64% vs. 90%, p = 0.024) (slika 9). Za granične vrijednosti od 7.5cm i 10cm postojao je

trend prema lošijem preživljenju bolesnika s većom tumorskom masom, ali statistička značajnost nije dosegnuta.

**Slika 9.** EFS i OS bolesnika prema veličini najveće tumorske mase




## 4.2. Povezanost polimorfizama FcγRIIIa-158V/F i FcγRIIa-131H/R s ishodom bolesnika

Kod ukupno 58 bolesnika je učinjena analiza FcγRIIIa i FcγRIIa polimorfizama**.** U dva bolesnika nije bilo moguće izolirati dovoljno DNA za analizu. Značajke bolesnika i odgovor na liječenje prema analiziranim polimorfizmima prikazan je na tablici 3. Frekvencije FcγRIIIa polimorfizama bile su: V/V 36%, V/F 47% i F/F 17%. Frekvencije FcγRIIa polimorfizama bile su: H/H 38%, H/R 47% i R/R 15%. Nije bilo statistički značajnih razlika među podgrupama u pogledu dobi, spola, PS, LDH, ekstranodalne bolesti, stadija, veličine tumorske mase. Nije nađeno povezanosti između učestalosti pojedinih FcγRIIIa i FcγRIIa polimorfizama (p = 0.29). Nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na terapiju između bolesnika s FcγRIIIa fenotipom (VV 71%, VF 85%, FF 90% za (n)KR, p = 0.35) i FcγRIIa fenotipom (p HH 86%, HR 81%, RR 67% za (n)KR, p= 0.45).

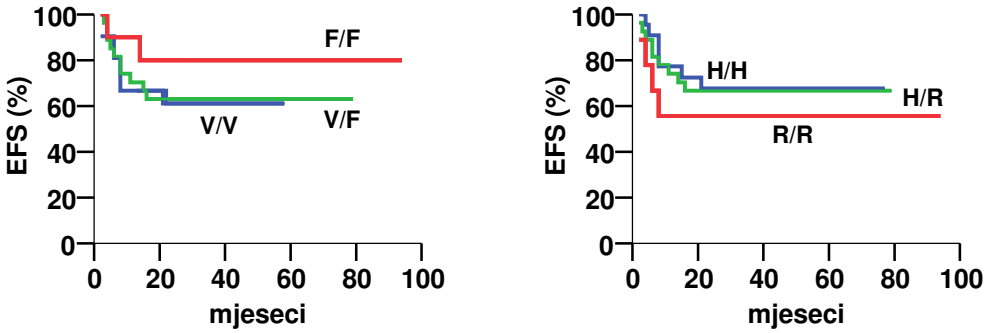
**Tablica 3.** Značajke bolesnika i ishod liječenja obzirom na FcγRIIIa i FcγRIIa polimorfizme.

| | FcγRIIIa 158 | | | | FcγRIIa 131 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | V/V | V/F | F/F | p | H/H | H/R | R/R | p |
| **Broj. (%)** | **21 (36)** | **27 (47)** | **10 (17)** | | **22 (38)** | **27 (47)** | **9 (15)** | |
| **Dob, medijan (raspon) [godine]** | 44 (25-75) | 49 (25-74) | 35 (17-67) | 0.31 | 48 (22-73) | 48 (17-75) | 38 (25-68) | 0.33 |
| **Muški spol (%)** | 11 (52) | 18 (67) | 5 (50) | 0.51 | 13 (59) | 15 (56) | 6 (67) | 0.84 |
| **Stadij III i IV (%)** | 9 (43) | 16 (59) | 6 (60) | 0.48 | 9 (41) | 17 (63) | 5 (56) | 0.30 |
| **Dob ≥ 60 (%)** | 8 (38) | 8 (30) | 1 (10) | 0.28 | 7 (32) | 8 (30) | 2 (22) | 0.87 |
| **PS > 1 (%)** | 8 (38) | 13 (48) | 5 (50) | 0.74 | 10 (45) | 11 (41) | 5 (56) | 0.74 |
| **Povišen LDH (%)** | 13 (62) | 17 (63) | 8 (80) | 0.57 | 14 (64) | 18 (66) | 6 (67) | 0.97 |
| **>1 ekstranod. zahvaćenost (%)** | 6 (29) | 7 (26) | 3 (30) | 0.96 | 4 (18) | 8 (30) | 4 (44) | 0.32 |
| **Tumor > 5cm (%)*** | 14 (74) | 14 (54) | 7 (70) | 0.35 | 17 (77) | 14 (56) | 4 (50) | 0.22 |
| **IPI (%)** | | | | | | | | |
| **0-2** | 12 (57) | 15 (56) | 5 (50) | 0.93 | 14 (64) | 14 (52) | 4 (44) | 0.56 |
| **3-5** | 9 (43) | 12 (44) | 5 (50) | | 8 (36) | 13 (48) | 5 (56) | |
| **Odgovor na th. (n)KR** | **15 (71)** | **23 (85)** | **9 (90)** | **0.35** | **19 (86)** | **22 (81)** | **6 (67)** | **0.45** |

* za troje bolesnika nije bilo podataka o veličini najveće tm. mase

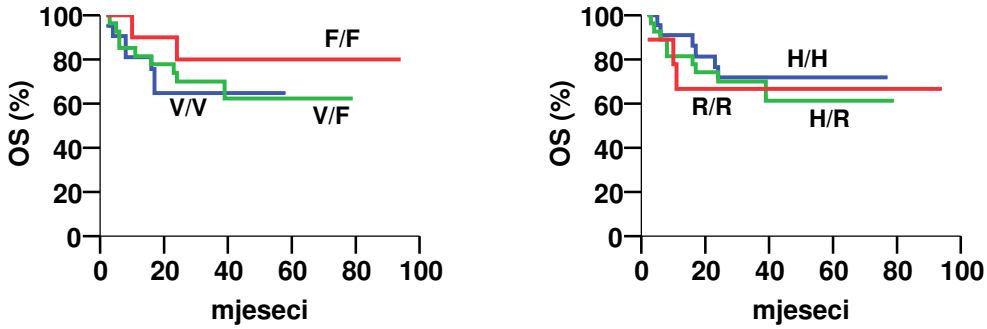
Nadalje, nije bilo razlike u preživljenju obzirom na polimorfizme gena za FcγRIIIa i FcγRIIa receptore. Za FcγRIIIa polimorfizme 2-godišnji EFS iznosio je: V/V 61%, VF 63%, FF 80%; p = 0.58 (slika 10). Za FcγRIIa polimorfizme 2-godišnji EFS iznosio je: H/H 68%, H/R 67%, RR 56%; p = 0.64 (slika 10).

**Slika 10.** EFS obzirom na FcγRIIIa i FcγRIIa polimorfizme



Za FcγRIIIa polimorfizme 2-godišnji OS iznosio je: V/V 64%, VF 70%, FF 80%; p = 0.61 (slika 11). Za FcγRIIa polimorfizme 2-godišnji OS iznosio je: H/H 72%, H/R 70%, RR 67%; p = 0.64 (slika 11).

**Slika 11.** OS obzirom na FcγRIIIa i FcγRIIa polimorfizme



## 4.3. Imunohistokemijski biljezi

### 4.3.1. Biljezi aktivacije i diferencijacije, podjela na GC i non-GC podtipove

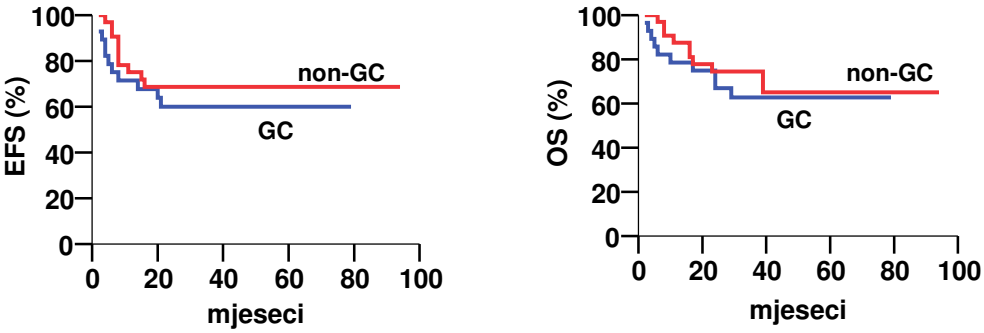
Imunohistokemijsko bojanje na CD10, bcl-6 i MUM1 učinjeno je na uzorcima svih 60 bolesnika. CD10 pozitivnih je bilo 35%, bcl-6 pozitivnih 68%, MUM1 pozitivnih 62% bolesnika (tablica 4). Prema algoritmu Hansove i suradnika učinjena je podjela DLBCL prema podrijetlu: 47% bolesnika je svrstano u GC skupinu, a 53% u non-GC skupinu. Niti jedan od biljega zasebno nije korelirao s odgovorom na terapiju ($p = 0.43$ za CD10; $p = 0.73$ za bcl-6; $p = 0.88$ za MUM1) kao niti GC vs. non-GC podtip (79% vs. 84%, $p = 0.56$).

**Tablica 4.** Imunohistokemijski biljezi aktivacije i diferencijacije i podjela na GC i non-GC podtip.

| Imunohistokemijski biljeg | n | % |
|---|---|---|
| CD10 | | |
| - | 39 | 65 |
| + | 21 | 35 |
| Bcl-6 | | |
| - | 19 | 32 |
| + | 41 | 68 |
| MUM1 | | |
| - | 23 | 38 |
| + | 37 | 62 |
| | | |
| **GC** | 28 | 47 |
| **non-GC** | 32 | 53 |

Nije nađeno povezanosti između preživljenja bolesnika (EFS i OS) i pojedinačnog izražaja CD10, bcl-6 i MUM1. Isto tako, GC i non-GC imunofenotip nisu bili povezani s razlikom u preživljenju ($p = 0.40$ za EFS, $p = 0.47$ za OS) (slika 12).

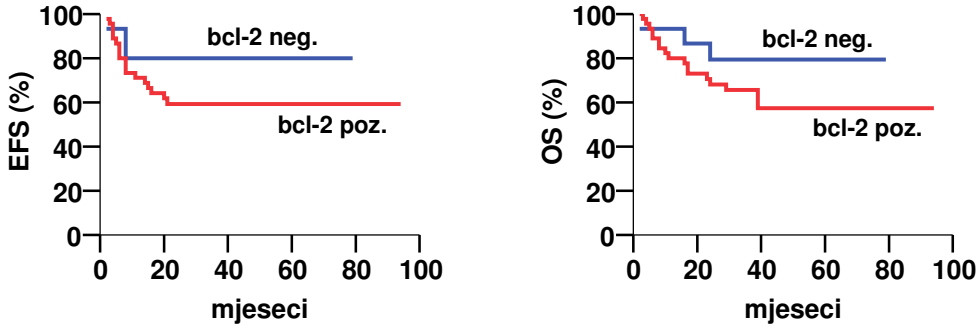
**Slika 12.** EFS i OS obzirom na GC i non-GC imunofenotip




### 4.3.2. Bcl-2

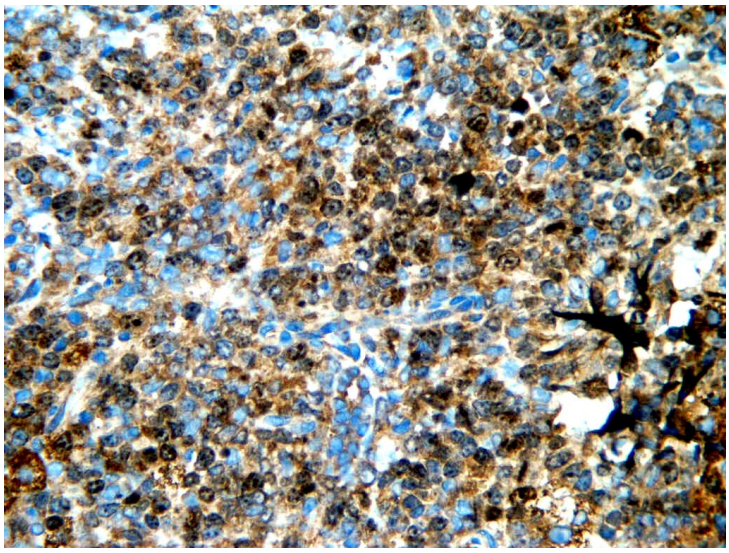
Kod svih 60 uzoraka bolesnika je učinjeno bojenje na bcl-2 od čega je 45 (75%) bilo pozitivno, a 15 (25%) bcl-2 negativno. Izražaj bcl-2 pozitivno je povezan s izražajem MUM1 (p = 0.047), no povezanost s non-GC fenotipom nije dosegla statističku značajnost (p= 0.07). Pored toga, bolesnici s izražajem bcl-2 imali su lošiji IPI (u skupini s visokim IPI bilo je 3 od 15 bcl-2 negativnih i 23 od 45 bcl-2 pozitivnih bolesnika, p = 0.035). Nije bilo statističke povezanosti između bcl-2 i ostalih ispitivanih parametara. Usprkos povezanosti s nepovoljnim IPI, DLBCL s izražajem bcl-2 nisu imali statistički lošiji odgovor na liječenje od bcl-2 negativnih (80% vs. 87% za (n)KR, p = 0.56). Slično tome, nije nađeno razlike u preživljenju obzirom na izražaj bcl-2 (p = 0.71 za EFS, p = 0.48 za OS) (slika 13).

