

Izraženost i klinički značaj galektina-3, VEGF-a i NF-κB u difuznom B-velikostaničnom limfomu

Bašić-Kinda, Sandra

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:105:092923>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sandra Bašić-Kinda

**Izraženost i klinički značaj galektina-3,
VEGF-a i NF- κ B u difuznom
B-velikostaničnom limfomu**

DISERTACIJA



ZAGREB, 2023

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sandra Bašić-Kinda

**Izraženost i klinički značaj galektina-3,
VEGF-a i NF- κ B u difuznom
B-velikostaničnom limfomu**

DISERTACIJA

ZAGREB, 2023.

Disertacija je izrađena u Odjelu za maligne bolesti Zavoda za hematologiju Klinike za unutrašnje bolesti, Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, i u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Voditelj (mentor) rada: prof. dr. sc. Igor Aurer

ZAHVALA

Ovaj doktorat ima dugu povijest, prva zamisao potiče od prof. dr. sc. Marina Nole koji nažalost više nije među nama ali je njegova misao glavna tema ovog rada, a uspomena na Marina bila mi je najveći poticaj u radu.

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Igoru Aureru na korisnim savjetima i diskusijama, upornosti, poticanju i vodstvu tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Značajno su doprinijeli i ostale kolege Zavoda za hematologiju, posebice oni koji se bave liječenjem limfoproliferativnih bolesti (prim. dr. Ivo Radman, dr.sc. Dino Dujmović, dr. Barbara Dreta i doc.dr.sc. Josip Batinić).

Posebna zahvala prof. dr. sc. Borisu Labaru koji mi je nesebično prenio svoje medicinsko znanje i naučio me da uvidim izazove i ljepotu hematologije.

Zahvaljujem kolegicama i djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Zagreb (doc. dr.sc. Ivani Ilić, doc. dr.sc Snježani Dotlić i mag. med.lab.diag. Katarini Ražnjević) kao i kolegama i djeletnicima Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KBC Rijeka posebice prof. dr. sc. Nives Jonjić, na trudu i pomoći da ovoj rad uspije.

Zahvaljujem svojoj obitelji, suprugu Emilu, svojoj djeci Kristini i Marku, roditeljima i bratu na podršci i strpljenju.

Sandra Bašić-Kinda

Zagreb, 2023.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. Difuzni B – velikostanični limfom (DLBCL).....	1
1.1.1. Liječenje DLBCL-a.....	4
1.2. Prognostički čimbenici kod DLBCL-a.....	5
1.2.1. Međunarodni prognostički indeks.....	5
1.2.2. Podijela DLBCL-a prema staničnom podrijetlu.....	6
1.2.3. Biljezi apopoze.....	7
1.2.4. Galektini.....	11
1.2.5. Biljezi angiogeneze.....	16
1.3. Svrha rada.....	18
2. HIPOTEZA.....	20
3. CILJEVI RADA.....	21
3.1. Opći ciljevi.....	21
3.2. Specifični ciljevi:.....	21
4. ISPITANICI I METODE.....	22
4.1. Ispitanici.....	22
4.2. Obrada ispitanika.....	22
4.3. Liječenje, procjena odgovora i praćenje	23
4.4. Patohistološke metode.....	24
4.4.1. Imunohistokemijska bojenja.....	24
4.5. Klinički ishodi.....	30
4.6. Statističke metode.....	30
5. REZULTATI.....	31
5.1. Značajke bolesnika i ishodi liječenja.....	31
5.2. Povezanost ishoda liječenja i staničnog podrijetla DLBCL određenog imunohistokemijski algoritmom po Hansovoj.....	36
5.3. Povezanost izražaja BCL2 s drugim parametrima i ishodima liječenja.....	37
5.4. . Povezanost izražaja galektina-3 s drugim parametrima i ishodima liječenja.....	40

5.5. Povezanost izražaja NF- κ B s drugim parametrima i ishodima liječenja.....	43
5.6. . Povezanost izražaja VEGF-a s drugim parametrima i ishodima liječenja.....	46
5.7. Multivarijatna analiza.....	49
6. RASPRAVA.....	50
6.1. Ishodi liječenja, značajke bolesnika i bolesti te odabir bolesnika.....	50
6.2. Podjela prema COO određena imuhistokemijskim bojenjem po Hansovoj.....	51
6.3. BCL2.....	53
6.4. Galektin 3.....	54
6.5 NF- κ B.....	58
6.6. VEGF.....	58
6.7. Imunohistokemijski biljezi kao prognostički faktori u DLBCL	60
7. ZAKLJUČAK.....	62
8. SAŽETAK.....	63
9. SUMMARY.....	64
10. LITERATURA.....	65
11. ŽIVOTOPIS.....	81

POPIS OZNAKA I KRATICA

- ABC – tip DLBCL podrijetla aktiviranih B-limfocita (engl. activated B cell)
- ALK – od kinaza anaplastičnog limfoma (engl. anaplastic lymphoma kinase)
- BCL2 – od B-stanični limfom 2 (engl. B-cell lymphoma 2), jedan od najvažnijih staničnih antiapoptoičkih proteina
- BCR – B stanični receptor (eng. B-cell receptor)
- BL – Burkittov limfom
- BNLI – Britansko nacionalno istraživanje limfoma (engl. British National Lymphoma Investigation)
- CEOP – polikemoterapijski protokol koji sadrži ciklofosfamid, etopozid, vinkristin i steroid
- CHOP – polikemoterapijski protokol koji sadrži ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin i steroid
- CHOEP – polikemoterapijski protokol, CHOP + etopozid
- CNOP – polikemoterapijski protokol koji sadrži ciklofosfamid, mitoksantron, vinkristin i steroid
- COO – stanično podrijetlo (engl. cell of origin)
- CRD – domena za prepoznavanje ugljikohidrata (engl. carbohydrate recognizing domain)
- CT – kompjuterizirana tomografija
- DA-EPOCH – polikemoterapijski protokol koji sadrži iste lijekove kao CHOEP, ali se svi citostatici osim ciklofosfamida primjenjuju u kontinuiranoj infuziji tijekom 4 dana
- DLBCL – difuzni B-velikostanični limfom (engl. diffuse large B-cell lymphoma)
- DNK – deoksiribonukleinska kiselina
- EBV – Epstein-Barrov virus
- ECOG – Istočna kooperativna onkološka grupa (engl. Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status)
- EFS – doživljenje bez događaja (engl. event-free survival)
- FISH – fluorescentna in situ hibridizacija
- FL – folikularni limfom
- G – obinutuzumab
- GCB – tip DLBCL podrijetla limfocita germinativnog centra (engl. germinative center B-cell)
- GEP – tehnologija genskog čipa (engl. gene expression profiling)

HHV8 – humani herpes virus 8
HIV – virus humane imunodeficijencije
IKK – kompleks I κ B kinaze
IPI – međunarodni prognostički indeks (engl. international prognostic index)
KKS – kompletna krvna slika
LDH – laktat dehidrogenaza
MCL – limfom plaštenih stanica (engl. mantle cell lymphoma)
MZL – limfom marginalne zone (engl. marginal zone lymphoma)
NHL – non-Hodgkin limfom
NF- κ B – Nuklearni faktor kapa B, transkripcijski faktor
NK – prirodene ubojice (engl. natural killer), vrsta limfocita
NOS – bez dodatnih obilježja (engl. not otherwise specified)
OS – ukupno doživljenje (engl. overall survival)
PCR – lančana reakcije polimerizacije
Pre-mRNA – predglasnička RNK
PS – opće stanje (engl. performance status)
R – rituksimab
REAL klasifikacija – Revidirana europsko-američka klasifikacija limfoma (engl. Revised European and American Lymphoma Classification)
RNK – ribonukleinska kiselina
SLL – limfom malih limfocita
SZO – Svjetska zdravstvena organizacija
TNF – čimbenik nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor)
VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. vascular endothelial growth factor)

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Difuzni B velikostanični limfom (DLBCL)

Limfom je kao nozološki entitet prvi put opisao 1832.g. britanski liječnik Thomas Hodgkin, po kome i danas jedna vrsta limfoma (Hodgkinov limfom) nosi ime (1). Non-Hodgkin limfomi (NHL) su heterogena skupina limfoproliferativnih bolesti koje nemaju obilježja Hodgkinovog limfoma, a nastaju klonalnom proliferacijom limfoidnih stanica. S obzirom na razlike u patohistološkim obilježjima, kliničkim značajkama, odgovoru na liječenje i prognozi pojedinih vrsta limfoma bilo je potrebno, ali i vrlo zahtjevno, klasificirati ih. Unatoč razvoju medicine, pojavi novih tehnologija i uvođenju novih dijagnostičkih metoda, problem klasifikacije limfoma nije ni do danas riješen. I u najnovijim klasifikacijama postoje tzv. „provizorni entiteti“ koje usprkos svim raspoloživim dijagnostičkim i kliničkim podacima nije moguće jasno definirati. Prva klasifikacija limfoma, koja je bila prvenstveno morfološka, objavljena je 1941 godine, nakon čega slijedi Rappaportova klasifikacija objavljena 1956.g (2,3). U njoj se prvi put razlikuje difuzni i nodularni način rasta limfoma. 1966.g. Lukes i Butler objavili su novu klasifikaciju u kojoj se po prvi put prepoznaju različiti tipovi Hodgkinovog limfoma (4). Tijekom 60-tih godina otkriveno je da limfociti sudjeluju u imunološkom odgovoru i da postoje različite vrste: T, B i NK stanice. Desetak godina kasnije otkriveni su limfocitni površinski antigeni/receptori pomoću kojih su se mogle razlikovati vrste limfocita, ali i razlikovati normalni od neoplastičnih (5). 1970-tih se nekoliko američkih i europskih grupa udružilo s idejom izrade nove klasifikacije koja bi objedinila patološke i kliničke podatke što je rezultiralo Kielskom klasifikacijom 1974. godine (6). Potom su slijedili Lukes-Collinsova, BNLI i Working Formulation (Radna) klasifikacija, od kojih niti jedna nije bila općeprihvaćena (7-9). Naposljetku je devedesetih godina prošlog stoljeća objavljena REAL klasifikacija, koja je za definiranje različitih entiteta koristila kombinaciju morfologije, imunofenotipizacije, genetskih osobina, ali i kliničke prezentacija i tijeka bolesti (10). Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), objavljena 2001.g, prihvatila je iste principe (11). Od tada se ova klasifikacija koristi diljem svijeta, a zbog napretka medicine i pojave novih saznanja revidirana je u dva navrata, zadnji put 2016.g. (12,13). Prema klasifikaciji SZO NHL spadaju u tumore zrelih

B-limfocita, odnosno zrelih T-limfocita i NK-stanica. Klinički ih se može podijeliti na indolentne, agresivne i vrlo agresivne. Na B-limfome otpada >90% svih slučajeva NHL.

Simptomi i znakovi limfoma mogu biti uzrokovani tumorskom masom, potiskivanjem normalne hematopoeze i imunopoeze ili lučenjem citokina, odnosno odgovorom organizma na bolest (opći simptomi). Bolesnici se najčešće liječniku javljaju zbog povećanja limfnih čvorova. Kao prvi simptom mogu se javiti kašalj ili nedostatak zraka zbog povećanja mediastinalnih limfnih čvorova, odnosno bolovi u trbuhu, gubitak apetita i smetnje pražnjenja crijeva zbog povećanja čvorova u trbuhu. Ekstranodalni limfomi manifestiraju se simptomima od strane organa koji je zahvaćen, npr. kožnim promjenama kod kožnih limfoma, neurološkim ispadima kod limfoma mozga i sl.

Tumori limfocitne loze mogu suprimirati normalnu hematopoezu i uzrokovati najčešće anemiju, a rjeđe granulocitopeniju ili trombocitopeniju. Povećana sklonost infekcijama i autoimunim fenomenima (najčešće autoimuna hemolitička anemija ili imunotrombocitopenija) javljaju se zbog poremećene regulacije imunološkog sustava.

Od općih simptoma koji nastaju kao posljedica otpuštanja različitih citokina najčešći su umor, opća slabost i nemoć. U tzv. B simptome spadaju povišena temperatura (>38 C bez infekcije), noćno znojenje (toliko da se bolesnik mora presvući), svrbež (uz ekzorijacije) i gubitak na težini (>10% u 6 mjeseci) (14,15).

Difuzni B- velikostanični non-Hodgkin limfom (DLBCL) je najčešći limfom i na njega otpada preko 30% svih NHL-a. Dijagnoza se postavlja histološkim pregledom bioptiranog materijala i imunohistokemijskom analizom. Morfološki, tumor karakterizira difuzna infiltracija srednje velikim i velikim neoplastičnim B-limfocitima s obilnom citoplazmom i velikom jezgrom koja je jednaka ili veća od jezgore histiocita ili više nego dvostruko veća od zrelog limfocita. Ove stanice narušavaju i brišu strukturu zahvaćenog limfnog čvora. Stanice na svojoj površini izražavaju pan-B biljege, uključujući CD19, CD20, CD22, CD 79a i CD 45. Oko 14% tumora je CD30+ (16). Subklasifikacija DLBCL-a se, kao i klasifikacija limfoma, često mijenjala zbog novih spoznaja o biološkim i kliničkim osobinama te patogenezi. Najnovija klasifikacija prepoznaje nekoliko morfoloških varijanti, precizno definiranih podtipova DLBCL-a i kliničko patoloških entiteta koji pripadaju porodici DLBCL-a.

Morfološki prepoznajemo 3 tipa:

- Centroblastična varijanta: predominantna populacija su srednje veliki do veliki limfociti s ovalnom ili okruglom jezgrom.
- Immunoblastična varijanta: >90% stanica su imunoblasti i velike stanice s velikom jezgrom
- Anaplastična varijanta: velike i vrlo velike stanice s pleomorfnom jezgrom

Na specifične podtipove DLBCL-a i ostale kliničko-patološke entitete iz ove skupine otpada manjina svih slučajeva. Daleko najveći broj ubraja se u najveću skupinu, DLBCL bez dodatnih obilježja (DLBCL-NOS) (Tablica 1).

Tablica 1.

DLBCL bez dodatnih obilježja (NOS) <ul style="list-style-type: none">○ Nalik B-limfocitima germinativnog centra (GCB)○ Nalik aktiviranim B-limfocitima (ABC)
Podtipovi B-velikostaničnog limfoma <ul style="list-style-type: none">○ Velikostanični B limfom bogat T-limfocitima i histiocitima○ Primarni DLBCL središnjeg živčanog sustava○ Primarni kožni DLBCL, nožni tip○ EBV-pozitivni DLBCL○ DLBCL povezan s kroničnom upalom○ Primarni medijastinalni B-velikostanični limfom○ Intravaskularni B-velikostanični limfom○ ALK+ B-velikostanični limfom○ Primarni efuzijski limfom○ Velikostanični B-limfom s <i>IRF4</i> translokacijom○ HHV8+ DLBCL, NOS

Bolest se može javiti u bilo kojoj dobi, medijan pri dijagnozi je 66 godina. Nešto je češći u muškaraca nego u žena (6,7 vs 4,6 na 100.000 stanovnika). Učestalost se povećava s dobi.

Petogodišnje preživljenje se smanjuje s dobi, do 55 godina iznosi oko 78-84% a nakon 65 godina je znatno lošije i iznosi oko 54-60%. Učestalost DLBCL-a porasla je između 1970. i 1995.g. i ne može se u potpunosti objasniti boljom dijagnostikom, novom klasifikacijom niti pojavom HIV infekcije. Nakon toga se broj novih slučajeva stabilizirao (17,18). Incidencija DLBCL-a u Republici Hrvatskoj iznosi oko 7,6 na 100 000 stanovnika, godišnje se ukupno dijagnosticira oko 320 bolesnika (19).

DLBCL spada u grupu agresivnih limfoma, može zahvatiti bilo koji organ, a najčešće zahvaća limfne čvorove ili druge limfne organe (slezena, tonzile) te koštanu srž. Oko 40% bolesnika ima B simptome.

1.1.1. Liječenje DLBCL-a

Unatoč tome što se radi o agresivnom limfomu, bolest je izlječiva. Kemoterapija po shemi CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednizolon) standardni je oblik liječenja agresivnih limfoma pa tako i DLBCL-a od sedamdesetih godina prošlog stoljeća (20,21). Ovom terapijom može se izliječiti oko 40% bolesnika. Dodatak rituksimaba (R), monoklonskog anti-CD20 protutijela, (R-CHOP) značajno je poboljšao ishod liječenja, no još uvijek 30-40% bolesnika ne postiže dobar odgovor na terapiju ili im se javi relaps bolesti (22-24). Zbog toga su iskušane brojne modifikacije ovog protokola, povećanjem doze ili dodatkom novih cistostatika. Izgleda da je najučinkovitija kombinacija R-CHOP-a s etopozidom (R-CHOEP), no o tome nema konsenzusa (25-27). Nove spoznaje o biologiji limfoma, disregulaciji i aktivaciji B-staničnog receptora (BCR) i njegovog utjecaja na nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) potaknule su ideju o upotrebi bioloških agensa, koji utječu na ove signalne putove, u liječenju DLBCL-a. Iskušane su kombinacije kemoimunoterapije s različitim novim lijekovima kao što su bortezomib, ibrutinib i lenalidomid, no niti jedna nije pokazala uvjerljivu prednost nad R-CHOP-om (28-30). Imajući u vidu ulogu BCL2 proteina (od engl. B-cell lymphoma 2, B-stanični limfom 2) u inhibiranju apoptoze pa tako i progresiji tumora, nedavno je provedena studija kombinacije R-CHOP-a s inhibitorom BCL2, venetoklaksom. Prelimarni rezultati su obećavajući, a randomizirana studija je u tijeku (31).

Bolesnici kod kojih se javi relaps bolesti, a pogodni su za liječene transplantacijom liječe se agresivnijim kemoterapijskim protokolima te autolognom transplantacijom matičnih

hematopoetskih stanica (32,33). Ovakvim liječenjem postiže se izlječenje kod oko 40% bolesnika u kasnom relapsu, dok su rezultati u onih s primarno rezistentnom bolesti i u ranom relapsu (<6 mj. od završetka prve linije liječenja) još lošiji s dugoročnim preživljenjem od 20% ili manje (34). Novija studija SCHOLAR-1 na više od 600 bolesnika s refraktornim DLBCL-om potvrdila je gore navedene rezultate zbog čega su ovi bolesnici populacija na kojoj se ispituju novi lijekovi, postupci i metode liječenje (35).

1.2. Prognostički čimbenici kod DLBCL-a

1.2.1. Međunarodni prognostički indeks

Nakon istraživanja provedenog na velikom broju agresivnih limfoma, 1993.g. objavljen je međunarodni prognostički indeks (IPI), po kojem su bolesnici svrstani u četiri rizične skupine (Tablica 2 i 3) (36). Čimbenici od prognostičke važnosti uključeni u IPI su: dob, vrijednost LDH u serumu, opće stanje bolesnika, stadij te broj ekстранodalnih lokalizacija bolesti. Brojna istraživanja su pokušala identificirati imunohistokemijske ili genetske biljege DLBCL-a koji bi omogućili da se na početku liječenja predvidi koji će bolesnici lošije odgovoriti na terapiju. Iako su otkriveni mnogi biološki markeri povezani s nastankom i progresijom tumora, za niti jedan nema konsenzusa o prognostičkom značenju niti prednosti pred IPI-jem. Zato je ovaj indeks i dalje zlatni standard s kojim se uspoređuju svi drugi prognostički parametri.

Tablica 2. Međunarodni prognostički indeks

Parametar		
Dob	≥60 godina	1 bod
Klinički stadij	III ili IV	1 bod
LDH	iznad gornje granice normale	1 bod
PS (ECOG)	≥2	1 bod
Broj ekстранodalnih lokalizacija	≥2	1 bod

Tablica 3. Stratifikacija bolesnika u prognostičke skupine

Broj bodova (vrijednost IPI)			
0, 1	2	3	4, 5
Niski rizik	Srednje niski rizik	Srednje visoki rizik	Visoki rizika

1.2.2. Podjela DLBCL-a prema staničnom podrijetlu

U nastojanju da se što bolje razjasni biologija limfoma, korištene su razne tehnike za analizu tumorskih stanica. Početkom ovog tisućljeća razvijena je tehnologija genskog čipa (engl. gene expression profiling, GEP), koja omogućava analizu izražaja tisuće gena u stanicama. Uočeno je da se DLBCL na temelju toga može podijeliti u dvije različite grupe koje upućuju na moguće različito stanično podrijetlo (engl cell of origin, COO): GCB (engl. germinal center B-cell like) grupu koja izražava gene koji su izraženi na normalnim B stanicama germinativnog centra te ABC (engl. activated B-cell-like) grupu koja izražava gene koji su izraženi na aktiviranim B stanicama periferne krvi. Pokazalo se da GCB grupa ima bolju prognozu od ABC podgrupe. 10-15% slučajeva nije moguće klasificirati (37,38).

GEP se ne koristi u rutinskoj kliničkoj praksi zbog visoke cijene i činjenice da se analiza mora provoditi na svježim uzorcima tkiva. U rutinskoj kliničkoj praksi za podjelu na GCB i ABC grupu obično se koristi imunohistokemijska analiza. Najčešće korišteni algoritam za prepoznavanje ove dvije grupe je onaj kojeg su objavili Hans i suradnici (39). Podjela je provedena na osnovu biljega CD10, BCL6 i MUM1. DLBCL porijekla germinativnog centra (GCB) su CD10+ ili BCL6+, MUM 1-, a oni koji nisu porijekla germinativnog centra, tj. porijekla su aktiviranih B stanica (ABC) CD10-, MUM 1+ ili BCL 6 +, MUM 1-. Više istraživačkih skupina provelo je klinička ispitivanja od kojih su neka potvrdila prognostički značaj ove podjele (40-42) dok su druga pokazala da podjela na GCB i ABC bazirana na imunohistokemijskoj analizi nije prognostički značajna (43-46). Testirani su i drugi imunohistokemijski modeli kao što je algoritam po Choiju koji uz CD10, BCL6 i MUM1 koristi

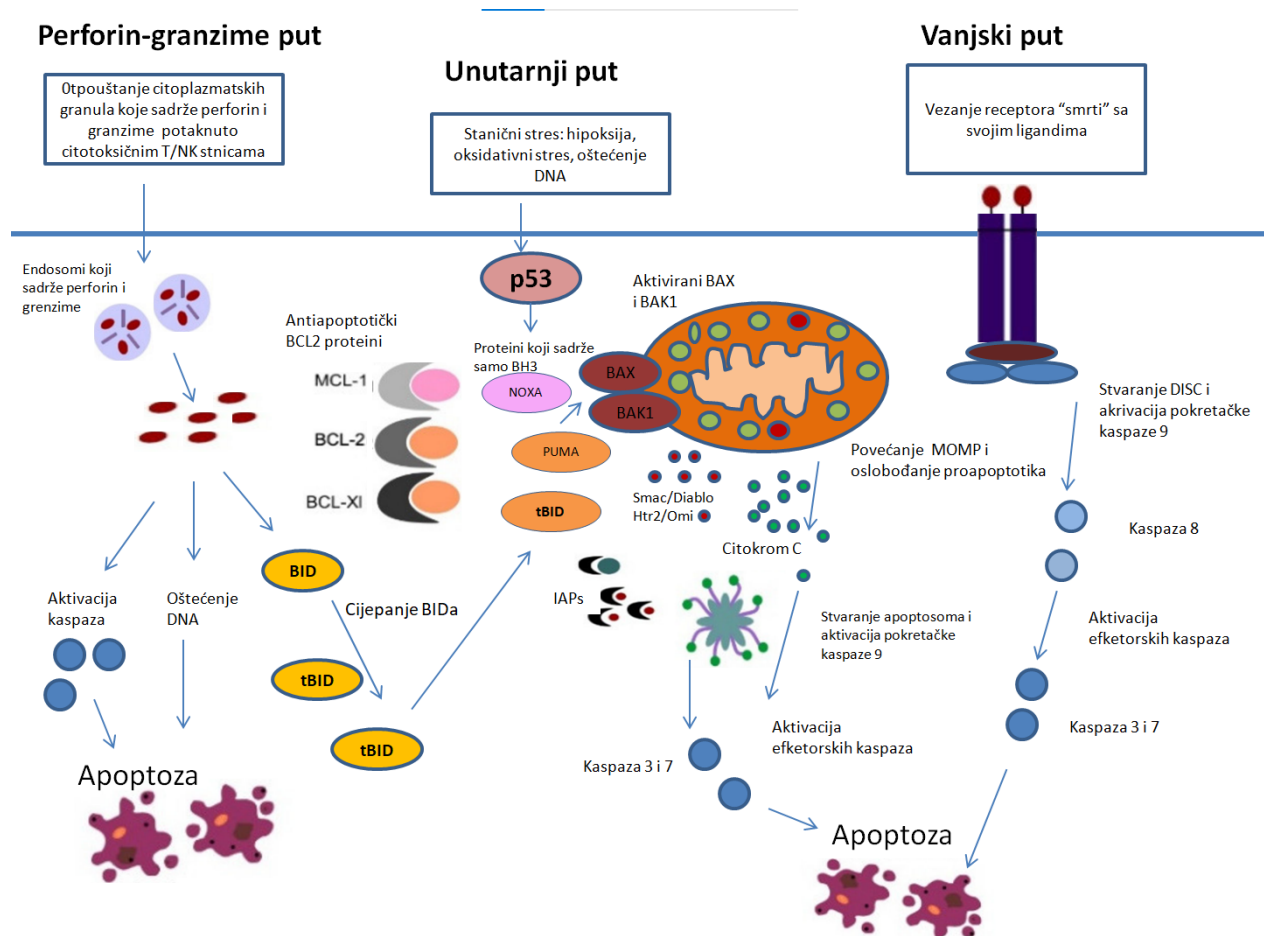
još i FOXP1 i GCET1 (47). Isprva se činilo da ovaj algoritam bolje korelira s rezultatima genskog čipa i ishodima od algoritma po Hansovoj, no kasnije studije to nisu potvrdile (48).

