

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Лавиника Атанасковић

**УДРУЖЕНОСТ ПОЛИМОРФИЗАМА ГЕНА ЗА ИНТЕРЛЕУКИНЕ 2  
И 6, CD14 И ГЛУТАТИОН ТРАНСФЕРАЗУ S СА КЛИНИЧКИМ  
КАРАКТЕРИСТИКАМА, РЕЗУЛТАТИМА ЛЕЧЕЊА И  
ПРОГНОЗОМ ОБОЛЕЛИХ ОД ДИФУЗНОГ В ЛИМФОМА  
ВЕЛИКИХ ЋЕЛИЈА**

Ментор: Доц. др Оливера Тарабар

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

**Крагујевац, 2019.**

I.	УВОД	5
1.	ЕПИДЕМИОЛОШКИ АСПЕКТИ DLBCL	7
2.	ЕТИОЛОШКА ПРИЗМА DLBCL	8
2.1	Инфективни агенси	8
2.2	Поремећај имунорегулације	9
2.3	Експозиција хемијским агенсима	10
2.4	Генетски фактори	10
2.5	Генски полиморфизам	11
2.6	Фактори животног стила	13
3.	ПАТОФИЗИОЛОШКИ МЕХАНИЗМИ DLBCL	
3.1	Диференцијација Б лимфоцита	13
3.2	Механизам малигне трансформације	14
3.2.1	Хромозомске абнормалности	14
3.2.2	Молекуларна основа генске експресије	17
3.2.3	Улога GTS у патогенези DLBCL	18
3.2.4	Интерлеукин 2 у патогенези DLBCL	20
3.2.5	Интерлеукин 6 у патогенези DLBCL	22
3.2.6	CD14 моноцити у патогенези DLBCL	24
3.2.7	Полиморфизми у генима за цитокине	26
3.2.8	Генски полиморфизми GST	26
3.2.9	Генски полиморфизми IL6	26
3.2.10	Генски полиморфизми IL2	27
3.2.11	Генски полиморфизми CD14	29

4.	КЛАСИФИКАЦИЈА DLBCL-----	29
5.	ДИЈАГНОСТИКА DLBC-----	30
	5.1 Имунохистохемијске анализе-----	30
	5.2 Клиничке карактеристике болести-----	31
	5.3 Лабораторијска и рендгенолошка дијагностика-----	31
6.	ТЕРАПИЈСКИ ПОТЕНЦИЈАЛИ DLBCL-----	32
7.	ПРОГНОСТИЧКИ ИНДИКАТОРИ DLBCL-----	33
	7.1 интернационални прогностички индекс-----	33
	7.2 имунофенотип као прогностички параметар болести-----	34
II.	ДЕФИНИЦИЈА ПРОБЛЕМА И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА-----	35
	1. Хипотеза-----	36
	2. Циљеви истраживања-----	37
III.	МЕТОДОЛОГИЈА РАДА И ИСПИТАНИЦИ-----	37
	1. Испитаници-----	37
	2. Методологија рада-----	40
	3. Експериментални део истраживања-----	41
	3.1 Коришћење хемикалије-----	41
	3.2 Изоловање ДНК-----	42
	3.3 Одређивање GTS генотипова-----	43
	3.4 Одређивање IL6 и IL2 генотипова-----	44
	3.5 Одређивање CD14 генотипова-----	45
	4. Статистика -----	46

IV.	РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА-----	47
1.	Анализа GST гена-----	47
2.	Анализа CD14 гена-----	50
3.	Анализа IL6 гена-----	55
4.	Анализа IL2 гена-----	56
V.	ДИСКУСИЈА-----	58
VI.	ЗАКЉУЧЦИ-----	83
VII.	ЛИТЕРАТУРА-----	84

## I. УВОД

Дифузни Б лимфом великих ћелија (DLBCL) је агресивна и најзаступљенија неоплазма лимфног ткива, са учесталошћу од око 30% свих неХочкин-ских лимфома (NHL) (Stein и сар, 2008). Представљају неоплазму великих трансформисаних Б-ћелија које својом клоналном пролиферацијом и дифузним растом потпуно нарушавају нормалну архитектуру лимфног чвора (Hunt и сар., 2008). Ови лимфоми се карактеришу хетерогеним морфолошким, имунофенотипским и генетским одликама из којих произилази и веома различита клиничка слика болести, одговор на примењену терапију и преживљавање. Разумевање основа ове хетерогености представља критичан корак ка даљем напретку у контроли ове болести, која остаје клинички изазов у више од једне трећине болесника са DLBCL који неће одговорити на терапију прве, нити на следеће терапијске линије.

Стални напредак у патоморфолошким, имунофенотипским и биолошким студијама је омогућио поделу DLBCL у подгрупе и различите клиничке ентитете који су инкорпорирани у класификацију тумора хематопоетског и лимфног ткива Светске здравствене организације (WHO), укључујући и најновију класификацију из 2016 године (Swerdlow и сар., 2008; Swerdlow и сар., 2016).

У последњих петнаестак година, развој технологија високе резолуције је обезбедио значајну помоћ у идентификовању генетских лезија и/или нарушених сигналних путева који су потребни за покретање и прогресију DLBCL. Према профилу експресије гена издвојена су два подтипа DLBCL, један са профилом експресије гена порекла герминативног центра Б-ћелија (GCB DLBCL) и други под тип чине DLBCL са генским профилом активисаних Б-ћелија периферне крви, означених као ABC DLBCL. Наведене две подгрупе DLBCL се карактеришу различитим морфолошким, имунофенотипским али и хромозомским аберацијама. Такође, ове две подгрупе DLBCL се карактерису и значајно различитим одговором на примењено лечење (Rosenwald и сар., 2003; Alizadeh и сар., 2000; Wright и сар., 2003).

DLBCL се проучава као модел мултифакторијалне етиопатогенезе који укључује генетске факторе, поремећај имуног одговора, факторе животне средине, изложеност инфективним агенсима, професионалну изложеност и

навике у исхрани, који могу допринети развоју лимфома (Swerdlow и сар., 2008; Swerdlow и сар., 2016).

Између наведених фактора повезаних са патогенезом болести, дисрегулација имуног система је најбоље приказана, о чему сугерише и податак да око 8% оболелих од Б-ћелијског NHL испољавају различите аутоимуне феномене и исто тако, оболели од реуматоидног артритиса имају двоструки ризик за развој Б ћелијског лимфома, највероватније као последица хроничне Б ћелијске активације и стимулације (Cunningham-Rundles, 2012; Dias and Isenberg, 2011).

Чешћа појава болести у појединим породицама сугерише улогу и наслеђених генетских варијанти, полиморфизама гена, о чему сведоче резултати бројних епидемиолошких студија које су испитивале улогу варијација у једном нуклеотиду ДНА секвенце (SNP), појединачних или у склопу хаплотипова и њихову удруженост са појавом NHL и DLBCL (Rothman и сар., 2006; Skibola и сар., 2007; Cerhan и сар., 2012; Cerhan и сар., 2014).

Цитокини имају значајну улогу у пролиферацији и диференцијацији нормалних Б ћелија (Cohen and Shachar, 2012). Имајући у виду њихову улогу у Б-ћелијском развоју, посебном интересовању изложени су полиморфизми у генима за проинфламаторне и имунорегулаторне цитокине, као и полиморфизми у генима укљученим у урођени имуни одговор. Функционално важне полиморфне варијанте у генима за цитокине могу да доведу до промене у експресији, структури и активности генског продукта, да мењају Б-ћелијску функцију, али и да делују на бројне реактивне ћелија у миљеу лимфоног чвора и да доприносе трансформацији, пролиферацији и еволуцији малигног Б ћелијског клона (Scott and Gascoyne, 2014; Nielsen и сар., 2015).

Клиничка слика оболелих од DLBCL је, такође, веома различита. Болест се најчешће испољава безболним порастом једне или више периферних лимфних жлезда, али и туморским променама различитих нодалних и екстранодалних регија са оштећењем захваћених органа. Док поједини болесници имају локализовану болест, 50-60% оболелих испољиће узнапредовали стадијум болести што је параметар значајно лошијег исхода лечења (Green и сар., 2014).

Применом комбиноване имунохемиотерапије, базиране на моноклонском CD20 антители, ритуксимабу и комбинованој хемиотерапији, комплетна (CR) и дуготрајна ремисија се може постићи у око 60% лечених болесника. Међутим, више од 30% болесника неће реаговати на терапију прве линије или ће обновити болест након претходно постигнуте CR, тако да приближно 50% оболелих од DLBCL остају са данашњим терапијским приступом, неизлечени (Shaffer и сар., 2012). Сазнања о генетском профилу сваког оболелог, укључујући генске полиморфизме, могу допринети нашем разумевању различите ефикасности имунохемиотерапије у оболелих и разјаснити различито испољене токсичне ефекте исте. Због тога значајно место у истраживању наследних варијанти заузимају полиморфизми у генима укљученим у метаболизам и детоксикацију различитих неопластичних лекова (Falduto и сар., 2017).

У свакодневној клиничкој пракси се ради процене агресивности болести употребљава Интернационални прогностички индекс (IPI) који је базиран на карактеристикама оболелог, али и на карактеристикама саме болести. Ради стратификације болесника у групе ризика уз IPI скор, користе се и други параметри прогнозе базирани на патохистолошкој анализи туморског ткиваса имунохистохемијом, FISH (*fluorescentna in situ hibridizacija*) и PCR (*polymerase chain reaction*). Међутим, ниједан од данас установљених прогностичких параметара није се показао користан у погледу најбоље терапијске опције за сваког болесника посебно која би допринела најбољем терапијском одговору у оболелих од DLBCL.

Због тога се намеће потреба сталних и нових истраживања како би се разоткрила комплексна и хетерогена природа болести.

Стицање нових сазнања из области полиморфизама у генима који су укључени у имунски одговор и детоксикацију канцерогена би могла да допринесу бољем разумевању хетерогене природе болести али и развоју рационалних циљаних терапија.

### **1. ЕПИДЕМИОЛОШКИ АСПЕКТИ DLBCL**

У готово свим земљама за које су подаци доступни, уочена је повећана годишња стопа инциденце NHL (Zelenetz, 2010). Последње две деценије

нарочито је уочена појава болести ван лимфних чворова, у екстранодалним локализацијама (Yuan и сар., 2014).

На DLBCL отпада око 1/3 свих NHL одраслих што га чини најчешћом Б-ћелијском неоплазмом са инциденцом од 3-4 случаја на 100 000 становника годишње (Cerchiatti and Leonard, 2013.). Карактеристика је старије животне доби са медијаном појављивања болести у доби од 65 година.

Од свих лимфома DLBCL је показао највећи пораст инциденце у последње 2 деценије за 50-100% (Bumera-Ciećkiewicz и сар., 2014). Овај пораст инциденце не може се објаснити развојем савремених дијагностичких процедура, већ се евентуално може повезати са повећаним коришћењем имуносупресивне терапије и већој експозицији факторима као што су ултраљубичасто зрачење, пестицидима и хербицидима.

## **2. ЕТИОЛОШКА ПРИЗМА DLBCL**

Етиопатогенеза болести није у потпуности разјашњена. Повећан ризик за настанак лимфома је примећен код болесника са урођеним и стеченим поремећајем имунитета, аутоимуним болестима, вирусним инфекцијама, као и код особа изложених различитим хемијским канцерогенима (Swerdlow и сар., 2008; Swerdlow и сар., 1016).