**Slika 13.** EFS i OS obzirom na izražaj bcl-2

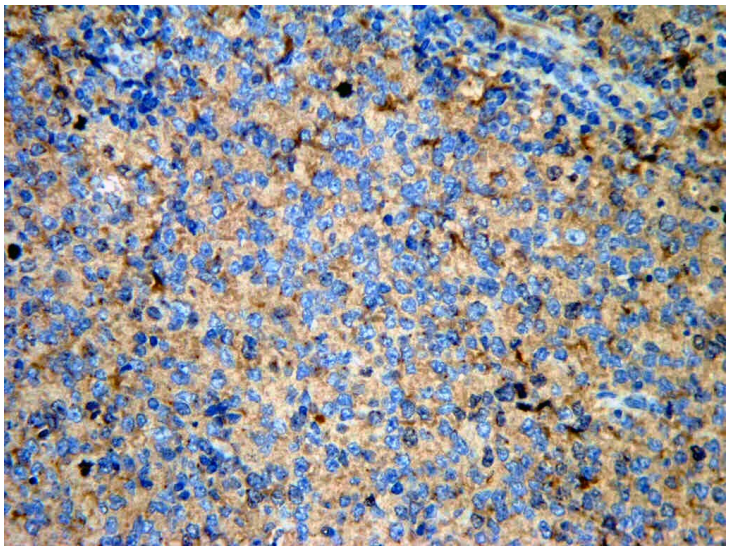


### 4.3.3. Survivin

Imunohistokemijsko bojanje na survivin učinjeno je na uzorcima 59 bolesnika (slika 14 a, b). Kod jedne bolesnice se zbog utroška materijala bojanje nije moglo učiniti.



**Slika 14a.** Većina tumorskih stanica pokazuje nuklearnu pozitivnost na survivin.

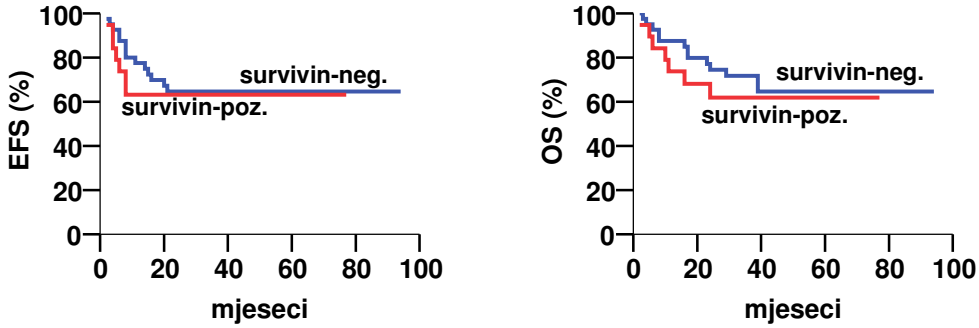


**Slika 14b.** Jezgre tumorskih stanica su jasno survivin-negativne.

Uzoraka pozitivnih na survivin bilo je 15 (25%). Nije bilo korelacije između pozitivnosti na survivin i ostalih parametara (dob, spol; stadij bolesti, dob ≥ 60 godina, PS, ekstranodalna lokalizacija > 1, LDH, tumorska masa > 5cm, IPI; CD10, bcl-6, MUM1, bcl-2, kaspaza-3, CD43). Nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na liječenje između survivin-pozitivnih i survivin-negativnih DLBCL (74% vs. 85% za (n)KR, p = 0.30). Slično tome, nije

nađeno razlike u preživljenju obzirom na izražaj survivina (p = 0.71 za EFS, p = 0.48 za OS) (slika 15).

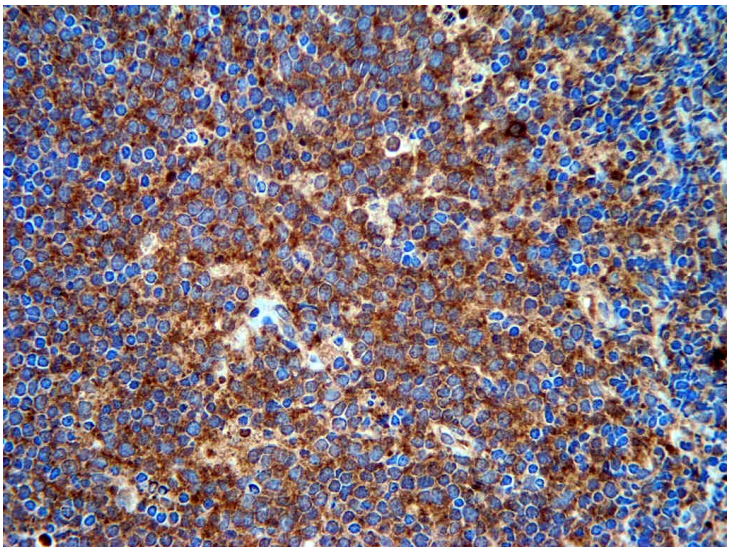
**Slika 15.** EFS i OS obzirom na izražaj survivina

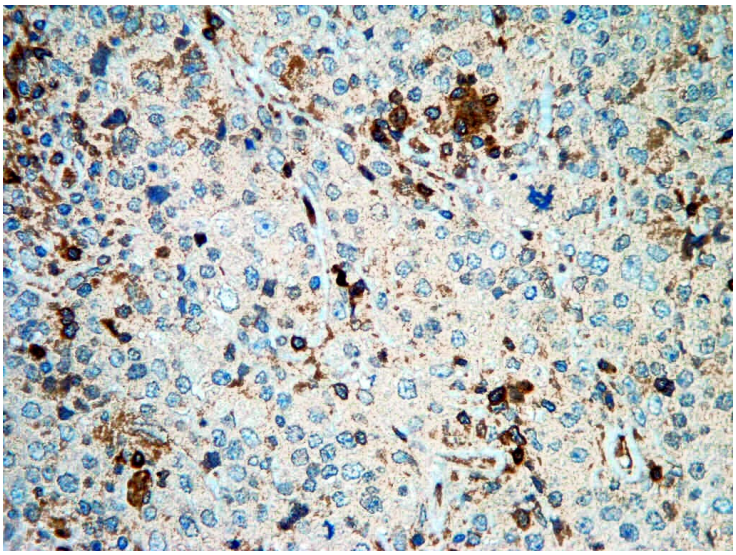



### 4.3.4. Kaspaza-3

Imunhistokemijsko bojanje na kaspazu-3 učinjeno je na kod svih bolesnika (slika 16 a, b).

**Slika 16a.** Gotovo sve tumorskih stanice pokazuju izrazitu citoplazmatsku pozitivnost na kaspazu-3.



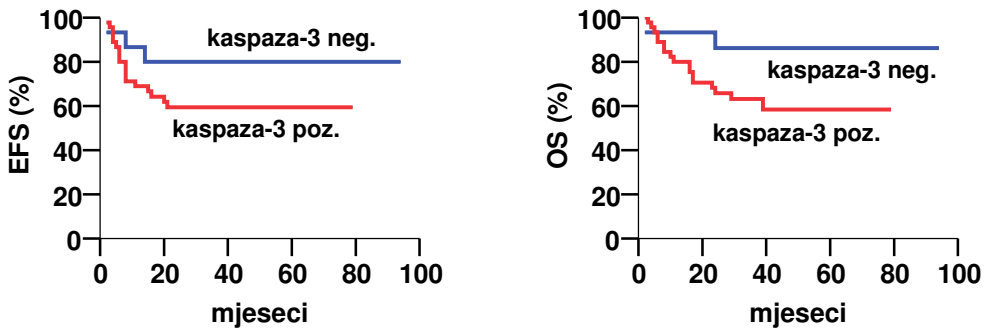


**Slika 16b.** Tek poneka tumorska stanica je citoplazmatski pozitivna na kaspazu-3.

Nalaz manje od 50% obojenih tumorskih stanica (rezultati 0 i 1) je smatran kaspaza-3 negativnim, dok je nalaz više od 50% obojenih tumorskih stanica je (rezultati 2 i 3) smatran pozitivnim. Među analiziranim uzorcima, 45 (75%) ih je bilo pozitivno na kaspazu-3 dok je svega 15 (25%) uzoraka je bilo negativno. U našoj seriji bolesnika je u svim pozitivnim tumorima obojenje na kaspazu-3 bilo difuzno. Točkasto obojenje citoplazme koje je opisano u radu Donoughua i sur.[96] nismo opazili. Nije bilo korelacije između pozitivnosti na kaspazu-3 i svih ostalih parametara (dob, spol; stadij bolesti, dob ≥ 60 godina, PS, ekstranodalna lokalizacija > 1, LDH, tumorska masa > 5cm, IPI; CD10, bcl-6, MUM1, bcl-2, survivin, CD43). Pri analizi odgovora na terapiju, nije bilo statistički značajne razlike obzirom na ekspresiju kaspaze-3: 93% kod kaspaza-3 negativnih vs. 78% kod kaspaza-3 pozitivnih za (n)KR, p = 0.34.

Bolesnici s DLBCLom negativnim na kaspazu-3 imali su trend boljeg preživljenja u odnosu na one pozitivne na kaspazu-3, no ta razlika nije dosegla statističku značajnost. Dvogodišnji EFS bio je 80% naprema 59%, p = 0.17; a dvogodišnji OS, 86% naprema 65%, p = 0.10. (slika 17).

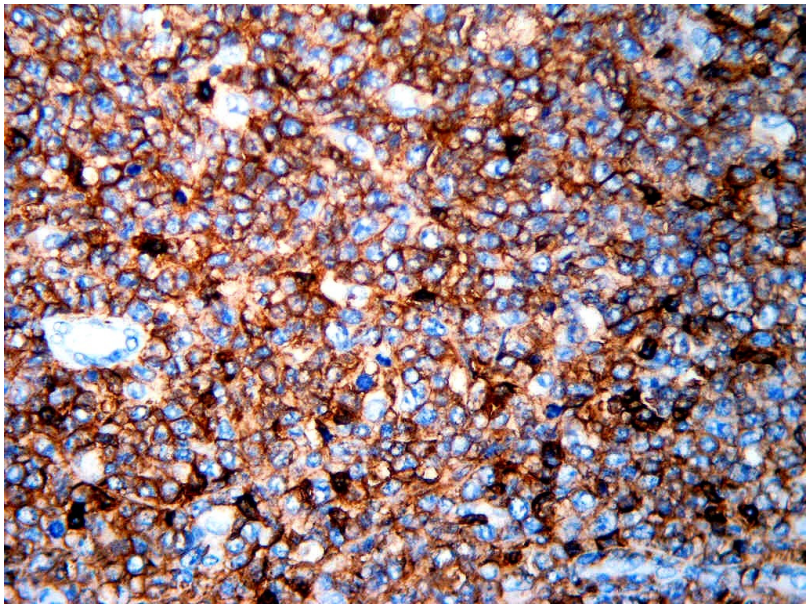
**Slika 17.** EFS i OS obzirom na izražaj kaspaze-3

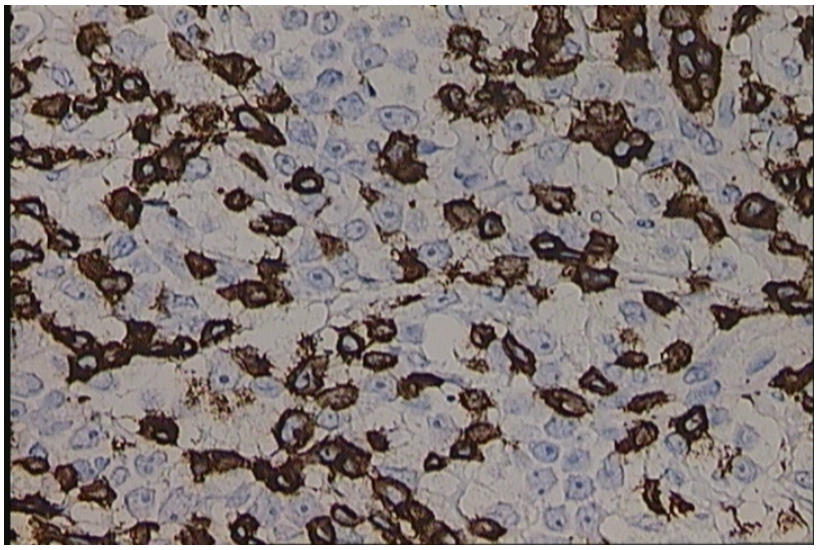



### 4.3.5. CD43

Svih 60 uzoraka je analizirano na CD43, od čega je 16 (27%) bilo CD43 pozitivno, a 44 (73%) CD43 negativno. CD43 je molekula koja se nalazi na membrani stanice što se prikazuje kao membranski pozitivitet (slika 18 a, b) Iako smo kao graničnu vrijednost uzeli 30%, zapravo je CD43 kod pozitivnih DLBCL izražen u gotovo svim tumorskim stanicama. Obrnuto, kod negativnih bolesnika gotovo nijedna tumorska stanica nije pozitivna.