Usprkos oprečnim rezultatima podjela DLBCL prema imunohistokemijski određenom staničnom podrijetlu postala je sastavni dio najnovije klasifikacije SZO. Najčešće se koriste algoritmi koji su predložili Hans i suradnici, ali se mogu koristiti i drugi, npr. gore spomenuti algoritam po Choiju.

1.2.3 Biljezi apoptoze

Apoptoza je fiziološki oblik stanične smrti koji su razvili višestanični organizmi kao mehanizam eliminacije nepoželjnih stanica. Programiranom smrću smatramo kontrolirani proces biokemijskih i morfoloških promjena u stanici koji završava smrću stanice. Ovaj proces je reguliran proapoptotskim i antiapoptotskim faktorima. Velik broj proteina sudjeluje u regulaciji apoptoze: enzimi proteaze zvani kaspaze, članovi BCL2 obitelji proteina, NF- κ B itd (49). U novije vrijeme otkriveno je da i galektini utječu na apoptozu.

Dva su osnovna puta apoptoze, unutarnji (mitohondrijski) i vanjski ili put apoptoze posredovan receptorima. Intrinzični ili mitohondrijski put najčešći je mehanizam apoptoze u kralježnjaka. Aktivaciju ovog puta mogu uzrokovati toksične tvari, virusne infekcije, oštećenja molekule DNK, izlaganje zračenju ili gubitak različitih faktora rasta. Prvi korak mitohondrijskog puta apoptoze reguliran je proteinima obitelji BCL2. Ekstrinzični put apoptoze ili put receptora smrti započinje na membranskim receptorima koji uključuju one za Fas i čimbenik nekroze tumora (engl. tumor necrosis factor, TNF). Vezivanje liganada na ove receptore dovodi do aktivacije adaptorskih proteina, kao što su proteini vezani uz Fas, koji imaju tzv. domenu smrti (engl. death domain) što rezultira aktivacijom kaspaze 8 i smrću stanice. Oba ova puta na kraju završavaju aktivacijom kaspaza koje cijepaju stanične proteine i dovode do oštećenja citoskeleta i proteina jezgre što sve dovodi do kontroliranog raspada stanice (50,51). Opisan je još jedan način apoptoze za kojeg su odgovorni citotoksični T limfociti i stanice prirodene ubojice (engl. natural killer cells, NK). One dovode do smrti stanice preko perforin-granzimskog puta koji u konačnici također dovodi do aktivacije kaspaza (52). Poremećaji apoptoze karakteristični su za tumore pa tako i za DLBCL. Mitohondrijalni put apoptoze često je inhibiran u B-staničnih limfoma.



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz puteva apoptoze

Prilagođeno prema Kalanova M. i sur (ref. 53)

TNF —faktor tumorske nekroze, DICS —signalni kompleks koji inducira smrt, BID —BH3 agonist smrti, interakcijska domena, tBID —krnji agonist smrti, interakcijska domena, PUMA —P53 regulirani modulator apoptoze, IAPs —proteini inhibitori apoptoze drugi mitohondrijski aktivator kaspaza/izravni inhibitor proteina vezanja apoptoze s niskom izolektričnom točkom, HtrA2/Omi – serinska proteaza Htr2/Omi

Obitelj BCL2 proteina čini više od 20 različitih članova koji se na osnovu svoje strukture i funkcije svrstavaju u 3 glavne podgrupe: proteini koji stimuliraju preživljavanje, pro-apoptotički efektorski proteini s više domena i pro-apoptotički proteini sa samo jednom domenom homolognom BCL2. Poremećaj ravnoteže između ovih proteina dovodi do narušavanja apoptotičkih procesa što može rezultirati boljim preživljavanjem tumorskih stanica. Proteini koji

stimuliraju preživljavanje su: BCL2, MCL1 (od „leukemija mijeloičnih stanica-1“, engl. „myeloid cell leukemia -1“), BCL-XL/BCL2L1 (od „B-stanični ekstra veliki limfom“, od engl. „extra large“), BCL-W/BCL2L2, BCL-B/BCL2L10 (od „protein 10 nalik BCL2“, eng. „like“) i A1/BCL2A1 ili BFL1. Anti-apoptotički BCL2 proteini razgrađuju/sekvestriraju pro-apoptotičke BCL2 proteine. Primarna uloga inhibitornog proteina BCL2 je sprečavanje oslobađanja citokroma-C i inhibicija aktivacije kaspaze-9, dakle unutarnjeg puta apoptoze, mada djeluje i na druge apoptotske kaskade (53). BCL2 je prvi put otkriven kod folikularnog limfoma (FL) zbog povezanosti s translokacijom t(14,18), a tek je kasnije otkriveno da se aberantna ekspresija javlja i u drugim malignim bolestima, uključujući leukemije i limfome (54). Pojačan izražaj BCL2 u B-NHL posljedica je genetskih abnormalnosti. Učestalost i jačina ekspresije razlikuju se kod pojedinih tipova limfoma. Tako je kod DLBCL BCL2 pozitivan u 49-67% slučajeva, kod FL u >90%, kod limfoma marginalne zone (MZL) u 80%, dok su svi limfomi plaštenih stanica (MCL) BCL2 pozitivni (55). Genetske promjene BCL2 gena, uključujući kromosomske translokacije, amplifikacije i dr, su česte u DLBCL. Neka istraživanja ukazuju da se učestalost tih promjena kao i stupanj BCL2 pozitivnosti razlikuju ovisno o staničnom podrijetlu DLBCL-a. Tako je npr. translokacija t(14;18) (q32;q21) nađena u više od 30% GCB DLBCL i povezana je s pojačanom ekspresijom BCL2 i lošijom prognozom. Ova promjena nije pronađena kod ABC DLBCL kod kojih je puno češće nađena amplifikacija 18q21 lokusa uz pojačanu ekspresiju BCL2 (56).

Objavljeni podaci o utjecaju BCL2 na apoptozu i preživljenje bolesnika s hematološkim malignim bolestima nisu jednoznačni. Neke studije u bolesnika s DLBCL su našle da je pojačan izražaj BCL2 povezan s lošijim ishodom liječenja (57,58). Druga istraživanja to nisu našla, pogotovo u bolesnika liječenih rituksimabom (59-61). S druge strane, studija u kojoj su se tumori dijelili na BCL2+ i BCL2- ne samo na temelju postotka pozitivnih stanica, već i intenziteta bojenja, našla je da je ovako određen BCL2 pozitivitet povezan s nepovoljnim ishodom liječenja (62). Obzirom na oprečne podatke još uvijek je ovo pitanje interesantno, kako kliničarima, tako i hematopatolozima.

Budući da BCL2 protein ima važnu ulogu u patogenezi limfoma, progresiji bolesti i rezistenciji na terapiju, zadnjih se desetljeća pokušava pronaći lijek koji bi utjecao na ovaj protein, a time i na ishod bolesti. Prvi inhibitor BCL2 bio je oblimersen, a prvi rezultati objavljeni su 2002. g. i nisu ispunili očekivanja (63). Tek desetak godina kasnije otkriven je selektivni inhibitor BCL2 venetoklaks koji se pokazao učinkovit u liječenju različitih limfocitnih, ali i

mijeloičnih tumora (64). Učinkovitost venetoklaksa u DLBCL još uvijek nije dokazana, ali su studije u tijeku.

Nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) zajednički je naziv za obitelj transkripcijskih čimbenika koja sadrži pet gena (*NF- κ B1*, *NF- κ B 2*, *RelA*, *c-Rel* i *RelB*). Uključeni su u različite biološke procese kao što su preživljenje i proliferacija stanica, ali i upala. NF- κ B povezan je s brojnim aspektima onkogeneze. Dokazana je njegova uloga u inhibiciji apoptoze, poticanju proliferacije i migracije stanica te regulaciji staničnog ciklusa. Nalazi se u citoplazmi stanice, no nakon aktivacije prelazi u jezgru gdje se veže na određene gene i potiče transkripciju. Inaktivni transkripcijski faktori zadržavaju se u citoplazmi, bilo zato što su vezani na klasične inhibitorne κ B proteine I κ B α , I κ B β , i I κ B ϵ ili zbog interakcije s inaktivnim prekursorima p105 i p100. Aktivaciju NF- κ B reguliraju kanonički i nekanonički put. U kanoničkom putu nakon stimulacije određenim faktorima dolazi do aktivacije kompleksa I κ B kinaze (IKK) koji se sastoji od katalitičkih podjedinica IKK α i IKK β te regulatorne podjedinice IKK γ što dovodi do fosforilacije i degradacije I κ B proteina (65-67). Nakon toga dolazi do ulaska NF- κ B transkripcijskih faktora u jezgru, posebice heterodimera p50 i RelA ili c-Rel, koji se onda vežu na DNK i utječu na transkripciju gena. U zdravim limfocitima aktivacija ovog puta je samo prolazna, brzo se prekida povratnom inhibicijom koja uključuje negativne regulatore kao što su I κ B α , I κ B ϵ (68). Kod nekanoničnog puta glavnu ulogu igra NF- κ B inducirajuća kinaza koja dovodi do aktivacije IKK α i inducira proteolizu. Iz prekursorskog p100 proteina generira se p52 koji onda formira transkripcijski aktivne heterodimere (p50/105, p52/100, p65/RelA, p65/RelB i p65/c-Rel). U novije vrijeme sve se više istražuje i uloga NF- κ B u poticanju angiogeneze. Učinak na angiogenezu ostvaruje tako što aktivira gene odgovorene za angiogenezu kao što su matriks metaloproteinaza, vaskularni čimbenik rasta (VEGF), urokinaza (aktivator plaziminogena) i interleukin– 8. Aktivacija NF- κ B uočena je u brojnim solidnim i hematološkim tumorima, uključujući leukemije i limfome, a ako nastane tijekom kemoterapije ili radioterapije često je povezana sa stečenom rezistencijom na liječenje (69-71).

2008.g. objavljen je rad španjolske grupe u kojem se imunohistokemijskim metodama određivala aktivnost NF- κ B u DLBCL-u, na temelju ekspresije P-p65, P-I κ B i nuklearne ekspresije p65 i p52 u tumorskim stanicama (70). Njihovi rezultati su pokazali da je u DLBCL-u pretežno aktivan nekanonički put te da je ekspresija P-p65 povezana s dobrom prognozom.

Nasuprot tome, 2017.g. kineski znanstvenici, Wang i sur. objavili su rad u kojem su pokazali da ekspresija NF- κ B određena imunohistokemijskim izražajem p65 kolerira s lošijim ishodom u bolesnika s non-GCB DLBCL (72). S obzirom na kompleksnost samog puta te različite biljege koji se koriste kao metode za mjerenje aktivnosti NF- κ B, rezultati mogu biti različiti i teški za tumačiti. NF- κ B kao regulator apoptoze, a izgleda i angiogeneze, igra važnu ulogu u patogenezi DLBCL-a i predstavlja zanimljivo područje za daljnja istraživanja. Definiranje pravih biljega kojima bi se određivala aktivnost, jasno određivanje pojačane aktivnosti i u konačnici pronalazak pravog inhibitora ovog puta mogli bi imati utjecaja na razjašnjavanje njegove biološke uloge i poboljšanje ishoda liječenja bolesnika s DLBCL-om.

1.2.4 Galektini

Galektini su porodica animalnih lektina karakteristična po mogućnosti prepoznavanja beta-galaktoze pomoću koje se vezuju na stanice i ekstracelularni matriks (73,74). Svi galektini sadrže domenu koja prepoznaje ugljikohidrate (CRD) građenu od oko 130 aminokiselina koja je odgovorna za njihovo vezivanje. Do danas je poznato 15 različitih galektina koji su prema broju i organizaciji CRD svrstani u 3 grupe: prototipna grupa, grupa s ponavljanjem tandema i kimerična grupa. Prototipna grupa ima jednu CRD, a u nju spadaju galektini 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 i 15. Galektini 4, 6, 8, 9 i 12 pripadaju u grupu s ponavljanjem tandema, a građeni su od jednog polipeptidnog lanca koji gradi dvije odvojene, ali homologne CRD. Galektin-3 je strukturalno različit i spada u treću, kimeričnu, grupu galektina. Galektini su nađeni u stanicama, u citoplazmi i jezgri, na površini stanice i u ekstracelularnom matriksu. Prisustvo galektina izvan stanica posljedica je sekrecije, najvjerojatnije neklasičnim putem. Ovi proteini imaju biološku funkciju unutar i izvan stanice. Intracelularno galektini putuju između citoplazme i jezgre i uključeni su u osnovne stanične funkcije kao što su transkripcija predglasničke RNK (pre-mRNA), regulacija staničnog rasta, apoptoza i regulacija staničnog ciklusa. Izvanstanični galektini mogu se vezati na stanice koje na svojoj površini izražavaju oligosaharide koji sadrže galaktozu, na glikoproteine izvanstaničnog matriksa, kao što su laminin, fibronektin, hensin i elastin, kao i na neke transmembranske proteine koji sadrže galaktozu. Kako se mogu vezati bivalentno ili multivalentno, povezuju neke od ovih proteina i potiču kaskadu transmembranskih signalnih puteva. Smatra se da na taj način galektini reguliraju proces mitoze, apoptoze i staničnog ciklusa.

Bivalentno vezivanje omogućuje međusobno povezivanje stanica te povezivanje stanica i vanstaničnog matriksa.

Galektini također djeluju i na angiogenezu tumora, najvjerojatnije potičući migraciju endotelnih stanica te modulirajući endocitozu pojedinih receptora važnih za progresiju tumora (npr. beta-1 integrina ili epidermalnog faktora rasta). Točan mehanizam djelovanja galektina još uvijek nije posve jasan. Budući su prisutni u brojnim stanicama i tkivima, pripisuju im se različite funkcije što je potaknulo brojna istraživanja u biologiji, medicini i farmakologiji. Postoje dokazi da su galektin-1 i galektin-3 odgovorni za transformaciju tumorskih stanica. Dokazano je da, inhibiranjem izražaja galektina-1 na stanicama glioma i galektina-3 na stanicama karcinoma dojke i štitnjače, tumorske stanice gube karakteristični transformirani fenotip. Nasuprot tome, dodatkom komplementarne DNK galektina-3 u normalne folikularne stanice dolazi do razvoja karcinoma (75).

Galektin-3 je protein veličine 29-35 kDa, prvi put otkriven 1980-tih kao površinski stanični antigen izražen na mišjim peritonealnim makrofagima (76). Kasnije je nađen na mišjim fibroblastima, leukemijskim stanicama štakora, a potom i na ljudskim stanicama pluća (77). Analiza aminokiselina i sekvencioniranje gena ovog proteina pokazala je sličnost među proteinima izoliranim iz različitih vrsta, a prema nomenklaturi koja je donešena 1994. godine svrstan je u porodicu galektina. Galektin-3 ima specifični kimerični tip strukture koja se sastoji od 3 različite strukturne domene: NH₂-terminalne domene od 12 aminokiselina koja sadrži mjesto za fosforilaciju serina i regulira njegovu celularnu ulogu; ponavljajuće domene slične kolagenu koja je bogata glicinom, tirozinom i prolinom i služi kao supstrat za metaloproteinazu te COOH terminalne domene od oko 130 aminokiselina. To je multifunkcionalni protein koji se prvenstveno nalazi u citoplazmi, a u jezgri prelazi neklasičnim putem sekrecije iz citoplazme. Nalazi se i u zdravim i tumorskim stanicama, a sudjeluje u brojnim biološkim funkcijama uključujući adheziju, proliferaciju, diferencijaciju, angiogenezu, progresiju i metastaziranje. U citoplazmi su nađeni različiti proteini koji imaju sposobnost vezanja galektina-3. Jedan od prvih za koje je to dokazano bio je BCL2 čija je uloga u apoptozi ranije objašnjena. Kasnije su nađene i druge molekule važne za apoptozu s kojima se galektin-3 vezuje (CD95, nukling, Alix/AIP1). Aktivnost galektina-3 u jezgri povezuje se s njegovom interakcijom s pre-mRNA čime može utjecati na transkripciju gena. Galektin-3 se može naći i u ekstracelularnom prostoru. Nema jasnog objašnjenja kako tamo dospjeva, najvjerojatnijom se čini teorija o aktivnoj sekreciji iz

stanica. Čini se da ovdje ima ulogu u međusobnoj adheziji i aktivaciji stanica, a djeluje i kemotaksijski. Na taj način utječe na održavanje homeostaze između stanica i imunološke reakcije, ali i na organogenezu, angiogenezu te tumorsku invaziju i metastaziranje. Provedena istraživanja ukazuju da na učinak galektina utječe nalazi li se u jezgri, citoplazmi, perinuklearnom ili ekstracelularnom prostoru. Uloga galektina-3 u rastu stanica najviše ovisi o tipu stanica, u nekima uzrokuje rast i proliferaciju, dok je u drugima obratno. Tako je, na primjer, pokazano da stanice ljudskog T limfoma u koje je unesen galektin-3 rastu brže i bolje od kontrole, za razliku od stanica raka prostate (78,79). Vezuje se na aktivirani K-Ras koji je najvažniji protein onkogenog Ras sustava u ljudi. Na taj način pojačava njegov utjecaj na fosfatidil-inozitol kinazu-3 i Raf-1 i na treći, za sada još uvijek nepoznati efektorski put, koji uključuje ekstracelularne kinaze (80).

Galektin-3 može imati proapoptotički, ali i antiapoptotički učinak (81). Na primjer, stanice DLBCL u čiju je citoplazmu unesen galektin-3 su otpornije na apoptozu uzrokovanu anti-Fas-om (82). Smatra se da je u djelovanje na apoptozu uključeno nekoliko regulatornih puteva. Na membrani stanica postoje receptori na koji se veže ekstracelularni galektin-3. Jedan od glavnih je transmembranska tirozin-fosfataza CD45. Jedna američka istraživačka grupa je 2012. g. pokazala da ekstracelularni galektin-3, vezujući se na CD45, dovodi do promjena u funkciji tog receptora i time uzrokuje rezistenciju na apoptozu (83). S druge strane, kao odgovor na različite faktore koji stimuliraju apoptozu, dolazi do premještanja galektina-3 iz citosola i jezgre na membranu mitohondrija koji se nalaze u perinuklearnom prostoru. Time se mitohondriji štite od oštećenja i na taj način se smanjuje oslobađanje citokroma-c i aktivacija kaspaza (84). Nasuprot tome, proapoptotička aktivnost ekstracelularnog galektina-3 pokazana je na stanicama humane T stanične leukemije. Glikoproteini CD7 i CD29 koji se nalaze na površini stanice su receptori na koje se veže galektin-3. Ovaj kompleks aktivira mitohondrijski put apoptoze koji uključuje citokrom-c i aktivaciju kaspaza (85).

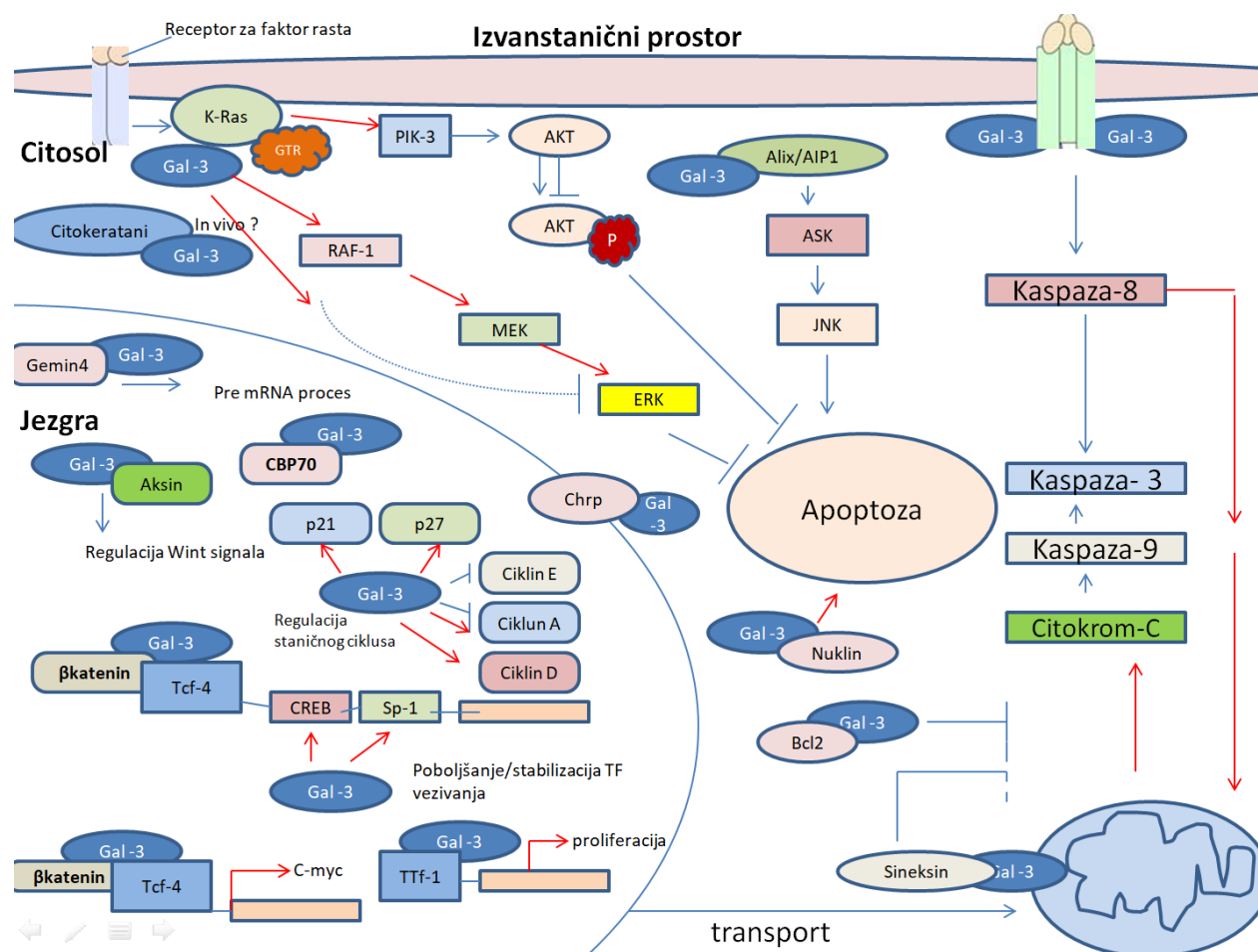
Galektin-3 potiče i angiogenezu. Pomoću CRD domene vezuje se na endotelne stanice, aktivira signalne puteve koji dovode do migracije endotelnih stanica i pokretanja kaskade angiogeneze. Markowska i suradnici pokazali su da je djelovanje galektina-3 povezano s VEGF i bazičnim čimbenikom rasta fibroblasta (86).

Galektin-3 nalazi se u memorijskim B stanicama i nekim limfomima, uključujući DLBCL i primarni efuzijski limfom, kao i u stanicama multiplog mijeloma, dok gotovo da i nije prisutan u

normalnim B stanicama germinalnog centra i plazma stanicama. Nema ga u MZL ni FL, ali je prisutan u agresivnim limfomima. Hoyer i sur napravili su imunohistokemijsku analizu ekspresije galektina-3 na 89 uzoraka različitih B-NHL. Pozitivni su bili 21 od 32 analizirana DLBCL-a (64%), a niti jedan FL, BL, MZL i limfom malih limfocita (SLL) (82). Preliminarni rezultati ukazuju da DLBCL pozitivni na galektin-3 imaju lošiju prognozu od negativnih (87).

Obzirom na moguću ulogu galektina-3 u regulaciji apoptoze i angiogeneze, ovaj bi protein mogao imati značajan utjecaj na razvoj i progresiju DLBCL-a, kao i na ishod liječenja. Zato su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razjasnilo njegovo kliničko značenje.