### **2.1 Инфективни агенси**

Лимфоми удружени са Синдромом стечене имунодефицијенције (AIDS) представљају једну од најчешћих болести удружених са AIDS у САД (Hentrich и сар., 2014). Болесници са AIDS имају 165 пута већи релативни ризик за настанак лимфома у периоду од три године од дијагнозе AIDS у поређењу са особама који нису носиоци вируса. Пре увођења високоактивне антиретровирусне терапије, инциденца свих подтипова NHL је била повећана до 200 пута код пацијената инфицираних HIV-ом (Gopal и сар., 2014).

Добро је познато да EBV доприноси настанку лимфома када се његов геном угради у геном Б-ћелије (Oyama и сар., 2003), мада су потребни и други предуслови како у оквиру инфицираног клона, тако и код домаћина. DLBCL који настају у стањима имунодефицијенције су значајно чешће



EBV позитивни, док је заступљеност EBV у DLBCL без имунодефицијенције присутна само у 10% случајева.

HHV-8 носи неколико гена који се могу понашати као онкогени, укључујући и ген хомолог ћелијском гену за циклин из групе D (Воу и сар., 2010). Примарни ефузиони лимфом је повезан са HHV-8 инфекцијом (Shah и сар., 2014).

Инфекција HCV је често повезана са мешовитим криоглобулинемијама и Б-ћелијским NHL лимфомима и указује да HCV може да зарази Бћелије и утичена њихову функцију. Ћелијске линије заражене HCV показују значајно израженију апоптозу (Petrizzo и сар., 2014).

Неколико инфективних агенаса је повезано са одређеним подтипovima лимфома. Тако је бактерија *H. Pylori* повезана са лимфомима желуца MALT типа (Park и сар., 2010), *Borrelia burgdorferi*, удружена са NHL коже, *Chlamydia psittaci*, повезана са лимфомом ока (Zhu и сар., 2013), као и *Campylobacter jejuni* инфекција (Coeuret и сар., 2014). За већину ових агенаса се сматра да испољавају своје малигне механизме првенствено или делимично путем хроничне стимулације имуног система (Nakamura и сар., 2013).

## 2.2 Поремећај имунорегулације

Повећана учесталост NHL код болесника са урођеним или стеченим облицима имунодефицијенције јасно показује улогу сниженог имуног одговора у настанку лимфома. Проучавањем болесника инфицираних HIV-ом и болесника након трансплатација ткива и органа показала су битност три фактора у утицају имунодефицијенције на настанак лимфома: степен, трајање и тип имунодефицијенције (Kaneko и сар., 2013; Hentrich и сар., 2014).

NHL је најчешћи малигнитет код младих особа са атаксија-телеангиектазија синдромом или *Wiskott-Aldrich syndrome* (WAS) који се карактерише примарном имунодефицијенцијом (Cossia и сар., 2012). Чешћа појава NHL је уочена код деце са *X linked* лимфопрлиферативним синдромом или комбинованом имунодефицијенцијом (Ajisawa, 2012). EBV је важан ко-фактор. Поред тога, дефекти у имунорегулацији који су резултат неравнотеже производње цитокина и генетских дефеката,

непрецизно и / или неефикасно преуређење гена имуноглобулина и Т-ћелијског рецептора током лимфопоезе, доприносе развоју лимфома.

Поједине студије сугеришу и чешћу појаву NHL у оболелих од аутоимуних и хроничних инфламаторних болести (Cunningham-Rundles, 2012; Dias and Isenberg, 2011). Додатна и често дуготрајна имуносупресивна терапија којом су изложени болесници са аутоимуним болестима, или пак болесници након трансплантације ткива и органа повећава ризик за настанак DLBCL (Cuccaro и сар., 2014).

Поремећаји имунорегулације доводе до поликлоналне активације Б-ћелија која у даљем току еволуира у моноклоналну малигну пролиферацију.

### **2.3 Експозиција хемијским агенсима**

Упадљиво повећање учесталости NHL запажено је у последњих 30 година што повећава интерес у идентификацији фактора спољашње средине и фактора повезаних са различитим професионалним делатностима који могу бити повезани са овим трендом. Пољопривредници имају низак укупни морталитет, али високу стопу за неке врсте неоплазми, посебно за NHL, што указује да изложеност различитим хемијским агенсима у пољопривреди може бити од значаја за развој NHL (Cosso и сар., 2013). Новије мета-аналитичке студије у многим земљама су показале да постоји конзистентан доказ позитивних асоцијација између NHL и различитих инсектицида, линдана и фенокси хербицида (Sterne и сар., 2011).

Резултати објављене студије су показали да NHL са транслокацијом 14;18 су повезани са експозицијом диелдрину, линдану, атразину и фунгицидима (Schinasi и сар., 2014).

Иако је удео пољопривредних радника у популацији релативно мали, излагање опште популације пестицидима је у све већем порасту. Употреба пестицида који се користе за негу зелених површина се повећава по стопи од 5-8%, односно концентрација пестицида који се користе за негу травњака је 5 пута већа него што се примењује за обраду пољопривредног земљишта (Alavanja и сар., 2014).

### **2.4 Утицај генетских фактора**

Чешћа појава неоплазми лимфног ткива у неким породицама сугерише да генетска предиспозиција може имати значај у настанку DLBCL. Ризик за

настанак NHL је повећан код особа са породичном историјом хематопоезног малигнитета. Претходна истраживања су показала да је пораст ризика за настанак DLBCL у рођака првог степена сродства 3-4 пута већи уколико је позитивна породична историја тумора хематопоезног ткива (Levine и сар., 2009). Такође, постоје подаци да имигранти задржавају стопу инциденце лимфома из земље свог порекла (Zhang и сар., 2014).

Породична историја болести, мада не искључиво, може бити везана за наслеђе и вероватно је сурогат генетске предиспозиције, посебно ако фактори ризика делују у заједничком породичном окружењу (Ali, и сар., 2013; Bassig, и сар., 2012).

Чешћа појава лимфома у оквиру једне породице указује да утицај генетске предиспозиције, али и присуство других фактора повезаних са навикама у исхрани, околностима животне и радне средине, могу допринети повећаном ризику за настанак болести. Резултати објављених студија су показали да пестициди и професионална изложеност бензену дају већи ризик за NHL међу појединцима са позитивном породичном историјом тумора (Rusiecki и сар., 2009). Међутим, фамилијарна предиспозиција, самостално или у комбинацији са другим факторима спољашне средине, чине мали удео у настанку NHL (мање од 5%) и, стога, не може да објасни већу инциденцу NHL.

### 2.5 Генски полиморфизам

Велики број до данас објављених асоцијационих студија је испитивала улогу генетских варијанти, полиморфизама, у ризику од настанка лимфома. Полиморфизам једног нуклеотида (SNP) је еволуцијски стабилна варијација у једном нуклеотиду DNA секвенце која се појављује у најмање 1% опште популације. Геном човека садржи више од 10 7 SNP, и они чине и до 90% свих генетских варијација у људи (Robert, и сар., 2014).

Иако велики део откривених полиморфизама гена не припадају функционално важним на основу њиховог биолошког значаја, резултати *in vitro* студија су показали да неки SNP, сами или у склопу хаплотипова, могу мењати експресију гена или пак функцију генског продукта и доприносити патогенези лимфома, утицати на фенотипске одлике болести или резултате лечења (Skibola, 2007). Потенцијално функционално важни

SNP смештени су у промотер регионима гена. Полиморфизми у промотер регионима гена могу деловати на везивање транскрипционих фактора и довести до промене експресије гена. Уколико су SNP смештени у кодирајућим регионима гена могу довести до промена у структури и функцији протеина, док SNP који се налазе у некодирајућим секвенцама могу утицати на *splicing* гена (Nilsen, и сар., 2015). SNP могу интерферирати са *microRNA* или дугим некодирајућим местима везивања RNA и доводити до епигенетских модификација (Smith, и сар., 2012).

У погледу ризика за настанак лимфома, испитивани су полиморфизми у генима који утичу на ДНА интегритет и метилацију. Другу велику групу од интереса за настанак лимфома чине полиморфизми у генима који утичу на преживљавање и раст Б-ћелија и обухватају полиморфизме у генима за проинфламаторне и имунорегулаторне цитокине, гене укључене у природни имунитет, оксидативни стрес, регулисање енергије и производњу хормона. Важну групу полиморфизама гена чине гени укључени у ксенобиотички метаболизам (Hill и сар., 2006). Генски полиморфизми појединих ксенобиотичких ензима који учествују у метаболизму неких канцерогена могу допринети услед промењене ензимске функције појачаном деловању канцерогена и његових метаболита и утицати на већу стопу настанка NHL и DLBCL (Chiu and Blair, 2009).

Резултати до сада највеће објављене асоцијационе студије Rothman-а и сар., *InterLymph* студија, утврдила је повезаност SNP у генима за фактор некрозе тумора (TNF)- $\alpha$  и интерлеукин (IL)10 са склоношћу за настанак лимфома (Rothman и сар., 2006). Ова студија на великом броју испитаника је потврдила повезаност присуства TNF- $\alpha$  308AA генотипа са повећаним ризиком од 25% и 65% за настанак NHL, односно DLBCL, ретроспективно. Такође, резултати исте студије су показали повезаност полиморфизама у дисталном и проксималног региону гена за *IL10* са повећањем DLBCL ризика за 28%. *InterLymph* студија је потврдила повезаност између полиморфизма *IL-6* (-174 G/C; rs1800795) промотера и ризика за NHL (Rothman и сар., 2006).

Такође, резултати студије указују да полиморфизам *IL-2* (-330T/G и +114T/G) гена може бити повезан са повећаном осетљивошћу према инфламаторним и малигним болестима (Serhan и сар., 2007).

Генски полиморфизам ензима из мултипле породице цитохрома P450 (CYP) и глутатион S-трансферазе (GST) има своје место, према резултатима студија, у лимфогенези (Ihsan и сар., 2014). CYP1A1 ензим је критичан у активирању полицикличних ароматичних угљоводоника и диоксина, и повезан је са леукемијом у детињству (Aschebrook-Kilfoy и сар., 2012). CYP3A4 је укључен у оксидацију паратиона и других оренофосфатних инсектицида, који су повезани са NHL (Kyle и сар., 2013).

### **2.6 Фактори животног стила**

Све више се истражује и повезаност исхране са етиологијом NHL. Показано је да ризик од NHL може бити повезан са повећаним уносом животињских протеина (Skibola, 2007), док повећан унос воћа и поврћа богатог каротеном је показао инверзну повезаност са NHL (Chiu и сар., 2011; Charbonneau, 2013).

## **3. ПАТОФИЗИОЛОШКИ МЕХАНИЗМИ DLBCL**

### **3.1 Диференцијација Б лимфоцита**

Б-лимфоцити настају у коштаном сржи диференцијацијом прекурсорних ћелија под стимулативним дејством IL7 секретованог од стране стромалних ћелија коштане сржи. У току матурације долази до реаранжирања генских локуса, прво за тешке (IgH), а за тим за лаке ланце имуноглобулина (IgL). У току реаранжирања гена избор генског сегмента IgH са варијабилног (V) локуса који се комбинује са сегментом разноликости (D) и једним спојним (J) сегментом случајно се врши (Eibel, и сар., 2014). Рекомбинација је иницирана од стране специфичних RAG1 и RAG2 протеина, који сарађују са специфичним секвенцама препознавања (рекомбинантне сигналне секвенце, RSSS) (Martin, 2002). Прекурсорске Б-ћелије поседују на мембрани имуноглобулине (IgM и IgD), који функционишу као антиген рецептори, улазе у процес позитивне селекције, преживљавају и придружују се популацији наивних Б-ћелија. Ћелије које подлегну негативној селекцији улазе у процес апоптозе у коштаном сржи.