**Slika 18a.** Pozitivno bojenje na CD43 - membranski pozitivitet u gotovo svim tumorskim stanicama.





**Slika 18b.** Negativno bojenje na CD43 – velike tumorske stanice su jasno negativne, dok su okolni T limfociti pozitivni.

Značajke bolesnika i povezanost s ostalim parametrima obzirom na izražaj CD43 prikazana je na tablici 5. Izražaj CD43 povezan je s muškim spolom ($p = 0.004$), više od jednom ekstranodalnom lokalizacijom ($p = 0.014$) te s nepovoljnim IPI ($p = 0.017$).

Bolesnici sa CD43 pozitivnim DLBCL imali su lošiji odgovor na terapiju u odnosu na CD43 negativne (63% vs. 89% za (n)KR, $p = 0.022$).

**Tablica 5.** Značajke bolesnika i odgovor na terapiju u odnosu na izražaj CD43

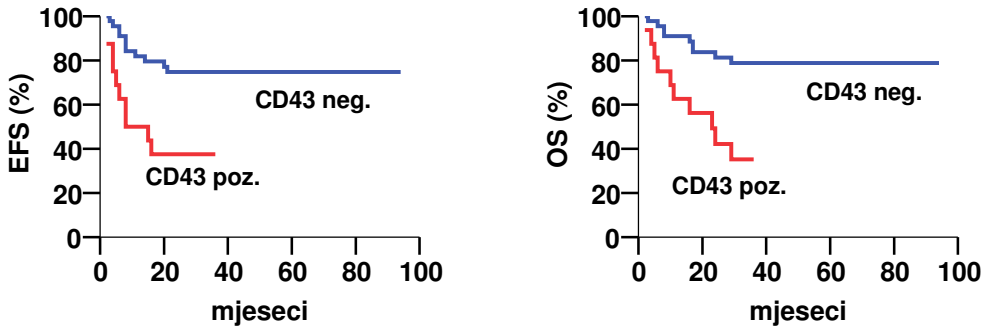
| Značajka | CD43 pozitivni n = 16 (27%) | CD43 negativni n = 44 (73%) | p |
|---|---|---|---|
| Demografske značajke | | | |
| dob (medijan, raspon) [godine] | 51 (17-73) | 47 (18-75) | 0.56 |
| muški spol (%) | 14 (88) | 20 (45) | **0.004** |
| Značajke bolesti (%) | | | |
| stadij III i IV | 11 (69) | 21 (48) | 0.15 |
| starost ≥ 60 godina | 4 (25) | 13 (30) | 0.73 |
| PS (ECOG-u) > 1 | 10 (63) | 16 (36) | 0.071 |
| povišen LDH | 13 (81) | 25 (57) | 0.082 |
| > 1 ekstranodalna zahvaćenost | 8 (50) | 8 (18) | **0.014** |
| najveća tumorska masa > 5cm* | 11 (73) | 26 (62) | 0.43 |
| IPI 3 do 5 | 11 (69) | 15 (34) | **0.017** |
| Izražaj ostalih biljega | | | |
| CD10 | 7 (44) | 14 (32) | 0.39 |
| bcl-6 | 11 (69) | 30 (68) | 0.97 |
| MUM1 | 10 (63) | 27 (61) | 0.94 |
| GC imunofenotip | 7 (44) | 21 (48) | 0.79 |
| bcl-2 | 4 (25) | 11 (25) | 1.00 |
| survivin** | 7 (44) | 8 (18) | 0.10 |
| kaspaza-3 | 15 (94) | 30 (68) | 0.092 |
| Odgovor na liječenje | | | |
| (n)KR | 10 (63) | 39 (89) | **0.022** |

* za troje bolesnika nije bilo podataka o veličini najveće tm. mase

** survivin je analiziran u 59 bolesnika

Bolesnici sa CD43 pozitivnim DLBCL imaju statistički značajno lošije dvogodišnje preživljenje u odnosu na CD43 negativne: 38% vs. 75% za EFS, p = 0.002; 42% vs. 81% za OS, p = 0.001. (slika 19.)

**Slika 19.** EFS i OS obzirom na izražaj CD43




## 4.4. Multivarijantna analiza

Obzirom na rezultate univarijantne analize i ukupni broj bolesnika u studiji, u multivarijantnu analizu su uključeni samo parametri koji čine IPI te CD43 koji je jedini od ispitivanih prognostičkih biljega u ovom istraživanju pokazao korelaciju s odgovorom na terapiju i preživljenjem.

### 4.4.1. Logistička regresija

Uključeni su parametri: CD43, stadij III i IV, dob bolesnika $\geq$ 60 godina, ekstranodalna lokalizacija > 1, povišen LDH, lošiji PS. Zavisna varijabla bio je odgovor na terapiju – (n)KR vs. ostali ishodi. Niti jedan parametar nije bio povezan s odgovorom na liječenje.

### 4.4.2. Coxova regresijska analiza

Uključeni su parametri: CD43, stadij III i IV, dob bolesnika $\geq$ 60 godina, ekstranodalna lokalizacija > 1, povišen LDH, lošiji PS. Nijedna varijabla nije korelirala s EFS, dok je jedino CD43 korelirao s OS (relativni rizik (RR) 2.78, $p = 0.04$) – tablica 6.

**Tablica 6.** Multivarijantna analiza parametara uključenih u IPI i CD43.

| Parametar | EFS | | OS | |
|---|---|---|---|---|
| | **RR (95%CI)** | ***p*** | **RR (95% CI)** | ***p*** |
| PS > 1 | 1.16 (0.46 – 2.92) | 0.76 | 1.47 (0.54 – 4.00) | 0.45 |
| Stadij III and IV | 1.17 (0.32 – 4.26) | 0.81 | 1.34 (0.32 – 5.58) | 0.69 |
| Dob ≥ 60 godina | 1.34 (0.48 – 3.70) | 0.58 | 1.84 (0.63 – 5.39) | 0.27 |
| Povišen LDH | 4.43 (0.84 – 23.40) | 0.079 | 3.12 (0.58 – 16.80) | 0.19 |
| Ekstranodalna lokalizacija > 1 | 1.57 (0.56 – 4.40) | 0.39 | 1.79 (0.59 – 5.46) | 0.30 |
| CD43 pozitivnost | 2.73 (1.50 – 4.97) | 0.077 | **2.78 (1.05 – 7.39)** | **0.040** |

Kratice: RR = relativni rizik; CI = interval pouzdanosti

U slijedećem koraku uzet je IPI kao jedinstvena varijabla u četiri kategorije ($IPI_4$) i CD43. Obje varijable su povezane s OS: RR 1.81 (CI za $IPI_4$, p = 0.008; RR 2.69 za CD43, p = 0.042).

Slični rezultati dobiveni su kad su bolesnici grupirani u dvije skupine prema IPI (IPI 0-2 vs. 3-5): RR 3.62 (CI 1.23 – 10.66) za IPI, p = 0.019; RR 2.83 (CI 1.09 – 7.38 ) za CD43, p = 0.032.

Za razliku od CD43, postojanje tumorske mase veće od 5cm koja je također u Kaplan-Meierovoj analizi preživljenja bila povezana s lošijim ishodom, nije neovisno povezana s lošijim OS (RR 2.87 (CI 0.61 – 13.35), p = 0.18) u odnosu na IPI.

# 5. Rasprava

## 5.1. Osvrt na rezultate liječenja, veličinu tumorske mase i kriterije odabira bolesnika

Ovo istraživanje učinjeno je na uzorku od 60 bolesnika s DLBCL liječenih R-CHOP-om ili sličnim antraciklinskim protokolom. Rezultati liječenja naših bolesnika (82% bolesnika je postiglo (n)KR; dvogodišnji EFS 64%, dvogodišnji OS 71%) jednaki su[27] ili neznatno lošiji od rezultata drugih istraživačkih grupa slične populacije bolesnika[68,69]. Iako broj bolesnika nije posebno velik, medijan praćenja bolesnika od 35 mjeseci je zadovoljavajući obzirom na činjenicu da se relaps bolesti obično javlja u prve dvije godine nakon provedenog liječenja. Značajna razlika u preživljenju, u univarijantnoj i multivarijantnoj analizi, između bolesnika s povoljnim i nepovoljnim IPI potvrđuje reprezentativnost ispitivane skupine bolesnika.

Nađena je i povezanost promjera najveće tumorske mase više od 5cm s lošijom prognozom bolesnika, dok to nije vrijedilo za tumorsku masu veću od 7.5 i 10cm. Međutim, u multivarijantoj analizi, tumorska masa veća od 5cm nije bila povezana s preživljenjem. Obzirom na različite kriterije definiranja "bulky disease" među različitim istraživačkim grupama ni velike, multicentrične studije nisu jasno definirale graničnu vrijednost za veličinu tumorske mase koja ima prognostičko značenje, posebno u doba rituksimaba. U velikoj američkoj studiji randomiziranoj studiji nije praćen utjecaj veličine tumorske mase na prognozu.[15] U francuskoj randomiziranoj studiji (GELA), koja je uključivala starije bolesnike, nije bilo utjecaja tumorske mase veće 10 cm na prognozu bolesnika.[13] U MInT studiji, koja je uključivala mlađe bolesnike s povoljnom prognozom prema IPI-u, stadija II –IV i one s velikom tumorskom masom stadija I, nađena je najbolja povezanost granične veličine 7.5cm s ishodom bolesnika.[14] U kasnijoj evaluaciji utjecaja veličine tumorske mase na prognozu bolesnika u MinT studiji, nađeno je da dodatak rituksimaba donekle smanjuje nepovoljan utjecaj velike tumorske mase.[123] Međutim, i u bolesnika liječenih rituksimabom i dalje postoji statistička povezanost tumorske mase veće od 6cm s OS, dok je jedino statistički značajna povezanost s EFS na graničnoj vrijednosti od 10cm ($p = 0.047$). Takvi različiti rezultati među studijama, uključivo i naše istraživanje, mogu se objasniti razlikama u ispitivanoj populaciji. Naime, kod bolesnika s nepovoljnim IPI te starijih bolesnika, za pretpostaviti je da je utjecaj veličine tumorske mase na prognozu manji, posebice uzevši u obzir rezultate GELA studije.[124]

Obzirom da način liječenja utječe na važnost pojedinih prognostičkih čimbenika, u naše smo istraživanje uključili bolesnike liječene na isti ili vrlo sličan način. Zbog toga nisu uključeni bolesnici stadija I s nodalnim limfomom odnosno svi oni koji nisu liječeni rituksimabom i antraciklinskom kemoterapijom (npr. zbog vrlo lošeg općeg stanja). Od 60 bolesnika, njih pet primilo je R-EPOCH, tri R-CNOP, dok su svi ostali (87%) liječeni R-CHOP-om. U ovom trenutku nema dokaza da je R-EPOCH bolji od R-CHOP-a.

Uključeni su bolesnici s nodalnim i ekstranodalnim DLBCL. Oko 1/3 limfoma su ekstranodalnog porijekla, međutim, ne postoje jedinstveni kriteriji za razlikovanje jednih od drugih, posebno ako je riječ o uznapredovaloj bolesti. [125,126] Niti klasifikacija SZO-a ne razlikuje DLBCL prema nodalnom i ekstranodalnom porijeklu.[4] Iako postoje biološke razlike u pojedinim podtipovima DLBCL-a obzirom na lokalizaciju, nije dokazano bolje preživljenje ekstranodalnih DLBCL u odnosu na nodalne ako se stratificiraju prema IPI-u.[125,126] Zbog svega navednog mi u ovoj studiji nismo razlikovali nodalne i ekstranodalne limfome.

Nadalje, u ovu studiju uključeni su i bolesnici s DLBCL-om medijastinuma. Iako klasifikacija po SZO-u izdvaja primarne medijastinalne B-stanične limfome (PMBL) kao poseban entitet zbog svojih posebnih bioloških značajka (mlađi bolesnici, veća učestalost u žena, posebne morfološke značajke tumorskih stanica, drugačiji profil izražaja gena), u praksi se oni jednako liječe kao i DLBCL drugih lokalizacija i imaju istu prognozu.[4] Osim toga, nema jasnih imunohistokemijskih razlika između tumorskih stanica u PMBL i ostalim vrstama DLBCL niti postoje naznake da bi izraženost nekog od ovdje istraživanih biljega bila različita u PMBL u odnosu na ostale DLBCL. Kliničke studije koje su ispitivale ulogu rituksimaba u DLBCL, također su uključivale i bolesnike s PMBL.[14,127] Stoga su i u ovo istraživanje uključeni bolesnici s medijastinalnim B-velikostaničnim limfomom liječeni R-CHOP-om.