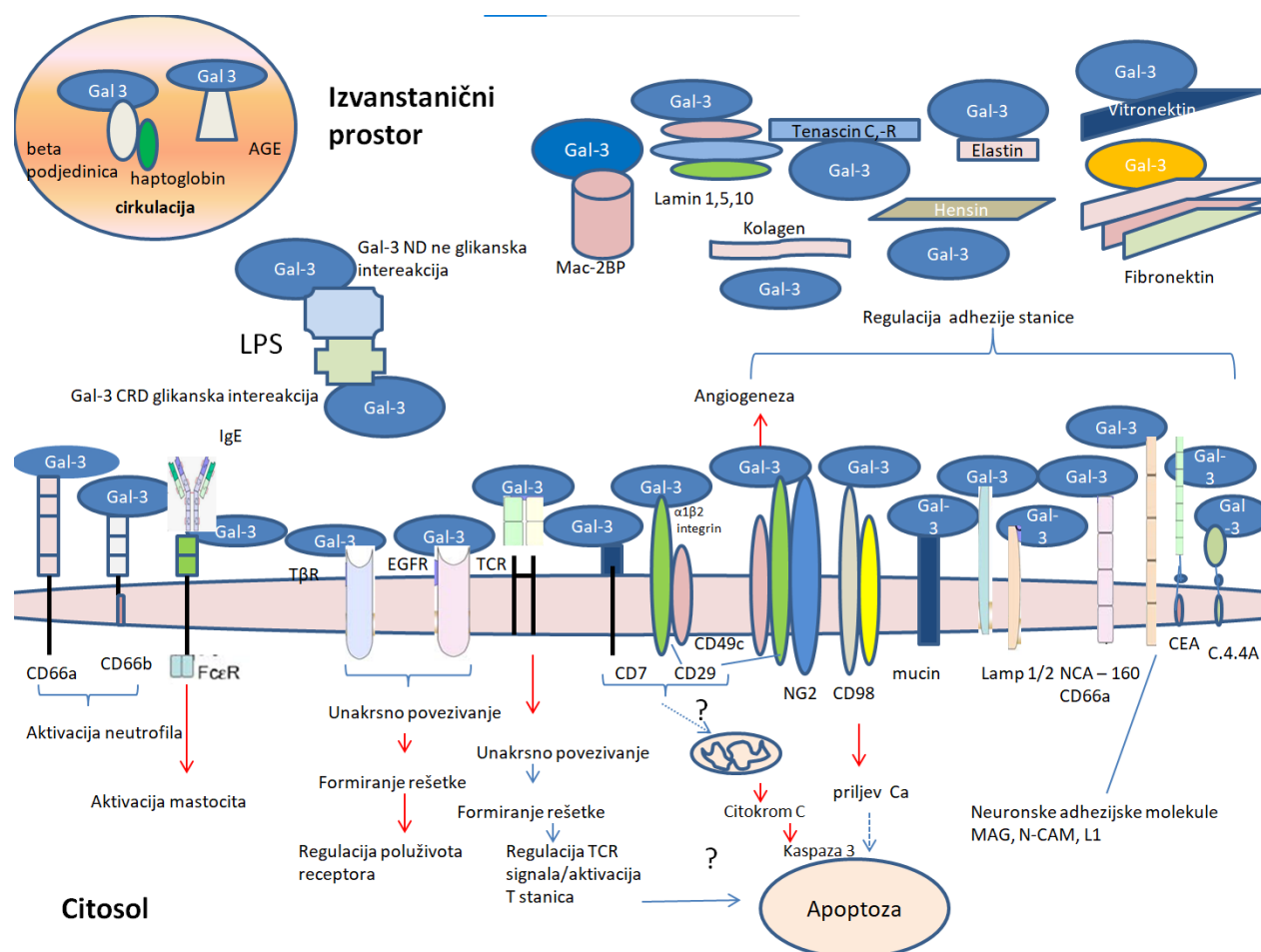
Pojednostavljeni prikaz intracelularne i ekstracelularne uloge galektina-3 prikazan je na slikama 2 i 3 (77).



Slika 2 Pojednostavljeni prikaz intracelularnog djelovanja galektina-3

Pilagođeno prema Dumić J. i sur. (ref. 77)

Crvene strelice pokazuju pozitivan učinak, plave crte pokazuju negativan učinak. Akt —serine/treonine kinaza Akt, Ask-1— kinaza koja regulira apoptotiče signale 1, CBP —protein koji veže ugljikohidrate 70, Chrp—cistein i histidin bogati protein, CREB—cAMP-odzivni element-vezajući protein, ERK—kinaza koja reagira na izvanstanični signal, Gal-3—galektin-3, GTP—guanozin trifosfat, JNK—c-Jun NH2-terminalna kinaza, MEK—mitogen-aktivirajući protein/ERK kinaze, P—fosfat, PI3K—fosfatidil inozitol kinaza 3, Raf-1—serine/treonin kinaza Raf-1, Tcf-4—T stanični faktor 4, TF—transkripcijski faktor, TTF-1—tiroid-specifični transkripcijski faktor.



Slika 3 Pojednostavljen prikaz ekstracelularnog djelovanja galektina-3

Prilagođeno prema Dumić J. i sur (ref. 77)

Crvena strelica predstavlja pozitivan učinak. AGE —završni produkt napredne glikacije, C4.4A —usidreni glikoprotein C4.4A, CEA —karcinoembriogeni antigen, CRD —domena koja prepoznaje ugljikohidrate, EGFR —receptor za epidermalni faktor rasta, FCεR—Fce receptor, Gal-3—galektin-3, IgE —imunoglobulin E, L1 —neuralna adhezijska molekula L1, Lamp1/2 —s lizozom povezani membranski protein 1/2, LPS —lipopolisaharid, Mac-2BP — Mac-2 vezni protein, MAG —s mijelinom povezani glikoprotein, N-CAM—adhezijaks molekula živčane stanice, NCA-160 —nespeifični unakrsno reagirajući antigen 160, ND —N-terminalna domena, NG2 —transmembranski hondroitin sulfat proteoglikan NG2, TβR —receptor za transformirajući faktor rasta beta, TCR — T stanični receptor.

1.2.5 Biljezi angiogeneze

Angiogeneza je rast novih krvnih žila potaknut proangiogenim faktorima koji potiču rast i međusobno povezivanje endotelnih stanica i stabilizaciju endotelne bazalne membrane. Provedena su brojna ispitivanja biološkog značenja i regulacije angiogeneze u tumorima, procesa bez kojeg tumor ne može rasti niti metastazirati, a u kojem sudjeluju normalne stanice (88-91). Stvaranje novih krvnih žila je kompleksan proces koji nastaje pod djelovanjem proangiogenih signala za koji je potrebno koordinirano sudjelovanje endotelnih i perivaskularnih stanica. Smatra se da su za progresiju i rast tumora potrebna barem dva mehanizma angiogeneze: lokalna neovaskularizacija iz mikrokoliša i mobiliziranje cirkulirajućih angiogenih stanica, tzv. endotelnih progenitorskih stanica (EPC) (92). Ovi procesi se odvijaju pod utjecajem vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF) i njegovih receptora.

Vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF, od engl. vascular endothelial growth factor) je prototip angiogenih proteina. Stvaraju ga različite tumorske stanice kao i stromalne stanice tumora. Ima ključnu ulogu u poticanju nastanka endotela krvnih žila, nakon čega slijedi angiogeneza, odnosno neovaskularizacija. U obitelji VEGF-a spadaju VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D i placentarni čimbenik rasta (PlGF) koji u interakciji sa svojim receptorima VEGFR1, VEGFR2 i VEGFR3 reguliraju različite aspekte angiogeneze i limfangiogeneze (93). VEGF-A vezuje se na VEGFR1 i VEGFR2. VEGFR2 prenosi mitogeni signal VEGF-A aktivirajući Raf-Mek-Erk i fosfatidilinozitol-3 kinazni put (94,95). VEGFR1 regulira VEGF signal na endotelnim stanicama. Nalazi se i na hematopetskim stanicama i ima ulogu u

kemotoksiji monocita, hematopoezi i mobiliziranju EPC (96). VEGF-C i VEGF-D u interakciji s VEGFR3 ključni su limfangiogenezu. VEGFR3 je neophodan i za razvoj krvnih žila tijekom rasta, ali i za tumorsku angiogenezu.

Razina VEGF je povišena u raznim tumorima kod ljudi, uključujući hematološke (multipli mijelom, limfomi, leukemije), rak dojke, mokraćnog mjehura, bubrega, gušterače i jajnika. Izražaj VEGF i VEGFR dokazan je na različitim tipovima agresivnih limfoma: perifernom T-staničnim limfomima (PTCL), DLBCL, MCL te primarnim efuzijskim limfomima. Za razliku od toga, indolentni FL rijetko izražavaju VEGF (97,98).

Studija, u kojoj je imunohistokemijskom metodom određivana ekspresija VEGF u stanicama DLBCL, pokazala je da njegova pojačana ekspresija korelira s razinom VEGFR1 i VEGFR2. Ista je grupa istraživača u drugoj studiji pokazala da pojačana ekspresija VEGF i VEGFR1 korelira s boljim doživljenjem bez događaja (EFS) i ukupnim doživljenjem (OS) u bolesnika liječenih terapijom koja sadrži antracikline (99,100). Za razliku od toga, nekoliko godina kasnije pokazano je da pojačana ekspresija VEGFR2 korelira s lošijim ishodom bolesnika s DLBCL-om, dok izražaj VEGF-a nije utjecao na prognozu (101).

Antiangiogeni agens bevacicumab u kombinaciji s kemoterapijom poboljšava preživljenje bolesnika s karcinomom kolona (102), ali ne i DLBCL (103).

1.3. Svrha rada

Difuzni B-velikostanični limfom maligna je limfoproliferativna bolest iz skupine non-Hodgkinovih limfoma, a predstavlja 30% svih novodijagnosticiranih NHL-a što ga čini najčešćim agresivnim limfom. Manifestira se u većini slučajeva povećanim limfnim čvorovima, mada tumor može infiltrirati i zahvatiti bilo koji organ i tkivo. (16) Najčešće se javlja u dobi od 66 godina, učestalost se povećava s dobi a nešto je češći u muškaraca nego u žena (17,18). Prema najnovijoj klasifikaciji WHO DLBCL se na osnovu različitog staničnog podrijetla dijeli u GCB grupu koja izražava gene prisutne na B stanicama germinativnog centra i na ABC grupu koja izražava gene prisutne na aktiviranim B stanicama periferne krvi. Po nekim dosadašnjim radovima čini se da GCB grupa ima bolju prognozu od ABC grupe (37,38). Bolest je izlječiva u određenom broju bolesnika, a liječenje imunokemoterapijom po shemi R-CHOP značajno je popravilo ishode iako još uvijek oko 40% bolesnika ne odgovori na terapiju ili uđe u relaps bolesti (22-24). Istraživanja pojedinih hematoloških grupa uspjela su pokazati da dodatak etopozida pogotovo kod visokorizičnih bolesnika rezultira boljim ishodom (25-27). Međutim i dalje rezultati koji se postižu standardnom terapijom nisu zadovoljavajući. U namjeri da se poboljša ishod provode se brojna ispitivanja fokusirana na biologiju ovog tipa limfoma. Među biološkim faktorima koji se ispituju dosta se značenja pridaje BCR receptoru i njegovom utjecaju na NF- κ B signalni put, kao i BCL2 proteinu i VEGF-u. BCR receptor i NF- κ B kao signalni put koji ima ulogu u apoptozi činili su se zanimljivim ciljem za terapiju malim ciljanim molekulama. Za sada se nažalost niti jedan od tih lijekova nije pokazao posebno učinkovitim (lenalidomid, ibrutinib, bortezomib). BCL2 protein ima značajnu ulogu u progresiji tumora, te je inhibicija ovog proteina venetoklaxsom za sada pokazala obećavajuće rezultate (28-31). VEGF je prototip angiogenih proteina, a njegov izražaj dokazan na različitim tipovima agresivnih limfoma među kojima je i DLBCL. Međutim dodatak antiangiogenih lijekova npr. bevacizumaba nije rezultirao boljim ishodima (97,98,103). Dosadašnjim istraživanjima očito još uvijek nije nađeno rješenje koje bi značajnije promijenilo ishode te se stoga i dalje značajna sredstva ulažu u istraživanje unutarstaničnih procesa kod DLBCL-a.

Zadnjih desetak godina spominje se jedna nova skupina proteina, galektini, koji pripadaju porodici animalnih laktina. Ovi proteini utječu na regulaciju rasta, staničnog ciklusa i apoptoze. Među njima se posebno ističe galektin-3, jedini iz ove porodice proteina koji ima kimeričnu strukturu. Galektin-

3 građen je od 3 strukturne domene, NH₂ terminalna domena koja sadrži mjesto za fosforizaciju serina, ponavljajuću domenu sličnu kolagenu, te COOH terminalnu domenu za prepoznavanje ugljikohidrata. Pojedina istraživanja ukazuju da galektin-3 utječe na progresiju tumora blokirajući apoptozu i potičući angiogenezu (81,82,83,84,85). Promotorska regija gena za galektin-3 sadrži dva vezna mjesta za NF- κ B, a isto tako galektin-3 ima BH1 domenu koju sadrži i BCL2 koja je važna za antiapoptotički učinak ali se čini da galektin 3 i BCL2 ovaj učinak postižu preko drugih unutarstaničnih struktura (146, 142). Aniojeni učinak najvjerojatnije se postiže interakcijom galektina-3 s N-glikanskim kompleksom na α v β 3 integrinu i aktivacijom integrin signalnog puta koji utječe na angiogenu aktivnost VEGF (91). U preko 50% DLBCL-a pojačana je izraženost galektina-3. Rezultati jednog rada pokazali su da bolesnici s DLBCL-om koji imaju pojačani izražaj galektina-3 imaju lošiju prognozu (87).

Stoga smo odlučili u našoj skupini bolesnika s DLBCLom koja je liječena uniformnom terapijom (R-CHOP ili R-CHOP-like) odrediti izražaj galektina-3, NF- κ B, BCL2 i VEGF-a. Svrha je ovog rada utvrditi dali izraženost galektina-3 kolerira s kliničkim značajkama bolesnika (dob, spol, LDH, stadij bolesti, opće stanje bolesnika) i bolesti (prvenstveno stanično podrijetlo tumora) i utječe li na njihov prognostički značaj. Svrha rada je i odrediti izražaj drugih potencijalno značajnih bioloških faktora kao što su: VEGF, NF- κ B i BCL2, te ustanoviti postoji li međusobna korelacija u izražaju ovih bioloških faktora i galektina-3.

2. HIPOTEZA

Pojačani izražaj galektina-3, VEGF-a, NF κ -B i BCL2 korelira s lošijim prognostičkim i kliničkim značajkama i slabijim odgovorom na terapiju u difuznom B-velikostaničnom limfomu.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći ciljevi

1. Utvrditi učestalost izražaja galektina-3 u DLBCL-u
2. Ustanoviti postoji li povezanost između izražaja galektina-3, pojedinih aktivacijskih, apoptotičkih i angiogenetskih biljega te ishoda liječenja.

3.2. Specifični ciljevi

1. utvrditi postoji li korelacija između:
 - izražaja galektina-3 i BCL2, VEGF i NF- κ B
 - izražaja galektina-3 i staničnog porijekla DLBCL-a određenog imunohistokemijski algoritmom po Hansovoj
 - izražaja NF- κ B i VEGF
 - izražaja galektina-3 i kliničkih značajki bolesti, odnosno ishoda liječenja
 - izražaja VEGF i kliničkih značajki bolesti, odnosno ishoda liječenja
2. procijeniti je li klinički svrsishodno određivati izražaj galektina-3 i VEGF-a u bolesnika DLBCL-om.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U ovo istraživanje uključeni su bolesnici s novodijagnosticiranim, histološki verificiranim, nodalnim ili ektranodalnim DLBCL, liječeni od 2003. do 2008. godine u KBC Zagreb ili KBC Rijeka, a koji ispunjavaju sljedeće uključne kriterije:

1. Klinički stadij proširenosti II-IV ili I nepovoljne prognoze kao i IE.
2. Inicijalno je planirano provesti liječenje s najmanje 4 ciklusa imunokemoterapije.
3. Liječeni su imunokemoterapijom po shemi R-CHOP ili slično.
4. Dostupni su svi potrebni klinički podaci.
5. Dostupni su dovoljno veliki histološki uzorci tumora.

U istraživanje nisu uključeni bolesnici:

1. S transformiranim indolentnim limfomom
2. HIV pozitivni
3. S inicijalno zahvaćenim centralnim nervnim sustavom

U studiju je uključeno ukupno 123 bolesnika.

4.2. Obrada ispitanika

Obrada bolesnika uključivala je uzimanje detaljnih anamnestičkih podataka (uključujući procjenu PS po ECOG-u i postojanje B simptoma) te fizikalni pregled bolesnika s posebnim osvrtom na palpaciju perifernih limfnih čvorova (vrat, supraklavikularna regija, aksile, prepone i eventualno ostale palpaciji dostupne regije zahvaćene limfomom), mjerenje njihove veličine i palpaciju jetre i slezene.

Laboratorijska obrada uključivala je:

- Kompletnu krvnu sliku (KKS)
- Opće biokemijske parametre uključujući razinu laktat dehidrogenaze (LDH), neophodnu za izračunavanje IPI

Proširenost bolesti određivana je kompjuteriziranom tomografijom (CT) baze vrata, prsnog koša, trbuha i male zdjelice uz primjenu intravenskog kontrasta. Radi procjene zahvaćenosti koštane

srži kod svih je bolesnika prije početka liječenja učinjena biopsija kosti (104). Na temelju rezultata ovih pretraga određen je stadij bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji i veličina tumorske mase (105).

4.3. Liječenje, procjena odgovora i praćenje

U bolesnika je, u skladu sa standardnom kliničkom praksom, ovisno o dobi, IPI i komorbiditetima planirano liječenje s 4-8 ciklusa imunokemoterapije (R-CHOP ili sl). Šest bolesnika je zbog slabije srčane funkcije liječeno imunokemoterapijom po R-CNOP ili R-CEOP protokolu (doksorubicin je zamjenjen mitoksantronom ili etopozidom). Šest bolesnika liječeno je R-CHOEP ili R-DA-EPOCH protokolima u kojima je standardnoj terapiji dodan etopozid.

Procjena odgovora na liječenje provođena je u skladu s preporukama. Interim evaluacija je rađena CT-om nakon trećeg ciklusa terapije. U slučaju postizanja najmanje parcijalne remisije, nastavlja se s planiranim liječenjem. Reevaluacija CT-om rađena je i nakon završetka planirane imunokemoterapije kada je, u bolesnika koji su imali zahvaćenu koštanu srž pri dijagnozi, ponavljana i biopsija kosti (104). Kod bolesnika koji su na početku bolesti imali veliku tumorsku masu i onih s ostatnim tumorom nakon imunokemoterapije, provedeno je zračenje, a potom ponovno evaluacija bolesti. Bolesnici koji nisu postigli kompletnu remisiju ili je došlo do progresije tijekom liječenja (refraktorna bolest) kao i oni kod kojih se DLBCL ponovno pojavio nakon što je postignuta remisija (relaps bolesti), dobili su drugu liniju terapije. To je u bolesnika ≤ 60 godina uključivalo intenzivnu kemoterapiju s transplantacijom autolognih matičnih krvotvornih stanica u slučaju povoljnog odgovora, a u starijih bolesnika primjenu standardne kemoterapije.

Po završetku prve linije liječenja, bolesnici su praćeni klinički, prve tri godine otprilike svaka 3-4 mjeseca, četvrte i pete godine otprilike svakih 6 mjeseci, a potom jednom godišnje. Radiološke pretrage su ponavljane samo u slučaju kliničke sumnje na relaps limfoma.

4.4. Patohistološke metode

Dijagnozu DLBCL-a postavili su na Kliničkom zavodu za patologiju KBC Zagreb ili KBC Rijeka iskusni hematopatolozi uobičajenim metodama koje su uključivale

imunohistokemijska bojenja. Svi su uzorci fiksirani u 10% puferiranom formalinu, dehidrirani u uzlaznom nizu koncentracija alkohola zaključno s ksilolom te prožeti parafinom. Potom su uklopljeni u parafin, rezani na rezove debljine 4 mikrometara i obojeni standardnim bojenjem hemalaun-eozinom (HE). Za potrebe rutinske kliničke obrade, su nakon pregleda uzoraka bojenih HE učinjena dodatna imunohistokemijska bojenja. Za potrebe uključivanja u ovo istraživanje, dva hematologa su još jednom pregledala preparate i provjerila patohistološku dijagnozu. Niti jedan bolesnik nije isključen iz studije zbog pogrešne inicijalne dijagnoze. Uzorci su potom na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KBC Zagreb dodatno obojani imunohistokemijskim metodama na galektin-3, NF- κ B i VEGF.

4.4.1. Imunohistokemijska bojenja

Svi uzorci su već prethodno bili obojani standardnim imunohistokemijskim metodama za određivanje izražaja biljega CD20, CD3, BCL6, CD10 i MUM1. Korištena su komercijalno dostupna monoklonska mišja protutijela na CD20 (klon L26, razrjeđenje 1:200, Dako, Glostrup, Danska), CD3 (klon PC3/188A, razrjeđenje 1:200, Dako, Glostrup, Danska), BCL-6 (klon PG-B6p, razrjeđenje 1:10, Dako, Glostrup, Danska), CD10 (klon 56C6, razrjeđenje 1:30, Dako, , Glostrup, Danska), MUM1 (klon MUM1p, razrjeđenje 1:25, Dako, Glostrup, Danska). Tkivne rezove smo deparafinirali i demaskirali antigen u PT-linku pri temperaturi +97°C kroz 20 minuta u puferu s visokim pH (pH 9.0). Za vizualizaciju izražaja biljega, nakon reakcije primarnog protutijela i antigena korišten je EnVision FLEX K8000 kit (Dako), kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi, a čitav je proces izveden u automatu DAKO Autostainer. Opisani kit sadrži peroksidazu hrena kao sekundarno protutijelo (HRP, engl. Horse radish peroxidase) i vodikov peroksid za blokiranje tkivne peroksidaze. Kao kontrastno bojanje na uzorcima bojanim imunohistokemijskom metodom koristili smo hemalaun.

Nakon imunohistokemijskog bojanja analizirani su svi uzorci, a izražaj protutijela procijenjen je na 1000 stanica na velikom povećanju mikroskopa (x400) u čitavom uzorku. Lokalizacija signala može biti u jezgri, membrani ili citoplazmi. Proteinska ekspresija BCL6 i MUM1 nalazi se u jezgri, dok je proteinska ekspresija CD20 i CD10 na membrani. Za imunohistokemijska bojenja na CD20, BCL6, CD10, MUM1 pozitivnim rezultatom smatra se nalaz specifičnog izražaja u više od 30% tumorskih stanica. Prema rezultatima

imunohistokemijskog bojanja bolesnici su svrstani u dvije skupine: GC i ABC (39). DLBCL podrijetla stanica germinativnog centra (GC) ima jedan od dva sljedeća fenotipa: CD10+, BCL6+ ili CD10-, BCL6+, MUM1-, dok DLBCL podrijetla negerminativnog centra ili sličan aktiviranim B stanicama (ABC) ima fenotip: CD10-, BCL6+ ili BCL6, MUM1+, odnosno CD10-, BCL6-, MUM1-.



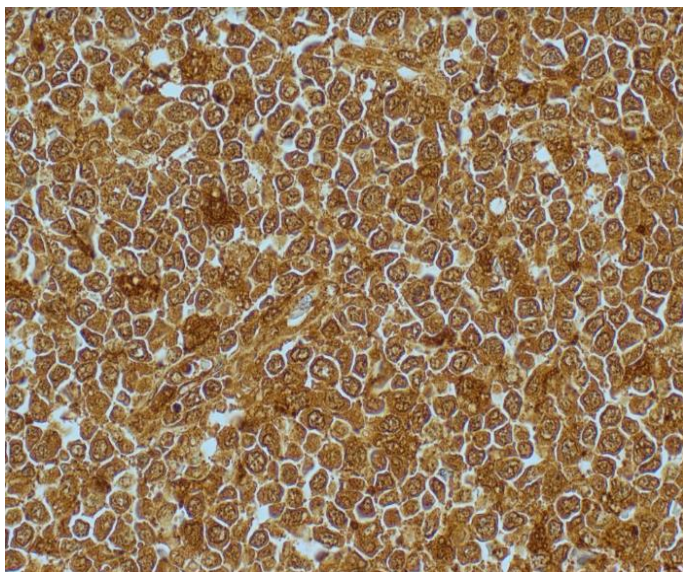
Slika 4 . Imunohistokemijsko određivanje podskupina DLBCL-a.