Наивне Б-ћелије напуштају коштану срж и насељују периферне лимфне органе, претежно лимфне чворове. Лимфоцити улазе у герминативни центар лимфног чвора бивају стимулирани антигеном након чега постају центробласти, пролиферишу и сазревају у центроците (Giltiay, и сар., 2012). Током диференцијације антигеном активираних Б-ћелија, у реаранжираним генским локусима накупљају се тачкасте соматске мутације, које се називају соматске хипермутације (SHM) и којом се мења афинитет мембранских имуноглобулина за антиген. Процес CSR је завистан од бројних ћелијама посредованих и цитокинских сигнала које луче фоликуларне дендритичне целије продукујући IL2, IL4, IL10, IL12, IL13, IL17, IL21, INF gamma, TGF beta i TNF alfa. Међусобна интерреакција фактора раста и цитокина је неопходна за преживљавање и пролиферацију у поступку стицања различитих антигена (Moensand Tangye, 2014).

Центробласт експримира *BCL-6* и *CD10* ген на којима се дешавају хипермутације. У даљем току долази до експресије и *BCL-2* гена. Кључни моменат за сазревање Б-ћелија у герминативном центру је нисходна регулација *BCL-6* која је подстакнута контролном функцијом *CD40* и *CD23* лиганда на које делују цитокини Т-хелпер лимфоцита (IL4). Поремећаји током процеса рекомбинација могу да доведу до иницијације малигне трансформације и настанак лимфома (Linderoth и сар., 2003).

### 3.2 Механизам малигне трансформације

DLBCL настају малигном трансформацијом Б ћелија током процеса диференцијације у прегерминативним, герминативним и постгерминативним центрима секундарних лимфних органа.

#### 3.2.1. Хромозомске абнормалности

Соматске мутације у важним регулаторним секвенцама гена, амплификације и хромозомске транслокације су најчешће промене на генима које утичу и мењају нормалан развој Б ћелија.

Хромозомске транслокације представљају главни механизам активације протоонкогена укључених у настанак NHL-а, а настају као резултат узајамне замене тачно одређених секвенци између два различита хромозома. У току ових транслокација, протоонкоген је у близини места прекида (новог споја) и најчешће не долази до настанка фузионог гена, већ се прото-онкоген поставља у близину хетерологе регулаторне секвенце

(Gaidano и сар., 2000). Најчешће је то регулаторна секвенца гена рецептора за антигенали може бити и било која друга секвенца на датом нивоу диференцијације ћелије од које лимфом води порекло. Последично долази до грешке у преписивању прото-онкогена које може бити хомотропно и хетеротропно (Kuppers and Dall-a Favera, 2001). Док се хомотропни поремећај односи на прото-онкогене који се иначе преписују у нормалним ћелијама, хетеротропни поремећаји се односе на прото-онкогене који се не преписују у нормалним ћелијама и од чијег измењеног клона потиче лимфогенеза. Механизам ове хромозомске транслокације се још увек не зна прецизно, али новија истраживања потврђују претходне хипотезе да је поремећај ензима учесника рекомбинације гена (*AID - activation induced cytidine deaminase*) одговоран за погрешна спајања (Nagaoka и сар., 2002).

Како су хромозомске транслокације присутне и код здравих људи који немају лимфом, присуство ових кариотипских промена није довољно за настанак лимфома (Marculescu и сар., 2002).

Процес соматске хипермутације доводи углавном до супституција нуклеотида у преуређењу варијабилних региона гена док делеције и дуплирања чине око 5% мутација (Sherry и сар., 2011). Мутације се јављају са веома високом стопом,  $10^3$  до  $10^4$  парова база по једној ћелији по једној деоби у региону око 1-2 kb низводно од транскрипционог промотера (Хе и сар., 2014). Изгледа да хипермутација зависи од присуства Ig појачивача за транскрипцију Ig гена, и да посебно изазива иницијацију транскрипције (Hu и сар., 2013). Недавно је показано да се хипермутација јавља због грешке ДНА полимеразе (Chen и сар., 2014).

Упркос кључној улози хипермутација репараторних гена, постоји недовољно доказа који подржава њихово директно учешће у пропагирању геномске нестабилности у Б-ћелијама лимфома. Насупрот томе, појединци са биалелским герминалним мутацијама у неким од гена за поправку ДНА често показују уз имунодефицијенцију повећан ризик за развој лимфома (de Miranda и сар., 2011).

Гени укључени у поправку ДНА продукују NHEJ (*nonhomologous end-joining*) протеине и ензиме који су делимично склони грешкама зато што поправљају нехомологе прекинуте ланце ДНА и овај пут поправке је константно активан за разлику од HR (*homologous recombination*) која је активна само у S фази ћелијског циклуса за репарацију хомологих ланаца

ДНА (Lieber и сар., 2010). Дефицит у овим протеинима у оквиру p53 гена дају предиспозицију за развој имунодефицијенције и про-Б-ћелијских лимфома. Многе студије сугеришу да NHEJ/V(D)J мутације могу да учествују у лимфогенези (Hähnel и сар., 2014).

Код DLBCL најчешће су захваћени *BCL-6*, *BCL-2* и *Мус* онкогени. Хромозомске аберације које обухватају *BCL-6* су једне од најчешћих и повезане су са повећаним ризиком за развој DLBCL. *BCL-6* је прото-онкоген који је смештен на хромозому 3q27 и експримиран је на нормалним Б-ћелијама герминативног центра (Green и сар., 2014). Његова улога је да блокира гене укључене у прогресију ћелијског циклуса у одговору на оштећење ДНА (Lenz and Staudt, 2010). Хромозомске транслокације које укључују *BCL-6* ген јављају се у 30% до 40% случајева. Промене у експресији *BCL-6* протеина услед хромозомских аберација могу да доведу до неуспеха у диференцијацији ћелија, и последично до активације и пролиферације ћелија. Сходно томе, промовишући опстанак ћелија доприносе генетској нестабилности и малигној трансформацији (Guo и сар., 2014).

*BCL-2* се налази на хромозому 18q21 у региону промотора гена који кодира тешки ланац Ig на хромозому 14q32. Прекомерна експресија *BCL-2* протеина због транслокације 14;18 налази се у 15% до 30% свих DLBCL (Iqbal и сар., 2006). *BCL-2* ген, који кодира анти-апоптозни протеин игра важну улогу у патогенези DLBCL. Овај протеин је укључен у механизме који се односе на отпорност на хемотерапију и показано је да је укупно преживљавање код DLBCL боље уколико је смањена експресија *BCL-2* гена и циклина D2 (Amen и сар., 2007). Међутим, други аутори су показали негативан ефекат експресије *BCL-2* гена само у подгрупи лимфома са генским профилем ABC DLBCL (Meier и сар., 2008).

Мутације *сМус* онкогена су обично удружене са комплексним променама кариотипа. Најчешћа дисрегулација *сМус* онкогена је последица транслокације 8;14 током које се *Мус* ген у позицији 8q24 ставља под контролу промотер региона гена за тежак ланац имуноглобулина. Реаранжмани *Мус* гена се могу наћи у 2% до 16% DLBCL, нарочито код екстранодалних лимфома (Friedberg and Fisher, 2008).

У лимфомагенези су присутни и други механизми активације прото-онкогена. Један од њих је амплификација *мус* онкогена и представља лош



прогностички параметар у DLBCL. Мутације могу захватити кодирајуће и регулаторне секвенце и тиме променити биолошке особине протеинског продукта (Cabanillas, 2011).

Поремећај активности тумор супресорских генау DLBCL најчешће је резултат биалелске инактивације. Она настаје делецијом једног и мутацијом другог алела тумор супресорског гена, мада се могу јавити и друге комбинације. Најчешће је у патогенези DLBCL укључен тумор супресорски ген *p53*, код 30 % DLBCL (Nogai, и сар., 2011). Ген *p53* може бити инактивиран од стране *BCL-6* гена током генезе лимфома. Протеин *p27*, који је укључен у регулацију прогресије ћелијског циклуса из G1 у S фазу заједно са циклином D1, један је од новооткривених тумор супресорских гена (Rendleman и сар., 2014). Протеини *p16*, *p18* и *p21*, такође регулатори ћелијског циклуса, производи су тумор супресорског гена чија делеција и/или мутација доводи до њихове инактивације (Nogai и сар., 2011).

### 3.2.2 Молекуларна основа генске експресије

Геномска анализа DLBCL је открила висок степен сложености ових лимфома са великом стопом индивидуалне хетерогености. Студије експресије гена су показала да постоје барем три различита подентитета у склопу DLBCL која се карактеришу различитим хромозомским аберацијама и специфичним активним онкогеним путевима. Прву подгрупу чине DLBCL са генским профилем сличним ћелијама герминативног центра (eng. germinal center B-cell-like-GCB), другу лимфоми са генским профилем активираних периферних Б-ћелија (eng. Activated B-cell-like-ABC) и трећој подгрупи припадају примарни медијастинални Б-ћелијски лимфоми (PMBL), који се према профилу експресије гена не могу класификовати ни у GCB ни у ABC DLBCL (Alizadeh и сар., 2000; Rosenwald и сар., 2002; Wright и сар., 2003). Ове подгрупе се такође разликују и у погледу одговора на примењену терапију и исхода лечења. DLBCL GCB имају значајно бољи терапијски одговор и петогодишње преживљавање од око 76%, у поређењу са ABC DLBCL код којих је петогодишње преживљавање само 16% (Bohers и сар., 2014).

ABC DLBCL најчешће имају тризомију 3q и 18q21-q22, као и губитак 6q21-q22, док GCB DLBCL се карактеришу променама на 12q12 (Iwasaki and Medzhitov, 2010).

Карактеристика ABC подтипа је конститутивна активност NF-κB пута. За разлику од нормалних Б ћелија GC и GCB DLBCL, већина ABC DLBCL нема рекомбинације класа имуноглобулина (CSR), тако да на ћелијској површини најчешће експримирају само IgM имуноглобулине (Carbone и сар., 2014). ABC DLBCL стичу генетске лезије које ометају даљу диференцијацију Б ћелија у плазма ћелије што се сматра важним почетним кораком у патогенези ABC DLBCL, мада је природа прекурсорских ћелије нејасна (Younes, 2013). Сматра се да могу да потичу од IgM меморијских ћелија постгерминативног порекла или од прегерминативних Б ћелије (Gloghini and De Leval, 2013).

Лимфоми облика PMBL се манифестују туморском променом медијастинума и карактеристика су младих жена. Туморска маса често садржи остатак тимуса, сугеришући да потиче од ретких тимусних Б-ћелија (Ritz и сар., 2014). Према профили експресије гена сличнији је Хочкин-овом лимфому (Wilson и сар., 2014).

Различите мутације у наведеним подтиповима DLBCL (CD79A, CD79B, MYD88, CARD11, гени за BCR и NF-κB путеве и епигенетски регулатор EZH2) могу да представљају подлогу за циљану терапију лимфома (Bohers и сар., 2014).

### 3.2.3 Улога GSTу патогенези DLBCL

GSTs (*glutathione S-transferases*) је фамилија мултифункционалних ензима који учествују у метаболизму многих ксенобиотика и канцерогена. GSTs такође игра улогу у модулацији индукције других ензима и протеина у ћелији, нпр. код ДНА поправке и у одржавању интегритета генома (Fang и сар., 2011).