.

## 5.2. FcγRIIIa-158V/F i FcγRIIa-131H/R polimorfizmi

U ovom radu nije nađena povezanost između FcγRIIIa-158V/F i FcγRIIa-131H/R polimorfizma i odgovora na liječenje R-CHOP-om. Početne studije kod bolesnika s FL liječenih monoterapijom rituksimabom pokazale su povezanost FcγRIIIa-158V/V fenotipa s boljim ishodom,[17,21] a jedna od studija je pokazala i bolji ishod bolesnika s FcγRIIa-131H/H alelom[21]. Kasnije studije kod bolesnika s FL liječenih CHOP-om i rituksimabom nisu našle povezanost FcγRIIIa-158V/F i FcγRIIa-131H/R polimorfizama i ishoda,[24,25] a isto je

pokazano i kod limfoma plaštene zone liječenih imunokemoterapijom.[26] Prvu studiju u kojoj je ispitivana povezanost FcγRIIIa-158V/F i FcγRIIa-131H/R polimorfizama s odgovorom na terapiju R-CHOP-om u 113 bolesnika s DLBCL objavili su korejski autori.[27] Oni su našli da je *FcγRIIIA-158 V/V* genotip povezan s većim postotkom remisija i bržim postizanjem odgovora na R-CHOP terapiju. Međutim, nije bilo razlika u EFS i OS među pojedinim FcγRIIIa genotipovima, dok FcγRIIa 131 H/R polimorfizam nije utjecao na ishod. Izuzetno nizak postotak bolesnika s F/F genotipom od samo 5.3% i stopom odgovora od svega 50% nedvojbeno je pridonio statističkoj značajnoj razlici u odgovoru na terapiju između FcγRIIIa polimorfizama koja, međutim, nije rezultirala razlikom u preživljenju. Suprotno tome, rezultati naših bolesnika nisu našli nikakvu korelaciju FcγRIIIa i FcγRIIa polimorfizama ni s odgovorom niti s preživljenjem.[128]

Utjecaj polimorfizama FcγRIIIa receptora na terapiju rituksimabom posljedica je većeg afiniteta homozigota za valin (V/V) za IgG1 u odnosu na homozigote za fenilalanin (F/F) što dovodi do boljeg vezanja protutijela na efektorske stanice: NK stanice i makrofage, tj. djelotvornijeg ADCC i posljedično boljeg protutumorskog učinka.[19] Slično tome, bolji odgovor na terapiju zabilježen je kod monoterapije drugim protutijelima kao što su cetuksimab[129] i terapije koja uključuje trastuzumab[130]. Utjecaj polimorfizama FcγRIIa receptora na prognozu opažen u nekim studijama[21,129] objašnjava se ipak ne sasvim neovisnim naslijeđivanjem polimorfizama (engl. linkage disequillibrium) za FcγRIIIa i FcγRIIa kao što se prvobitno smatralo na osnovu rada Lernbrechera i sur[130]. To se može dokazati upotrebom posebnih statističkih programa koji bolje otkrivaju povezanost između pojednih alela nego „obični“ $\chi^2$ test na manjim uzorcima.[131] Veća frekvencija V/V i H/H među našim ispitanicima kao i među drugim studijama s bjelačkom populacijom ukazuje na tu mogućnost.[18,131]

Nepostojanje povezanosti polimorfizama FcγRIIIa i FcγRIIa i ishoda u bolesnika liječenih kombinacijom kemoterapije i rituksimaba može se objasniti na dva načina. Prvo objašnjenje je da ADCC-a putem FcγRIIIa i FcγRIIa receptora zapravo nema, tj. da su drugi mehanizmi djelovanja rituksimaba odgovorni za njegov učinak u DLBCL, u prvom redu povećanje kemosenzitivnosti[49] odnosno aktivacija komplementa[30] ili, manje vjerojatno, izravni apoptotski učinak rituksimaba[44].

Drugo objašnjenje je da ADCC putem Fc receptora ipak predstavlja važan mehanizam djelovanja rituksimaba u DLBCL, ali je taj učinak maskiran učinkom kemoterapije i utjecajem svih ostalih faktora koji određuju ishod bolesnika (IPI, značajke tumora) i zbog toga se teško može dokazati, posebno na manjem broju bolesnika. Eksperimentalni rezultati

na miševima i staničnim linijama agresivnih limfoma nedvojbeno pokazuju da je ADCC putem Fcγ receptora bitna komponentna učinka rituksimaba.[133,134] Stoga su dizajnirane i novije vrste protutijela koji imaju veći afinitet za receptore na efektorskim stanicama i posljedično bolje protutumorsko djelovanje u eksperimentalnim modelima.[135,136]

## 5.3. Biljezi aktivacije i diferencijacije

Rezultati imunohistokemijskog bojenja na CD10, bcl-6 i MUM1 nisu pokazali povezanost niti jednog od ispitivanih parametara s ishodom bolesnika. Prema algoritmu Hansove i suradnika, 47% naših bolesnika imalo je GC, a 53% non-GC imunofenotip. Navedena raspodjela odgovara raspodjeli u većini drugih objavljenih radova.[60,68,69]

U našoj skupini bolesnika nije nađena povezanost imunohistokemijske podjele na GC i non-GC skupinu s odgovorom na terapiju niti s preživljenjenjem. Takvi rezultati su u suglasju s dvjema studija koje su uključivale bolesnike liječene kombinacijom rituksimaba i kemoterapije[68,137], a proturječni studiji autora algoritma po Hansovoj[69]. Iako molekularne studije upotrebom tehnologije genskog čipa konzistentno pokazuju razliku u preživljenju između GC-genotipa i non-GC genotipa,[57-59] uključivo i bolesnike liječene rituksimabom,[138] imunohistokemijske studije su imale proturječne rezultate i prije ere rituksimaba. Nekoliko studija je imalo rezultate slične Hansovoj[65-67,139,140], no neke su imale suprotne rezultate[61,141-144]. Dva su moguća objašnjenja za takvu diskrepancu. Moguće je da rituksimab poboljšavajući prognozu bolesnika s non-GC fenotipom poništava prognostičku vrijednost algoritma prema Hansovoj i sur. Tome u prilog idu rezultati analize uzoraka bolesnika iz velikih, randomiziranih studija[13,15] kojima je pokazan gubitak negativnog prognostičkog utjecaja bcl-2 odnosno pozitivnog prognostičkog utjecaja bcl-6 u skupini bolesnika liječenih R-CHOP-om u usporedbi bolesnicima koji su liječeni samo CHOP-om. [54,145] To se može objasniti utjecajem rituksimaba na unutarstanične signalne molekule uključene u proces apoptoze. Naime, smatra se da rituksimab povećava kemosenzitivnost limfomskih stanica tako što blokira antiapoptotsko djelovanje nekih molekula kao što su bcl-2 i bcl-6 odnosno NFκB sustava.[49,51,54,145,146] Sve te antiapoptotske molekule aktivirane su upravo u skupini bolesnika s non-GC fenotipom. U prilog tome govore i rezultati novijih imunohistokemijskih studija koji su testirali algoritam na vlastitoj seriji bolesnika koji su liječeni s i bez rituksimaba.[68,137] Suprotno svemu navedenom, nova studija autora algoritma po Hansovoj pokazala je prognostičko značenje algoritma i u bolesnika liječenih rituksimabom.[69]

Budući da neke studije opovrgavaju rezultate algoritma po Hansovoj i u bolesnika neliječenih rituksimabom, nameće se zaključak da algoritam za određivanje GC i non-GC imunofenotipa upotrebom bcl-6, CD10 i MUM1 nije adekvatan nadomjestak za molekularne metode. Zaista, stopa imunohistokemijski definiranih GC imunofenotipova je varijabilna od studije do studije (od 18% u studiji Borovečki i sur.[140] do 49% u studiji de Paepe-a i sur.[143]) i, u pravilu, manja nego u molekularnim studijama[57-59]. Teško je analizu velikog broja gena koji definiraju GC i non-GC podtip DLBCL-a nadomjestiti određivanjem izražaja samo tri proteina. Moguće da bi se dodatkom nekih drugih biljega, moglo bolje razlikovati povoljni i nepovoljni imunofenotip, posebno kod bolesnika liječenih rituksimabom. Nedavno objavljene studije pokazale su prognostičko značenje bcl-2 u kontekstu podjele na na GC i non-GC imunofenotip u bolesnika liječenih rituksimabom.[147,148] Broj bolesnika u našoj studiji nije bio dovoljan za adekvatnu statističku analizu podskupina prema bcl-2 unutar GC i non-GC skupina.

Potkraj 2008. objavljena je nova studija multicentrične grupe za molekularno profiliranje limfoma koja je, koristeći tehnologiju genskog čipa, potvrdila prognostičku vrijednost podjele na GC i non-GC genotip i kod bolesnika liječenih rituksimabom.[138] K tome je multivarijantnom analizom prediktivnosti dobivena i jedna sasvim nova podjela koja osim podrijetla tumorskih stanica uzima i obzir mikrookoliš. Tako su dobivena nova tri tipa genske ekspresije: GC-genotip, stromal-1 tip koji predstavljaju povoljnu prognozu i stromal-2 tip koji je povezan s lošijom preživljenjem. Realno je očekivati da će to generirati nova istraživanja i dovesti do pronalaženja novih imunohistokemijskih biljega koji će zamijeniti ili nadopuniti algoritam po Hansovoj.

## 5.4. Bcl-2

Bcl-2 je antiapoptotski protein. U većini studija bolesnici, čiji limfomi izražavaju bcl-2, imaju lošiji ishod ako su liječeni samo kemoterapijom. Uz to, u nekim studijama se bcl-2 koristi i kao biljeg aktiviranog (non-GC) imunofenotipa.[62,64,147-149] Prema radu Hans i sur,[60] uzeta je granična vrijednost za bcl-2 od 30% što je rezultiralo nešto većim postotkom pozitivnih uzoraka (75%) u odnosu na neke druge studije koje su koristile graničnu vrijednost od 50% i imale 59% - 66% bcl-2 pozitivnih uzoraka.[54,150] Međutim, rezultati su identični, niti u jednom radu nije nađena povezanost izražaja bcl-2 s ishodom bolesnika liječenih R-CHOP-om, premda je u našoj studiji izražaj bcl-2 bio statistički povezan s nepovoljnim IPI (p= 0.035). Dvije navedene studije su za usporedbu pokazale i lošiji ishod bcl-2 pozitivnih

bolesnika u kontrolnoj grupi bolesnika liječenih samo CHOP-om.[54,150] Vezano uz korelaciju s ostalim parametrima, u našoj studiji je bcl-2 bio povezan s izražajem MUM1 ($p = 0.047$) uz snažan trend ka poveznošću s non-GC fenotipom ($p = 0.07$), što je u skladu s gore navedenim studijama koje ga inkorporiraju u biljege aktivacije limfocita.

Značenje bcl-2 kao antiapoptoskog proteina u kontekstu djelovanja rituksimaba raspravljeno je u slijedećem odjeljku.