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

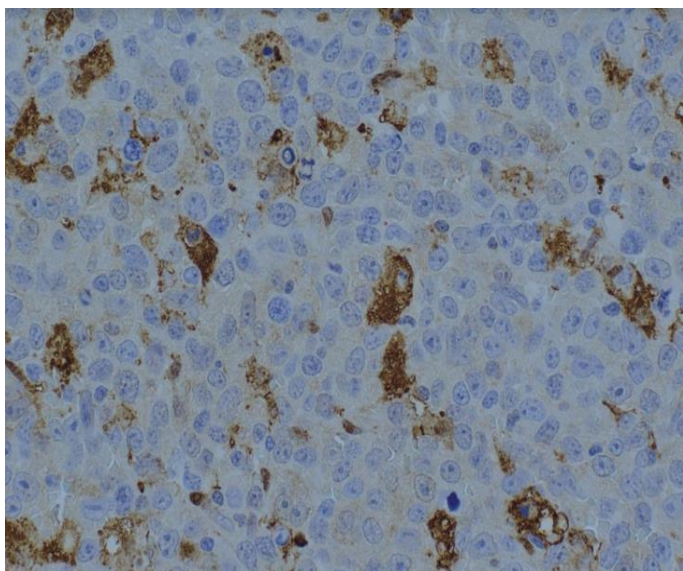
Za detekciju **BCL2** koristili smo primarno „spremno za uporabu“ monoklonsko mišje protutijelo (klon 124, LOT 33260, Dako, Glostrup, Danska). Tkivne rezove smo deparafinirali i demaskirali antigen u PT-linku pri temperaturi +97°C kroz 20 minuta u puferu s visokim pH (pH 9.0). Primarno protutijelo inkubirali smo 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za vizualizaciju izražaja biljega, nakon reakcije primarnog protutijela i antigena korišten je EnVision FLEX K8000 kit (Dako), kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi. Postupak vizualizacije je dovršen u instrumentu Dako Autostainer. Pozitivnim rezultatom imunohistokemijskog bojanja smatrana je obojanost citoplazme u više od 50% tumorskih stanica kako je preporučeno u literaturi (106).

Za detekciju **galektina-3** koristili smo primarno zečje monoklonsko protutijelo (klon EP2775Y, razrjeđenje 1:100, Abcam, Cambridge, Velika Britanija). Tkivne rezove smo deparafinirali i demaskirali antigen u PT-linku pri temperaturi +97°C kroz 20 minuta u puferu s visokim pH (pH 9.0). Inkubacija primarnog protutijela traje 1 sat na sobnoj temperaturi. Za vizualizaciju izražaj biljega, nakon reakcije primarnog protutijela i antigena korišten je EnVision FLEX K8000 kit (Dako), kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi. Postupak vizualizacije je dovršen u instrumentu Dako Autostainer. Pozitivnim rezultatom imunohistokemijskog bojanja

smatrana je obojanost jezgre i/ili citoplazme u više od 30% tumorskih stanica (107). Kao pozitivna kontrola unutar uzorka korišteni su makrofagi.

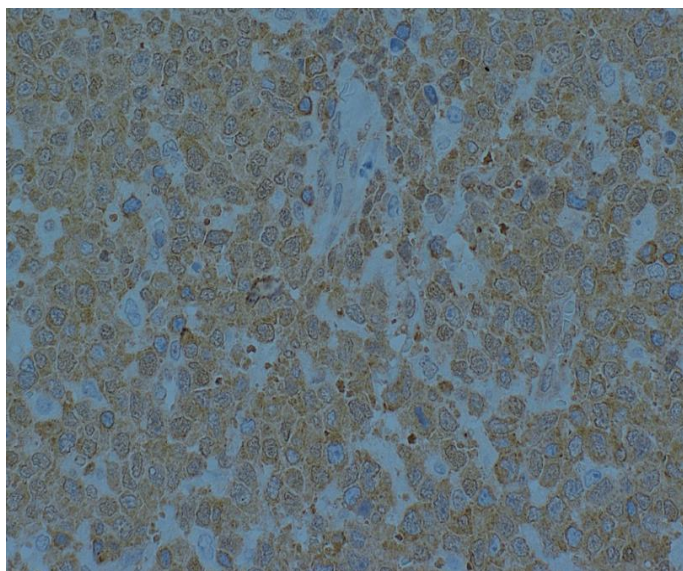


Slika 5. Stanice su izrazito pozitivne na galektin3 i u jezgri i u citoplazmi

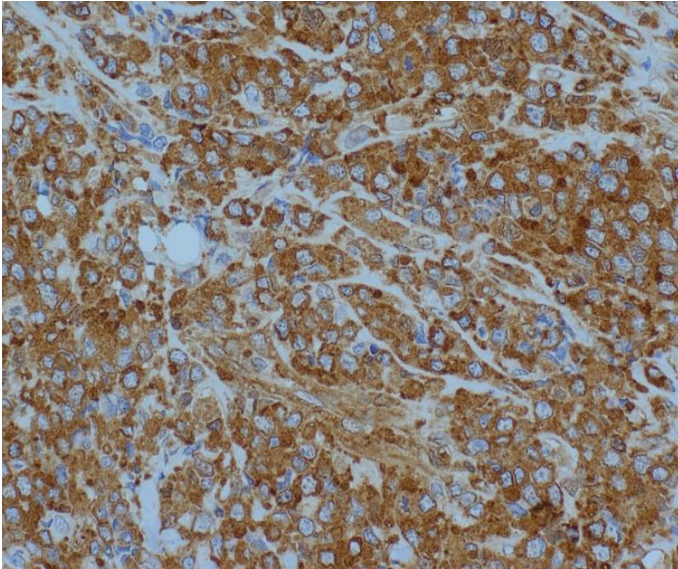


Slika 6. Tek pokoja stanica pokazuje pozitivnost na galektin 3

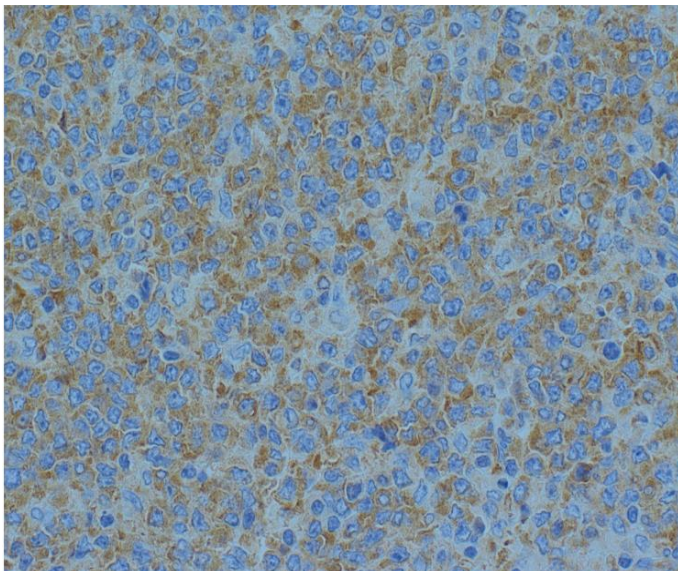
Za detekciju **NF- κ B** koristili smo primarna mišja monoklonska protutijela usmjerena protiv p65 (klon F-6, razrjeđenje 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornija, SAD). Za detekciju **VEGF** smo također koristili primarna mišja monoklonska protutijela (klon C-1, razrjeđenje 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornija, SAD). Nakon deparafinizacije rezova uzorci su stavljeni u inkubaciju preko noći na temperaturu +4°C. Za demaskiranje primarnih protutijela korištena je vrućina (mikrovalna pećnica) od +95°C kroz 10 minuta u tris-EDTA puferu s visokim pH (pH 9.0). Pozitivnim rezultatima kod NF- κ B anti-p65 smatrana je obojanost jezgre u više od 30% tumorskih stanica (108, 109). Pozitivnim rezultatom za VEGF smatrana je obojanost citoplazme u više od 30% stanica (110).



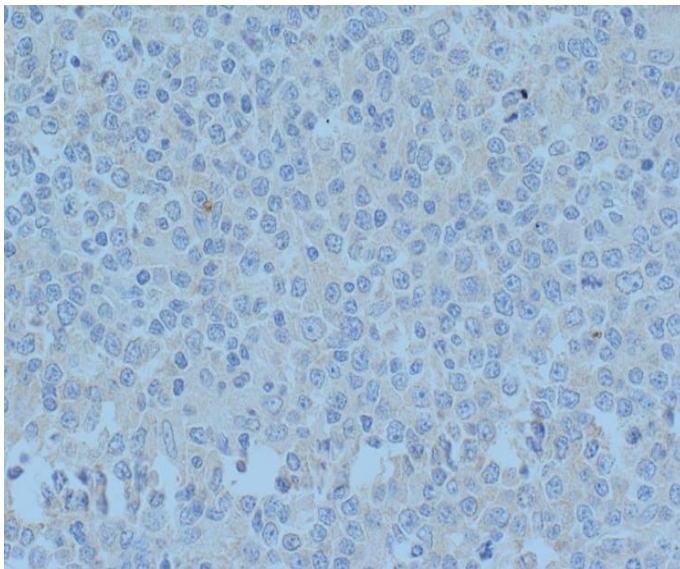
Slika 7. Jezgre stanica izrazito su pozitivne na NF- κ B



Slika 8. Gotovo da nema jezgara stanica koje pozitivne na NF- κ B



Slika 9. Većina stanica pokazuje obojenost citoplazme na VEGF



Slika 10. Tek pokoja stanica pokazuje obojanost citoplazme na VEGF

Za sva imunohistokemijska bojanja napravljena su pozitivna kao i negativna kontrolna bojenja. Uzorke su neovisno analizirala dva patologa i pristupnica. Neslaganja oko procjene pozitivnog rezultata imunohistokemijskog bojanja riješena su dogovorom.

4.5. Klinički ishodi

Od kliničkih ishoda smo kod bolesnika promatrali odgovor na liječenje, doživljenje bez znakova bolesti (engl. „event-free survival“, EFS) i doživljenje (engl. „overall survival“, OS). Procjena odgovora provedena je prema kriterijima međunarodne radne grupe (111). EFS smo računali od prvog dana primjene prvog ciklusa terapije do neuspjeha liječenja (nezadovoljavajuć odgovor na liječenje, progresija bolesti, započinjanje nekog drugog neplaniranog anti-limfomskog liječenja, relaps bolesti, smrt od bilo kojeg uzroka) ili do zadnje kontrole. OS smo računali od prvog dana primjene prvog ciklusa terapije do smrti od bilo kojeg uzroka ili do zadnje kontrole.

4.6. Statističke metode

Dobivene razlike u frekvencijama između ispitivanih skupina testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Za procjenu EFS i OS korišten je Kaplan-Meierov postupak, a za njihovu usporedbu log-rank analiza (112). Za usporedbu obilježja bolesnika koristili smo χ^2 test i neparametrijske statističke postupke (Mann-Whitneyev U test). Multivarijatna analiza učinjena je Coxovim regresijskim testom. Za procjenu prediktivne vrijednosti pojedinih parametara korištena je Coxova regresijska analiza. Razina statističke značajnosti zaključivanja bila je $p < 0,05$. Statistička analiza učinjena je slobodno dostupnim statističkim programima (113 i 114).

5. REZULTATI

5.1. Značajke bolesnika i ishodi liječenja

U ispitivanje je uključeno ukupno 123 bolesnika, 63 muškarca i 60 žena, s medijanom dobi od 65 g i rasponom od 22-84 g. Značajke bolesnika i bolesti detaljnije su prikazane u tablici 4.

Nakon završenog liječenja, na terapiju je odgovorilo 108 bolesnika (87,8%), od toga su 93 (75,6%) postigla kompletnu remisiju (KR), a 15 (12,1%) parcijalnu remisiju bolesti (PR). Četrnaest bolesnika (11,3%) koji su odgovorili na terapiju je tijekom praćenja ušlo u relaps (tablica 5).

Tablica 4. Značajke bolesnika i bolesti

Značajke bolesnika	Broj bolesnika (%)
Demografske osobine	
<i>Dob</i> (medijan / raspon) g.	64,5 (22-84)
≥65 g.	61 (49,5)
<i>Spol</i>	
Muškarci	63 (51,2)
Žene	60 (48,8)
Značajke bolesti	
<i>Stadij bolesti</i>	
Stadij I	17 (13,8)
Stadij II	54 (43,9)
Stadij III	20 (16,2)
Stadij IV	32 (26)
<i>Opće stanje bolesnika</i>	
ECOG 0-1	85 (69,1)
ECOG ≥2	38 (30,8)
<i>Povišen LDH*</i>	76 (61,7)
<i>Međunarodni prognostički indeks**</i>	
IPI 0-1	42 (34,1)
IPI 2	38 (30,8)
IPI 3	29 (23,5)
IPI 4-5	13 (13,8)

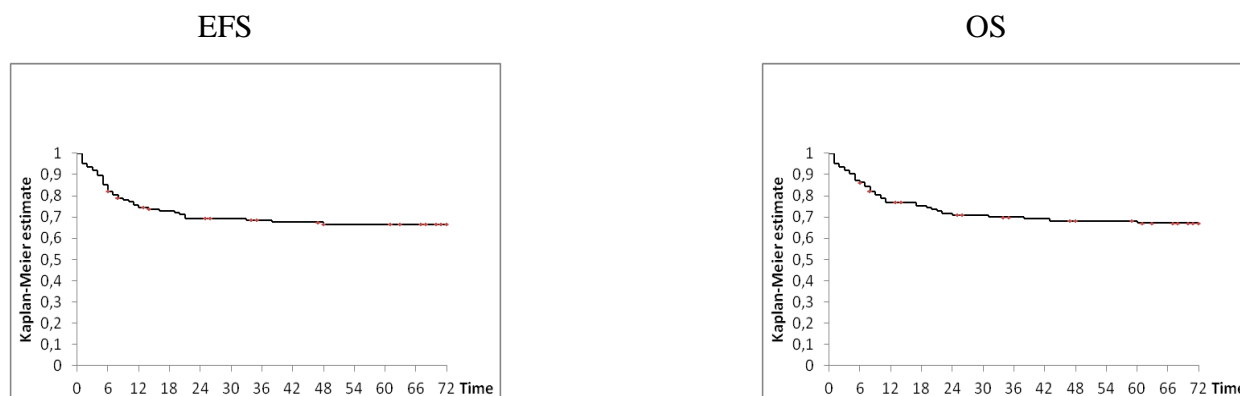
*za 7 bolesnika nema podatak o LDH

** za 1 bolesnika nema podatak o IPI

Tablica 5. Odgovor na terapiju

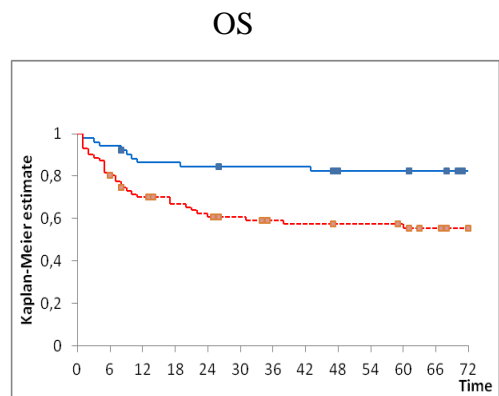
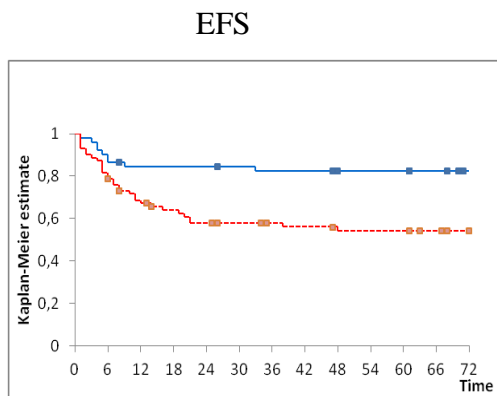
Odgovor na liječenje	Broj bolesnika (%)
Kompletna remisija (KR)	93 (75,6)
Parcijalna remisija (PR)	15 (12,1)
Stabilna bolest (SB)	3 (2,4)
Progresivna bolest (PB)	12 (9,7)
Relaps nakon postignutog odgovora	14 (11,3)

Medijan praćenja živućih bolesnika bio je 68 mjeseci. Ukupno dvogodišnje doživljenje bez događaja (EFS) bilo je 69,4% a petogodišnje 66,6%. Ukupno dvogodišnje doživljenje (OS) iznosilo je 70,9%, a petogodišnje 67,2% (Slika 11).



Slika 11. EFS i OS svih bolesnika

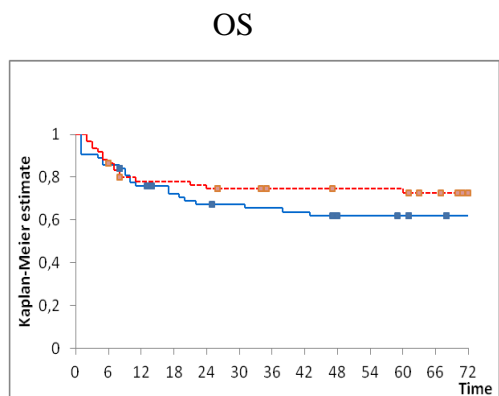
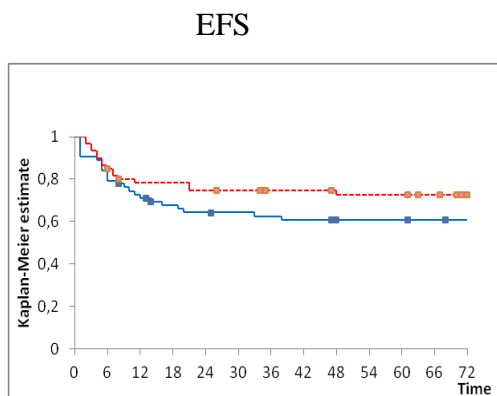
Dvogodišnji EFS bio je statistički značajno bolji za bolesnike mlađe od 65 godina, 84,5%, u usporedbi s 57,8% za one starije od 65 godina. Petogodišnji EFS iznosio je 82,6% kod mlađih u usporedbi s 54,3% kod starijih bolesnika ($p < 0,001$). OS je bio također statistički značajno bolji kod mlađih nego kod starijih bolesnika, 84,5% naprema 60,7% nakon dvije godine i 82,4% naprema 55,5% nakon pet godina ($p < 0,001$) (Slika 12).



<65 godina; >65 godina

Slika 12. EFS i OS ovisno o dobi

Analizom doživljenja prema spolu nismo našli razlike između žena i muškaraca. Dvogodišnji i petogodišnji OS kod žena iznosio je 74,7% i 72,7%, a kod muškaraca 67,3% i 62,2% ($p=0,269$). Nije bilo statistički značajne razlike ni u EFS, dvogodišnji EFS kod žena bio je 74,7% u usporedbi s 64,3% kod muškaraca, a petogodišnji 72,7% naprema 61,1% ($p=0,271$) (Slika 13).



muškarci, žene

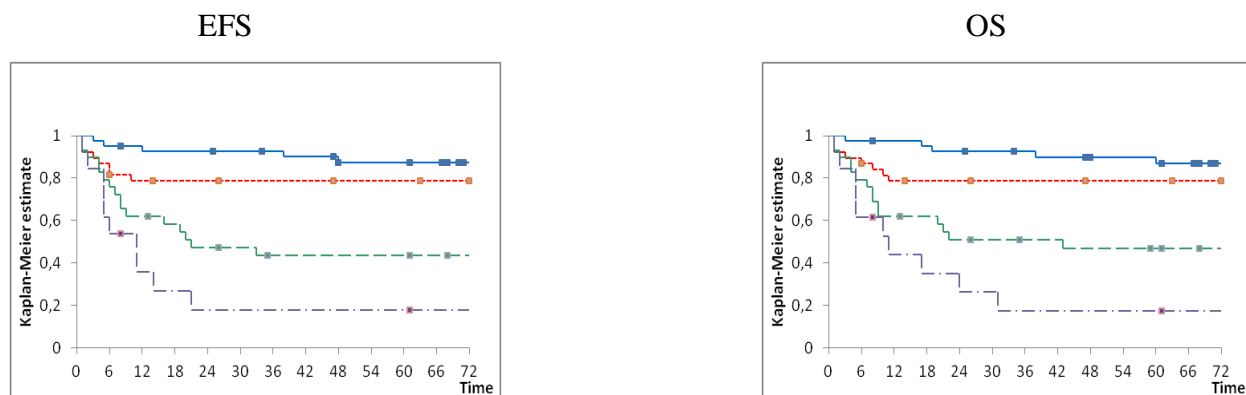
Slika 13. EFS i OS prema spolu

Prema Međunarodnom prognostičkom indeksu (IPI), svrstali smo bolesnike u 4 prognostičke grupe: niskog rizika – IPI-0-1, srednje niskog rizika – IPI-2, srednje visokog rizika

– IPI-3 i visokog rizika – IPI-4-5. Ova podjela je imala statistički izrazito značajan utjecaj na EFS kao i OS ($p < 0,001$ za oba promatrana ishoda) (slika 14 i tablica 6).

Tablica 6. EFS i OS prema IPI

	EFS na 2 g.	EFS na 5 g.	OS na 2 g.	OS na 5 g.
IPI 0-1	92,7%	87,4%	92,6%	87%
IPI 2	78,9%	78,9%	78,7%	78%
IPI 3	47,5%	43,5%	51,1%	46,8%
IPI 4-5	17,9%	17,9%	26,3%	17,5%



IPI 0-1; IPI 2; IPI 3; IPI 4-5

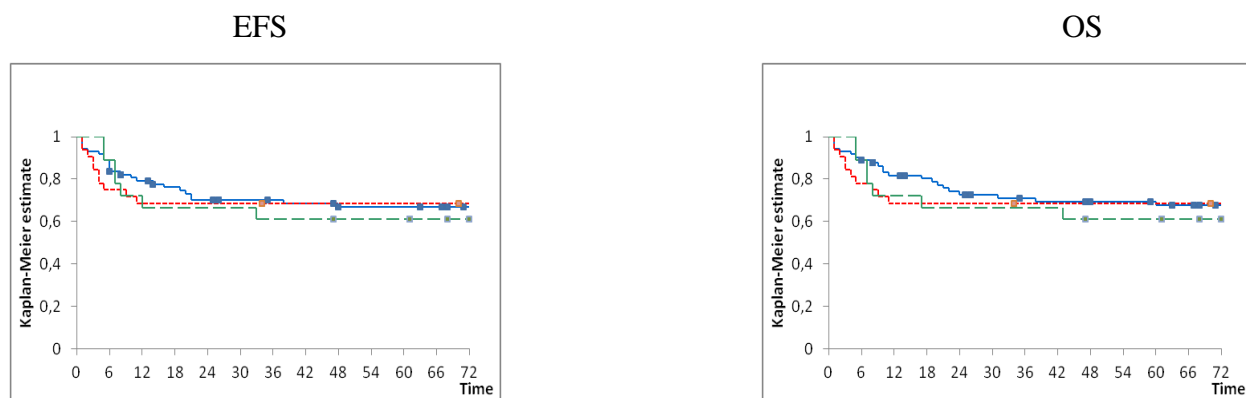
Slika 14. EFS i OS ovisno o IPI

U našoj populaciji razlika u EFS i OS između bolesnika niskog rizika i onih srednje niskog rizika nije bila statistički značajna ($p=0,06$), iako postoji trend boljeg ishoda za grupu niskog rizika. Još je manja bila razlika u ishodima bolesnika srednje visokog i visokog rizika, $p=0,13$.

Obzirom na ne tako veliki broj bolesnika naše smo bolesnike za daljnje analize vezane uz IPI svrstali u dvije grupe, one s povoljnim (nižim) IPI (0-2) i one s nepovoljnim (višim) IPI (3-5).

5.2. Povezanost ishoda liječenja i staničnog podrijetla DLBCL-a određenog imunohistokemijski algoritmom po Hansovoj

Od ukupno 123 bolesnika 32 (26%) su imala limfom GC porijekla, 73 (59,3%) ABC podrijetla, dok kod 18 (14,6%) nije bilo moguće odrediti podtip. Nije nađeno statistički značajne razlike u doživljenju bolesnika ovisno o staničnom podrijetlu tumora. Dvogodišnji EFS bio je kod GC grupe 70,1%, kod ABC grupe 68,7%, a kod onih kod kojih nije bilo moguće odrediti COO 66,6%. Petogodišnji EFS iznosio je u te 3 skupine 66,7%, 68,7% i 61,1% ($p=0,83$). Dvogodišnji OS bio je kod GC grupe 68,7%, kod ABC grupe 72,7%, a u grupi kod kojih je COO bio neodrediv 66,6%. Petogodišnji OS bio je u te tri skupina 68,7%, 67,6% i 61,1% ($p=0,75$) (Slika 15).



GC, ABC, neodredivo

Slika 15. EFS i OS ovisno o staničnom podrijetlu

Analizirali smo i povezanost staničnog podrijetla s dobi bolesnika te smo našli da je ABC fenotip značajno češći kod starijih bolesnika. U bolesnika s ABC fenotipom 30 (41,1%) bilo je mlađe, a 43 (58,9%) starije od 65 godina, dok ih je u bolesnika s GC fenotipom bilo 22 (68,7%), odnosno 10 (31,3%) ($p=0,01$).