У току процеса детоксикације постоје две фазе: прва фаза укључује реакције оксидације за које је задужен микрозомални комплекс ензима цитохром P450, и друга фаза, у којој мултипли ензими GSTs катализују коњугацију ксенобиотика и канцерогена и тако липофилне агенсе

метаболишу у хидрофилне како би се лакше елиминисали из организма (Puyas и сар., 2014). Уједно, GSTs може да учествује у елиминацији и деградацији хипероксида у току оксидативног стреса (Wilkins и сар., 2014). GSTs су такође укључени у биосинтезу леукотриена, простагландина, стероидних хормона, тирозина.

GSTs су димери лоцирани претежно у цитосолу, али постоји и посебна класа ензима који су смештени у митохондријама где имају значајну улогу у регулацији одбране ћелије од оксидативног стреса, али и у регулацији апоптозе (Yeси сар., 2014).

Фамилија GSTs обухвата сложене и распрострањене ензими који су класификованина основу различитих критеријума, укључујући аминокиселине, нуклеотидне секвенце, имунолошке и кинетичке критеријуме (Mashiyama и сар., 2014). Свака подфамилија може да садржи високо хомогене полипептиде, који могу да деле више од 90% идентитета ензима. Аминокиселински остаци на позицијама 60 и 80 су слични у класама GSTs (Abdellaoui и сар., 2014). Различите структуре гена GSTs фамилије и њихове хромозомске локализације упућују на разноликост у величини интрона и егзона и на основу ових карактеристика су подељени на *alpha, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta* и *zeta* (Webb и сар., 1996; Licciardello и сар., 2014). Фамилија GSTs *kappa* припада митохондријалној GSTs и независна је група протеина, под називом MAPEG ("мембрана-асоцирани протеини укључени у еикосаноид и глутатион метаболизам") и то су мембранске компоненте микрозоме и митохондрија ћелија. Код сисара, GSTs су присутне у готово свим ткивима. Код људи, највиши ниво цитосолне GSTs активности је изражен у јетри, док бубрег, плућа, и црева имају ниже нивое активности.

Свака GSTs суб јединица се састоји од N-терминалног и C-терминалног домена. Овај последњи домен, који поседује  $\alpha$ -хеликс структуру, садржи део GSTs-везујућег места за везивање хидрофобних електрофила (*H-site*). N-терминални домен везује thioredoxin-like fold ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ ) који гради већи део *H-site*. Овај домен је прилично константан међу различитим класама GSTs за разлику од C-терминалног домена. Варијације у аминокиселинским хидрофобним остацима *H-site* чине подлогу селективности (Dourado и сар., 2008).

Резултати спроведених испитивања указују да ензими из групе GST имају имуномодулаторну улогу у транскрипцији цитокинских гена и у процесима пролиферације ћелија што може довести до неповољног одговора организма на патогене уколико постоји дефект у *GST* генима. Смањена активност GST утиче неповољно и на одговор ћелије на оксидативни стрес. Ензими GST су негативни модулатори стреса ћелија и апоптозе изазване лековима и токсинима кроз интеракцију са специфичним сигналним киназама. (Lu, 2014).

GSTP1-1 инхибира c-Jun N-terminal kinase (JNK) кроз директну интеракцију протеин-протеин. JNK је митоген-активирана протеин киназа (MAPK) укључена у ћелијску диференцијацију и пролиферацију, апоптозу и запаљење. Активиран JNK фосфорилише c-Jun, компоненту Активатор протеина-1 (AP-1), транскрипционог фактора. Ова активација изазива индукцију AP-1 - зависних циљних гена који доводе до ћелијске пролиферације или ћелијске смрти (Das и сар., 2009).

GSTP1-1 се повезује и са рецептором TNF, tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) и инхибира TRAF2 индуковану активацију JNK и p38- MAPK и тако блокира апоптозу (Nie Nie и сар., 2011).

Већина антиканцерских агенса индукује ћелијску смрт или апоптозу туморских ћелија активирањем MAPK путева, посебно оних који укључују JNK и p38- MAPK. Улога GSTP1-1 као ендогеног инхибитора JNK активације може инхибирати ове сигналне путеве. Зато, инхибиција GSTP1-1 обећава као стратегија за лечење канцера.

### 3.2.4 Интерлеукин 2 у патогенези DLBCL

Интерлеукин (*IL*) 2 је откривен 1976 као фактор раста Т-ћелије. *IL2* стварају антигеном активисане Т ћелије, делује аутокринно стимулишући Т ћелијску пролиферацију, и такође, потенцира раст и преживљавање CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Т регулаторних ћелија. Према томе, *IL2* је неопходан како за индукцију, тако и за регулацију имуног одговора, посредованог Т ћелијама. У одсуству *IL2* Т регулаторна ћелија не може да опстане. *IL2* делује на *IL2* рецептор који има три различите субјединице:  $\alpha$  (55 kDa),  $\beta$  (75 kDa) и  $\gamma$  (64 kDa). Протеолитичким цепањем  $\alpha$  субјединице настаје CD25 или *sIL2R* који се налази на мембрани CD4<sup>+</sup> Т регулаторних ћелија. Свака субјединица везује се за *IL2* са мањим (*IL2R $\alpha$* ) или интермедијалним (*IL2R $\beta$*  and  $\gamma$ ) афинитетом (Tsuji и сар., 2014, Fujiwara и сар., 2014). *IL2R $\alpha$*

се експримира на Т, Б и НК ћелијама и моноцитима, тако да само активирани Т и Б лимфоцити експримирају повећан ниво *sIL2* (Yamauchi и сар., 2012).

*IL2* је гликопротеин кога секретују Th1 ћелије које имају централну улогу у активирању Т ћелијама посредованих имуних одговора. Осим што стимулише пролиферацију и диференцијацију Т ћелија, стимулаторно делује и на пролиферацију и диференцијацију урођеноубилачких НК ћелија и Б лимфоцита. Уједно доприноси развоју регулаторних Т ћелија и регулише експанзију и апоптозу активираних Т ћелија (de Souza и сар., 2014,; Huang и сар., 2014).

Сва три ланца *IL2R* су експримирани на активираним Т ћелијама и регулаторним Т ћелијама и везују *IL2* са високим афинитетом. Везивање *IL2* за рецепторе доводи до активирања најмање три главна сигнална пута: фосфоинозитол 3-киназа (*PI3-K*) / *ACT*, Ras-МАРкиназа и ЈАК-STAT путеве са ЈАК1 и ЈАК3 (Wang и сар., 2014).

До сада објављени резултати указују да је ниво солубилног *sIL2R* (CD25) повећан у болесника са DLBCL и користи се као прогностички индикатор код овог типа лимфома. Матриксметалопротеиназе (MMPs), значајне у ширењу тумора, цепају *IL2R $\alpha$*  ланце на мембрани ћелија и доприносе повећању нивоа *sIL2* у DLBCL. Виши ниво *sIL2* у серуму оболелих од DLBCL повезан је са мањим терапијским одговором и лошијом прогнозом (Goto и сар., 2012).

ММР производе макрофаги, неутрофили и дендритске ћелије током запаљења и микротуморогенезе. Активност ММР је повећана у лимфомима као и број макрофага (Pennanen и сар., 2008). Повећан број макрофага у ткивима тумора је повезан са лошијом прогнозом у неким облицима лимфома. Уочен је значајно већи број макрофага у ткиву оболелих од DLBCL у поређењу са бројем макрофага у реактивно измењеним лимфним чворовима као и позитивна корелација нивоа *sIL-2* у серуму и броја макрофага у екстранодалним ткивима DLBCL (Gloghini и сар., 2013).

Недавно је, међутим, нађено да моноклонално антителио које реагује са *IL2* рецепторима на активираним Т ћелијама (анти-TAC) реагује и са одређеним туморским Б ћелија. Рекомбинантни *IL2*, изведен из *Escherichia coli* која експримира хумани ген, је у стању да промовише јаку

пролиферацију хуманих активираних Б ћелија. Осим тога, резултати учињених испитивања су показали да анти-ТАС антитела такође реагују са нормалним Б ћелијама активираним *Staphylococcus aureus*-омида инхибирају пролиферативни одговор таквих ћелија на *IL2*. Коначно, експерименти имунопреципитације су открили да анти-ТАС дефинишу сличне молекуле како на активираним Т тако и на Б ћелијама (Miyazaki и сар., 2010).

### 3.2.5 Интерлеукин 6 у патогенези DLBCL

Интерлеукин (IL)6 је мултифункционални цитокин који регулише имуни одговор, хематопоезу и акутни фазни одговор у инфламацији. Своје биолошке функције остварује преко два рецепторна молекула: IL6R рецептора (gp80, CD126) и gp130. Када се IL6 везује за mIL6R (membrane-bound form of IL6R), долази до хомодимеризације gp130 чиме се повећава афинитет за лиганд. Интересантно је и да се sIL6R (soluble form of IL6R) такође везује за IL6, и комплекс IL6-sIL6R може да формира комплекс са gp130. Хомодимеризација комплекса активира JAKs (Janus kinases) које фосфорилишу тирозинске остатке на цитоплазматској домени gp130. Тако се активирају два пута: први, gp130 Tyr759-SHP-2 (Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2)/ERK (extracellular-signal-regulated kinase) MAPK (mitogen-activated protein kinase) пут и други, gp130 YXXQ-JAK/STAT (signal transducer and activator of transcription) пут (Rose-John и сар., 2004).

Повећање нивоа IL6 је повезано са инфламацијом, аутоимуним обољењима и туморима. IL6 продукују Т и Б ћелије, моноцити, фибробласти, кератиноцити, ендотелне ћелије, мезангијалне ћелије, адипоцити и неке туморске ћелије. Рецептор IL6 (IL6R) је углавном дистрибуиран на хематопоеским ћелијама. Блокатор IL6R, TCZ (tocilizumab; хумано IL6R моноклонално антитело) примењује се у неким аутоимуним болестима и код тумора (Yoshimura и сар., 2009). У циркулацији се налази sgp130 (soluble gp130), који снажно инхибира комплекс IL6-sIL6R са мембранским gp130 (Jostock и сар., 2001).

Рецептор gp130 учествује и у сигналним путевима других цитокина и фактора раста, укључујући LIF (leukaemia inhibitory factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), IL11 и IL27 (Dillon, и сар., 2004). Са другим цитокинима, као што су IL3, IL5 и GM-CSF (granulocyte/macrophage

colony-stimulating factor) користи заједно  $\beta$  рецептор, а са IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 и IL21 користе заједно компоненте  $\gamma$  рецептора (Rochman и сар., 2009). Интерлеукин 6 рецептор, познат као CD126, је протеински комплекс који се састоји од IL6 рецептор субјединице  $\alpha$  - IL6R $\alpha$ , као и од интерлеукин 6 трансдуктор сигнала, гликопротеина 130 (познат као CD130), који дели са другим цитокинима, члановима IL6 фамилије (Heinricсар., 1998). Остали чланови фамилије IL6 су: IL11, IL27, цилијарни неутрофилни фактор (CNTF), кардиотрофин1 (СТ-1), кардиотрофину сличан цитокин (CLC), инхибициони фактор леукемије (LIF), онкостатинМ (OSM) и Капошијев сарком асоцирани херпес вирус (KSHV). Везивањем IL6 за његов рецептор се иницира каскада преноса сигнала преко Јанус киназе - ЈАК, као и везивањем STAT, транскрипционог фактора, посебно STAT3. Фосфорилисани STAT3 формира димер који у једру активира транскрипцију гена који садрже елементе STAT3 одговора. Мутације у Јанус кинази су главни молекуларни поремећаји у хематолошким малигнитетима код људи (Hirano и сар., 2000). Други пут преноса сигнала путем активације IL6R је Ras посредовани пут преноса сигнала. Он се одвија преко митогеном активираниог протеина – MAP киназе, који активира транскрипционе факторе као што су ELK-1 и NF-IL-6, који заједно са транскрипционим фактором AP-1 и фактором серумског одговора (SRF), регулишу низ комплексних промотора и енхансера да реагују на IL6 и друге сигналне факторе (Ichibaсар.,1998). Поред ЈАК/STAT и Ras/MAP путева преноса сигнала, IL6 активира PI3K и протеински комплекс NF-КарраВ (Chan и сар.,1997). PI3K/Акт/NF-Карра В каскада финално утиче на антиапоптоички ефекат IL6 који се приписује фосфорилацији BCL-2. IL6 такође блокира TGF $\beta$  индуковану активацију каспазе 3, која је од суштинског значаја за програмирану ћелијску смрт (Harrington и сар.,2008). Неуспела апоптоза је један од главних разлога настанка тумора и развоја аутоимунских болести, док нежељена апоптоза настаје код исхемија или Алзхеимер-ове болести.