## 5.5. Apoptotski biljezi

### 5.5.1. Survivin

U analiziranoj skupini bolesnika nije nađena povezanost između pozitivnosti na survivin i promatranih ishoda. Isto tako, izražaj survivina nije korelirao s izražajem drugih ispitivanih biljega. Survivin je inhibitor apoptoze koji je ekstenzivno evaluiran u različitim zloćudnim tumorima pa tako i limfomima.[80] Ukupno 6 studija do sada je istraživalo prognostičko značenje survivina u DLBCL.[73,90-94] Međutim, načini ocjenjivanja pozitivnosti na survivin su bili različiti. Citoplazmatski pozitivitet survivina evaluiran je u prvoj studiji na limfomima.[90] U većini kasnijih studija promatran je nuklearni pozitivitet,[91,93,94] u jednoj nije specificirano da li je promatran nuklearni ili citoplazmatski pozivitet,[73] a u jednoj su promatrana oba koristeći posebno konstruirano protutijelo[72]. Najčešća granična vrijednost pri ocjenjivanju pozitivnosti na survivin bila je obojenost više od 30% tumorskih stanica.[73,90,91] Ostale studije su koristile druge, semikvantiativne kriterije, gledajući intenzitet i/ili postotak pozitivnih stanica. Niti u jednoj od studija s DLBCL-om rezultati nisu bili provjereni PCR-om.Vodeći se kriterijima iz literature (nuklearni pozitivitet, granična vrijednost 30%) dobili smo 25% uzoraka pozitivnih na survivin. Takva razina pozitivnosti survivina u našoj studiji je znatno niža u odnosu na druge studije gdje je stopa pozitivnosti bila 60%-82%. Moguća objašnjenja za takvu razliku su različiti kriteriji očitavanja izražaja survivina, upotreba različitih klonova survivina, te naposljetku, različiti načini fiksacije preparata koji mogu utjecati na bojanje survivinom.[80] U pogledu prognoze, naši rezultati su u suglasju s nekim studijama,[73,93,94] a proturječni drugim[90-92]. Ukupno gledano, naš rad predstavlja još jedan doprinos obilju proturječnih rezultata o prognostičkom značenju survivina u zloćudnih tumora. Ipak, ovo je prvo istraživanje prognostičke vrijednosti survivina u bolesnika s DLBCL-om liječenih kombinacijom rituksimabom i kemoterapijom. Nema podataka o tome da li rituksimab modificira ulogu survivina i time utječe na prognozu bolesnika. Eksperimentalni podaci na staničnim linijima i mišjim modelima sugeriraju inhibiciju rasta

tumora ukoliko se stanične linije agresivnog B-limfoma tretiraju survivinskim protusmislenim oligonukleotidima (engl. antisense oligonucleotides).[151] Zanimljivo, ako se terapiji priroda rituksimab, postiže se sinergistički učinak *in vitro*, ali ne *in vivo.* Nedavno je objavljena studija faze I u kojoj su bolesnici u uznapredovalim fazama različitih tumora liječeni inhibitorom survivina (YM155): posebno obećavajući odgovor postignut je u tri bolesnika s limfomom.[152]

### 5.5.2. Kaspaza-3

Slično survivinu, nije bilo korelacije između kaspaze-3 i promatranih ishoda u našoj grupi bolesnika kao ni povezanosti s izražajem ostalih biljega. Također, nismo uspjeli identificirati točkasti i difuzni tip citoplazmatskog bojenja koji je bio od prognostičkog značenja u radu Donoghue i sur,[96] iako smo koristili identičan klon protutijela na kaspazu-3. Ipak, postojao je trend lošijeg preživljenja bolesnika sa slabijim izražajem kaspaze-3 i u našem ($p = 0.10$) i u citiranom radu ($p > 0.09$). Međutim, za razliku od ovdje primijenjene kaspaze koja predstavlja neaktivirani oblik, u radu Murisa i sur.[99] ispitivana je aktivirana kaspaza-3 čiji izražaj je statistički povezan ($p < 0.001$) s lošijim preživljenjem bolesnika. Visok izražaj kaspaze-3 i kaspaze-9 odražava nefunkcioniranje unutrašnjeg apoptotskog puta kojim djeluje citostatska terapija odnosno prisutnost inhibitora apoptoze kao što je XIAP molekula (iz obitelji inhibitora apoptoze). Kasnija istraživanja su pokazala da inhibitori XIAP-a induciraju apoptozu u takvim staničnim linijama.[153]

Moguće je da bi se analizom aktivirane kaspaze-3 dobili drugačiji rezultati. Međutim, nismo se odlučili na analiziranje aktivne kaspaze-3, jer je u radu Murisa i sur. bila eksprimirana u vrlo malom broju stanica (od 1% do 17%, medijan 3.5%). Uzevši u obzir tako nisku razinu izražaja, adekvatna imunohistokemijska evaluacija mogla bi se učiniti samo upotrebom sofisticirane tehnologije dvostrukog imunohistokemijskog bojenja kako bi se pokazalo da su obojene stanice zaista tumorske.

### 5.5.3. Povezanost survivina, kaspaze-3, bcl-2 i djelovanje rituksimaba

Ideja ovog rada bila je analizom prognostičkog utjecaja proapoptotskih molekula (kaspaza-3) i inhibitora apoptoze (bcl-2 i survivin) pokušati se približiti mehanizmima putem kojih rituksimab dovodi do apoptoze tumorskih stanica. Međutim, nije nađeno povezanosti niti jednog od ispitivanih biljega s ishodom bolesnika kao ni njihove međusobne povezanosti. Jedno od objašnjenja je nereproducibilnost imunohistokemijskih metoda zbog čega su i

prethodno objavljene studije s tim istim biljezima imale proturječne rezultate na bolesnicima liječenim bez rituksimaba. To posebno vrijedi za survivin i kaspazu-3.

Drugo moguće objašnjenje je činjenica da eksperimentalni rezultati na staničnim linijama sugeriraju utjecaj rituksimaba na proksimalnije apoptotske puteve kao ciljno mjesto proapoptotskog djelovanja rituksimaba, što uključuje i bcl-2 koji blokira unutrašnji put apoptoze (odjeljak 1.1.3, slika 2).[49] Alternativno, u nekim eksperimentalnim studijama je pokazano proapoptotsko djelovanje rituksimaba neovisno o kaspazama.[42-44] Buduće studije, posebno u kontekstu primjene novih lijekova kao što su inhibitori bcl-2 ili inhibitori survivina bi trebali bolje odgovoriti na to pitanje i dodatno rasvijetliti ulogu rituksimaba na proces apoptoze.

## 5.6. CD43

Kod 27% bolesnika nađen je izražaj CD43 na tumorskim stanicama. To je u skladu s rezultatima drugih studija gdje je izražaj CD43 pokazan u 16% odnosno 28% DLBCL-a.[115,116] Iz ovdje prikazanih rezultata vidljiva je poveznost izražaja CD43 na tumorskim stanicama s lošijim odgovorom na terapiju i preživljenjem. Iako se loš prognostički utjecaj može objasniti povezanošću s nepovoljnim IPI, CD43 je u multivarijatnoj analizi neovisno o IPI povezan s lošijim preživljenjem. Kad se IPI uzme kao jednistvena varijabla u dvije ili četiri kategorije, CD43 i dalje pokazuje statistički značajnu povezanost s OS. Zanimljivo, CD43 je u ovom istraživanju bio izražen u DLBCL uglavnom muških bolesnika za što nema plauzibilnog objašnjenja.

Ovdje prikazani rezultati u skladu su s ranije objavljenom studijom na maloj skupini bolesnika s limfomom okularnih adneksa gdje je CD43 također bio povezan s lošijom prognozom.[117] Osim navedenog, do sada u literaturi nije objavljen niti jedan rad koji je ispitivao prognostičko značenje CD43 u limfoma ili drugih hematopoetskih tumora. Zbog toga smo u zasebnom radu proširili ovo istraživanje i na bolesnike koji nisu liječeni rituksimabom, a u uključili smo i one stadija I.[154] U toj proširenoj grupi bolesnika CD43 je zadržao svoju vrijednost kao biljeg loše prognoze, neovisan o GC imunofenotipu, no, za razliku od ovdje prikazanih rezultata, izražaj CD43 nije bio statistički povezan s IPI, spolom ili više od jednom ekstranodalnom lokalizacijom. Pored toga, isključena je povezanost izražaja CD43 s izražajem CD5 koja se može naći u 10% DLBCL i udružena je s lošijom prognozom.[155]

Moguće su različita objašnjenja negativnog prognostičkog utjecaja CD43. Jedna od pretpostavki je da je CD43 povezan s proširenom bolesti tj. da izražaj CD43 preko interakcije s endotelom omogućava lakše „metastaziranje“ tumorskih stanica. U našoj skupini bolesnika, CD43 nije bio statistički povezan s uznapredovalim stadijem bolesti, ali je postojao trend u tom smjeru. Međutim, bolesnici sa CD43 pozitivnim DLBCL imali su statistički češću više od jednu ekstranodalnu lokalizaciju limfoma što govori u prilog pretpostavki o olakšanom širenju CD43-pozitivnih tumorskih stanica. Eksperimentalna istraživanja na T limfocitima pokazala su da je CD43 ligand za E-selektin na endotelnim stanicama i posreduje migraciju aktiviranih T limfocita na mjesto upale.[107,108] U nedavno objavljenom radu pokazano je da CD43 ima glavnu ulogu u ekstravazaciji leukemijskih B stanica.[156] Razina izražaja CD43 povezana je s infiltracijom ekstravaskularnih tkiva i stvaranjem leukemičnih infiltrata na mišjem modelu. U solidnih tumora, izražaj CD43 u stanicama karcinoma cebelog crijeva može imati ulogu u širenju tumora tako što posreduje njihovo adherenciju za peritoneum.[157] Svi ti eksperimentalni podaci upućuju na moguću ulogu CD43 u širenju DLBCL, posebno ekstranodalno, što dovodi do lošijeg odgovora na standardnu terapiju, veću mogućnost relapsa i lošijeg preživljenja.

Alternativno objašnjenje za nepovoljnu prognozu CD43-pozitivnih DLBCL je moguće antiapoptotsko djelovanje ovog glikoproteina. Naime, u radovima publiciranim prije desetak godina istraživana je uloga CD43 u preživljavanju B limfocita na modelu transgeničnih miševa. Budući da CD43 fiziološki nije izražen na mirujućim B limfocitima u krvi, Dragone i sur.[158] su ga transfecirali u CD43-negativne B limfocite što je dovelo do produljenog preživljenja i snižene osjetljivosti na apoptozu transgeničnih stanica. U drugoj studiji, učinjena je transfekcija CD43 cDNA u CD43-negativni limfom u štakora.[159] CD43-pozitivne stanice su imale smanjenu osjetljivost na apoptozu u G1 fazi staničnog ciklusa i bolje preživljenje u kulturi nakon deplecije seruma u odnosu na CD43-negativne stanice. Kasnije objavljene studije su istraživale molekularne mehanizme antiapoptotske aktivnosti CD43 u različitim tipovima stanica. Potencijalni mehanizam kočenja apoptoze u T limfocita uključuje otpornost na apoptozu putem FAS liganda.[110] Slično tome, nedavno objavljena studija u solidnih tumora ukazala je na ulogu CD43 u razvoju tumora tako što pomaže izbjeći apoptozu posredovanu FAS-om u tumorima s oštećenim p53.[160] Pored navedenog puta, aktivacija NF-κB kao anti-apoptotskog mehanizma može biti dodatni mehanizam, aktiviran u CD43 pozitivnim progenitorskim stanicama B-limfocita.[161]

Konačno, treba uzeti u obzir i mogućnost da je CD43 možda samo epifenomen tj. da obilježava jednu, već genetički definiranu, vrstu DLBCL s lošijom prognozom. Na primjer,

nedavno je objavljena studija genske ekspresije u bolesnika s DLBCL liječnih rituksimabom koja je utvrdila postojanje „stromal-2“ obrasca izražaja gena koji je udružen s lošijom prognozom, a povezan je s tumorskom vaskularizacijom.[138] Slično tome, moguće je da CD43 pozitivni DLBCL pripadaju grupi Burkittu sličnih DLBCL-a koji imaju lošiju prognozu.[162]

Bez obzira na hipotetske mehanizme kojima je CD43 posredno ili neposredno povezan s lošijom prognozom bolesnika s DLBCL, u ovom radu je pokazan kao neovisan pokazatelj lošijeg ishoda. Iako ovdje broj bolesnika nije dovoljan kako bi se statistički vjerodostojno mogao analizirati utjecaj CD43 u različitim podgrupama bolesnika, u proširenoj skupini bolesnika našli smo posebno negativan utjecaj CD43 u skupini bolesnika s povoljnim IPI, dakle, u skupini onih koji bi trebali imati dobru prognozu.[154] To implicira mogućnost temeljitije evaluacije i praćenja bolesnika s CD43 pozitivnim DLBCL (npr. PET-CT pri dijagnozi i praćenju), a može se razmišljati i o primjeni intenzivnijih terapijskih opcija u odnosu na standardni R-CHOP +/- zračenje. Naravno, naši rezultati prethodno zahtijevaju potvrdu drugih istraživača i to na većoj skupini bolesnika.

## 5.7. Imunohistokemijski biljezi i prognoza DLBCL

Općenito govoreći, čini se da ne postoji općeprihvaćen imunohistokemijski biljeg koji bi bio od prognostičkog značaja u DLBCL. Ekspertna skupina patologa iz devet različitih centara ocjenjivala je uobičajene imunohistokemijske biljege na uzorcima tumorskog tkiva TMA metodom (cilindri tumorskog tkiva izvađenih iz parafinske kocke koji se analiziraju na istom stakalcu kako bi se uštedio materijal i biljezi; engl. „tissue microarray“).[163] Nađena je začuđujuće niska podudarnost među različitim centrima, posebno za neke biljege: najveća podudarnost među patolozima bilo je u projeni bojenja na CD20, srednja za bcl-2, dok je bcl-6 bio jedan od najproblematičnijih. Upravo je bcl-6 važan za razlikovanje GC i non-GC fenotipa što je vjerojatno i razlog različite učestalosti fenotipova među različitim skupinama (i različitih rezultata). Važno je naglasiti da naše istraživanje, za razliku od većine citiranih studija, nije rađeno TMA metodom, nego je bojenje analizirano na cijelom presjeku tumorskog tkiva što je prednost jer se izbjegava greška u izboru cilindra za TMA. Međutim, drugi razlozi, kao što su različite laboratorijske tehnike među studijama (od fiksacije tkiva do upotrebe različitih primarnih i sekundardnih protutijela), različiti kriteriji očitavanja i različita subjektivna interpretacija bojenja, mogu dovesti do velikih varijacija u prognostičkom značenju pojedinih biomarkera. To je činjenica koju svakako treba imati na umu i prilikom analize nekih novih imunohistokemijskih biljega. Zbog toga, svaki novi biljeg treba biti

evaluiran na velikom broju bolesnika u različitim centrima, prije nego što se na osnovu njega počne planirati terapijski pristup bolesniku.