5.3. Povezanost izražaja BCL2 s drugim parametrima i ishodima liječenja

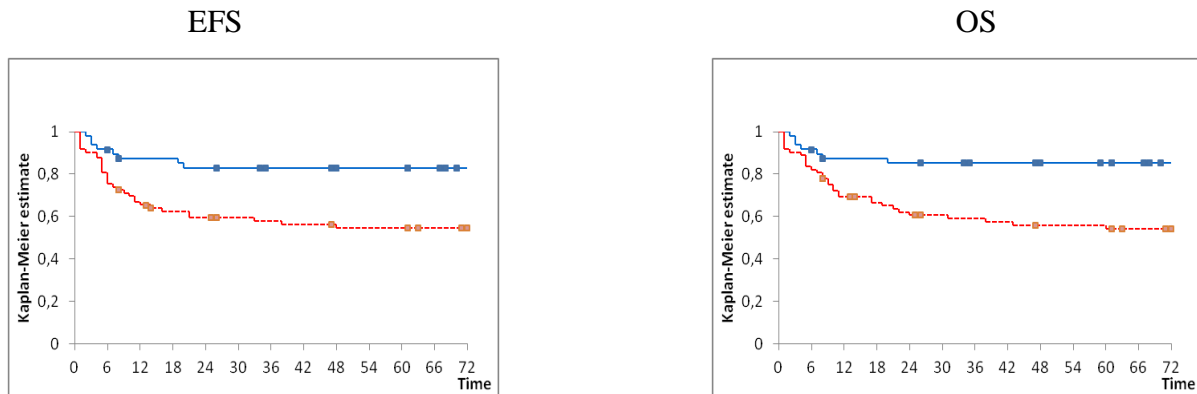
Imunohistokemijsko bojenje na BCL2 učinjeno je kod svih bolesnika, no kod dva iz tehničkih razloga nije bilo moguće sa sigurnošću očitati nalaz. 48 (39%) ih je bilo BCL2 negativno, a 73 (59,3%) pozitivno. Ove dvije grupe se nisu statistički značajno razlikovale po dobi, spolu, LDH, IPI, ECOG PS ni stadiju bolesti niti u izražaju drugih imunohistokemijskih biljega koje smo određivali. Odgovor na terapiju bio je lošiji kod BCL2 pozitivnih bolesnika, manje ih je postiglo KR ($p=0,05$) (tablica 7).

Tablica 7. Značajke bolesnika i bolesti u odnosu na izražaj BCL2

Značajke	BCL2 +, n=73 (59,3%)	BCL2 -, n=48 (39%)	p
<i>Dob</i>			
<65	37 (51%)	24 (50%)	1
≥65	36 (49%)	24 (50%)	
<i>Spol</i>			
Muškarci	41 (56%)	20 (42%)	0,13
Žene	32 (44%)	28 (58%)	
<i>PS</i>			
ECOG 0-1	49 (67%)	34 (71%)	0,69
ECOG ≥ 2	24 (33%)	14 (29%)	
<i>Stadij bolesti</i>			
St. I-II	38 (52%)	32 (67%)	0,11
St. III-IV	35 (48%)	16 (33%)	
<i>IPI</i>			
IPI 0-2	46 (63%)	32 (67%)	0,84
IPI ≥ 3	26 (27%)	16 (33%)	
<i>LDH</i>			
uredan	23 (32%)	16 (33%)	0,68
povišen	48 (66%)	27 (56%)	
<i>COO</i>			
GCB	18 (25%)	13 (27%)	1
ABC	43 (59%)	29 (60%)	
neodredivo	12 (16%)	6 (13%)	
<i>Galektin-3</i>			
Galektin-3+	38 (52%)	30 (63%)	0,26
Galektin-3-	34 (47%)	17 (35%)	
<i>VEGF</i>			
VEGF+	53 (73%)	34 (71%)	0,83
VEGF-	20 (27%)	14 (29%)	
<i>NF-κB</i>			
NF-κB+	37 (51%)	21 (44%)	0,46
NF-κB-	36 (49%)	27 (56%)	
Odgovor na terapiju			
KR	50 (68%)	41 (85%)	0,05
>KR	23 (32%)	7 (15%)	

Analiza doživljenja pokazala je statistički značajnu razliku u EFS između BCL2- i BCL2+ bolesnika ($p < 0,001$) (83% u BCL2- naprema 60% u BCL2+ na 2 godine i 83% naprema 55% na 5 godina). Poboljšanje EFS odrazilo se i na OS bolesnika ($p = 0,001$). Dvogodišnji OS je

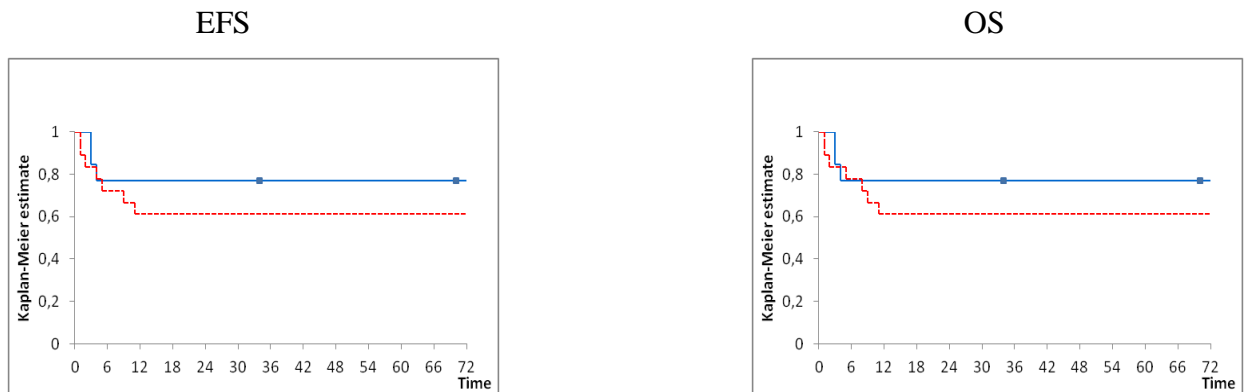
kod BCL2- iznosio 85% u odnosu na 61% kod BCL2+, a petogodišnji 85% u odnosu na 54% (Slika 16).



BCL2 +, BCL2 -

Slika 16. EFS i OS ovisno o izražaju BCL2

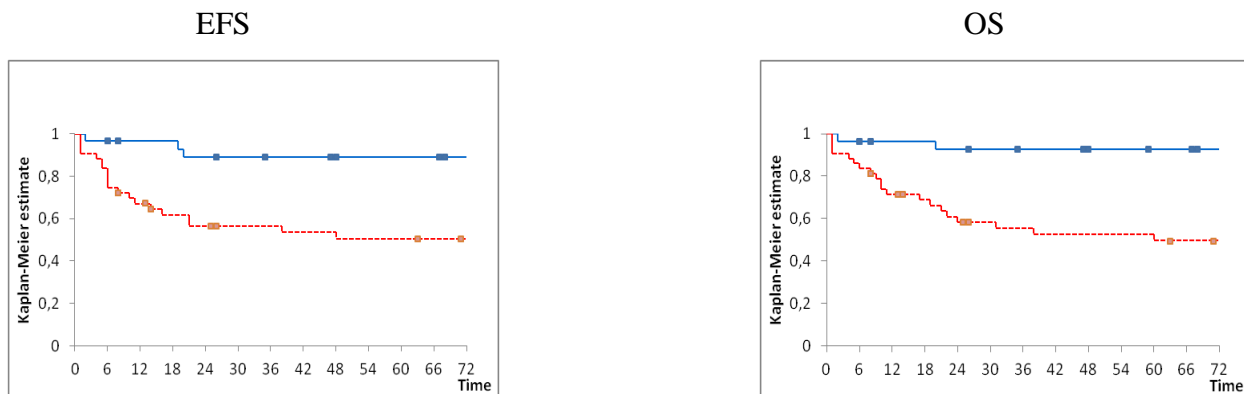
Analizirali smo ishode ovisno izražaju BCL2 i staničnom porijeklu tumora. Razlika u ishodima BCL2+ i BCL2- bolesnika s GCB fenotipom nije bila statistički značajna ($p=0,29$ za EFS i $p=0,23$ za OS) (Slika 17).



BCL2 +, BCL2 -

Slika 17. EFS i OS ovisno o BCL2 bolesnika s GCB podtipom DLBCL

Za razliku od toga, BCL2- bolesnici s ABC podtipom DLBCL su imali statistički značajno bolji EFS i OS od BCL2+ ($p=0,001$) (Slika 18).



BCL2 +, BCL2 -

Slika 18. EFS i OS ovisno o BCL2 i ABC fenotipu

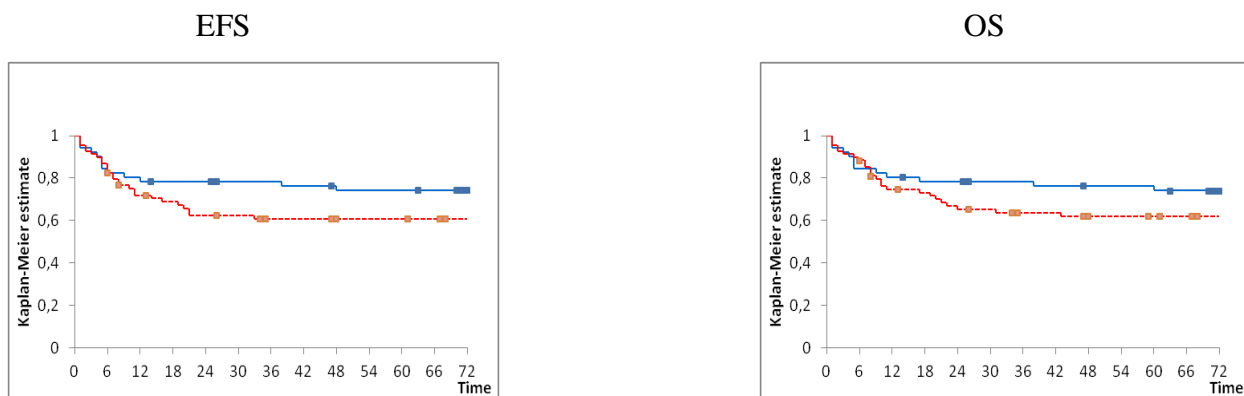
5.4. Povezanost izražaja galektina-3 s drugim parametrima i ishodima liječenja

Kod svih 123 bolesnika učinjeno je imunohistokemijsko bojenje na galektin-3, no kod tri ih nije bilo moguće adekvatno interpretirati. Od ukupno broja DLBCL, 51 (41,4%) je bio galektin-3 negativan, a 69 (56,1%) pozitivan. Nije bilo statistički značajne razlike u izražaju galektina-3 u odnosu na dob, spol, LDH, ECOG PS i stadij bolesti. Za razliku od toga, izražaj galektina-3 povezan je s IPI i značajno je veći u bolesnika s višim IPI ($p=0,0002$). Usporedbom izražaja drugih imunohistokemijskih parametara i galektina-3, nađeno je da je izražaj galektina-3 češći u tumora ABC fenotipa ($p=0,029$), kao i u onih koji pojačano izražavaju NF- κ B ($p=0,016$). Iako su galektin-3+ bolesnici imali statistički značajno viši IPI, što bi inače kolerira s odgovorom na terapiju, nismo našli razlike u postizanju odgovora ovisno o izražaju galektina-3 (Tablica 8).

Tablica 8. Značajke bolesnika i bolesti u odnosu na izražaj galektina-3

Značajke	Galektin-3 +, n= 69 (56,1%)	Galektin-3 -, n= 51 (41.4%)	p
<i>Dob</i>			
<65 g.	30 (43%)	30 (59%)	0,32
≥ 65 g.	39 (57%)	21 (41%)	
<i>Spol</i>			
Muškarci	38 (55%)	23 (45%)	0,35
Žene	31 (45%)	28 (55%)	
<i>PS</i>			
ECOG 0-1	43 (62%)	40 (78%)	0,07
ECOG ≥ 2	26 (38%)	11 (22%)	
<i>Stadij bolesti</i>			
St. I-II	40 (58%)	29 (57%)	1
St. III-IV	29 (42%)	22 (43%)	
<i>IPI</i>			
IPI 0-2	35 (51%)	43 (84%)	0,0002
IPI ≥ 3	33 (48%)	8 (16%)	
<i>LDH</i>			
uredan	23 (33%)	16 (33%)	1
povišen	45 (66%)	27 (56%)	
<i>COO</i>			
GCB	12 (25%)	19 (37%)	0,029
ABC	45 (59%)	26 (51%)	
neodredivo	12 (25%)	6 (12%)	
<i>VEGF</i>			
VEGF+	53 (77%)	34 (67%)	0,30
VEGF-	16 (23%)	17 (33%)	
<i>NF-κB</i>			
NF-κB +	40 (58%)	18 (35%)	0,016
NF-κB-	29 (42%)	33 (65%)	
<i>Odgovor na terapiju</i>			
KR	49 (71%)	42 (82%)	0,20
<KR	20 (29%)	9 (18%)	

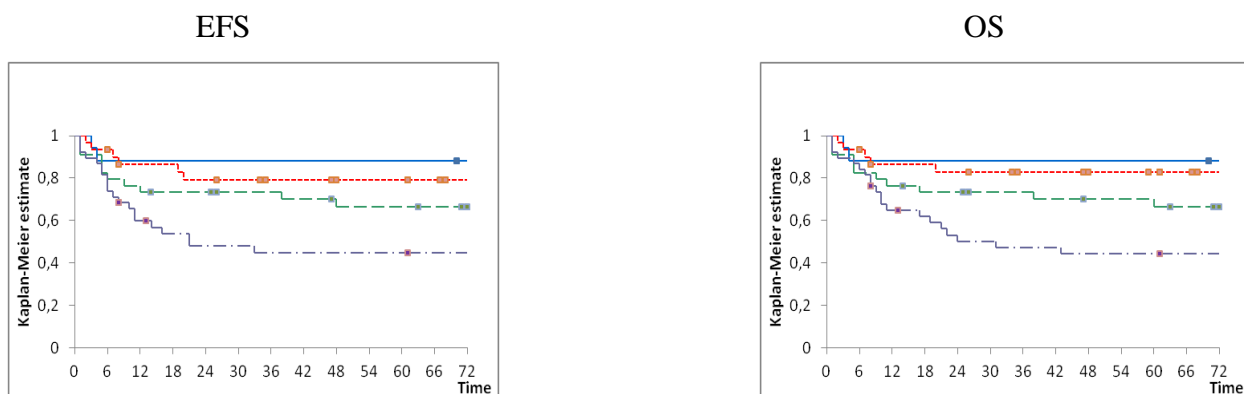
Između galektin-3 + i galektin-3 - bolesnika nije bilo statistički značajne razlike u EFS. Dvogodišnji EFS je kod galektin-3 - bolesnika bio 78%, a kod galektin-3 + bolesnika 62%, a petogodišnji 74% u odnosu na 61% (p=0,16). Također nije nađeno razlike niti u ukupnom doživljenju bolesnika, dvogodišnji OS galektin-3 - naprema galektin-3 + bio je 78% naprema 65%, a petogodišnji 74% naprema 62% (p=0,19) (Slika 19).



galektin-3 +, galektin-3 -

Slika 19. EFS i OS ovisno o izražaju galektina3

Analizirali smo i ishod liječenja bolesnika ovisno o istovremenom izražaju BCL2 i galektina-3 te se pokazalo da oni koji su BCL2 + i galektin-3 + imaju značajno lošiji ishod od BCL2 + i galektin-3 - s dvogodišnjim EFS 44% naprema 73% ($p=0,002$) i dvogodišnjim OS 50% naprema 74% ($p=0,006$). BCL2 - bolesnici imaju isti ishod neovisno o tome dali su galektin-3 pozitivni ili negativni.

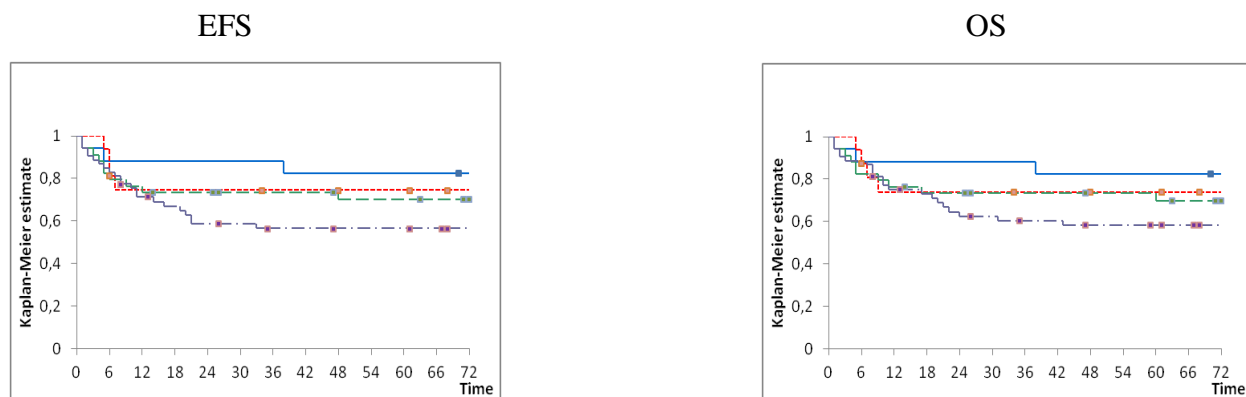


BCL2 – galektin-3 -, BCL2 – galektin-3 +; BCL2 + galektin-3 -, BCL2+ galektin-3 +

Slika 20. EFS i OS ovisno o izražaju BCL2 i galektina-3

Usporedbom preživljenja bolesnika koji su galektin-3 + i VEGF + s drugim grupama bolesnika (galektin-3 + VEGF -, galektin-3 - VEGF + i galektin-3 - VEGF -) dvostruko pozitivni bolesnici imali su najlošije ishode s dvogodišnjim EFS 53,5% u odnosu na dvostruko negativne

bolesnike koji su imali dvogodišnji EFS 92% ($p=0,07$), a dvogodišnji OS 92,4% naprema 54,7% ($p=0,09$), iako ova razlika nije dosegla statističku značajnost (slika 21).



Galektin-3 – VEGF -, galektin-3 – VEGF +, galektin-3 + VEGF -, galektin-3 + VEGF +

Slika 21. EFS i OS ovisno o izražaju galektina-3 i VEGF

5.5. Povezanost izražaja NF- κ B s drugim parametrima i ishodima liječenja

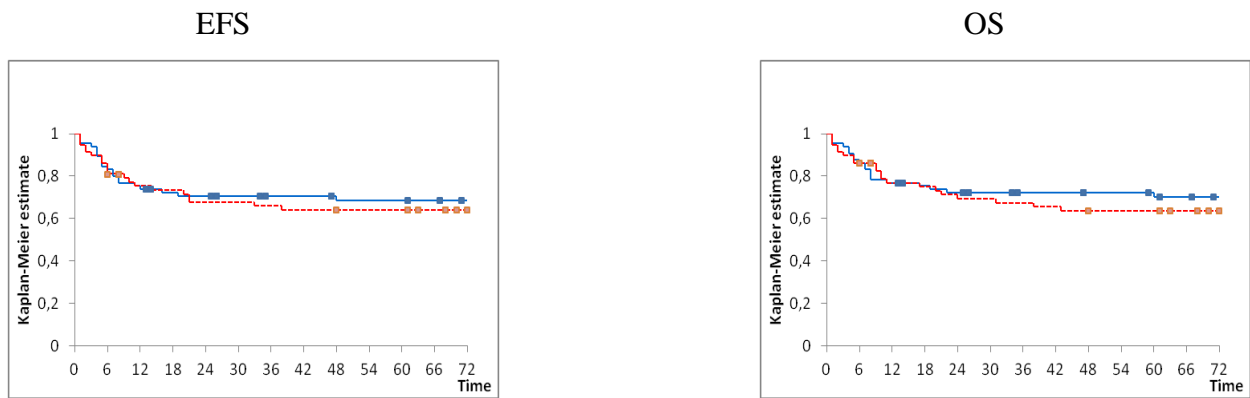
Kod svih smo bolesnika učinili imunohistokemijsko bojenje na NF- κ B. 65 bolesnika (52,8%) bilo je NF- κ B negativno, a 58 (47,2%) ih je bilo NF- κ B pozitivno. Analizirali smo postoji li povezanost izražaja ovog imunohistokemijskog parametara i značajki bolesnika i bolesti. Nismo našli povezanosti s dobi, spolom, IPI, LDH i ECOG PS. Pokazalo se da je izražaj NF- κ B povezan sa stadijem bolesti. Značajno više bolesnika koji su bili NF- κ B pozitivni imali su uznapredovali stadij bolesti ($p=0,027$). Nije dokazana povezanost s izražajem drugih analiziranih imunohistokemijskih parametara osim već gore navedene povezanosti s izražajem galektina-3. Odgovor na terapiju nije se razlikovao između NF- κ B + i NF- κ B - bolesnika (Tablica 9).

Tablica 9. Značajke bolesnika i značajke bolesti u odnosu na izražaj NF-κB

Značajke	NF-κB +, n= 58 (47,2%)	NF-κB -, n= 65 (52,8%)	p
<i>Dob</i>			
<65 g.	29 (50%)	33 (51%)	1
≥ 65 g.	29 (50%)	32 (49%)	
<i>Spol</i>			
Muškarci	31 (53%)	32 (49%)	0,71
Žene	27 (47%)	33 (51%)	
<i>PS</i>			
ECOG 0-1	38 (67%)	47 (72%)	0,44
ECOG ≥ 2	20 (33%)	18 (28%)	
<i>Stadij bolesti</i>			
St. I-II	27 (47%)	44 (68%)	0,027
St. III-IV	31 (53%)	21 (32%)	
<i>IPI</i>			
IPI 0-2	37 (64%)	43 (66%)	0,7
IPI ≥ 3	21 (26%)	21 (32%)	
<i>LDH</i>			
uredan	19 (33%)	21 (32%)	0,84
povišen	38 (66%)	38 (58%)	
<i>COO</i>			
GCB	12 (21%)	20 (31%)	0,2
ABC	38 (66%)	35 (54%)	
neodredivo	8 (14%)	10 (15%)	
<i>VEGF</i>			
VEGF+	42 (72%)	46 (71%)	0,1
VEGF-	16 (28%)	19 (29%)	
<i>Odgovor na terapiju</i>			
KR	45 (78%)	48 (74%)	0,67
<KR	13 (22%)	17 (26%)	

EFS i OS nisu se razlikovali kod NF-κB pozitivnih i NF-κB negativnih bolesnika.

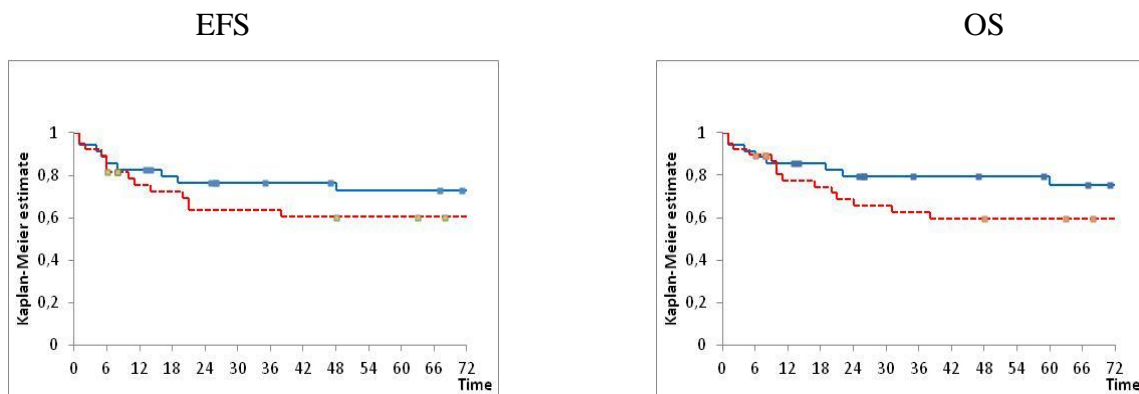
Dvogodišnji i petogodišnji EFS kod NF-κB - iznosio je 71% i 69%, a kod NF-κB + 68% i 64%, p=0,55. Dvogodišnji i petogodišnji OS NF-κB - bio je 72% i 70%, a kod NF-κB + 69% i 64%, p=0,42 (Slika 22).



NF- κ B -, NF- κ B +

Slika 22. EFS i OS ovisno o izražaju NF- κ B

Nije bilo statistički značajne razlike u promatranim ishodima (EFS i OS) ni kada smo analizirali odvojeno GCB i ABC grupu DLBCL. Iako su bolesnici ABC fenotipa imali lošije ishode ukoliko su bili NF- κ B + od NF- κ B -, ova razlika nije statistički značajna. Dvogodišnji EFS za NF- κ B + bio je 79,7% a za NF- κ B- 63,4% ($p=0,15$), dok je OS bio 79,5% vs 65,1% , $p=0,14$ (slika 23).