IL6 има плејотропно дејство, може да делује про-инфламаторно и анти-инфламаторно, тј. Упално и анти-упално. Читав спектар различитих утицаја IL6 на разне ћелије указује на активност овог цитокина у регулацији имунског одговора и запаљењске реакције. Он такође иницира имунски одговор на трауму, посебно на опекотине, као и на неоплазије. И поред тога што спада у групу Th2 цитокина, IL6 подједнако помаже расти

нарочито диференцијацију Т и Б лимфоцита. IL6 не подстиче секрецију цитокина, али повећава осетљивост имунокомпетентних ћелија на друге цитокине, највероватније утицајем на број и афинитет цитокинских рецептора. Продукција и секреција IL6 се увек повећава у акутној фази запаљења, а његова улога као анти-упалног цитокина се огледа у његовом инхибиторном деловању на TNF $\alpha$  и IL1 и активацијском деловању на IL-1R $\alpha$  и IL10. Про-инфламаторна улога IL6 се огледа у промоцији Th17 диференцијације и инхибицији Т рег диференцијације, што указује да IL6 балансира између ове две популације ћелија и може ублажити симптоме аутоимунских болести.

IL6 повећава синтезу имуноглобулина IgM, IgG и IgA у Б-ћелијама путем повећања активности CD4<sup>+</sup> Т-ћелија и веће IL21 продукције. Анти IL6 антитело инхибира митогенима активiranу синтезу Ig без деловања на ћелијску пролиферацију (Dienz и сар., 2004).

IL6 стимулише Th ћелије и инхибира IL2 продукцију и индукцију Т регулаторних ћелија (Yoshida и сар., 2010).

Резултати више објављених студија указују да је ниво IL6 повишен код неких тумора и да је повезан са неповољном прогнозом код карцинома бубрега, јајника, простате, меланома, алиилимфома (Malinowska и сар., 2009; Ara, 2010). Активирањем ERK1/2, IL6 стимулише не само пролиферацију тумора већ промовише метастазирање, опште симптоме и кахексију код тумора (Dutt, 2009).

Добро је познато да је IL6 главни фактор раста туморских мијеломских ћелија (Kawano и сар. 2000). Биолошка улога IL6 у хуманој Б-ћелијској туморогенези испитивана је на EBV-ом трансформисаним Б-лимфобластима у које је убачен трансфекцијом хумани IL6 ген. Конститутивна експресија IL6 у ћелијама миша је изазвала малигну трансформацију Б-ћелија у условима имунодефицијенције (Ghesquière и сар., 2013).

### 3.2.6 CD14 у патогенези DLBCL

Молекул CD14 је испољен на моноцитима, макрофазима, гранулоцитима и дендритичним ћелијама. Делује као корецептор за бактеријске липополисахариде (LPS). Има улогу у активацији макрофага индуковану LPS. CD14 ћелије имају улогу у стимулацији Т и Б-ћелијске



пролиферације. Утицај CD14 моноцитана Б-ћелијски одговори де посредно активацијом антиген специфичних Т ћелија који доприносе формирању CD40 лиганда на Б ћелијама. Активирани CD40 лигандом, CD14 моноцити могу директно да утичу на Б ћелије и ослобађају цитокине, IL10 који уз сарадњи с aIL2 стимулише пролиферацију Б ћелија (Bergtold и сар., 2005).

BAFF (B cell-activating factor), цитокин из TNF фамилије везује се за CD40L, и стимулише Б ћелијску пролиферацију. Иначе је експримиран на DC, моноцитима и макрофагима (Nardelli и сар., 2001). BAFF спречава апоптозу Б-ћелија.

У туморским ћелијама лимфома експримирана су 3 рецептора: BAFF или APRIL (a proliferation-inducing ligand), који су названи BAFF-R, Б-ћелијски антиген сазревања (BCMA), трансмембрански активатор, калцијум модулатори циклофилин лигандинте реактор (TACI) (Pelekanou и сар., 2013). BAFF и APRIL су експримирани у DLBCL на моноцитима или Б-ћелијама (Maskau и сар., 2004). У ткиву DLBCL је запажен повећан број CD14+ моноцита који продукују активаторе Б-ћелија и тако подржавају развој туморских ћелија и погоршавају прогнозу (Chris и сар., 2007).

Имајући у виду наведено, присуство CD14+ моноцита и BAFF рецептора подржава пролиферацију и преживљавање Б-ћелија у DLBCL. Многе студије су показале да присуство повећаног броја CD14+ моноцита у инфилтрату DLBCL је повезано и са појачаном секрецијом CCL5 (C-C chemokine ligand 5) који привлачи моноците из крви у тумор (Zhang и сар., 2009). CCL5 је иначе хемокин кога продукују моноцити, Т лимфоцити, тромбоцити, туморске ћелије и друге ћелије и главна је мета NF-κB пута активације.

Полиморфизаму BAFF генима или генима његових рецептора играју значајну улогу у лимфогенези, тако да се све више разматра примена инхибитора овог фактора у терапији лимфома (Pelekanou и сар., 2013).

Испитивањем културе Б ћелија у ткиву DLBCL запажено је да су CD14+ моноцити изузетно ефикасни у активацији Б-ћелија које су активирани са анти-BCR/анти-CD40/IL2 терапијом. У стромалном ткиву тумора доказано је присуство CD14+ моноцита. Култивисање ћелија лимфома без моноцита и егзогеног BAFF/IL2 је доводило до пропадања туморских ћелија и додавање само цитокина није могло да опорави туморске ћелије, што

потврђује значај CD14+ моноцита у генези лимфома (Venkatesan, 2014). Показана је повишена експресија CCL5 у ћелијама DLBCL али само у културама ћелија у којима се налазе моноцитни цитокини. Овај хемокин даље привлачи моноците и Т ћелије чиме се у DLBCL подржава лимфогенеза (Yano и сар., 2014).

### 3.2.7 Полиморфизми у генима за цитокине

Цитокини и њихови рецептори су веома полиморфни (Haukim, и сар., 2002). Бројне до сада објављене асоцијационе студије истраживале су удруженост полиморфизама у генима за различите цитокине са ризиком за настанак или прогнозу различитих хематолошких оболења, укључујући и DLBCL. Обзиром на различите технике и методе примењиване у овим студијама, и даље постоје контраверзе у погледу стварног функционалног значаја SNP у генима за цитокине и њихов утицај на појаву или клинички ток лимфома (Smith and Humphries, 2009).

### 3.2.8 Генски полиморфизам IL6

Један од најчешће испитиваних гена у погледу функционалности је ген за IL6, и нешто мање, ген за IL6R. Ген за IL-6 се налази на кратком краку хромозома 7(7p21) и у геному човека заузима 1.125 bp. Састоји се од пет егзона и четири интрона. До данас је познато 147 полиморфизама у овом гену. Унутар егзона описана су 54 полиморфизама, и то 37 у кодирајућем подручју, 12 испред и 5 иза кодирајућег подручја. Најчешћа до сада испитивања су обухватала 4 SNP у промотер региону *IL6* у позицији -597 (G/A), -572(G/C), -373(A/G), и -174(G/C).

Најчешће је предмет досадашњег истраживања обухватао полиморфизме у *IL6* гену који се налазе у промотер региону гена, и то најчешће, SNP кластер ID броја (rs) 1800795 (-174G/C). Студије на анималним моделима су показале 2.4-3.6 пута пораст у експресији повезан са G алелом -174 *IL6* SNP, ипак, друге *in vivo* и *in vitro* студије нису биле успешне да прикажу удруженост алела и њихове активности. Могуће да SNP смештени у дисталном промотер региону могу бити одговорни за већину функционалних варијанти у *IL6* гену (Smith, и сар., 2012).

Повишена концентрација IL6 је повезана са лошијом стопом одговора и прогнозом код оболелих од хроничних лимфопрлиферативних оболења као што су хронична лимфоцитна леукемија, Хочкинови и NHL. Giachelia

са сарадницима је показала да су резултати оболелих од DLBCL лечених ритуксимабом били повезани са нивоом *IL6*. Иста студија међутим, није потврдила генотипску-фенотипску повезаност између нивоа *IL6* и *IL6 rs 1800795 SNP (-174 G/C)* (Giachelia и сар., 2012).

### 3.2.9 Генски полиморфизам *IL2*

Ген за *IL2* се налази на хуманом хромозону 4q. Два полиморфизма, *-330T/G* и *+114T/G*, идентификована су у *IL2* гену, први у региону промотера на позицијина *-330* (John и сар., 1998), и други у првом ексону на позицији *+114* (Matesanz и сар., 2000). Објављени резултати истраживања показали су да *G* алелска варијанта на позицији *-330T/G* је била удружена са смањеном продукцијом *IL2 in vivo* (Hoffman 2001, Matesanz 2004), и исто тако повезана са различитим болестима и карциномима, укључујући атрофични гастритис, реуматоидни артритис, карцином желуца и лимфомима (Zhao and Wang, 2015; Shin и сар., 2008; Wu и сар., 2009).

Механизам којим полиморфизам *IL2* гена на позицији *-330T / G* утиче на појаву NHL није у потпуности јасан. Са једне стране, *IL2* је укључен у диференцијацију Б ћелија, и на другој страни, *IL2* промовише експресију и повећава интринзичну цитотоксичност НК ћелија (Meropol и сар., 1998; Einsebes и сар., 2004). Познато је да НК ћелије посредују у антителима-зависној ћелијској цитотоксичности (ADCC) путем експресије активирајућег рецептора за Fc део IgG антитела (Cooper и сар., 2001a). Могуће да смањени ниво *IL-2* повезан са генским полиморфизмом *IL2* гена може умањити антитуморски одговор путем ADCC код болесника са NHL-ом и, стога, повећати осетљивост на појаву NHL.

### 3.2.10 Генски полиморфизми GST

Ови ензими су производи више гена који се могу сврстати у најмање четири еволуционе класе. Гени који кодирају сваку класу групишу се на различитим хромозомима. Заступљеност различитих класа GST је индивидуална, уочен је недостатак *mu* класе GST1 изоензима у свим расним групама (Sheehan и сар., 2001) и настаје због делеције *GST1* гена.

Постоји кластер од 5 *GSTA* гена који је лоциран на хромозому 12; кластер од 5 *GSTM* гена на 1p13; два *GST-omega* гена на 10q25.1; *GSTP1* на 11q13q; два *GST-theta* гена на 22q11.2; и један ен *GSTZ1* на 14q24.3. Псеудо гени су нађени на различитим хромозомским локацијама од кластера

функционалних гена од којих су псеудогени настали (Townsend и сар., 2005).