S druge strane, unatoč spomenutim nedostacima, bilo bi pogrešno zanemariti istraživanja imunohistokemijskih biljega tj. proteina na račun sofisticiranih molekularnih metoda koje identificiraju gene. Proteini ipak predstavljaju konačne proizvode transkripcije gena koji su odgovorni su za funkcioniranje živog organizma i prognozu bolesti, a mogu se relativno jednostavno vizualizirati unutar stanice rutinski dostupnim metodama.

# 6. Zaključci

- Polimorfizmi receptora za Fc fragment, FcγRIIIa 158 V/F i FcγRIIa 131 H/R, ne utječu na odgovor na liječenje, EFS i OS. Može se zaključiti da razlike u ADCC posredovanom Fcγ receptorom nisu od kliničkog značaja u bolesnika s DLBCL liječenih kombinacijom rituksimaba i CHOP-a, za razliku od bolesnika s FL liječenih monoterapijom rituksimabom. Rezultati su u djelomičnoj suprotnosti sa studijom korejskih autora gdje su bolesnici FcγRIIIA 158 V/V genotipom imali bolji odgovor na liječenje, no ta razlika nije rezultirala boljim preživljenjem.
- Imunohistokemijska podjela na GC i non-GC podtip DLBCL-a prema algoritmu Hansove i suradnika nije povezana s odgovorom na liječenje i preživljenjem bolesnika. Također, niti jedan od ispitivanih biljega (CD10, bcl-6, MUM1) samostalno nije povezan s ishodom liječenja. Takvi rezultati su sukladni većini objavljenih studija u bolesnika liječenih R-CHOP-om što se može objasniti poboljšanjem prognoze bolesnika s non-GC fenotipom dodavanjem rituksimaba kemoterapiji, ali i činjenicom da predloženi algoritam ipak nije univerzalno prihvatljiv nadomjestak za razlikovanje molekularnih podskupina DLBCL-a.
- Izražaj biljega apoptoze na tumorskim stanicama (bcl-2, survivin i kaspaza-3) nije povezan s ishodom bolesnika. Nedostatak prognostičkog značaja bcl-2 opažen je i u većini drugih studija u kojima su bolesnici liječeni R-CHOP, a objašnjava se djelovanjem rituksimaba na unutrašnji apoptotski put i povećanjem kemosenzitivnosti. Suprotno tome, završni dio apoptotskog puta koji uključuje survivin i kaspazu-3 vjerojatno nije podložan izravnom djelovanju rituksimaba. Promatran je nuklearni izražaj survivina, s nižem postotkom pozitivnih tumorskih stanica u odnosu na dosadašnje studije. Nismo mogli razlikovati ranije opisani točkasti i difuzni tip citoplazmatskog bojenja na kaspazu-3.
- CD43, transmembranska molekula čija fiziološka uloga nije potpuno istražena, otkriven je kao biljeg lošijeg odgovora i preživljenja. Multivarijantna analiza pokazala je povezanost izražaja CD43 s lošijim preživljenjem neovisno o IPI-u. Radi potvrde nepovoljnog prognostičkog utjecaja CD43 biljega potrebno je provesti dodatna istraživanja u drugim centrima. Isto tako su potrebna dodatna istraživanja kako bi se utvrdili biološki mehanizmi utjecaja CD43 na ishod liječenja DLBCL-a.

# 7. Sažetak

Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL) je najčešći ne-Hodgkinov limfom. Standardnim metodama liječenja moguće je izliječiti oko 60% bolesnika, a prognoza ovisi prvenstveno o kliničkim značajkama, sažetim u tzv. međunarodnom prognostičkom indeksu (IPI). Međutim, nema općeprihvaćenih molekulskih i imunohistokemijskih prognostičkih biljega u DLBCL.

Cilj ovog rada bio je analizirati prognostički značaj molekularnih i imunohistokemijskih biljega u 60 bolesnika s DLBCL-om liječenih na jedinstven način, kombinacijom rituksimaba i kemoterapije po shemi CHOP ili slične.

Nije nađena povezanost polimorfizama Fcγ receptora IIIa (FcγRIIIa) 158 V/F i FcγRIIa 131 H/R s odgovorom na liječenje i preživljenjem što ukazuje da stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima putem Fcγ receptora nije najznačajniji mehanizam djelovanja rituksimaba u ovoj skupini bolesnika. Imunohistokemijski biljezi diferencijacije i aktivacije, CD10, bcl-6, MUM1, nisu bili od prognostičkog značenja u ispitivanoj skupini bolesnika. Podjela DLBCL-a na GC i non-GC imunofenotip upotrebom algoritma po Hansovoj nije bila povezana s promatranim ishodima. Ovaj nalaz ukazuje da imunohistokemijske metode ne mogu zamijeniti analizu izražaja gena u razlikovanju molekularnih podtipova DLBCL-a- Alternativno, moguće je da rituksimab mijenja prognostičko značenje nekih biljega. Biljezi apoptoze, bcl-2, survivin i kaspaza-3, također nisu bili povezani s promatranim ishodima. Za razliku od toga, izražaj CD43 je bio povezan sa slabijim odgovorom na liječenje i lošijim preživljenjem, neovisno o IPI-u. Čini se da je CD43 vrlo značajan novootkiveni nepovoljni prognostički faktor u bolesnika s DLBCL.

# 8. Summary

**Title: Prognostic importance of FcγRIIIa and FcγRIIa genetic polymorphisms and expression of survivin and caspase-3 in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with combination of rituximab and CHOP chemotherapy**

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most frequent non-Hodgkin lymphoma. Using standard treatment approaches, about 60% of patients can be cured; prognosis depends primarily on clinical characteristics summarized in the „International Prognostic Index“ (IPI). However, there is no generally accepted molecular or immunohistochemical prognostic marker for DLBCL.

The aim of this study was to investigate the prognostic importance of molecular and immunohistochemical markers in 60 patients with DLBCL treated homogenously with rituximab and CHOP or CHOP-like chemotherapy.

No correlation was found between Fcγ receptor IIIa (FcγRIIIa) 158 V/F and FcγRIIa 131 H/R polymorphisms and response to treatment or survival, suggesting that antibody dependent cellular cytotoxicity through Fcγ receptors is not the most important mechanism of rituximab action in this setting. Immunohistochemical markers of differentiation and activation, CD10, bcl-6 and MUM1, were not of prognostic significance in this group of patients. Classification of DLBCLs in GC and non-GC subtypes according to the algorithm published by Hans and co-workers did not affect the outcomes. This finding suggests that immunohistochemical methods cannot reliably replace gene expression profiling in differentiating between molecular subtypes of DLBCL. Alternatively, it is possible that rituximab may change the prognostic significance of some markers. Apoptosis markers, bcl-2, survivin and caspase-3, were also not associated with outcomes. In contrast, CD43 expression was associated with a lower response rate and inferior survival, independently of IPI. Thus, CD43 seems to be a very important new adverse prognostic marker in patients with DLBCL.

# 9. Literatura


1. Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. Medico-Chirurgical Transactions, London, 1832; 17:68-114.
2. Louis Rosenfeld. Thomas Hodgkin : Morbid Anatomist & Social Activist. Madison Books, Lanaham; 1993.
3. Jakić-Razumović J, Aurer I. The World Health Organization Classification of lymphomas. Croat Med J 2002; 43:527-534.
4. Harris NL, Jaffe ES, Vardiman JW, Stein H, Diebold J, Mueller-Hermelink HK. WHO classification of haematopoietic and lymphoid tissues: Introduction. In: Jaffe ES ed. Tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 1st ed. IARC Press, Lyon; 2001.
5. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Chang TE, Cole P, Mandel JS, Trichopoulos D. The non-Hodgkin lymphomas: A review of epidemiologic literature. Int J Cancer 2007; 120:1-39.
6. Clarke CA, Glaser SL. Changing incidence of non-Hodgkin lymphomas in the United States. Cancer 2002; 94:2105-23.
7. Labar B, Hauptmann E, ur. Hematologija. Školska knjiga, Zagreb; 2007.
8. Incidencija raka u Hrvatskoj 2006, Bilten br. 31. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb; 2008.
9. Dominis M. Maligni limfomi – epidemiološka situacija u Hrvatskoj 2007. CD s prezentacijama - 4. Rocheov onkološki vikend.
10. Muller AMS, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. Ann Hematol 2005; 84:1-12.
11. Marcus R, Hagenbeek A. The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. Eur J Haematol Suppl 2007; 67:5-14.
12. Mitrović Z, Aurer I. Rituksimab u liječenju B-staničnih ne-Hodgkinovih limfoma. Lijec Vjesn. 2006; 128:36-42.
13. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Ferme C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol 2005; 23:4117-26.

14. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Rettengell R, Trneny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B cell lymphoma: a randomized controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. Lancet Oncol 2006; 7:379-91.
15. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, Dakhil SR, Woda B, Fisher RI, Peterson BA, Horning SJ. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. Clin Oncol. 2006; 24:3121-7.
16. Cvetkovic RS, Perry CM. Rituximab - a review of its use in Non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. Drugs 2006; 66:791-820.
17. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutical activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. Blood 2002; 99:754-8.
18. van der Pol WL, Jansen MD, Sluiter WJ, van de Sluis B, Leppers-van de Straat FG, Kobayashi T, Westendorp RG, Huizinga TW, van de Winkel JG. Evidence for non-random distribution of Fcγ receptor genotype combinations. Immunogenetics 2003; 55:240-6.
19. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. FcγRIIIa 158 V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell by FcγRIIIa, independently of FcγRIIIa-48L/R/H phenotype. Blood 1997; 90:1109-14.
20. Binstadt BA, Geha RS, Bonilla F. IgG Fc receptor polymorphisms in human disease: implications for intravenous immunoglobulin therapy. J Allergy Clin Immunol. 2003; 111:697-703.
21. Weng W-K, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. J Clin Oncol 2003; 21:3940-7.
22. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, Frankel SR, Touroutoglou N, Turnbull B, Anderson KC, Maloney DG, Fox EA. Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. J Clin Oncol 2005; 23:474-81.
23. Farag SS, Flinn IW, Modali R, Lehman TA, Yound D, Byrd JC. FcγRIIIa and FcγRIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2004; 103:1472-4.

24. Boetcher S, Pott C, Ritgen M, Hiddeman W, Unterhalt M, Kneba M. Evidence for FcγRIIIA–independent rituximab effector mechanisms in patients with follicular lymphoma treated with combined immunochemotherapy [abstract]. Blood 2004; 104:170a.
25. Carlotti E, Palumbo GA, Oldani E, Acerboni S, Di Raimondo F, Cortelazzo S, et al. FcgammaRIIIA and FcgammaRIIA polymorphisms do not predict clinical outcome of follicular non-Hodgkin's lymphoma patients treated with sequential CHOP and rituximab.Haematologica. 2007; 92:1127-30.
26. Galimbreti S, Palumbo GA, Caracciolo F, Benedetti E, Pelosini M, Brizzi S, Golay J, Pulsoni A, Foà R, Rambaldi A. The efficacy of rituximab plus Hyper-CVAD regimen in mantle cell lymphoma is independent of FCgammaRIIIa and FCgammaRIIa polymorphisms. J Chemother. 2007; 19:315-21.
27. Kim Dh, Jung HD, Kim JG, Lee JJ, Yang DK, Park YH, Do YR, Shin HJ, Kim MK, Hyun MS, Sohn SK. FcγRIIIa gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2006; 108: 2720-5.
28. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood. 1994;12:177-86.
29. Golay J, Lazzari M, Facchineti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T, Rambaldi A, Introna M. CD20 levels determinate the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. Blood. 2001; 98:3383-9.
30. Golay J, Cittera E, Di Gaetano N, Manganini M, Mosca M, Nebuloni M, van Rooijen N, Vago L, Introna M. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. Haematologica 2006; 91:176-83.
31. van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, Hach CE, van Oers MH. Complement activation plays a key role in the side effects of rituximab treatment. Br J Haematol 2001; 115:807-11.
32. Terui Y, Sakurai T, Mishima Y, Sugimura N, Sasaoka C, Kojima K, Yokoyama M, Mizunuma N, Takahashi S, Ito Y, Hatake K. Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to complement-dependent cytotoxicity with rituximab. Cancer Sci. 2006; 97:72-9.