ABC NF- κ B -, ABC NF- κ B +,

Slika 23. EFS i OS ovisno o izražaju NF- κ B u ABC

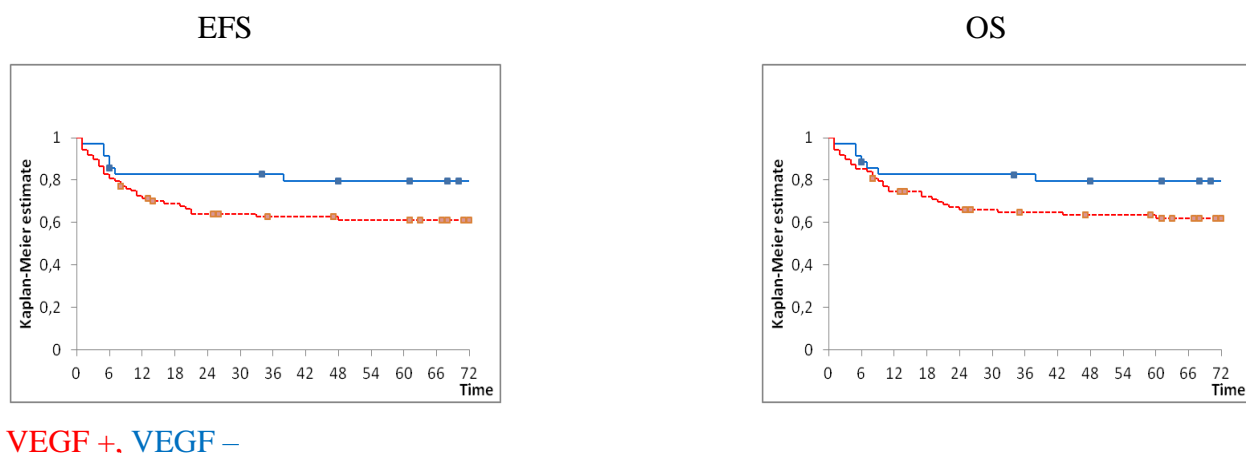
5.6. Povezanost izražaja VEGF-a s drugim parametrima i ishodima liječenja

Imunohistokemijsko bojenje na VEGF učinili smo kod svih 123 bolesnika, 35 (28,5%) bilo je VEGF negativno, a 88 (71,5%) VEGF pozitivno. Nismo našli povezanost između izražaja VEGF-a i značajki bolesnika i bolesti: dob, spol, LDH, ECOG PS i stadija bolesti. Usporedbom s drugim određivanim biljezima pojačan izražaj VEGF-a povezan je s ABC fenotipom, značajno više VEGF + bolesnika imalo je ABC fenotip ($p=0,0004$). Nije bilo razlike u odgovoru na terapiju između VEGF + i VEGF - bolesnika (Tablica 9)

Tablica 10. Značajke bolesnika i značajke bolesti u odnosu na izražaj VEGF

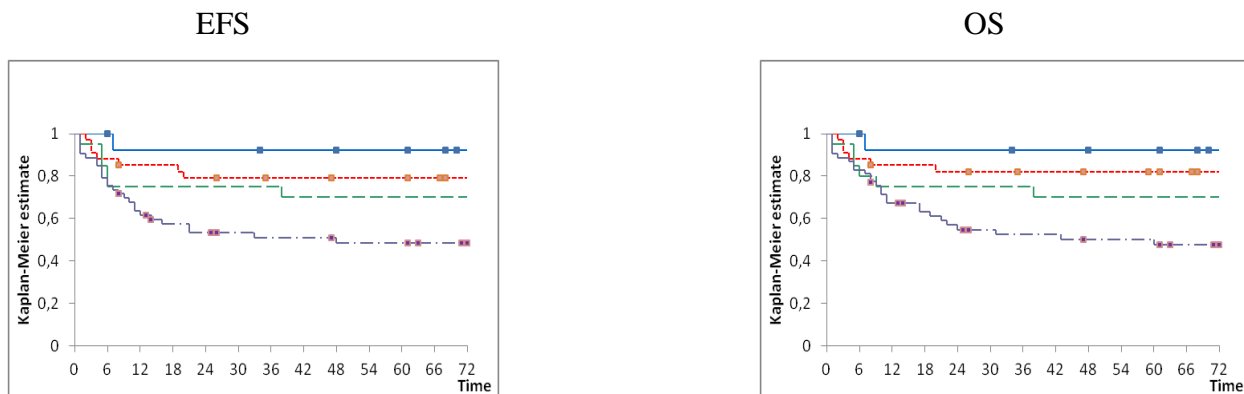
Značajke	VEGF +, n= 88 (71,5%)	VEGF -, n= 35 (28,5%)	p
<i>Dob</i>			
<65 g.	41 (47%)	21 (60%)	0,23
≥ 65 g.	47 (53%)	14 (40%)	
<i>Spol</i>			
Muškarci	47 (53%)	16 (46%)	0,40
Žene	41 (47%)	19 (54%)	
<i>PS</i>			
ECOG 0-1	56 (64%)	29 (83%)	0,05
ECOG ≥ 2	32 (36%)	6 (17%)	
<i>Stadij bolesti</i>			
St. I-II	50 (57%)	21 (60%)	0,84
St. III-IV	38 (43%)	14 (40%)	
<i>IPI</i>			
IPI 0-2	53 (60%)	27 (77%)	0,09
IPI ≥ 3	34 (39%)	8 (23%)	
<i>LDH</i>			
uredan	26 (30%)	14 (40%)	0,39
povišen	56 (64%)	20 (57%)	
<i>COO</i>			
GCB	15 (17%)	17 (49%)	0,0004
ABC	60 (68%)	13 (37%)	
neodredivo	13 (15%)	5 (14%)	
<i>Odgovor na terapiju</i>			
KR	63 (72%)	30 (86%)	0,11
<KR	25 (28%)	5 (14%)	

EFS i OS nisu se razlikovali kod VEGF pozitivnih u odnosu na VEGF negativne bolesnike, iako možda postoji trend boljeg ishoda VEGF negativnih bolesnika. EFS nakon dvije godine bio je kod VEGF negativnih 83%, a kod VEGF pozitivnih 64%, a petogodišnji 80% naprema 61% ($p=0,07$). OS iznosio je na dvije godine 83% za VEGF pozitivne, a 66% za VEGF negativne, a na 5 godina 80% naprema 62%, $p=0,09$ (slika 24).



Slika 24. EFS i OS ovisno o izražaju VEGF

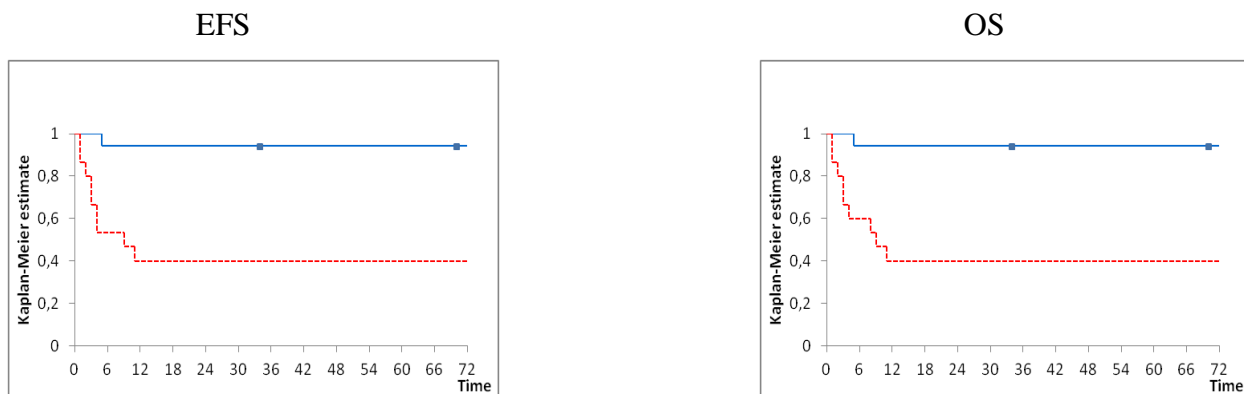
Iako VEGF nije pokazao značajnu prognostičku važnost, analizirali smo ishode ovisno o izražaju BCL2. Bolesnici koji su BCL2 + i VEGF + imaju značajno lošiji ishod s dvodišnjim EFS 53% i OS 53% u odnosu na bolesnike koji su BCL2 - i VEGF – čiji su EFS 92% i OS 92% ($p=0,004$ i $p=0,006$). Ishod ovih bolesnika lošiji je i od ishoda bolesnika koji su bili BCL2+ i VEGF -, iako ova razlika nije značajna. BCL2 negativni bolesnici imaju isti ishod neovisno o izražaju VEGF-a (Slika 25).



BCL2 – VEGF -, BCL2 – VEGF +, BCL2 + VEGF -, BCL2 + VEGF +

Slika 25. EFS i OS ovsno o izražaju BCL2 i VEGF

Nismo našli statistički značajnije razlike u promatranim ishodima (EFS i OS) u ABC grupi bolesnika ovisno o VEGF. VEGF + bolesnici imali su dvogodišnji EFS 70%, a VEGF - 69% ($p=0,7$), a OS 70% naprema 68% ($p=0,63$). Kod bolesnika GCB fenotipa našli smo statistički značajno lošiji i EFS i OS kod VEGF + bolesnika. VEGF + bolesnici imali su dvogodišnji EFS 40%, a VEGF - 94% ($p=0,001$), a OS 40% naprema 94% ($p=0,001$) (Slika 26).



VEGF +, VEGF -

Slika 26. EFS i OS ovisno o VEGF u bolesnika GCB fenotipa

5.7. Multivarijatna analiza

Učinili smo multivarijatnu analizu potencijalnih prognostičnih čimbenika za EFS i OS. Koristili smo Coxovu regresijsku analizu.

Napravili smo dvije analize, u prvoj smo analizirali samo imunohistokemijske parametre kod kojih postoji barem trend razlike u promatranim ishodima: BCL2, galektin-3 i VEGF. BCL2 je izrazito statistički značajan ($p < 0,001$ za OS i $p = 0,001$ za EFS), dok je galektin-3 na granici statističke značajnosti (Tablica 11)

Tablica 11. Multivarijatna analiza imunohistokemijskih biljega

p	OS	EFS
BCL2	<0,001	0,001
Galektin-3	0,093	0,068
VEGF	0,198	0,161

U drugoj analizi smo uz navedene parametre dodali IPI. U ovom modelu BCL2 i IPI su izrazito statistički značajni prognostički čimbenici, dok galektin-3 za razliku od prethodne analize nije uopće statistički značajan (Tablica 12).

Tablica 12. Multivarijatna analiza imunohistokemijskih biljega i IPI

p	OS	EFS
IPI	<0,001	<0,001
BCL2	<0,001	0,001
Galektin-3	0,784	0,880
VGF	0,406	0,351

6 RASPRAVA

6.1. Ishodi liječenja , značajke bolesnika i bolesti te odabir bolesnika

U naše ispitivanje uključeno je ukupno 123 bolesnika s medijanom dobi od 64,5 godine što je u skladu s medijanom dobi u drugim radovima iz opće populacije (115,116). Medijan praćenja naših bolesnika je 68 mjeseci, što je duže nego u većini studija, imajući u vidu da se većina relapsa javlja unutar prvih 24-30 mjeseci. Ishodi liječenja slični su ishodom drugih publiciranih radova koji se bave sličnom problematikom (KR -75,7%, dvogodišnji EF 69,4% i dvogodišnji OS 70,9%) (45,116). S obzirom da je dodatak rituksimaba značajno promijenio ishod liječenja bolesnika s DLBCL u studiju nismo uključili bolesnike koji nisu liječeni rituksimabom (117). Uključeni su svi oni bolesnici kod kojih je planirano liječenje s najmanje 4 ciklusa R-CHOP ili R-CHOP nalik kemoterapije, pa tako i bolesnici sa stadijem jedan kod kojih je proveden ovakav vid liječenja. Ukupno je bilo 17 bolesnika stadija I od kojih samo 2 nisu imala nepovoljnije prognostične čimbenike za koje je poznato da značajno pogoršavaju prognozu bolesnika i zbog kojih ih je potrebno liječiti kao i bolesnike s višim stadijem (velika tumorska masa i povišen LDH).

Postoje brojni literaturni podaci koji govore o utjecaju dobi na prognozu bolesnika, povezanosti s izražajem nepovoljnih prognostičkih faktora i lošijim ishodom liječenja. U većini, pogotovo starijih studija, kao granica za podjelu na mlađe i starije koristi se dob od 60 godina, a ova je dobna granica i jedan od kriterija za IPI. Međutim, u novije vrijeme se ova granica pomiče na 65 godina i intenzivnija kemoterapija kao i ATKS primjenjuju se kod bolesnika do 65 godina pa i starijih. Njemačka grupa pokazala je naprimjer da se preživljenje nakon 2002. značajno povećalo kod bolesnika u dobi između 60-64 godine i onih u dobi između 65-69 (116). Švedska studij, koja je analizirala preživljenje bolesnika s non-Hodgkinovim limfomima u preko 7100 bolesnika, pokazala je da postoji značajna razlika u preživljenju bolesnika za svakih 10 godina dobi (115). Mi smo u našoj studiji analizirali ishode prema dobi podjelivši bolesnike na mlađe od 65 i ≥ 65 godina. Ovakom podjelom dobili smo statistički značajnu razliku i u EFS i u OS (dvogodišnji EFS za mlađe 84,5%, a za one starije od 65 godina 57,8%, a OS 84,5% vs 60,7%), što upućuje da i granica od 65 godina može biti odabrana za podjelu na mlađe i starije bolesnike.

Nakon što je rituksimab postao standardni sastavni dio liječenja bolesnika s DLBCL, javljaju se publikacije o ishodu liječenja ovisno o spolu koji upućuju na moguć povoljniji utjecaj rituksimaba kod žena. LNHL98.5, prva randomizirana studija koja je usporedila R-CHOP vs CHOP, provedena 1990-tih, pokazala je da su veću korist od rituksimaba imale žene nego muškarci. Do istog rezultata je došla i skupna analiza francuske grupe na velikom broju bolesnika koja je uključila i prethodnu studiju. U kombiniranoj analizi medijan PFS je kod žena bio 90,6 mjeseci, a kod muškaraca 55 mjeseci ($p=0.02$). Medijan OS nije dosegnut kod žena dok je kod muškaraca bio 90,6 mjeseci ($p=0,06$) (118). U našoj seriji su žene imale bolje ishode od muškaraca, no ova razlika nije dosegla statističku značajnost ni za EFS niti OS (dvogodišnji EFS kod žena bio je 74,7% a kod muškaraca 64,3% a OS 74,7% naprema 67,3%, $p=0,26$). Prema podacima Američkog registra DLBCL je nešto češći u muškaraca nego u žena (6,7 vs 4,6 na 100 000) (119). Tako je i u našoj grupi bolesnika bilo nešto više muškaraca nego žena.

Kao i većina studija koja se bavi istraživanjem ishoda DLBCL i mi smo analizirali utjecaj IPI koji uključuje dob, stadij, LDH, broj zahvaćenih ekстранodalnih lokalizacija te PS po ECOG-u. Na osnovu IPI bolesnici se dijele u četiri prognostičke grupe. U značajnom broju objavljenih radova, pogotovo onih prije ere rituksimaba, postoji statistički značajna razlika između svake od ove četiri grupe bolesnika. U našoj populaciji nema statistički značajne razlike između bolesnika niskog rizika i onih srednje niskog rizika (dvogodišnji EFS 92,7% i 78,9%, $p=0,06$), iako postoji trend boljeg doživljenja. Još je manja značajnost razlike u ishodima bolesnika srednje visokog i visokog rizika (dvogodišnji EFS 47% vs 17,9 %, $p=0,13$). Ovakav rezultat više korelira s novijim podacima Kanadske studije po kojem IPI u bolesnika liječenih rituksimabom definira dvije rizičke skupine, one dobre i loše prognoze. Stoga je definiran novi, tzv. revidirani IPI (R-IPI), po kome se bolesnici dijele na one niskog rizika koji nemaju niti jedan rizičan faktor, srednjeg rizika koji imaju 1-2 rizična faktora i visokorizične bolesnike s 3 ili više rizičnih faktora (120).

6.2. Podjela prema COO određena imunohistokemijskim bojenjem po Hansovoj

Najnovija klasifikacija limfoma Svjetske Zdravstvene Organizacije iz 2016 g. uvrstila je kao obavezan dio dijagnostike DLBCL podjelu prema staničnom porijeklu na osnovu imunohistokemijskog bojenja. Najčešće se koristi algoritam kojeg je predložila Hans i suradnici.

Metoda je jednostavna i uključuje 3 biljega: CD10, BCL6 i MUM1. O adekvatnosti ove metode za predviđanje ishoda postoje različiti podaci i stavovi kao što je već navedeno u uvodu. U našoj grupi bolesnika promatrani ishodi EFS i OS nisu se razlikovali kod GCB i ABC grupe. U sličnoj studiji iz našeg centra na drugim bolesnicima također nismo uspjeli dokazati razliku u ishodu između ove dvije grupe (45). Sličnu skupinu bolesnika iz svakodnevne kliničke prakse analizirala je i Švicarske grupa koja je pokazala da postoji statistički značajna razlika u ishodu (121). Imajući u vidu da postoji više studija koje govore da bolesnici s ABC fenotipom imaju lošiji ishod, a isto tako i onih koje pokazuje da nema razlike, može se reći kako ova široko uvriježena metoda ima svojih ograničenja, a rezultati su nekonzistentni. Podijela bazirana na GEP puno je pouzdanija (122,123). U svojoj studiji kolege iz Švicarske pokušale su objasniti zašto postoji ova razlika. Prikupili su podatke iz 7 centara o načinu na koji se određivao GCB i ABC fenotip te su pokazali da se u različitim ustanovama za imunohistokemijska bojenja, koja se rade po istom algoritmu, koriste različiti klonovi protutijela različitih proizvođača, postoje razlike u postupku fiksiranja i bojenja, a ni definicija pozitivnosti nije bila uniformna (121). U ranije objavljenom radu iz naše ustanove na drugim bolesnicima i ovoj disertaciji korištena su ista bojenja i isti kriteriji pozitivnosti pa su i rezultati isti. Imali smo 18 bolesnika (14,6%) koje nije bilo moguće svrstati ni u GCB ni u ABC grupu što je u skladu s podacima drugih studija u kojima se ovaj postotak kretao od 5-15% (121,124).

Analizom povezanosti COO i značajki bolesnika u našoj studiji našli smo značajno veću učestalost ABC fenotipa kod bolesnika u dobi ≥ 65 godina. Postoje objavljeni podaci o povezanosti ABC DLBCL sa starijom dobi, iako je starija dob različito definirana. Tako su npr. u Francuskoj studiji starijima smatrani bolesnici stariji od 50, a u Njemačkoj oni stariji od 75 godina (125,126). Njemačka grupa analizirala je skupno podatke iz 3 različite studije uključujući i RICOVER-60, koja je uspoređivala CHOP14 i CHOP21 +/- rituksimab u starijih bolesnika s DLBCLom. Za podjelu bolesnika u GCB i ABC grupu korištene su obje metode, imunohistokemijska po Hans algoritmu i GEP i ishod je bio isti, neovisno o metodi koja je korištena. Neki autori smatraju da je veća učestalost ABC u starijoj dobi posljedica promjena B-stanične populacije tijekom starenja pri čemu dolazi do smanjenja raznolikosti normalne B-stanične populacije, što povećava rizik od klonalne ekspanzije B stanica (127).

6.3. BCL2

Od ukupnog broja bolesnika u našoj studiji 59,3% bilo je BCL2 pozitivno što je u skladu s rezultatima drugih publikacija u kojima se pozitivnost kreće od 49-67%. To znači da je naša grupa po tom pitanju reprezentativna. Analizom promatranih ishoda naših bolesnika utvrdili smo značajnu razliku u EFS i OS ovisno o izražaju BCL2. BCL2 pozitivni bolesnici imali su statistički značajno lošije doživljenje bez događaja i ukupno doživljenje. Ti su bolesnici imali i lošiji odgovor na terapiju, manje bolesnika postiglo je KR, iako ta razlika nije dosegla razinu statističke značajnosti. Postoje različiti literaturni podaci o utjecaju imunohistokemijskog izražaja BCL2 na ishod liječenja bolesnika s DLBCL, od kojih su neki pokazali jasnu korelaciju (pogotovo noviji), dok su rezultati ranijih publikacija raznolikiji (57-61).

U većini studija za određivanje BCL2 pozitivnosti korišteno je isto protutijelo (klon 124) kao i u našoj studiji. Za razliku od toga, razina pozitivnosti različito je definirana te se u nekim studijama pozitivnom smatrala bilo koja pozitivnost odnosno >0-1%, a u drugima su pozitivnim smatrani uzorci s >75% pozitivnih stanica (128-130). Ovime se možda može objasniti razlika u rezultatima pojedinih studija. Mi smo pozitivnim smatrali one uzorke kod kojih je >50% tumorskih stanica bilo pozitivno (106). Kako je zbog razvoja selektivnog BCL2 inhibitora izražaj ovog antiapoptotskog proteina postao interesantan, definiraju se nove, sve točnije, metode za određivanje izražaja BCL. Tako je nastala i metoda koja uz postotak pozitivnih stanica za sigurniju procjenu pozitivnosti koristi još i jačinu izražaja BCL2 na osnovu koje se pacijenti dijele u četiri grupe: one koji ga ne izražavaju, imaju slab izražaj, srednje jaki i jaki izražaj. Iako se čini da se na ovaj način može precizije prepoznati BCL2 pozitivne bolesnike (62,131), SZO i dalje preporučuje definiciju BCL pozitivnosti na temelju nalaza >50% pozitivnih stanica koju smo mi koristili u ovom radu.

Neke od ranijih studija pokazale su da je BCL2 značajan prognostički faktor samo kod bolesnika s ABC fenotipom (57,132), iako postoji i studija s oprečnim rezultatima (133). U našoj grupi bolesnika BCL2 je bio značajan prognostički faktor samo kod bolesnika s ABC fenotipom. U grupi s GCB fenotipom ishod BCL2 pozitivnih bolesnika je bio brojčano lošiji, ali razlika nije dosegla statističku značajnost. Mutacije BCL2 su česte kod bolesnika s GCB fenotipom DLBCL i povezane s *bcl2* translokacijama te mogu uzrokovati pseudonegativne nalaze ukoliko se pozitivnost određuje imunohistokemijskim bojenjem. Najčešće se ove mutacije dešavaju u

području petlje koju prepoznaje standardno BCL2 antitijelo, klon 124. Stoga se od strane nekih autora preporuča da se kod bolesnika s GCB fenotipom *bcl2* određuje FISHem, što bi moglo biti posebno važno ukoliko bi se venetoklaks pokazao učinkovitim, jer ove mutacije ne utječu na djelotvornost venetoklaks (134,135). Pretklinički podaci na staničnim linijama i mišjim modelima pokazali su značajno veći učinak ukoliko se R/G-CHOPu doda venetoklaks. U studiji faze Ib koja je uključivala osim DLBCL i bolesnike s folikularnim limfom rezultati su bili obećavajući (136). Kasnija studija faze II čiji su rezultati uspoređeni s GOYA studijom (R-CHOP vs G-CHOP u DLBCL) pokazala je trend boljeg EFS kod bolesnika s visokorizičnim DLBCL u cijeloj grupi liječenih bolesnika, a posebice u onih koji eksprimiraju BCL2 (31).

U multivarijantnoj analizi imnohistokemijskih biljega u našoj skupini je BCL2 ostao nezavisni prognostički faktor za ishod liječenja.

6.4 Galektin-3

Galektin-3 je jedan od anti-apoptotičkih proteina čija je pojačana ekspresija nađena u određenih B-limfoproliferativnih bolesti kao što su DLBCL, multipli mijelom i primarni efuzijski limfom. Pojačana ekspresija nađena je na staničnim linijama ovih tumora, ali i na uzorcima uzetim od bolesnika. U našoj studiji galektin-3 je bio pozitivan kod 69 (56,1%), negativan kod 51 (41,4%) bolesnika, a kod 3 nismo mogli odrediti izražaj. To je vrlo slično rezultatu studije koja se bavila ulogom ovog proteina u inhibiciji apoptoze u kojoj je učestalost ekspresije galektina-3 u jezgri ili citoplazmi kod DLBCL bila 66% (82). U istoj studiji nije nađeno pojačane ekspresije galektina-3 u ostalim B limfomima: FL, BL, MZL niti SLL. Da bi odredili ekspresiju galektina-3 u B stanicama tijekom njihovog normalnog sazrijevanja, analizirani su uzorci iz ljudskih tonzila. Rezultati su pokazali da je izražaj galektina-3 najslabiji u stanicama germinativnog centra, nešto jači u naivnim B stanicama, a najjači u memorijskim B stanicama. Kod naših bolesnika ekspresija galektina-3 bila je značajno veća kod bolesnika ABC fenotipa ($p=0,029$). Ovaj rezultat je donekle sukladan rezultatima gore navedene studije jer su i BL i FL, koji ne pokazuju pojačanu ekspresiju galektina-3, limfomi porijekla germinativnog centra. To ukazuje da izražaj galektina-3 korelira sa staničnim podrijetlom tumora.