Генски полиморфизам у ензимској групи GST је повезан са ризиком од многих малигних болести, као што су злоћудне болести плућа, бешике, дебелог црева, али и лимфома (Zhang и сар., 2012). Ова фамилија ензима је неопходна за детоксикацију цитостатика или њихових метаболита. Њихова детоксикациона активност је кротијална за ефикасност и токсичност циклофосаида и доксорубицина, који су основни цитостатици за лечење лимфома, и садржани у стандардном СНОР протоколу (Falduto, и сар., 2017).

Бројни полиморфизми постоје у генима за GST. *GSTM1* и *GSTT1* гени, припадници GST супер фамилије, приказују се у две алелске варијанте, првој са хомозиготном делецијом, *null* генотип, који је повезан са потпуним изостанком функционалног GST ензима и *positive* алелска варијанта која кодира функционални *GSTM1* или *GSTT1* ензим (Hayes и сар., 1995; Pemble, и сар., 1994; Hayes и сар., 2005).

До сада су спроведене бројне асоцијационе студије које су истраживале повезаност полиморфизама *GSTM1* и *GSTT1* гена и ризика од настанка болести, њихов утицај на резултате лечења новодијагностикованих болесника са DLBCL и токсичне ефекте терапије. Обзиром на биолошку функцију GST, многе епидемиолошких студија су истраживале удружено дејство *GSTM1* и *GSTT1* полиморфизама на исход болесника са DLBCL (Ribrag, и сар., 2003; Cho, и сар., 2010; Yri, и сар., 2013; Yang, и сар., 2014). Међутим, резултати различитих студија су донекле дивергентни, што се може преписати различитим ограничењима између студија, као што је различито етничко порекло оболелих, протоколи и фазе лечења, као и различито дизајниране студије (Chin, и сар., 2005; Yang и сар., 2014).

Присуство високе активности GST може да допринесе ефикаснијој детоксикацији хемијских канцерогена изаштите ткива од оштећења ДНА (Yang и сар., 2014). Појединци са *null* генотипом *GSTM1* или *GSTT1* неефикасно елиминишу електрофилне канцерогене, што може да повећа ризик од соматских мутација које доводе до формирања тумора. Такође, показано је да *null* генотип повећава ризик од DLBCL скоро 4 пута у особа мушког пола (Yang и сар., 2014).

Показано је да прекомерна ензимска експресија GST, нарочито GSTP1-1 је удружена са природном и стеченом резистенцијом на разне структурно несродне антиканцерогене лекове (Ruzza и сар., 2009).

### 3.2.11 Генски полиморфизам CD14

CD14 молекула се експримира на површини моноцита, макрофага, неутрофила и дендритичних ћелијама у форми везан за површину мембране, али такође, постоји и у облику солубилног протеина. Он има улогу корцептора за бактериски липополисахарид (LPS). Солубилни CD14 може да мења одговор целуларног и хуморалног имунитета директном интеракцијом са Т и В лимфоцитима. Повишене вредности солубилног CD14 су нађене у тешким облицима инфекција и инфламаторним болестима, али и такође у болесника са NHL (Baseggio и сар., 2001).

*CD14* се налази у региону хромозома 5 (5q31.1) који садржи кластере гена који кодирају многе мијелоидне факторе раста. До данас је откривено више полиморфних региона у *CD14* гену, један од њих, *CD14-159C/T* (rs2569190) се налази у промотор региону гена у позицији-159 од стартног места транскрипције, и најчешће је анализиран у асоцијационим студијама. Досадашња испитивања су показала да се ради о функционалном полиморфизму, односно да је присуство *T* алела повезано са већим нивоом солубилног CD14 (LeVan и сар., 2001). Показано је да *CD14-159C/T* SNP може бити повезан са развојем карцинома желуца у појединаца са *H. pylori* инфекцијом (Wang и сар., 2014), гастричним MALT лимфомом (Ture-Ozdemir и сар., 2008) и са појавом Хочкиновог лимфома у деце (Andrie и сар., 2009.)

## 4. КЛАСИФИКАЦИЈА DLBCL

Због дифузног раста малигних В ћелија које мењају нормалну архитектуру оболелог лимфоног чвора, према REAL класификацији из 1994. године, по први пут су названи DLBCL. Стални напретци у цитогенетским и молекуларним студијама допринели су да је последних више од двадесет година класификација NHL претрпела многе измене. Од 2016. године у употреби је нова, ревидирана класификација тумора лимфоног ткива Светске здравствене организације (WHO) (Swerdlow, и сар., 2016).

**Табела 1. Класификација DLBCL према WHO класификације из 2008.**

<p><b>Морфолошки типови</b></p> <p>A. Центробластни</p> <p>B. Имунобластни</p> <p>C. анапластични</p> <p><b>Остали</b></p> <p>I. Т-ћелијски богат хистиоцитима</p> <p>II. Лимфоматоидна грануломатоза</p> <p>III. плазмобластични</p> <p>IV. DLBCL удружен са EBV</p> <p>V. DLBCL удружен са хроничном инфламацијом</p> <p>VI. DLBCL коже доњих екстремитета</p> <p>VII. Примарни DLBCL ЦНС</p> <p>VIII. DLBCL траије животне доби</p> <p><b>DLBCL субтипови</b></p> <p>a) медијастинални</p> <p>b) примарни ефузиони лимфом</p> <p>c) интраваскуларни</p> <p><b>COO класификација</b></p> <p>1) GCB DLBCL</p> <p>2) ABC DLBCL</p> <p>3) PMBL</p>
---

## 5. ДИЈАГНОСТИКА DLBCL

Дијагноза болести је заснована на патохистолошкој анализи туморског ткива са имунохистохемијском обрадом ткива. Данас се рутински препоручује употреба FISH анализе у детекцији MYC и Bcl-2 експресије (Swerdlow и сар., 2016).

### 5.1 Имунохистохемијске анализе

Туморске ћелије у DLBCL експримирају Б-ћелијске антигене (CD19, CD20, CD22, CD79а, PAX5). Површни имуноглобулини (IgM>IgG>IgA) су присутни у 50-75% случајева. Други маркери који се користе у дијагнози и субтипизацији DLBCL су :CD10, Bcl-6, Bcl-2, CD43, CD30, IRF4/MUM1, CD138, MYC, Cyclin D1, EBV, Ki67. Аберантни фенотипови нису неуобичајени у DLBCL, а могу бити одговорни за конфузију у

дијагностици. У неким случајевима, губитак једног или више Б фенотипских маркера је могућ. Око 10% DLBCL испољава CD5 позитивност.

Cyclin D1+, CD5 негативни DLBCL немају карактеристичну t (11; 14) али могу имати додатне копије CCND1/c хромозома 11.18. Такође, за разлику од већине мантлећелијских лимфома (MCL), CyclinD1+ случајеви DLBCL су негативни заSOX11 (Juskevicius и сар., 2014).

Генетске карактеристике као што је реаранжман Bcl-2 је присутан у 20% случајева, реаранжман у Bcl-6 у 30%, мутације Bcl-6 у 70% и реаранжмани MYC у 10% случајева (Ozbalak , 2013).

У неким случајевима, могу постојати аберантне карактеристике фенотипа које је тешко повезати са DLBCL, тако да DLBCL могу делити фенотипске и хистолошке карактеристике са другим лимфомима, највероватније због заједничких патогених путева, као што су лимфоми"сиве зоне" (Tsuji и сар., 2014).

### **5.2 Клиничке карактеристике болести**

Клиничка хетерогеност је значајна одлика DLBCL. Најчешће клиничке манифестације болести су безболно увећани лимфни нодуси, неспецифични знаци системске болести и увећање паренхимних органа и инфилтрованих лимфомом. Екстранодална форма болести се последњих деценија појављује чешће и налази се у око 40% DLBCL (Swerdlow и сар., 2016). Болест може изоловано захватати тонзиле, централни нервни систем, желудац, кости и остала екстранодална места. Током напредовања болести инфилтрација захвата многе органе а посебно јетру, кожу и мозак.

Симптоми су неспецифични и подразумевају фебрилност, анорексију, губитак у телесној маси, ноћно презнојавање.

### **5.3 Лабораторијска и рентгенолошка дијагностика**

Поред лабораторијских (комплетна крвна слика, седиментација, С-реактивни протеин, биохемијски параметри, LDH, имуноглобулини) и вирусолошких анализа, у циљу процене проширености болести спроводе се различите неинвазивне (ултрасонографија, компјутеризована томографија, магнетна резонанца) и инвазивне технике (ендоскопска експлорација гастро и респираторног тракта, анализа ликвора, биопсија

коштане сржи) за дијагностиковање DLBCL. Последњих десетак година користе се и напредније технике коа што је FDG-PET-CT (engl. Fluorine-18-Deoxyglucose Positron Emission Tomography with CT).

У циљу процене проширености болести у употреби је систем стејжирања по AnnArbor класификацији.

## 6. ТЕРАПИЈСКИ ПОТЕНЦИЈАЛИ DLBCL

DLBCL је агресивни лимфом који уколико се не лечи, медијана преживљавања износи мање од 1 године. Алгоритми лечења се дефинишу према степену проширености болести, Интернационалном прогностичком индексу (IPI), старосној доби оболелог и присутним коморбидитетима(Tilly H, Dreyling M, ESMO Guidelines Working Group.). Успешна терапија се спроводи антинеопластичним лековима али и потпорним лечењем које сузбија компликације лимфома и нежељене реакције хемотерапије.

Ритуксимаб је револуционарна терапијска стратегија код DLBCL и примењује се од 1997. године. Поседује неколико механизма антитуморског дејства: везујући се на CD20 антиген који је заступљен у великој концентрацији на површинама нормалних и неопластичних Б ћелија доводи до комплементом индуковане лизе и фагоцитозе, покреће од антитела зависну ћелијску цитотоксичност (ADCC) и индукује секундарну имунуреакцију (Pelekanou и сар., 2014). Последњих година се све више истражује и улога других анти 20, као што су обинутузумаб и офатумумаб.

Код тек откривеног DLBCL, стандардна прва линија је комбинована хемиотерапија по СНОР (циклофосфамид, доксорубицин, винкрестин, преднизон) протоколу. Увођење ритуксимаба, моноклонског антиCD20 уз СНОР терапију допринело је значајно бољем терапијском одговору, продужењу времена до прогресије болести (eng. progression free survival, PFS) и укупном преживљавању(eng. overall survival, OS) болесника са DLBCL. Радиотерапија се примењује у локализованој болести или устањима резидуалне болести након хемиотерапије.

Упркос напретку терапије DLBCL, око 40% болесника је резистентно на терапију прве линије или ће обновити болест након претходне комплетне ремисије. У лечењу резистентне/релапсирајуће болести, примењују се агресивни комбиновани хемиотерапијски протоколи укључујући и



трансплантацију матичних крвних ћелија(Cerchiatti and Leonard, 2013; Nagle, и сар., 2013).

## 7. ПРОГНОСТИЧКИ ИНДИКАТОРИ DLBCL

DLBCL је агресивни лимфом са веома хетерогеном прогнозом. У циљу процене проширености болести и одлуке о терапији прилагођеној њеној агресивности, у оболелих од DLBCL се користе бројни прогностички параметри базирани на клиничким, имунохистохемијским и цитогенетским, односно молекуларним маркерима болести.