33. Bannerji R, Kitada S, Flinn IW. Apoptotic-regulatory and complement-protecting protein expression in chronic lymphocytic leukemia: relationship to in vivo rituximab resistance. J Clin Oncol. 2003; 21:1466-71.
34. Weng WK, Levy R. Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. Blood. 2001; 98:1352-7.
35. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, Sotto JJ, Leroux D, Bensa JC, Plumas J. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. Blood 2003; 101:949-54.
36. van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebelin SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. Clin Cancer Res. 2006; 12:4027-35.
37. Klepfish A, Rachemilowitz EA, Kotsianidis I, Patchenko P, Schattner A. Adding fresh frozen plasma to rituximab for the treatment of patients with refractory advanced CLL. QJM. 2008; 101:737-40.
38. Cruz RI, Hernandez-Ilizaturri FJ, Olejniczak S et al. CD52 over-expression affects rituximab-associated complement-mediated cytotoxicity but not antibody-dependent cellular cytotoxicity: preclinical evidence that targeting CD52 with alemtuzumab may reverse acquired resistance to rituximab in non-Hodgkin lymphoma. Leuk Lymphoma. 2007; 48:2424-36.
39. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. Cancer Biol Ther 2005; 4:139-63.
40. Shan D, Ledbetter JA., Press OW. Signaling events involved in anti- CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. Cancer Immunol.Immunother. 2000; 48:673–83.
41. Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM. Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. Blood Cells Mol. Dis. 2000; 26:133–43.
42. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, Aron JL, Pearson M, Lucas D, Reed JC. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. Blood 2002; 99:1038-43.
43. Chan HT, Hughes D, French RR, Tutt AL, Walshe CA, Teeling JL, Glennie MJ, Cragg MS. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton x-100 insoluble membrane rafts. Cancer Res 2003; 63:5480-9.

44. Stanglmaier M, Ries S, Hallek M. Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic, caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia cells. Ann Hematol. 2004; 83:634-45.
45. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. Mol Immunol. 2007; 44:3823-37.
46. Chow KU, Sommerland WD, Boehrer S, et al. Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances activity of cytotoxic drugs in vitro: role of cytokines, complement and caspases. Haematologica 2002. 1:33-43.
47. Alas S, Bonavida B, Emmanouillides S. Potentiation of fludarabine cytotoxicity on non-Hodgkin's lymphoma by pentoxifyline and rituximab. Anticancer Res 2000. 20:2961-6.
48. Alas S, Ng CP, Bonavida B. Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma. Clin Cancer Res. 2002; 8:836-45.
49. Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunoresistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions. Oncogene. 2007; 26:3629-36.
50. Vega MI, Huerta-Yepez S, Garban H, Jazirehi AR, Emmanouilides C, Bonavida B. Rituximab inhibits p38 MAPK activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of p38 MAPK in drug resistance. Oncogene. 2004; 23:3530–3540.
51. Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive Nuclear factor-κB signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. Cancer Res 2005; 65:264-76.
52. Jazirehi AR, Gan XH, de Vos D, Emmanouilides C, Bonavida B. Rituximab (anti-CD20) selectively modifies Bcl-xL and apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) expression and sensitizes human non-Hodgkin's lymphoma B cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. Mol Cancer Ther. 2003; 2:1183–93.
53. Suzuki E, Bonavida B. Rituximab inhibits the constitutively activated PI3K-Akt pathway in B-NHL cell lines: involvement in chemosensitization to drug-induced apoptosis. Oncogene. 2007; 26:6184-93.
54. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, Berger F, Bosly A, Morel P, Tilly H, Bouabdallah R, Reyes F, Gaulard P, Coiffier B. Rituximab plus

CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Blood. 2003; 101:4279-84.

55. Skvortsova I, Skvorstov S, Popper BA, Saurer M, Auer T, Moser R, Kamleitner H, Zwierzina H, Lukas P. Rituximab enhances radiation-triggered apoptosis in non-Hodgkin's lymphoma cells via caspase-dependent and -independent mechanisms. J Radiat Res. 2006; 47:183-96.
56. International Non-hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 1993; 329 (14): 987-94.
57. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000, 403:503-11.
58. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM; 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; 346:1937-47.
59. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberg DS, Lander ES, Aster JC, Golub TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. Nat Med 2002. 8:68-74.
60. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. Blood 2004; 103:275-82.
61. Colomo L, Lopez-Guillerno A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, Colomer D, Falini B, Montserrat E, Campo E. Clinical impact of the differentiation profile assessed

by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood 2003; 101:78-84.

62. Zinzani PL, Dirnhofer S, Sabatini E, Alinari L, Piccaluga PP, Stefoni V, Tani M, Musuraca G, Marchi E, Falini B, Baccarani M, Pileri SA. Identification of outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. Immunohistochemical profiling of homogeneously treated de novo tumors with nodal presentation on tissue micro-arrays. Hematologica 2005; 90:341-7.
63. Chang CC, McClintock S, Clevelend RP, Trzpuc T, Vesole DH, Logan B, Kajdacsy-Balla A, Perkins SL. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol 2004; 28:464-70.
64. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GK, Oudejans JJ. 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; 208:714-23.
65. Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M, Linderoth J, Dictor M, Jerkeman M, Cavallin-Ståhl E, Sundström C, Rehn-Eriksson S, Backlin C, Hagberg H, Rosenquist R, Enblad G. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. Mod Pathol. 2005; 18:1113-20.
66. Van Imhoff GW, Boerma EJ, van der Holt B, Schuuring E, Verdonck LF, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2006; 24:4135-42.
67. Oh YH, Park CK. Prognostic evaluation of nodal diffuse large B cell lymphoma by immunohistochemical profiles with emphasis on CD138 expression as a poor prognostic factor. J Korean Med Sci. 2006; 21:397-405.
68. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, Taskinen M, Berglund M, Amini RM, Blomqvist C, Enblad G, Leppä S. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy.Blood. 2007; 109:4930-5.
69. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, Perry KD, Smith LM, Shi X, Hans CP, Greiner TC, Bierman PJ, Bociek RG, Armitage JO, Chan WC, Vose JM. 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; 26:4587-94.

70. Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, van Groningen K, van Krieken JH, de Jong D, Kluin PM. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. J Clin Oncol. 1996;14:2131-8.
71. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, Fillet G, Salles G, Marolleau JP, Diebold J, Reyas F, Gaulard P. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Blood. 1996; 87:265-72.
72. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Blood. 1997; 90:244-51.
73. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Chan WC, Aoun P, Cochran GT, Pan Z, Smith LM, Lynch JC, Bociek RG, Bierman PJ, Vose JM, Armitage JO. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. Mod Pathol. 2005; 18:1377-84.
74. Shivakumar L, Armitage JO. Bcl-2 gene expression as a predictor of outcome in diffuse large B-cell lymphoma. Clin Lymphoma 2006; 6:455-7.
75. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. Clin Cancer Res. 2009; 15:1126-32.
76. Akyurek N, Yongsheng R, Rassidakis GZ, Schlette EJ, Medeiros LJ. Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. Cancer 2006; 107:1844-51.
77. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat Rev Mol Cell Biol 2002; 3:401-10.
78. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, *et al*. An antiapoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. Biochemistry 2001; 40:1117–23.
79. Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, Ng SC: Survivin does not inhibit caspase-3 activity. Blood 2000; 96:4002–3.
80. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? Int J Cancer. 2005;114:509-12.

81. Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H,Hopfner M, Germer CT, Scherubl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in esophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 2003; 88:115–9.
82. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma.Hepatology 2000; 31:1080 –5.
83. Javle MM, Tan D, Yu J, LeVea CM, Li F, Kuvshinoff BW, Gibbs JF.Nuclear survivin expression predicts poor outcome in cholangiocarcinoma. Hepatogastroenterology 2004; 51:1653–7.
84. Lu B, Gonzalez A, Massion PP, Shyr Y, Shaktour B, Carbone DP, Hallahan DE. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. Br J Cancer 2004; 91:537– 40.
85. Lehner R, Lucia MS, Jarboe EA, Orlicky D, Shroyer AL, McGregor JA, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2002; 10:134–8.
86. Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. Br J Cancer 2003; 88:1077– 83.
87. Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer KR. Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. Eur J Surg Oncol 2003; 29:379–82.
88. Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marce S, Villamor N, Ott G, Montserrat E, Campo E, Colomer D. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. Am J Pathol 2004; 164:501–10.
89. Schlette EJ, Medeiros LJ, Goy A, Lai R, Rassidakis GZ. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2004; 22:1682-8.
90. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. Blood 2000; 96:1921-25.
91. Watanuki-Miyauchi R, Kojima Y, Tsurumi H, Hara T, Goto N, Kasahara S, Saio M, Moriwaki H, Takami T. Expression of survivin and of antigen detected by a novel monoclonal antibody, T332, is associated with outcome of diffuse large B-cell lymphoma and its subtypes. Pathol Int 2005; 55:324-30.
92. Mainou-Fowler T, Overman LM, Dignum H, Wood K, Crosier S, Angus B, Proctor SJ, Anderson JJ. A new subtype-specific monoclonal antibody for IAP-survivin identifies

high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma and improves the prognostic value of bcl-2. Int J Oncol. 2008; 32:59-68.

93. Karabatsou K, Pal P, Dodd S, Mat A, Haylock B, Aguirreburualde M, Moxam N, Pinson-Ellis W, Broome J, Rainov NG. Expression of survivin, platelet-derived growth factor A (PDGF-A) and PDGF receptor alpha in primary central nervous system lymphoma. J Neurooncol. 2006; 79:171-9.
94. Lin L, Min Z, Ping Z. Expression of PLK1 and survivin in diffuse large B-cell lymphoma. Leuk Lymphoma 2007; 48:2179-83.
95. Krajewski S, Gascoyne RD, Zapeta JM, Krajewska M, Kitada S, Chhanabhai M, Horsman D, Berean K, Piro LD, Fugier-Vivier I, Liu YJ, Wang HG, Reed JC. Immunolocalisation of the ICE/Ced 3-family protease, CPP32 (Caspase-3) in non-Hodgkin lymphomas, Chronic lymphocytic leukemias and reactive lymph nodes. Blood 1997; 89:3817-25.
96. Donoghue S, Baden SH, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large cell lymphoma. Cancer Res 1999; 59:5386-91.
97. Dukers DF, Meijer CJ, ten Berge RL, Vos W, Ossenkoppele GJ, Oudejans JJ. High numbers of active caspase 3-positive Reed-Sternberg cells in pretreatment biopsy specimens of patients with Hodgkin disease predict favorable clinical outcome. Blood. 2002; 100:36-42.
98. ten Berge RL, Meijer CJ, Dukers DF, Kummer JA, Bladergroen BA, Vos W, Hack CE, Ossenkoppele GJ, Oudejans JJ. Expression levels of apoptosis-related proteins predict clinical outcome in anaplastic large cell lymphoma.Blood. 2002; 99:4540-6.
99. Muris JJ, Cillessen SA, Vos W, van Houndt IS, Kummer A, van Krieken JH, Jiwa NM, Jansen PM, Kluin-Nelemans HC, Ossenkoppele GJ, Gundy C, Meijer CJ, Oudejans JJ. Immunohistochemical profiling of caspase signalling pathways predicts clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. Blood 2005; 105:2916-23.
100. Remold-O'Donnell E, Zimmerman C, Kenney D, Rosen FS. Expression on blood cells of sialophorin, the surface glicoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. Blood. 1987; 70:104-9.
101. Shimizu Y, Shaw S. Cell adhesion: mucins in the mainstream. Nature. 1993; 366:630-1.

102. Wong RC, Remold-O'Donnell E, Vercelli D, Sancho J, Terhorst C, Rosen F, Geha R, Chatila T. Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin). Feedback regulation by protein kinase C. J Immunol. 1990; 144:1455-60.
103. Pedraza-Alva G, Merida LB, Burakoff SJ, Rosenstein Y. CD43-specific activation of T-cells induces association of CD43 to Fyn kinase. J Biol Chem. 1996; 271:27564-68.
104. Mody PD, Cannon JL, Bankuwala HS, KM, Schilling AB, Swier K, Sperling AI. Signaling through CD43 regulates CD4 T-cell trafficking. Blood. 2007; 110:2974-82.
105. Ardman B, Sikorski MA, Staunton DE. CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion. Procl Natl Acad Sci USA. 1992; 89:5001-5.
106. Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B. Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. Nature. 1995; 377:535-8.
107. Matsumoto M, Shigeta A, Furukawa Y, Tanaka T, Miyasaka M, Hirata T. CD43 collaborates with P-selectin glycoprotein ligand-1 to mediate E-selectin-dependent T cell migration into inflamed skin. J Imunnol. 2007; 178:2499-506.
108. Fuhlbrigge RC, King SL, Sackstein R, Kupper TS. CD43 is a ligand for E-selectin on CLA+ human T cells. Blood. 2006; 107:1421-6.
109. Hernandez JD, Nguyen JT, He J, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LG. Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. J Immunol. 2006; 177:5328-36.
110. He YW, Bevan MJ. High level expression of CD43 inhibits T cell receptor/CD3-mediated apoptosis. J Exp Med. 1999; 190:1903-8.
111. Tsao L, Colovai AI, Jiang JG, Bhagat G, Alobeid B. Characterizing CD43 expression in haematogones using multicolor flow cytometric analysis. Br J Haematol. 2005; 128:820-3.
112. Arends JE, Bot FJ, Gisbertz IA, Schouten HC. Expression of CD10, CD75 and CD43 in MALT lymphoma and their usefulness in discriminating MALT lymphoma from follicular lymphoma and chronic gastritis. Histopathology. 1999; 35:209-15.
113. Lee PS, Beneck D, Weisberger J, Gorczyca W. Coexpression of CD43 by benign B cells in the terminal ileum. Appl Immunohistochem Mol. 2005; 13:138-41.
114. Knowles DM. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasma. In: Knowles DM, ed. Neoplastic hematopathology. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lipincott, Wiliams & Wilkins; 2001:93-226.

115. Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. Am J Clin Pathol. 1999; 111:488-94.
116. Gelb AB, Rouse RV, Dorfman RF, Warnke RA. Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded B-lineage non-Hodgkin's lymphomas. Am J Clin Pathol. 1994; 102:825-34.
117. Nola M, Lukenda A, Bollmann M, Kalauz M, Petrovecki M, Bollman R. Outcome and prognostic factors in ocular adnexal lymhoma. Croat Med J. 2004; 45:328-32.
118. Aurer I, Dominis M, Štern-Padovan R, Huić D, Šantek F. Dijagnostika i liječenje limfoma – hrvatski konsenzus. Lijec Vjesn. 2007; 129:111-7.
119. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. J Clin Oncol. 1989; 7:1630-6.
120. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working group. J Clin Oncol. 1999; 17:1244-125.
121. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988; 16:1215.
122. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Associ 1958; 53:457-80.
123. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, Belch A, Walewski J, Zinzani PL, Mingrone W, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Corrado C, Scheliga A, Loeffler M, Kuhnt E; MabThera International Trial (MInT) Group. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInT) study. Lancet Oncol. 2008; 9:435-44.
124. Ribera JM. Adverse prognosis of bulky disease in good-risk DLBCL. Lancet Oncol. 2008; 9:406-7.
125. Krol AD, le Cessie S, Snijder S, Kluin-Nelemans JC, Kluin PM, Noordijk EM. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphoma (NHL): the impact of alternative definitions tested in the Comprehensive Cancer Centre West population-based NHL registry. Ann Oncol. 2003;14:131-9.

126. López-Guillermo A, Colomo L, Jiménez M, Bosch F, Villamor N, Arenillas L, Muntañola A, Montoto S, Giné E, Colomer D, Beà S, Campo E, Montserrat E. J Clin Oncol. 2005; 23:2797-804.
127. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, MacPherson N, O'Reilly S, Spinelli JJ, Sutherland J, Wilson KS, Gascoyne RD, Connors JM. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. J Clin Oncol. 2005; 23:5027-33.
128. Mitrović Z, Aurer I, Radman I, Ajduković R, Sertić J, Labar B. FCgammaRIIIA and FCgammaRIIA polymorphisms are not associated with response to rituximab and CHOP in patients with diffuse large B-cell lymphoma.Haematologica. 2007; 92:998-9.
129. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, Yang DY, Nagashima F, Azuma M, Chang HM, Borucka E, Lurje G, Sherrod AE, Iqbal S, Groshen S, Lenz HJ. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. J Clin Oncol 2007; 25:3712-18.
130. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu–positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2008; 26:1789-96.
131. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, Leitman SF, Goldin LR, Huppi K, Chanock SJ. Variant genotypes of the low-affinity Fcgamma receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcgamma receptor polymorphisms in control and disease populations. Blood. 1999; 94:4220-32.
132. Lejeune J, Thibault G, Ternant D, Cartron G, Watier H, Ohresser M. Evidence for linkage disequilibrium between Fcgamma RIIIa-V158F and Fcgamma RIIa-H131R polymorphisms in white patients, and for an Fcgamma RIIIa-restricted influence on the response to therapeutic antibodies. J Clin Oncol. 2008; 26:5489-91.
133. Minard-Colin V, Xiu Y, Poe JC, Horikawa M, Magro CM, Hamaguchi Y, Haas KM, Tedder TF. Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcgammaRI, FcgammaRIII, and FcgammaRIV. Blood. 2008; 112:1205-13.
134. Fischer L, Penack O, Gentilini C, Nogai A, Muessig A, Thiel E, Uharek L. The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells. Exp Hematol. 2006; 34:753-9.

135. de Romeuf C, Dutertre CA, Le Garff-Tavernier M, Fournier N, Gaucher C, Glacet A, Jorieux S, Bihoreau N, Behrens CK, Béliard R, Vieillard V, Cazin B, Bourel D, Prost JF, Teillaud JL, Merle-Béral H. Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of FcgammaRIIIA/CD16. Br J Haematol. 2008; 140:635-43.
136. Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, Kubota A, Shitara K, Nakamura K. Enhanced binding affinity for FcgammaRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. Mol Immunol. 2007; 44:3122-31.
137. Saito B, Shiozawa E, Usui T, Nakashima H, Maeda T, Hattori N, Shimozuma J, Adachi D, Yamochi-Onizuka T, Takimoto M, Nakamaki T, Ota H, Tomoyasu S. Rituximab with chemotherapy improves survival of non-germinal center type untreated diffuse large B-cell lymphoma. Leukemia. 2007; 21:2563-6.
138. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. N Engl J Med. 2008; 359:2313-23.
139. Sjö LD, Poulsen CB, Hansen M, Møller MB, Ralfkiaer E. Profiling of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry: identification of prognostic subgroups. Eur J Haematol. 2007; 79:501-7.
140. Borovečki A, Korać P, Nola M, Ivanković D, Jakšić B, Dominis M. Prognostic significance of B-cell differentiation genes encoding proteins in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma grade 3. Croat Med J. 2008; 49:625-35.
141. Veelken H, Vik Dannheim S, Schulte Moenting J, Martens UM, Finke J, Schmitt-Graeff A. Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy. Ann Oncol. 2007; 18:931-9.
142. Dupuis J, Gaulard P, Hemery F, Itti E, Gisselbrecht C, Rahmouni A, Copie-Bergman C, Brière J, El Gnaoui T, Gaillard I, Meignan M, Haioun C. Respective prognostic values of germinal center phenotype and early (18)fluorodeoxyglucose-positron emission

tomography scanning in previously untreated patients with diffuse large B-cell lymphoma. Haematologica. 2007; 92:778-83.

143. De Paepe P, Achten R, Verhoef G, Wlodarska I, Stul M, Vanhentenrijk V, Praet M, De Wolf-Peeters C. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. J Clin Oncol. 2005; 23:7060-8.
144. Uccella S, Placidi C, Marchet S, Cergnul M, Proserpio I, Chini C, Novario R, Pinotti G, Capella C. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. Leuk Lymphoma. 2008; 49:1321-8.
145. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, Fisher RI, Kurtin PJ, Macon WR, Chhanabhai M, Felgar RE, Hsi ED, Medeiros LJ, Weick JK, Reed JC, Gascoyne RD. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. Blood. 2006; 107:4207-13.
146. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. J Exp Med. 2001; 194:1861-74.
147. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Enblad G, Leppä S. Bcl-2 but not FOXP1, is an adverse risk factor in immunochemotherapy treated non-germinal center diffuse large B-cell lymphomas. Eur J Haematol. 2009; DOI: 10.1111/j.1600-0609.2009.01222.x
148. Song MK, Chung JS, Shin DH, Seol YM, Shin HJ, Choi YJ, Cho GJ. Prognostic significance of the Bcl-2 negative germinal centre in patients with diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP. Leuk Lymphoma. 2009; 50:54-61.
149. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, Lynch J, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Campo E, Ott G, Müller-Hermelink HK, Delabie J, Jaffe ES, Grogan TM, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Staudt LM, Chan WC. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2006; 24:961-8.
150. Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM, Raffeld M, Gutierrez M, Chabner BA, Staudt L, Jaffe ES, Janik JE. Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers. J Clin Oncol. 2008; 26:2717-24.

151. Ansell SM, Arendt BK, Grote DM, Jelinek DF, Novak AJ, Wellik LE, Remstein ED, Bennett CF, Fielding A. Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Leukemia. 2004; 18:616-23.
152. Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, Patnaik A, Papadopoulos K, Takimoto C, Bartels P, Keating A, Antonia S. Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. J Clin Oncol. 2008; 26:5198-203.
153. Cillessen SA, Reed JC, Welsh K, Pinilla C, Houghten R, Hooijberg E, Deurhof J, Castricum KC, Kortman P, Hess CJ, Ossenkoppele GJ, Meijer CJ, Oudejans JJ. Small-molecule XIAP antagonist restores caspase-9 mediated apoptosis in XIAP-positive diffuse large B-cell lymphoma cells. Blood. 2008; 111:369-75.
154. Mitrović Z, Ilić I, Nola M, Aurer I, Sonicki Z, Bašić-Kinda S, Radman I, Ajduković R, Labar B. CD43 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. Clin Lymphoma Myeloma 2009; In press
155. Kobayashi T, Yamaguchi M, Kim S, Morikawa J, Ogawa S, Ueno S, Suh E, Dougherty E, Shmulevich I, Shiku H, Zhang W. Microarray reveals differences in both tumors and vascular specific gene expression in de novo CD5+ and CD5- diffuse large B-cell lymphomas. Cancer Res 2003; 63:60-6.
156. Nonomura C, Kikuchi J, Kiyokawa N, Ozaki H, Mitsunaga K, Ando H, Kanamori A, Kannagi R, Fujimoto J, Muroi K, Furukawa Y, Nakamura M. CD43, but not P-selectin glycoprotein ligand-1, functions as an E-selectin counter-receptor in human pre-B-cell leukemia NALL1. Cancer Res 2008; 63:790-9.
157. Ziprin P, Alkhamesi NA, Ridgway PF, Peck DH, Darzi AW. Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumourmesothelial cell adhesion. Biol Chem 2004; 385:755-61.
158. Dragone LL, Barth RK, Sitar KL, Disbrow GL, Frelinger JG. Disregulation of leukosialin (CD43, Ly48, sialophorin) expression in the B-cell lineage of transgenic mice increases splenic B-cell number and survival. Procl Natl Acad Sci USA 1995; 92:626-30.
159. Misawa Y, Nagaoka H, Kimoto H, Ishii Y, Kitamura K, Tsunetsugu-Yokota Y, Shibuya M, Takemori T.CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion. Eur J Immunol 1996; 26:2573-81.
160. Kadaja-Saarepuu L, Laos S, Jääger K, Viil J, Balikova A, Lõoke M, Hansson GC, Maimets T. CD43 promotes cell growth and helps to evade FAS-mediated apoptosis in

non-haematopoietic cancer cells lacking the tumor suppressors p53 or ARF. Oncogene 2008; 27:1705-15.

161. Jimi E, Phillips RJ, Rincon M, Voll R, Karasuyama H, Flavell R, Ghosh S. Activation of NF-κB promotes transition of large, CD43+ pre-B cells to small, CD43- pre B-cells. Int Immunol 2005; 17:815-25.
162. Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, Greiner TC, Weisenburger DD, Rosenwald A, Ott G, Müller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Delabie J, Rimsza LM, Braziel RM, Grogan TM, Campo E, Jaffe ES, Dave BJ, Sanger W, Bast M, Vose JM, Armitage JO, Connors JM, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Fisher RI, Miller TP, Montserrat E, Wilson WH, Bahl M, Zhao H, Yang L, Powell J, Simon R, Chan WC, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. N Engl J Med. 2006; 354:2431-42.
163. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, Sander B, Thorns C, Campo E, Molina T, Norton A, Hagenbeek A, Horning S, Lister A, Raemaekers J, Gascoyne RD, Salles G, Weller E; Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. J Clin Oncol. 2007; 25:805-12.

# 10. Životopis

Rođen sam 02. lipnja 1978. u Zagrebu. Nakon mature u zagrebačkoj XV. gimnaziji, 1996. sam upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, a diplomirao 2002. Pripravnički staž i civilni vojni rok obavio sam u OB Sveti Duh, nakon čega sam 2003. položio državni ispit. Od kraja 2003. zaposlen sam kao znanstveni novak – asistent Medicinskog fakulteta na projektu „Dijagnostika i liječenje limfoma“ prof. dr. Igora Aurera na Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Zagreb. Godine 2006. sam završio doktorski poslijediplomski studij iz biomedicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Potkraj 2006. započeo sam specijalizaciju iz interne medicine. Oženjen sam i otac jednog djeteta.