Pojačana ekspresija galektina-3 u dugoživućim memorijskim stanicama u skladu je s podacima da galektin-3 inhibira apoptozu. U studiji koja je ukazala na njegov antiapoptotički učinak, nađeno je da on štiti Jurkat T stanice od anti-Fas inducirane apoptoze (137). Anti-Fas protutijela uzrokuju značajno manje apoptoze i u B stanicama s pojačanim izražajem galektina-3 (82). Budući da stanice germinativnog centra slabo izražavaju galektin-3 postavlja se pitanje kako dolazi do njegovog pojačanog izražaja u GCB DLBCL. Jedno od mogućih objašnjenja je da do pojačanja izražaja dolazi tijekom ili nakon transformacije stanica, a drugo da se tumor razvija iz onih rijetkih stanica koje izražavaju galektin-3. Studije na drugim tumorima koji pojačano izražavaju galektin-3, kao što su npr. karcinom gušterače, debelog crijeva, astrocitom i hepatocelularni karcinom, pokazale su da njegov izražaj korelira s većom agresivnošću tumora, metastatskim potencijalom i transformacijom u agresivniji oblik (138-141). U populaciji bolesnika uključenih u naše ispitivanje pokazalo se da je izražaj galektina-3 značajno veći kod bolesnika s višim IPI ($p=0,0002$), što moguće ukazuje da je i u DLBCL njegov izražaj povezan s agresivnošću bolesti. Što se tiče odgovora na terapiju, bolesnici koji su bili galektin-3 negativni imali su više KR nego galektin-3 pozitivni (87,4% vs 71%) no ova razlika nije bila statistički značajna.

Antiapoptotički učinak i prognostičko značenje pojačanog izražaja BCL2 u DLBCL su dobro poznati i potvrđeni i u našem ispitivanju. Do sada nije bilo poznato da bolesnici koji su istovremeno BCL2 + i galektin-3 + imaju lošije ishode. U našem istraživanju je razlika u EFS i OS u odnosu na bolesnike koji su negativni za oba biljega bila izrazito statistički značajna ($p=0,002$ i $0,006$). Dvostruko pozitivni bolesnici su imali lošije ishode i od BCL2 + galektin-3 - bolesnika, iako ova razlika nije bila značajna. Ukoliko prihvatimo teoriju o primarno antiapoptotičkoj ulozi galektina-3, iz toga bi se moglo zaključiti da u BCL2 + bolesnika pojačan izražaj galektina-3 djeluje sinergistički. Taj učinak bi se mogao objasniti rezultatima istraživanja provedenog još 1997. godine na staničnim linija ljudskog karcinoma dojke (142). U tom istraživanju je pokazano da galektin-3, iako sadrži NWGR domenu (domenu koja sadrži aspartat-triptofan-glicin-arginin slijed aminokiselina) i slična je BH1 domeni BCL2 koja je bitna za antiapoptotičku funkciju, djeluje na različitim mjestima u stanici i zato može imati sinergistički učinak s BCL2. Alternativno objašnjenje je da galektin-3, koji se nalazi u citoplazmi, može vezati BCL2 i tako formirati heterodimere koji onda jače inhibira mitohondrijski put apoptoze (oslobođanje citokroma C i aktivaciju apoptoze) od samog BCL2.

Osim unutar stanica, galektin-3 se nalazi i u izvanstaničnom prostoru gdje doprinosi sekrecijom. Nakon toga se može vezati za stanicu preko transmembranske tirozin fosfataze CD45. Na staničnim linijama DLBCL pokazano je da nakon vezivanja za CD45 galektin-3 smanjuje aktivnost fosfataze što nadalje uzrokuje smanjenje aktivnosti apoptotičkih puteva. Uklanjanje galektina-3 s CD45 receptora pomoću polivalentnog inhibitora glikana GCS-100, ponovno dovodi do povećanja aktivnosti fosfataze i povećane osjetljivosti stanica na citostatike (83). Sličan učinak pokazan je i na stanicama multiplog mijeloma (143). Na temelju ovog otkrića javila se ideja da se ovaj učinak GCS-100 iskoristi u liječenju B- limfoproliferativnih bolesti koje izražavaju galektin-3 koja nije nikad provedena u kliničkoj praksi.

Promatrali smo i povezanost izražaja galektina-3 s NF- κ B. Našli smo da značajno više galektin-3 pozitivnih bolesnika izražava NF- κ B ($p=0,016$). To je u skladu s rezultatima objavljenih radova koji su istraživali odnos NF- κ B i galektina-3 i koji ukazuju da NF- κ B dovodi do pojačanog izražaja galektina-3. Prvi dokazi potiču iz ispitivanja T-staničnog HTLV1 pozitivnog limfoma. Pokazano je da u T-stanicama ovog limfoma Tax protein, koji je snažan aktivator transkripcije HTLV1, dovodi do pojačanog izražaja galektina-3, ali indirektno, preko interakcije s CREB obitelji proteina (engl. cyclic-AMP-responsive element binding protein family) i NF- κ B. Autori su na temelju toga postavili hipotezu da aktivacija NF- κ B dovodi do izražaja galektina-3 (144). Studija provedena na stanicama glioblastoma potvrdila je ovo teoriju. Povezanost NF- κ B s izražajem galektina-3 dokazan je počevši od dvije poznate činjenice. Prva je da izlaganje stanica UV-C zračenju dovodi do degradacije I- κ B proteina što rezultira translokacijom NF- κ B u jezgru i aktivacijom transkripcijskih puteva (145). Druga je činjenica da promotorska regija (regija odgovorna za regulaciju transkripcije) gena za galektin-3 sadrži dva vezna mjesta za NF- κ B (146). Da bi utvrdili ima li pojačan izražaj galektina-3 veze s NF- κ B, stanice su prije izlaganja UV-C zračenju tretirane inhibitorom proteasoma koji sprečava degradaciju I- κ B. Nađeno je da u tretiranim stanicama nakon izlaganja zračenju dolazi do puno manjeg porasta izražaja galektina-3, nego u netretiranim stanicama (147).

Osim uloge u regulaciji apoptoze čini se da galektin-3 ima ulogu i u angiogenezi i da je ona povezana s VEGF. U našoj studiji je nešto više bolesnika koji su bili galektin-3 pozitivni bilo i VEGF pozitivno (76,7%, naprema 66,8% u galektin-3 negativnih bolesnika), no ova razlika nije značajna ($p=0,30$). Studija koja je napravljena na staničnim linijama i na rožnici miševa pokazala je da galektin-3 + stanice i jedinke nakon izlaganja VEGF-u pokazuju značajno veću angiogenu

aktivnost mjerenu brojem novonastalih krvnih žila, od onih koje su galektin-3 negativne. Ovaj se učinak najvjerojatnije postiže interakcijom galektina-3 s N-glikanskim kompleksom na $\alpha v\beta 3$ integrinu i aktivacijom integrin signalnog puta koji utječe na angiogenu aktivnost VEGF. $\alpha v\beta 3$ integrin je jedan od glavnih receptora na endotelnim stanicama, slabo izražen na normalnim endotelnim stanicama, a izražaj mu je pojačan na endotelnim stanicama žila u angiogenezi.

Blokiranjem ovog integrina izrazito se smanjuje angiogeni učinak VEGF. Smatra se da $\alpha v\beta 3$ integrin utječe na angiogenezu potaknutu citokinima utječući na interakciju stanica i staničnog matriksa što onda rezultira pojačanim izražajem citokinskih receptora uključujući VEGF, migracijom endotelnih stanica i pojačavanjem angiogenih signala potaknutih VEGF-om (91). Čini se da je $\alpha v\beta 3$ integrin i direktno povezan s citokinskim receptorima koji pojačavaju proangiogeno djelovanje VEGF, ali taj mehanizam za sada nije razjašnjen.

Povezanost galektina-3 i angiogeneze pokazana je i u radu o novim prognostičnim biljezima kod primarnog limfoma mozga. U toj studiji je pokazano da hiperplazija endotela predstavlja neovisni loš prognostički faktor. Galektin-3 je bio izražen u svega 15% uzoraka i nije korelirao s ishodom. Za razliku od toga, endotelna hiperplazija uz izražaj galektina-3 na endotelnim stanicama pokazala se kao značajan loš prognostički faktor (148).

U našem istraživanju usporedili smo ishode bolesnika ovisno o izražaju galektina-3 i VEGF. Iako nije dosegnuta statistička značajnost postoji jasan trend lošijih ishoda bolesnika koji su dvostruko pozitivni u odnosu na dvostruko negativne dok nije bilo razlike između galektin-3 + VEGF – i galektin-3 – VEGF + bolesnika. Ovaj nalaz bi mogao bi biti u skladu s teorijom da galektin-3 stimulira angiogenezu u DLBCL djelujući na istom signalnom putu kao i VEGF.

Multivarijatnom analizom galektin-3 nije se pokazao kao nezavisni prognostički faktor u DLBCL, iako postoji trend lošijeg ishoda galektin-3 pozitivnih bolesnika ($p=0,06$). To moguće ukazuje da je za učinak galektina-3 važna povezanost s drugim antiapoptotičkim i angiogenim mehanizmima.

6.5 NF-κB

Imunohistokemijskim bojenjem odredili smo izražaj NF-κB u svih naših bolesnika, 52,8% ih je bilo NF-κB -, a 48,2% NF-κB +. Izražaj NF-κB korelirao je sa stadijem bolesti i bio je značajno viši u stadiju III-IV. S obzirom da je trajna aktivnost NF-κB puta nužna za preživljenje malignih stanica, moguće je da pojačana aktivnost ovog puta dovede do brže progresije tumora. U studiji španjolske grupe objavljene 2008.g. pojačan izražaj NF-κB određivan je protutijelom na p56. Rezultati su pokazali da pojačan izražaj NF-κB korelira s povoljnom prognozom i da nema razlike u izražaju ovisno o staničnom podrijetlu tumora (70). Za razliku od toga, relativno nedavno publicirana studija Wanga i suradnika pokazala je da pojačan izražaj NF-κB korelira s lošijim ishodom, ali samo kod ABC grupe DLBCL. Multivarijantnom analizom je nađeno da je pojačan izražaj NF-κB nezavisan prognostički faktor kod bolesnika visokog IPI (72).

U našoj grupi bolesnika nismo našli da postoji povezanost izražaja NF-κB i staničnog porijekla tumora kao niti značajne razlike u ishodima kod bolesnika s GCB i ABC fenotipom ovisno o izražaju NF-κB, iako su bolesnici ABC fenotipa imali brojčano nešto lošije ishode ukoliko su bili NF-κB +, dvogodišnji EFS bio je 79% u NF-κB +, a 63% u NF-κB - ($p=0,15$).

6.6 VEGF

Prema do sada poznatim podacima čini se da VEGF i njegovi receptori ne utječu samo na angiogenezu, odnosno stvaranje krvnih i limfnih žila, već i da potiču rast i migraciju tumorskih stanica (99,100). S obzirom na to pretpostavili smo da bi izražaj VEGF mogao korelirati s lošijim ishodom kod bolesnika s DLBCL. U svih smo bolesnika učinili bojenje na VEGF, 28,4% ih je bilo negativno, a 71,5% pozitivno. Izražaj VEGF u ranije objavljenim studijama je jako varirao i kretao se između 40% i 75% (99,100,149). U naših bolesnika izražaj VEGF nije korelirao sa značajkama bolesnika niti bolesti, za razliku od slične studije u kojoj je bilo više VEGF + bolesnika u skupini bolesnika visokog rizika (149). U našoj skupini je 81% bolesnika s visokim IPI bilo VEGF +, a 19% VEGF -, dok je kod bolesnika s niskim IPI 66% bolesnika bilo VEGF +, a 24% VEGF - ($p=0,09$). Za razliku od toga u naših bolesnika postoji povezanost između izražaja

VEGF i staničnog podrijetla tumora. U skupini bolesnika ABC fenotipa bilo je značajno više VEGF + bolesnika ($p=0,004$). ABC podtip ima izražaj gena karakterističnu za normalne B stanice aktivirane preko B staničnog receptora. Kronična aktivacija BCR signalnog puta ključna je u patogenezi ABC tipa DLBCL (150,151) i direktno utječe na mikrookoliš smanjujući izražaj CXCR4 i CD62L (152). Mikrookoliš je glavni regulator angiogeneze potaknute VEGFom kojeg luče tumorske stanice. Osim toga, tumorske stanice potiču imunološke stanice u mikrookolišu na toleranciju i podržavanje svog preživljenja. Studija na relapsnim DLBCL, u kojoj je izražaj VEGF određivan PCRom, pokazala je da bolesnici s ABC tipom DLBCL (određenim GEP metodom) s pojačanim izražajem VEGF imaju značajno lošiji EFS i OS. Nije bilo razlike u ishodima GCB tipa DLBCL ovisno o izražaju VEGF (153). Druga studija u kojoj je određivan solubilni, cirkulirajući VEGF našla je da su VEGF pozitivni bolesnici imali lošiji ishod, a razlika je bila izraženija kod bolesnika s ABC nego GCB fenotipa (154).

Zbog svega navedenog analizirali smo i ishode VEGF+ i VEGF- bolesnika ovisno o COO. U našoj skupini nije bilo razlike u ishodima bolesnika s ABC fenotipom DLBCL ovisno o izražaju VEGF, dvogodišnji EFS za VEGF + bio je 70%, a za VEGF - 60%, a OS 73% naprema 68% ($p=0,68$ i $p=0,76$). Za razliku od toga, kod bolesnika s GCB fenotipom VEGF + bolesnici imali su značajno lošiji ishod od VEGF-, dvogodišnji EFS bio je 40% naprema 94% ($p=0,001$), a OS 40% naprema 94% ($p=0,001$). Razlika između naših rezultata i rezultata navedene dvije studije možda se može objasniti korištenjem različitih metoda za određivanje izražaja VEGF. Mi smo za oba biljega koristili imunohistokemijske metode. S druge strane, u multivarijantnoj analizi VEGF se nije pokazao statistički značajnim, tako da je moguće da su rezultati ranije objavljenih istraživanja posljedica neprepoznavanja drugih značajnijih prognostičkih biljega.

Osim uloge u angiogenezi, u novije vrijeme pokazalo se da je VEGF važan i za preživljenje endotelnih i tumorskih stanica. Čini se da to postiže time što potiče izražaj BCL2 (155-157). Pokazano je i da BCL2 dovodi do pojačanog izražaja VEGF u različitim tipova tumora (158-160) te na taj način pomaže angiogenezu. Obzirom na ove podatke, koji ukazuju na moguću interakciju ova dva proteina, analizirali smo i shode naših bolesnika ovisno o izražaju oba parametra. Naši rezultati pokazuju statistički značajno lošiji ishod u bolesnika koji su VEGF + i BCL2 + u odnosu na bolesnike koji su VEGF - i BCL2 -, kako u doživljenju bez znakova bolesti, tako i u ukupnom doživljenju. ($p=0,004$ za EFS i $p=0,006$ za OS). Naši rezultati su u

skladu s teorijom o potencijalnom sinergističkom učinku ova dva proteina na preživljenje tumorskih stanica.

6.7 Imunohistokemijski biljezi kao prognostički faktori u DLBCL

U našoj studiji imunohistokemijska podjela po algoritmu predloženom od Hans i suradnika nije se pokazala prognostički značajnom. Nije bilo razlike u doživljenju bolesnika ovisno o staničnom podrijetlu tumora. Kao što smo već istaknuli, čini se da postoji problem u različitim tehnikama koje se koriste u različitim laboratorijima. Studija koja je uspoređivala rezultate očitavanja određenih parametara u 8 različitih laboratorija pokazala je da postoje velike varijacije, a najveća razlika nađena je kod BCL6 i Ki67 (161). Upravo je BCL6, pored MUM1 najvažniji parametar za razlikovanje GCB i ABC fenotipa. Za razliku od toga izražaj BCL2 značajno je utjecao na ishode liječenja naših bolesnika. U multivarijantnoj analizi BCL2 ostaje uz IPI jedini nezavisni prognostički faktor u predviđanju ishoda. Iako je ranije bilo dosta nekonzistentnih rezultata i glede značenja izražaja BCL2, čini se da su naponi učinjeni kako bi se bolje tumačili rezultati ovog bojanja postigli rezultat te se u zadnje vrijeme u većini studija jasno pokazuje njegov prognostički značaj.

Galektin-3 kao protein o kojem se tek odnedavna govori kao faktoru koji utječe na različite procese uključujući rast stanica, njihovu diferencijaciju, adheziju, malignu transformaciju i metastaziranje, čini se utječući na apoptozu i angiogenezu, bio je primarni promatrani parametar u ovoj studiji. S obzirom na uloge ovog proteina opisane u literaturi, moglo se pretpostaviti da pojačan izražaj korelira s lošijim ishodom. Mi nismo uspjeli dokazati prognostičko značenje izražaja galektina-3 za ishod liječenja u našoj skupini bolesnika, iako su galektin-3 pozitivni bolesnici imali brožčano lošije ishode. U multivarijantnoj analizi ipak postoji trend za lošiji EFS ($p=0,06$) galektin-3 + bolesnika. Pokazali smo da kod BCL2 - bolesnika izražaj galektina-3 ne utječe na prognozu, dok kod BCL2 + izražaj galektina-3 korelira sa značajno lošijim ishodom liječenja što ukazuje da moguće postoji sinergistički učinak ova dva proteina na regulaciju apoptoze kod DLBCL.

Pojačani izražaj VEGF kao ni NF- κ B nije korelirao s ishodom liječenja naših bolesnika. Iako je u zadnjih dvadesetak godina naizgled jasno pokazana važnost angiogeneze u progresiji

limfoma, pitanje je je li određivanje izražaja VEGF u citoplazmi stanica pravi način za otkrivanje pojačane angiogeneze. Čini se da je pouzdanije određivanje solubilnog VEGF i gustoće krvnih žila. U budućim istraživanjima, osim izražaja VEGF u citoplazmi, bilo bi dobro koristiti i neku od ovih metoda kako bi se dobili pouzdaniji rezultati. S druge strane, valja napomenuti da primjena antiangiogenih lijekova, tj. dodatak antiVEGF protutijela bevacizumaba standardnoj terapiji (R-CHOP), nije poboljšala ishod liječenja bolesnika s DLBCL (103). Na temelju toga se možda može pretpostaviti da je angiogeneza regulirana i drugim procesima u tumorskim stanicama kao i lučenjem drugih čimbenika, a ne samo VEGF.

Brojna istraživanja pokazuju da je aktivnost NF- κ B puta važna za preživljenje tumorskih stanica kod različitih limfoproliferativnih bolesti. Prema literatunim podacima ova aktivnost jače je izražena kod ABC podtipa DLBCL. U našoj studiji nismo uspjeli pokazati razliku ishoda između NF- κ B + i NF- κ B - ABC DLBCL. I tu se nameće pitanje načina određivanja aktivnosti NF- κ B puta. Čini se da imunohistokemijska analiza nije najbolja metoda te da se pouzdaniji rezultati dobivaju određivanjem izražaja gena pomoću mikročipa. S kliničke strane su podaci iz literature ponovno dvojbeni. Smatralo se da je lenalidomid učinkovit u liječenju DLBCL, pogotovo ABC tipa i da je njegov učinak barem dijelom posljedica inhibicije angiogeneze preko inhibicije NF- κ B puta (162). S druge strane, nedavno objavljeno veliko klinička ispitivanje nije potvrdilo učinkovitost ovog lijeka u prvoj liniji liječenja ABC podtipa DLBCL određenog GEP tehnikom (30).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je od imunohistokemijski određenih biljega, jedini pouzdani prognostički faktor BCL2. Ostaje nejasno bi li za druge određivane parametre rezultati bili drugačiji da smo koristili metode usmjerene na detekciju RNA, DNA ili GEP.

7. ZAKLJUČAK

- U našoj studiji pokazali smo da 56% bolesnika s DLBCL izražava galektin-3 što je u skladu s literaturnim podacima. Izražaj galektina-3 nije se pokazao statistički značajnim prognostičkim čimbenikom za ishod liječenja naših bolesnika, iako u multivarijantnoj analizi postoji trend lošijeg ishoda galektin-3 + bolesnika, $p=0,06$.
- Izražaj galektina-3 povezan je s višim IPI. Značajno više bolesnika ima IPI ≥ 3 u grupi galektin-3 +, ali to nije bilo povezano s lošijim odgovorom na terapiju.
- Izražaj galektina-3 nije bio povezan s izražajem BCL2, no bolesnici koji su istovremeno i galektin-3 i BCL2 pozitivni imaju značajno lošiji ishod od bolesnika koji su galektin-3 - i BCL2 -. Ishod potonje skupine bolesnika izgleda je lošiji i od onih koji su galektin-3 - i BCL2 +, iako razlika nije statistički značajna.
- Izražaj galektina-3 nije bio povezan s izražajem VEGF.
- Izražaj galektina-3 bio je povezan s izražajem NF- κ B. Bilo je značajno više NF- κ B + bolesnika u skupini koja je izražavala galektin-3. Nije bilo razlike u ishodu galektin-3 + bolesnika ovisno o izražaju NF- κ B.
- Izražaj galektina-3 povezan je sa staničnim podrijetlom tumora. Značajno više galektin-3 pozitivnih tumora je ABC fenotipa. Nije bilo razlike u doživljenju ovisno o izražaju galektina-3 u bolesnika GCB, kao ni u onih ABC fenotipa.
- Izražaj VEGF nije povezan sa značajkama bolesnika. Izražaj VEGF je povezan sa staničnim porijeklom tumora. Bilo je značajno više VEGF + tumora ABC fenotipa. Nije bilo razlike u EFS i OS bolesnika s ABC fenotipom ovisno o izražaju VEGF, dok je ishod GCB DLBCL bio značajno lošiji kod VEGF + bolesnika.
- Čini se da određivanje izražaja galektina-3, kao ni određivanje izražaja VEGF imunohistokemijskim bojanjem nije klinički značajno. Na osnovu izražaja galektina-3 i VEGF ne može se predvidjeti ishod liječenja odnosno prognozu bolesnika. Obzirom na razvoj novih metoda liječenja koje su usmjerene na različite apoptotičke i angiogene mehanizme preživljenja tumora, za pretpostaviti je da će se razvijati senzitivnije metode za detekciju ovih proteina i njihovih receptora, odnosno puteva kojima utječu na preživljenje tumorskih stanica.

8. SAŽETAK

Uvod i svrha rada: Galektin-3 je jedini galektin kimerične strukture. Uključen je u važne stanične procese: regulaciju proliferacije stanica, apoptozu i angiogenezu. Više od 50% DLBCL-a izražava galektin-3. Preliminarni rezultati pokazuju da galektin-3 + DLBCL ima lošiju prognozu. Svrha je ovog rada usporediti biološke i kliničke karakteristike galektin3+ i galektin-3- DLBCL-a i ishode liječenja.

Materijali i metode: U novodijagnosticiranih bolesnika s DLBCL-om, liječenih R-CHOP-om ili sličnim protokolom analizirali smo kliničke karakteristike (dob, spol, IPI, odgovor na liječenje, EFS i OS). Imunohistokemijski smo odredili izražaj galektina-3, BCL2, VEGF i NF- κ B i stanično podrijetlo tumora.

Rezultati: Uključeno je ukupno 123 bolesnika uz medijan praćenja 68 mjeseci. Galektin-3 bio je pozitivan kod 69 (56,1%). Bolesnici koji su imali viši IPI ($p=0,002$), ABC fenotip ($p=0,029$) i pojačani izražaj NF- κ B ($p=0,016$) češće su izražavali galektin-3. Izražaj galektina 3 nije značajno utjecao na OS i EFS. BCL2 + bolesnici imali su značajno lošiji ishod ukoliko su istovremeno bili galektin3+ (dvogodišnji EFS 44% vs 73% ($p=0,002$) i OS 50% vs 74% ($p=0,006$)). Značajno više VEGF + tumora imalo je ABC fenotip. Značajno lošiji ishod imali su VEGF+ DLBCL GCB ali ne i ABC imunofenotipa ($p=0,001$). U multivarijantnoj analizi BCL2 je bio jedini značajni faktor za EFS i OS, dok izražaj galektina-3 pokazuje trend za lošiji ishod ($p=0,068$ za EFS i $p=0,093$ za OS).

Zaključak: Naši rezultati u skladu su s eksperimentalnim podacima koji pokazuju da NF- κ B stimulira izražaj galektina-3 i da galektin-3 dodatno potencira antiapoptotički učinak BCL2. Galektin-3 je češće izražen kod uznapredovalog stadija DLBCL-a i kod ABC fenotipa, što je u skladu s njegovim potencijalnim proliferativnim i antiapoptotičkim učinkom i njegovim izražajem na memorijskim stanicama.

9. SUMMARY

Expresion and clinical importance of galectin-3, VEGF and NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma, Sandra Bašić-Kinda, 2023

Introduction and aim: Galectin-3 is the only chimeric galectins. It is involved in crucial cellular processes including cell proliferation, apoptosis and angiogenesis. More than 50% of DLBCL express galectin-3. Preliminary results showed that galectin 3+ DLBCL have inferior prognosis. The purpose of this study is to compare biological and clinical characteristics of galectin-3+ and galectin-3- DLBCL and outcomes of treatment.

Material and methods: In newly diagnosed DLBCL patients treated with R-CHOP like regimens we analyzed clinical characteristics (age, sex, IPI, response to treatment, EFS and OS). Expression of gal-3, BCL2, VEGF and NF- κ B and cell of origin were determined by immunochemistry.