### 7.1. Интернационални прогностички индекс

Интернационални прогностички индекс IPI (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993) базиран је на лако доступним клиничким параметрима и најчешће се користи у клиничкој пракси за стратификацију болесника у четири групе ризика. У склопу IPI користи се пет клиничких карактеристика болести који одражавају агресивност лимфома (Ann Arbor клинички стадијум болести, ниво лактичне дехидрогеназе у серуму, број оболелих екстранодалних регија), реакцију оболелог на болест ECOG перформанс статус (Eastern Cooperative Oncology Group) и способност оболелог да толерише примењену терапију (старосна доб оболелог).

Како се прогноза оболелих разликује према старосној доби, користи се и Интернационални прогностички индекс за оболеле млађе 60 година, тз. аа IPI(age adjusted IPI). Са овим моделом, базираним на клиничком стадијуму, лактичној дехидрогенази и перформанс статусу, болесници се стратификују у 4 прогностичке групе (Табела бр. 2)

Ризична група	IPI score	Процент пацијената	5-годишња OS стопа	Стопа комплетних одговора
Низак	0	22%	83%	92%
Средње низак	1	32%	69%	78%
Високо средњи	2	32%	46%	57%
Високи	3	14%	32%	46%

### Ревидирани IPI (R-IPI) (2005)

Ревидиран Интернационални прогностички индекс (R-IPI) је развијен као модел за предвиђање исхода у болесника који примају терапију базирану на ритуксимабу са хемиотерапијом. Базиран је на истим клиничким карактеристикама које се користе у стандардном IPI, али категорише болеснике у 3 прогностичке групе (Табела бр. 3).

Ризична група	Број IPI фактора	Процент пацијената	4-годишњи PFS	4-годишња OS стопа
Врло добар	0	10%	94%	94%
Добар	1,2	45%	80%	79%
Лош	3,4,5	45%	53%	55%

### 7.2 Имунофенотип као прогностички параметар болести

Имунохистохемијски параметри, експресија bcl-2, X везаних инхибитора апоптозе, CD5, FOXP I, PСbeta, ICAM 1, HLA DR, c-FLIP, повезују се са лошијом прогнозом, док експресија bcl-6, CD10 и LMO 2 са повољним исходом (Swerdlow и сар., 2016; Stein и сар., 2008).

COO (the cell of origin classification system) је развијени систем хистолошке класификације који дели DLBCL у субтипове GCB DLBCL, ABC DLBCL и PMBL, и значајан је за прогностичку процену болести. Овај систем примењује имунохистохемијски метод ТМА (method utilizes immunoperoxidase tissue microarrays). GCB DLBCL субтип је повезан са бољом прогнозом (Bohers и сар., 2014). Резултати објављених студија показују да је петогодишње преживљавање код ABC DLBCL 15-30%, код GCB DLBCL 65-76%, а код PMBL 65% (Bohers и сар., 2014).

## II ДЕФИНИЦИЈА ПРОБЛЕМА И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

DLBCL је најчешћи Б-ћелијски лимфом са учесталошћу појаве у око 30%. Припадају агресивним неоплазмама лимфног ткива и карактеришу се веома хетерогеном клиничком сликом, одговором на терапију и преживљавањем. У основи ове разноликости се налази комплексна биологија тумора.

Премда је болест сензитивна на терапију, ипак, 30-40% оболелих неће постићи излечење са стандардном R-CHOP терапијом, или ће по постизању ремисије обновити болест, односно релапсирати. Међутим, најмање 30% њих неће одговорити ни на другу терапијску линију, укључујући и аутологу трансплантацију МСН. Очекивано преживљавање болесника који релапсирају након аутологе трансплантације МСН је око 9 месеци (Nagle, и сар. 2013).

У клиничкој пракси користе се различити прогностички параметри базирани углавном на клиничким карактеристикама болести и на патохистолошкој анализи тумора. Међутим, иако корисни за одлуку о терапији, ипак нису довољни да предвиде индивидуалну ефикасност и токсичност за сваког појединачног болесника са DLBCL, обично доводећи до различитих резултата чак и у условима сличног клиничког стадијума и патохистолошког типа болести.

Запажена чешћа појава лимфома у појединим породицама које су изложене истим условима животне средине и навикама, допринела је да је последњих готово двадесетак година значајно повећано интересовање за истраживање генетских варијанти, полиморфизама гена, како у погледу ризика за настанак болести, тако и у погледу њихове повезаности са клиничком сликом болести или пак одговором на стандардну CHOP терапију са ритуксимабом.

Генски полиморфизми представљају варијације у секвенци DNA (Robert, и сар. 2014) које се у општој популацији појављују са учесталошћу већом од 1%, и доводе до промена у експресији, структури и активности протеина који је производ гена. Имајући у виду патогенезу DLBCL и различит терапијски одговор на исту R-CHOP терапију, посебном интересовању изложени су полиморфизми у генима који генеришу и контролишу имунски одговор. Другу циљну групу од интереса чине полиморфизми у

генима који контролишу ензимске процесе и метаболизам бројних канцерогена, укључујући и хемиотерапијске агенсе који су саставни део R-CHOP протокола.

Више студија се бавило истраживањима повезаности полиморфизама у генима чији производи контролишу имуни одговор и инфламацију са ризиком за настанак NHL, укључујући и DLBCL (Rothman, и сар., 2006; Purdue, и сар. 2007; Wang, и сар., 2007; Thunberg, и сар., 2010; Skibola, и сар., 2010). Објављени резултати бројних студија су указали на могућу удруженост полиморфизама, како у генима за цитокине, тако и у генима укљученим у метаболизам различитих канцерогених супстанци са ризиком за настанак лимфома, као и њихову потенцијалну повезаност са клиничким карактеристикама и резултатима лечења оболелих од лимфома, укључујући DLBCL (Rothman, и сар., 2006; Purdue, и сар. 2007; Aschebrook-Kilfoy, и сар., 2012; Cho, и сар., 2010). Међутим, резултати наведених студија нису били конзистентни, како у погледу удружености полиморфизама гена са ризиком за настанак болести, тако и у погледу њиховог утицаја на клиничке карактеристике и прогнозу оболелих од DLBCL.

Како је примарни циљ у лечењу оболелих од DLBCL постизање комплетне клиничке ремисије и излечење болести, важно је у време дијагнозе стратификовати болеснике у групе ризика и применити терапију прилагођену њеној агресивности. Иако се у клиничкој пракси употребљавају бројни прогностички параметри базирани на клиничким, патохистолоским и цитогенетским обележјима, ни један није показао да у потпуности корелира са преживљавањем оболелих од DLBCL.

Нова сазнања о удружености полиморфизама гена са исходом лечења оболелих од DLBCL могу да допринесу бољој процени ефикасности и токсичности појединих лекова и пруже могућност примене терапије прилагођене поједином болеснику у зависности од порекла и поднебља.

### **1 ХИПОТЕЗА**

На основу досадашњих сазнања из литературе у којима није јасно дефинисана повезаност полиморфизма у генима који контролишу имунске процесе и метаболизам хемијских агенаса са клиничким карактеристикама и прогнозом оболелих од DLBCL, постављена је следећа радна хипотезе:

Присуство полиморфизама у генима за *GST*, *IL2*, *IL6* и *CD14* у болесника са *DLBCL* је удружено са клиничким карактеристикама, резултатима лечења и прогнозом оболелих.

## 2 ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Да бисмо проверили хипотезу постављени су следећи циљеви:

- Испитати учесталост полиморфизама у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2* -330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T код болесника са *DLBCL*.
- Код болесника са *DLBCL* испитати постојање повезаности између полиморфизама у генима за *GST*(*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2* -330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T и клиничких карактеристика болести.
- Истражити удруженост полиморфизама у генима за *GST*(*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2*-330T/G, *IL6* -597G/A и *CD14* -159C/T са одговором на терапију, током и исходом лечења у оболелих од *DLBC*

## III ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДОЛОГИЈА РАДА

### 1 Испитаници

Ово истраживање је обухватило 156 болесника са *DLBCL*. Клинички подаци о болесницима са *DLBCL* су приказани у табели 4.

<b>Карактеристике болесника/DLBCL (n=156)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Жене</b>	81 (51.9)
<b>Мушкарци</b>	75 (48.1)
<b>≤60 година</b>	106 (67.9)
<b>&gt;60 година</b>	50 (32.1)
<b>IPI 0, 1, 2</b>	104 (66.7)
<b>IPI 3, 4, 5</b>	52 (33.3)
<b>Клинички стадијум I/II</b>	80 (51.3)
<b>Клинички стадијум III/IV</b>	76 (48.7)
<b>Присуство екстранодалне болести</b>	102 (65.4)
<b>Одсуство екстранодалне болести</b>	54 (34.6)
<b>Туморски облик болести (<i>Bulky disease</i>)</b>	68 (43.6)
<b>Није присутан туморски облик болести</b>	88 (56.4)
<b>Апсолутни број лимфоцита <sup>a</sup></b>	
<b>&lt;1220/mm<sup>3</sup></b>	73 (50)
<b>≥1220/mm<sup>3</sup></b>	73 (50)
<b>Апс. бр. лимфоцита/апс. бр. моноцита <sup>a</sup></b>	
<b>&lt;2870/mm<sup>3</sup></b>	88 (60)
<b>≥2870/mm<sup>3</sup></b>	58 (40)
<b>Одговор на терапију</b>	
<b>комплетна клиничка ремисија</b>	92 (59.0)
<b>парцијална ремисија</b>	37 (23.7)

прогресија болести током терапије 27 (17.3)

Релапс 37 (28.6)

---

Према детерминисаним прогностичким параметрима болесници су подељени у две прогностичке групе :

1. група болесника са дефинисаним параметрима лоше прогнозе:

- животна доб већа 60 година

- *Ann Arbor* клинички стадијум (CS) III-IV

- IPI скор 3-5

- туморски облик болести дефинисан величином патолошког периферног лимфног чвора већег од 7 цм или туморским обликом болести медијастинума дефинисаног као попречни промер медијастиналне туморске масе већи од 1/3 промера грудног коша

- присуство општих тегоба при дијагнози болести ( презнојавање, губитак у телесној тежини, повишена телесна температура)

- присуство екстранодалне болести у > 1 локализације

2. група болесника без параметара лоше прогнозе

У истраживање су укључени болесници код којих је дијагноза, лечење и систематско праћење спровођено у Клиници за хематологију ВМА у периоду од маја 2005 год до децембра 2014.

Из испитивања су искључени болесници: 1) са претходном дијагнозом нискоагресивног лимфома који је трансформисао у DLBCL, 2) болесници са удруженим вирусом имунодефицијенције (HIV) и DLBCL, и 3) болесници са системском болести везивног ткива и DLBCL.

У истраживање су укључени болесници код којих је уводна терапија била *rituximab* (R)-CHOP (*ciklophosphamide, adriamycin, vincristin, pronizon*) протокол (6-8 циклуса). Радиотерапија у дози од 30-36 Gy је спроведена у болесника који су у време дијагнозе имали одлике туморског раста

болести или су задржавали локално резидуалну болест по спроведеном лечењу.

Сви болесници или чланови њихове уже породице су потписали пристанак за ово истраживање, након чега је добијена и сагласност Етичког комитета ВМА (од 18.05.2010, ВМА/06-10/А.2).

## 2 Методологија рада

Дијагноза болести је постављена у складу са критеријумима за класификацију тумора лимфног ткива Светске здравствене организације из 2008. године на основу патохистолошке анализе патолошког лимфног чвора или екстралимфатичне туморске промене са имунохистохемијском обрадом ткива (Swerdlow, и сар., 2008). Код болесника код којих је дијагноза DLBCL постављена пре 2008 године спроведена је патохистолошка ревизија тумора са додатном имунохистохемијом.