Results: 123 patients were included with a median follow up 68 months. Galectin-3 was positive in 69 (56,1%). Patient with high IPI ($p=0,002$), ABC phenotype ($p=0,029$) and NF- κ B + ($p=0,016$) expressed galectin-3 more frequently. Expression of galectin-3 did not affect OS and EFS. BCL2 + patients fared significantly worse if they coexpressed galectin-3 (2-y EFS 44% vs 73% ($p=0,002$) and OS 50% vs 74% ($p=0,006$)). Significantly higher number of VEGF + tumors were of ABC origin. Outcomes of VEGF + GCB, but not ABC DLBCLs were significantly inferior ($p=0,001$). In multivariant analysis BCL2 was only significant factor for EFS and OS, while galectin-3 showed trend for worse outcomes ($p=0,068$ for EFS and $p=0,093$ for OS).

Conclusion: Our results are consistent with experimental data showing that NF-KB stimulates galectin-3 expression and that galectin-3 potentiates antiapoptotic effect of BCL2. Galectin-3 is more commonly expressed in advanced stage DBCL and also in ABC phenotype, which is in accordance with his potential proliferative and antiapoptotic effect and its expression on memory cells.

10. LITERATURA

1. Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medico-Chirurgical Transactions*. London: 1832;17:68-114.
2. Gall EA, Mallory TB. Malignant lymphoma: a clinico-pathologic survey of 618 cases. *Am J Pathol*. 1942;18:381-429.
3. Rappaport H, Winter W, Hicks E. Follicular lymphoma: a re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer*. 1956;9:792-821.
4. Lukes R, Butler J, Hicks E. Natural history of Hodgkin's disease as related to its pathological picture. *Cancer*. 1966;19:317-344.
5. Shevach EM, Jaffe ES, Green I. Receptors for complement and immunoglobulin on human and animal lymphoid cells. *Transplant Rev*. 1973;16:3-28.
6. Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert K. Classification of non-Hodgkin lymphomas. *Lancet*. 1974;2:406-405.
7. Lukes RJ, Collins RD. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974;34: 1488-1503.
8. Bennett MH, Farrer-Brown G, Henry K, Jelliffe AM, Gerard-Marchant R, Hamlin I. i sur. Classification of non-Hodgkin lymphomas. *Lancet* 1974;2:405-408.
9. The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer* 1982;49:2 112-135.
10. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Muller-Hermelink HK. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: A progress report. *Am J Clin Pathol*. 1999;111:S8-12.
11. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. WHO classification of tumours. Tumours of the haematopoietic and lymphoid tissues, IARC, Lyon, 2001.
12. Swerdlow SH, Elias C, Haris NL, Pileri SA, Stein H, Thiele J. i sur. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 3. izd: IARC; Lyon 2008.

13. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. i sur. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4. izd. IARC, Lyon 2017.
14. Smith SD, Press OW. Diffuse large B-cell lymphoma and related diseases. U: Williams Hematology 9. izd, ur: Kaushansky K, Prchal JT, Press OW, Lichtman MA, Levi M, Burns LJ, Caligiuri MA. McGraw Hill, New York, 2016;1625-1640.
15. Aurer I, Dotlić S. Agresivni i vrlo agresivni B-stanični limfomi. U: Hematologija, ur. Labar B. Školska knjiga, Zagreb, 2017, 389-403.
16. Gascoyne RD, Campo E, Jaffe ES, Chan WC, Chan JKC, Rosenwald A. i sur. Diffuse large B-cell lymphoma, NOS. U: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4. izd, ur: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, LeBeau MM, Orazi A, Siebert R, IARC, Lyon 2017, 291-297.
17. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. seer.cancer.gov. Released Apr 2020, based on the Nov 2019 submission (1975-2017). Accessed Jan 18, 2021
18. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Chang TE, Cole P, Mandel JS. i sur. The non-Hodgkin lymphomas: A review of epidemiologic literature. Int J Cancer 2007; 120:1-39
19. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018.
20. McKelvey EM, Gottlieb JA, Wilson HE, Haut A, Talley RW, Stephens R. i sur. Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. Cancer 1976;38:1484-1493.
21. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Gorgan TM, Mize EM. i sur. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 1993;328:1002-1006.
22. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R. i sur. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002;346:235-242.

23. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB. i sur. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24:3121-3127.
24. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Rettengell R, Trneny M, Imrie K. i sur. 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;7:379-391.
25. Friedrichs B, Nickelsen M, Ziepert M, Altmann B, Haenel M, Viardot A. i sur. Doubling rituximab in high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma – results of the DENSE-R-MegaCHOEP trial. *Br J Haematol* 2019;184:760-768.
26. Leppä S, Jørgensen J, Tierens A, Meriranta I, Østlie I, de Nully Brown P. i sur. Patients with high-risk DLBCL benefit from dose-dense immunochemotherapy combined with early systemic CNS prophylaxis. *Blood Adv* 2020;4:1906-1915.
27. Bašić-Kinda S, Radman I, Dujmović D, Ilić I, Kralik M, Dobrenić M. i sur. R-CHOEP14 in younger high-risk patients with large B cell lymphoma: an effective front-line regimen with cardiac toxicity: a real-life, single-center experience. *Ann Hematol* 2021;100:1517-1524.
28. Leonard JP, Kolibaba KS, Reeves JA, Tulpule A, Finn IW, Kolevska T. i sur. Randomized phase II study of R-CHOP with or without bortezomib in previously untreated patients with non-germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2017;35:3538-3546.
29. Younes A, Sehn LH, Johnson P, Zinzani PL, Hong X, Zhu J. i sur. Randomized phase III trial of ibrutinib and rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in non-germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2019;37: 1285–1295.
30. Nowakowski GS, Chiappella A, Gascoyne RD, Scott DW, Zhang Q, Jurczak W. i sur. ROBUST: a phase III study of lenalidomide plus R-CHOP versus placebo plus R-CHOP in previously untreated patients with ABC-type diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2021;39:1317-1328. MC8078325.

31. Morschhauser F, Feugier P, Flinn IW, Gasiorowski R, Greil R, Illes A. i sur. A phase 2 study of venetoclax plus R-CHOP as first-line treatment for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2021;137:600-609.
32. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van der Lelie H, Bron D. i sur. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995;333:1540-1545.
33. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh GD, Linch DC, Trneny M. i sur. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010;28:4184-4190.
34. Costa LJ, Maddocks K, Epperla N, Reddy NM, Karmali R, Umyarova E i sur. Diffuse large B-cell lymphoma with primary treatment failure: ultra-high risk features and benchmarking for experimental therapies. *Am J Hematol.* 2017;92:161-170.
35. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Este E, Kuruvilla J, Westin J. i sur. Outcomes in refractory diffuselarge B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood.* 2017; 130:1800-1808.
36. International non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993;329:987-994.
37. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguirre RCT. i sur. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002;8:68-74.
38. Rosenwald A, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003;44 Suppl 3:S41-47.
39. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, i sur. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-282.
40. Jablonska J, Jesionek-Kupnicka D, Potemski P, Kovalik A, Sygut J, Kordek R. Comparison of two different immunohistochemical algorithms identifying prognostic subgroups of DLBCL. *Pol J Pathol.* 2010;3:124-132.

41. Alacacioglu I, Ozcan MA, Ozkal S, Piskin O, Turgut N, Demirkan F. i sur. Prognostic significance of immunohistochemical classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology* 2009;14:84-89.
42. Haarer CF, Roberts RA, Frutiger YM, Grogan TM, Rimsza LM. Immunohistochemical classification of de novo, transformed, and relapsed diffuse large B-cell lymphoma into germinal center B-cell and non germinal center B-cell subtypes correlates with gene expression profile and patient survival. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:1819-1824.
43. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F. i sur. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2003;101:78-84.
44. Moskowitz CH, Zelenetz AD, Kewalramani T, Hamlin P, Lessac-Chenen S, Houldsworth J. i sur. Cell of origin, germinal center versus nongerminal center, determined by immunohistochemistry on tissue microarray, does not correlate with outcome in patients with relapsed and refractory DLBCL. *Blood.* 2005;106: 3383-3385.
45. Ilić I, Mitrović Z, Aurer I, Bašić-Kinda S, Radman I, Ajduković R. i sur. Lack of prognostic significance of the germinal-center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with CHOP-like chemotherapy with and without rituximab. *Int J Hematol* 2009;90:74-80.
46. Gu K, Weisenburger DD, Fu K, Chan WC, Greiner TC, Aoun P. i sur. Cell of origin fails to predict survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol* 2012;30:143-149.
47. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J. i sur. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res.* 2009;15:5494-5502.
48. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD. i sur. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol.* 2011 Jan 10;29:200-207.
49. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010;2010:214074.

50. Fadeel B, Orrenisu S, Zhivotovsky B. The most unkindest cut of all: on the multiple roles of mammalian caspases. *Leukemia* 2000;14:1514-1525.
51. Ashkenazi, A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002;2:420–430.
52. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735–747.
53. Klanova M, Klener P. BCL-2 Proteins in Pathogenesis and Therapy of B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas. *Cancers (Basel)* 2020;12:938.
54. Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V. i sur. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood* 2009;114: 826–834.
55. Cho-Vega JH, Rassidakis GZ, Admirand JH, Oyarzo M, Ramalingam P, Paraguay A. i sur MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 2004;35:1095–1100.
56. Bolen CR, Klanova M, Trneny M, Sehn LH, He J, Tong J. i sur. Prognostic impact of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma and relationship to cell-of-origin: data from the phase III GOYA study. *Haematologica* 2020;105:2298-2307.
57. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A. i sur. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like-type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006;24:961–968.
58. Amen F, Horncastle D, Elderfield K, Banham AH, Bower M, Macdonald D. i sur. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patient. *Histopathology* 2007;51:70-79.
59. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d Agay MF, Briere J, Lavignac C. i sur. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin s lymphoma. *Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte (GELA)*. *Blood* 1996;87:265-272.
60. Shivakumar L, Armitage JO. Bcl-2 gene expression as a predictor of outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006;6:455-457.

61. Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM. i sur. Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab with analysis of germinal center and post germinal center biomarkers. *J Clin Oncol* 2008;2:2717-2724.
62. Punnoose E, Peale FV, Szafer-Glusman E, Lei G, Bourgon R, Do AD. i sur. BCL2 expression in first-line diffuse large B-cell lymphoma identifies a patient population with poor prognosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2021;21:267-278.
63. Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: Facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002;12:193–213.
64. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J. i sur. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013;19:202–208.
65. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005;446:457-482.
66. Liu F, Xia Y, Parker AS, Verma IM. IKK biology. *Immunol Rev* 2012; 246:239–253.
67. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:837–848.
68. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a000034.
69. Tabruyn SP, Griffioen AW. NF- κ B:a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis* 2008;11:101-106.
70. Espinosa I, Briones J, Bordes R, Burnet S, Martino R, Sureda A. i sur. Activation of NF- κ B signalling pathway in diffuse large B-cell lymphoma: clinical implication. *Histopathology* 2008;53:441-449.
71. Bernal-Mizrachi L, Lovly CM, Ratner L. The role of NF- κ B-1 and NF- κ B-2-mediated resistance to apoptosis in lymphomas *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9220-9225.
72. Wang J, Zhou M, Zhang Q, Xu J, Lin T, Zhou R. i sur. Prognostic value of expression of nuclear factor kappa-B/p65 in non-GCB DLBCL patients. *Oncotarget*. 2017;8: 9708–9716.
73. Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T. i sur. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins, *Cell* 1994;76:597–8.

74. Brewer F.C. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:255-262.
75. Liu FT, Rabinovich G.A. Galectins as modulators of tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:29-41.
76. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1982;128:1221-1228.
77. Dumić J, Dabelić S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:616-635.
78. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001;69:555–564.
79. Ellerhorst JA, Stephens LC, Nguyen T, Xu XC. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate* 2002;50:64–70.
80. Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments Kras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem* 2004;279:34922–34930.
81. Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 2005;10:267-275.
82. Hoyer KK, Pang M, Gui D, Shintaku IP, Kuwabara I, Liu FT. i sur. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 2004;164:893-902.
83. Clark MC, Pang M, Hsu DK, Liu FT, de Vos S, Gascoyne RD. i sur. Galectin-3 binds to CD45 on diffuse large B-cell lymphoma cells to regulate susceptibility to cell death. *Blood* 2012;120: 4635–4644.
84. Yu F, Finley RL, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem* 2002;277:15819–15827.
85. Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H. i sur. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II Tcell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:8302–8311.
86. Markowska AI, Liu FT, Panjwani N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. *J Exp Med* 2010;207:1981–1993.

87. Kim SJ, Lee SJ, Sung HJ, Choi IK, Choi C W, Kim BS. i sur. Increased serum 90K and galectin-3 expression are associated with advanced stage and a worse prognosis in diffuse large B-cell lymphomas. *Acta Haematol* 2008;120:211-216.
88. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 795–803.
89. Ruan J, Hajjar K, Rafii S, Leonard J.P. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* 2009;20:413-424
90. Kim KJ, Li B, Winer J, Gillet N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362: 841–844.
91. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N. i sur. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998;94: 715–725
92. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori H, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002;2: 826–835
93. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9: 669–676
94. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 1999;18: 2221–2230.
95. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V. i sur. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998;273: 30336–30343.
96. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B. i sur. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002;8: 841–849.
97. Doussis-Anagnostopoulou IA, Talks KL, Turley H, Debnam P, Tan DC, Mariatos G. i sur. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 2002;197: 677–683.

98. Foss HD, Araujo I, Demel G, Klotzbach H, Hummel M, Stein H. Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. *J Pathol* 1997;183: 44–50.
99. Gratzinger D, Zhao S, Marinelli RJ, Kapp AV, Tibshirani RJ, Hammer AS. i sur. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Am J Pathol* 2007; 170:1362–1369.
100. Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, Hsi ED, Hans CP, Pohlmann B. i sur. Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest* 2008;88:38–34
101. Gratzinger D, Advani R, Zhao S, Talreja N, Tibshirani RJ, Shyam R. i sur. Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (RCHOP). *Br J Haematol* 2010;148:235–244.
102. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W. i sur. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* (2004) 350(23):2335–2342.
103. Seymour JF, Pfreundschuh M, Trněný M, Sehn LH, Catalano J, Csinsky E. i sur. MAIN Study Investigators. R-CHOP with or without bevacizumab in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma: final MAIN study outcomes. *Haematologica* 2014;99:1343-9.
104. Aurer I, Dominis M, Kralik M, Balenović A, Huić D. Dijagnostika i liječenje limfoma – drugi hrvatski konsenzus. *Lijec Vjesn.* 2013;135:63-67.
105. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC. i sur. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol.* 1989;7:1630-1636.
106. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S. i sur. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30:3452-3459.

107. Suzuki O, Hirsch B, Abe M, Dürkop H, Stein H. Galectin-1-mediated cell death is increased by CD30-induced signaling in anaplastic large cell lymphoma cells but not in Hodgkin lymphoma cells. *Lab Invest* 2012;92:191–199.
108. Pham LV, Fu L, Tamayo AT, Bueso-Ramos C, Drakos E, Vega F. Constitutive BR3 receptor signaling in diffuse, large B-cell lymphomas stabilizes nuclear factor- κ B-inducing kinase while activating both canonical and alternative nuclear factor- κ B pathways. *Blood* 2011;117: 200–210.
109. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandrupa VS, Brachmachary M, Shen Q. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009;459:717-721.
110. Lee WJ, Kim YJ, Lee YJ, Won CH, Chang SE, Cho JH. Vascular endothelial growth factor protein expression is associated with a poor prognosis in patients with cutaneous extranodal natural killer/T-cell lymphoma. *Br J Dermatol* 2018;178:e11-e12.
111. Younes A, Hilden P, Coiffier B, Hagenbeek A, Salles G, Wilson W. International Working Group consensus response evaluation criteria in lymphoma (RECIL 2017). *Ann Oncol* 2017;28: 1436–1447.
112. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-480.
113. <https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx>
114. Lucijanić M. Survival analysis in clinical practice: analyze your own data using an Excel workbook. *Croat Med J* 2016;57:77-79.
115. Hedström G, Hagberg O, Jerkeman M, Enblad G. The impact of age on survival of diffuse large B-cell lymphoma – a population-based study. *Acta Oncologica* 2014;54:916-923
116. Pulte D, Jansen L, Gondos A, Emrich K, Holleczek B, Katalinic A, Survival of patients with non-Hodgkin lymphoma in Germany in the early 21st century. *Leukemia Lymphoma* 2013;54:979-985
117. Ngo L, Hee SW, Lim LC, Tao M, Quek R, Yap SP. Prognostic factors in patients with diffuse large B cell lymphoma: before and after the introduction of rituximab. *Leukemia Lymphoma* 2008;49:462–469.

118. Sarkozy C, Mounier N, Delmer A, Van Hoof A, Karsenti JM, Fleck E. i sur Impact of BMI and gender on outcomes in DLBCL patients treated with R-CHOP: a pooled study from the LYSA. *Lymphoma* 2014;<https://doi.org/10.1155/2014/205215>.
119. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. seer.cancer.gov. Released Apr 2020, based on the Nov 2019 submission (1975-2017). Accessed Jan 18, 2021
120. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007;109:1857-1861.
121. Reber R, Banz Y, Garamvölgyi E, Perren A, Novak U. Determination of the molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphomas using immunohistochemistry: a case series from the Inselspital, Bern, and a critical appraisal of this determination in Switzerland. *Swiss Med Wkly* 2013; 143:w13748.
122. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI. i sur The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-1947
123. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, Mate JL. i sur. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011;117:4836–4843.
124. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S. i sur. Prognostic significance of diffuse large B-cell lymphoma cell of origin determined by digital gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies. *J Clin Oncol* 2015;33:2848–2856.
125. Mareschal S, Lanic H, Ruminy P, Bastard C, Tilly H, Jardin F. The proportion of activated B-cell like subtype among de novo diffuse large B-cell lymphoma increases with age. *Haematologica* 2011;96:1888–1890.
126. Paul U, Richter J, Stuhlmann-Laiesz C, Kreuz M, Nagel I, Horn H. i sur. Advanced patient age at diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma is associated with molecular

- characteristics including ABC-subtype and high expression of MYC. *Leukemia Lymphoma* 2018;59:1213-1221.
127. Gibson KL, Wu YC, Barnett Y, Duggan O, Vaughan R, Kondeatis E. i sur. B-cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status. *Aging Cell* 2009;8:18-25.
128. Hu S; Xu-Monette ZY; Tzankov A, Green T;Wu L, Balasubramanyam A. i sur. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 2013;121:4021–4031.
129. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TFE, Bernd HW, Feller AC. i sur. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013;121:2253-2263.
130. Salles G, de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P. i sur. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood* 2011;117:7070-7078.
131. Tsuyama N, Sakata S, Baba S, Mishima Y, Nishimura N, Ueda K. i sur. BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. *Blood* 2017;130:489-500.
132. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Enblad G, Leppa 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;82:364–372
133. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC. i sur. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell–like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res* 2011;17:7785–7795.
134. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RJ. i sur. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;476:298-303.
135. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, Scott DW, Tan K, Ben-Nierah S. i sur BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2012;26:1383-1390.

136. Zelenetz AD, Salles G, Mason KD, Casulo C, Le Gouill S, Sehn LH. i sur. Venetoclax plus R- or G-CHOP in non-Hodgkin lymphoma: results from the CAVALLI phase 1b trial, *Blood* 2019;133:1964-1976.
137. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6737–6742.
138. Hsu DK, Dowling CA, Jeng KC, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999;81:519–526.
139. Bresalier RS, Yan PS, Byrd JC, Lotan R, Raz A. Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. *Cancer* 1997;80:776–787
140. Berberat PO, Friess H, Wang L, Zhu Z, Bley T, Frigeri L. i sur. Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer. *J Histochem Cytochem* 2001;49:539–549.
141. Schoepfner HL, Raz A, Ho SB, Bresalier RS. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer* 1995;75:2818–2826.
142. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HRC, Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res* 1997;57:5272-5276.
143. Streetly MJ, Maharaj L, Joel S, Schey SA, Gribben JG, Cotter FE. i sur. GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death. *Blood* 2010;115:3939-3948.
144. Hsu DK, Hammes SR, Kuwabara I, Greene WC, Liu FT. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactosidebindin glectin, galectin-3. *Am J Pathol* 1996;**148**: 1661–1670.
145. Li N, Karin M Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13012-13017
146. Kadrofske MM, Openo KP, Wang JL. The human LGALS3 (galectin-3) gene: determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys* 1998;349:7-20

147. Dumić J, Lauc G, Flögel M. Expression of galectin-3 in cells exposed to stress - roles of Jun and NF- κ B. *Cell Physiol Biochem* 2000;10:149-158.
148. D'Haene N, Catteau X, Maris C, Martin B, Salmon I, Decaestecker C. Endothelial hyperplasia and endothelial galectin-3 expression are prognostic factors in primary central nervous system lymphomas. *Br J Haematol* 2008;140:402-410.
149. Shahini L, Gašparov S, Petruševska G, Manxhuka Kerliu S, Veselaj F, Kurshumliu F. i sur. Clinical significance of VEGF-A and microvessel density in diffuse large B-cell lymphoma and low grade follicular lymphoma. *Acta Clin Croat* 2017;56:588-593.
150. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW. i sur. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008;319:1676-1679.
151. Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G. i sur. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 2006;441:106-110.
152. Vlad A, Deglesne PA, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, Baran-Marszak F. i sur. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in chronic lymphocytic leukemia cells is triggered by B-cell receptor ligation and associated with progressive disease. *Cancer Res* 2009;69:6387-6395.
153. Broséus J, Mourah S, Ramstein G, Bernard S, Mounier N, Cuccuini W. i sur. VEGF₁₂₁, is predictor for survival in activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma and is related to an immune response gene signature conserved in cancers. *Oncotarget* 2017; 8:90808–90824.
154. Riihijärvi S, Nurmi H, Holte H, Björkholm M, Fluge Ø, Møller Pedersen L. High serum vascular endothelial growth factor level is an adverse prognostic factor for high-risk diffuse large B-cell lymphoma patients treated with dose-dense chemoimmunotherapy, *Eur J Hematol* 2012;89:395-402.
155. Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 2001;85:273–278.
156. Dias S, Shmelkov SV, Lam G, Raffi S. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood* 2002;99:2532–2540.

157. Beierle EA, Strande LF, Chen MK. VEGF upregulates Bcl-2 expression and is associated with decreased apoptosis in neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* 2002;37:467–471.
158. Biroccio A, Candiloro A, Mottolise M, Sapora O, Albini A, Zupi G. i sur. Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and in vivo angiogenesis in a breast carcinoma line. *FASEB J* 2000;14:652–660.
159. Fernandez A, Udagawa T, Schwesinger C, Beecken W, Achilles-Gerte E, McDonnell T. i sur. Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:208–213.
160. Iervolino A, Triscioglio D, Ribatti D, Candiloro A, Biroccio A, Zupi G. i sur. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *FASEB J* 2002;16:1453–1455.
161. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A. i sur. 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.
162. Mondello P, Steiner N, Willenbacher W, Ferrero S, Ghione P, Marabese A. i sur. Lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma: is it a valid treatment option? *Oncologist* 2016;21:1107-1112.

11. ŽIVOTOPIS

Sandra Bašić-Kinda rođena je u 23.11.1970.godine u Zadru gdje je od 1985. do 1989. pohađala Srednju medicinsku školu „Medicinska škola Ante Kuzmanića“.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci upisala je 1989. Diplomirala je 1994 godine.

Od 1995. do 1997. u OB Zadar odrađivala je liječnički pripravnički staž, početkom 1998. položila državni ispit i stekla licencu za samostalan rad.

Specijalizaciju interne medicine započela je 1998. u Općoj bolnici Zadar, a dio specijalizacije provela je na Klinici za Internu medicinu KBC Zagreb, 2002. godine položila je specijalistički ispit te stekla titulu specijalista interne medicine.

Od 2005. do 2007. obavljala je subspecijalizaciju iz hematologije u KBC Zagreb i stekla titulu užeg specijalista hematologije 2007. godine.

Godine 2006. upisala je Poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo” na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, odslušala sve kolegije i položila sve ispite.

Aktivno je kao glavni istraživač sudjelovala u četiri kliničke studije te je kao suradnik sudjelovala u ispitivanju na još desetak kliničkih studija iz područja malignih limfoproliferativnih bolesti (non-Hodgkinov limfom, multipli mijelom, kronična limfatična leukemija).

Član je više hrvatskih stručnih društava (KroHem, Hrvatsko društvo za hematologiju), a od 2016. godine. tajnica je Hrvatskog društva za hematologiju Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ).

Član je i aktivno sudjeluje u radu međunarodnih hematoloških udruženja kao što su ERIC (engl.european research initiative on CLL), European MCL (mantle cell lymphoma) Network, Limfomske grupe EORTCa (engl. European Association for Cancer Research), IMS (engl. International Myeloma Society), BMSG (engl. Balkan Myeloma Study Group) što je rezultiralo i sa nekoliko publikacija u indeksiranim časopisima.

Autoric je više stručnih predavanja, usmenih priopćenja te postera na skupovima i kongresima u Hrvatskoj i inozemstvu.

Autorica je 40 tak znanstvenih radova koje je napisala samostalno ili u koautorstvu.

Od 2017 godine voditeljica je odjela za maligne hematološke bolesti Zavodza za Hematologiju Interne Klinike KBKa Zagreb. U trenutku pisanja disertacije udata je i majka dvoje djece.