Анамнеза је подразумевала присуство општих тегоба (повишена телесна температура, присутно презнојавање и губитак у телесној тежини) и податак о придруженим болестима, породичној анамнези са посебним освртом на присуство малигних болести лимфног ткива у најближих сродника.

У клиничком налазу су се пратиле периферне лимфне жлезде, величина јетре и слезине, промене на кожи или поткожном ткиву и неуролошки налаз.

У свих болесника су спроведена стандардна хематолошка (крвна слика са размазом периферне крви), биохемијска (параметри бубрежне функције, гликемија, укупни билирубин, укупни протеини, електролити, ензими јетре, лактична дехидрогеназа, алкална фосфатаза), имунолошка (имуноглобулини, електрофореза протеина серума, Coombsov тест) и вирусолошка испитивања (HBV, HCV, HIV, EBV, CMV).

У циљу процене проширености болести спровођена су комплексна радиолошка дијагностика (RTG срца и плућа, компјутеризована томографија грудног коша, трбуха и мале карлице, централног нервног система), у случају екстралимфатичних манифестација ендоскопска испитивања као што су гастроскопија, колоноскопија, бронхоскопија, анализа ликвора и биопсија коштане сржи.



Клинички стадијум болести (*CSI-IV*) одређиван је према *AnnArbor* класификацији (Carbone, и сар., 1971), а опште тегобе, ткз. Б симптоми на основу присуства повишене телесне температуре, губитка у телесној тежини за више од 10% у последњих 6 месеци и присутног ноћног презнојавања. Туморски облик болести смо дефинисали према уздужном промеру патолошке промене (лимфни чвор и/или екстралимфатична промена) која је већа од 7 цм и /или према попречном промеру средогруђа који је био већи од трећине укупног попречног промера грудног коша. Интернационални прогностички индекс (IPI скор) је одређиван на основу пет установљених параметара: животна доб, *AnnArborCS*, ниво лактичне дехидрогеназе у крви, перформанс *ECOG* (*Eastern Cooperative Oncology Group*) статус и више од једног захваћеног екстралимфатичног органа према критеријумима *Shipp*-аи сарадника из 1993 године.

Процена клиничког одговора базирана је према установљеним критеријумима *Cheson* и сарадника из 2007 године (*Cheson*, и сар., 2007).

Наведена клиничка испитивања спроведена су у Централној клиничко-биохемијској лабораторији у ВМА, Институту за радиологију и радиотерапију ВМА и Институту за патологију ВМА. Анализе полиморфности гена спроведене су у Институту за молекуларна и експериментална истраживања ВМА.

### **3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО ИСТРАЖИВАЊА**

#### **3.1 КОРИШЋЕНЕ ХЕМИКАЛИЈЕ**

Током израде експерименталног дела овог рада коришћене су следеће хемикалије:

- 2 x PCR Master Mix ( Qiagen, Немачка)
- Агароза (Serva, Немачка)
- Акриламид (Bio-Rad Laboratories, САД)
- Амонијум-персулфат (Bio-Rad Laboratories, САД)
- Азотна киселина ( Merck, Немачка)
- Бис-акриламид (Serva, Немачка)
- Борна киселина (Sigma, САД)
- Бром-фенол плаво (Serva, Немачка)

- EDTA (Bio-Rad Laboratories, САД)
- Етанол (Зорка, Србија)
- Етидијум-бромид (Serva, Немачка)
- Фикол 400 (Pharmacia LKB, Шведска)
- Формалдехид (Алкалоид, Македонија)
- Ксенил-цијанол ( Bio-Rad Laboratories, САД)
- Маркер молекуларне тежине DNK- O'RangeRuler™ DNA Ladders
- Натријум-карбонат (Serva, Немачка)
- Прајмери за PCR (Metabion, Немачка)
- Сирћетна киселина (Зорка, Србија)
- Сребро-нитрат (Serva, Немачка)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, САД)
- TaqMan R SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, САД)
- TEMED (Bio-Rad Laboratories, САД)
- Трис-база (Serva, Немачка)
- Трис- Cl (Serva, Немачка)

### 3.2 ИЗОЛАЦИЈА ДНК

Периферна крв болесника са DLBCL је узимана у епрувете са EDTA и чувана на  $-40^{\circ}\text{C}$  до изоловања ДНК. ДНК је изолована помоћу комерцијалног кита - PureLink™ Genomic DNA MiniKit (Invitrogen, Carlsbad, САД), према упутству произвођача.

Квалитет изоловане геномске DNA је провераван помоћу електрофорезе на 1% агарозном гелу. Агароза у праху је растварана у 0,5 x TBE пуферу (4.5 mM Tris-baza, 10 mM EDTA, 87 mM борма киселина; pH=8) до кључања. У раствор охлађен до  $70^{\circ}\text{C}$  је додаван етидијум-бромид у финалној концентрацији од  $5\mu\text{g/ml}$ . Гел ( $t \approx 60^{\circ}\text{C}$ ) је изливан у кадицу за електрофорезу и остављен да полимереше. (Sambrook, 1989).

У бунариће гела је стављано по 7  $\mu\text{l}$  геномске DNA и 2  $\mu\text{l}$  боје ( 6 x *loading buffer*: 0,25% бром-фенол плаво, 0,25% ксилен-цијанол, 20% фикол 400).

Електрофореза се одвијала у 0,5 x TBE пуферу при напону од 80 V и струји од 35- 40 mA око 40 минута (Pharmacia LKB, Шведска). Гел је анализиран под краткоталасном УВ светлошћу трансилуминатора (Pharmacia LKB, Шведска).

Геномска DNA је била одговарајућег квалитета уколико је на гелу након електрофорезе била уочљива јасна трака недалеко од бунарића.

### 3.3 ОДРЕЂИВАЊЕ *GST* ГЕНОТИПОВА

У овом истраживању су анализирани *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* генотипови методама које се заснивају на ланчаној реакцији полимеризације (*PCR*).

Услови *PCR*-а за умножавање *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* гена су приказани у табели број 5.

За *GSTT1* су описане две алелске варијанте - *GSTT1-null* (делеција гена, повезана са потпуним изостанком функционалног ензима) и *GSTT1-positive* која кодира функционалан ензим. Анализа *GSTT1* генотипа се заснивала на умножавању *GSTT1* региона *PCR* – ом и детекцији присуства продукта *PCR* реакције (480 bp) на 2% агарозном гелу након електрофорезе и бојења етидијум бромидом (присуство траке од 480 bp представља *GSTT1-positive* алел, а одсуство *GSTT1-null* алел). Да бисмо са сигурношћу тврдили да одсуство траке од 480 bp представља *GSTT1-null* алел, а не неуспешну *PCR* амплификацију, паралелно са *GSTT1* секвенцом, умножавао се и део гена за бета актин (289 bp). Узорци у којима није био умножен бета актин су били искључени из студије.

Слично као и за *GSTT1*, за *GSTM1* су описане две алелске варијанте - *GSTM1-null* (делеција гена, повезана са потпуним изостанком функционалног ензима) и *GSTM1-positive* која кодира функционалан ензим, тако да се *GSTM1* генотипизација заснивала на истој методологији, с тим што је величина *PCR* продукта који представља *GSTM1-positive* алел 132 bp. Пошто *GSTM1-positive* алел има две варијанте *GSTM1\*A* и *GSTM1\*B*, продукти *PCR* – а су били даље анализирани *RFLP* методом, која је у овом случају укључивала дигестију са *HaeII* рестрикционом ендонуклеазом према упуству произвођача (*ThermoScientific*, Литванија) и анализу продукта дигестије на 10% полиакрил амидном гелу након електрофорезе и бојења сребро нитратом. Полиакриламидни гел је припреман од 30% stock-а акриламида (акриламид : N,N' - метилен бис-

акриламид = 29:1), 10 x TBE пуфера (финално у раствору 0.5 x), 10% амонијум- персулфата (350 $\mu$ L у 30 ml раствора), TEMED-а (25 $\mu$ L у 30 ml раствора) и дестиловане воде. Гел је наносен у унапред припремљене калупе за вертикалну електрофорезу и остављен да полимерисе. У бунаре гела који су претходно испрани 0.5 x TBE пуфером од остатаката неполимерисаног акриламида, је додавано по 5 $\mu$ L стерилне воде и 2  $\mu$ L боје (6 x *loading buffer*). Маркер молекулске тежине DNK је коришћен према упутству произвођача. Електрофореза се одвијала у 0.5 x TBE пуферу око 2 сата при напону од 150- 200 V и струји од 10-20 mA на собној температури (*LKB Pharmacia*, Шведска). По истеку електрофорезе гел је фиксиран 10 минута у 10% етанолу, 3 минута у 1% HNO<sub>3</sub> и испран дестилованом водом. Бојен је 0.2% раствором AgNO<sub>3</sub> 30 минута на тамном и поново испран дестилованом водом. Као развијач је коришћен 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> са 0.02% формалдехида (5-10 минута). Гел је испран 10% сирћетном киселином и дестилованом водом.

На присуство алела *GSTM1*\*A су указале траке од 112 bp и 20 bp; *GSTM1*\*B трака од 132 bp, а на присуство оба алела (*AB* генотип) траке од 132 bp, 112 bp и 20 bp.

Генотипизација *GSTP1A313G* гена се заснивала на дигестији PCR продуката са рестрикционом ендонуклеаром *BsmI* према упутству произвођача (*ThermoScientific*, Литванија). Продукти дигестије су анализирани након електрофорезе на 10% PAG-у и бојења сребро-нитратом. Генотип *Ile/Ile* био је представљен присуством трака од 329 bp, 216 bp, 113 bp и 107 bp, док су *Val/Val* представљале траке од 216 bp, 113 bp и 107 bp.

### 3.4 ОДРЕЂИВАЊЕ IL6 И IL2 ГЕНОТИПОВА

*IL6-597G/A* (rs1800797) и *IL2 -330T/G* (rs2069762) генотипови су одређивани алелском дискриминацијом на апарату 7500 *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*, САД) помоћу *TaqMan* предизајнираних есеја, према упутству произвођача (*Applied Biosystems*, САД).

### 3.5 ОДРЕЂИВАЊЕ CD14 ГЕНОТИПОВА

*CD14 -159 C/T* (rs2569190) генотипови су одређени помоћу *PCR-RFLP* методе. Секвенце прајмера, услови амплификације и величина продукта *PCR*-а су приказани у табели 5. Продукти *PCR*-а (166 bp) били инкубирани

са *Hae*III рестрикционом ендонуклеазом према упутству произвођача (*ThermoScientific*, Литванија). Продукти дигестије су анализирани на 10% полиакрил амидном гелу након електрофорезе и бојења сребро нитратом (поступак припреме гела је описан у пасусу 3.3) Пошто у овом случају, рестрикциона ендонуклеаза сече *wild type* секвенцу, полиморфни алел је био представљен траком од 166 bp.

Табела 5. Секвенце прајмера и услови *PCR*-а за умножавање *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* и *CD14* гена

ГЕН	СЕКВЕНЦА ПРАЈМЕРА ЗА <i>PCR</i>	УСЛОВИ <i>PCR</i> -а	ВЕЛИЧИНА <i>PCR</i> ПРОДУКТА
<i>GSTT1</i>	5'- TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC- 3' 5'- TTGGGAAGGCGTCCAAGCGC-3'	94°C 5 min. (1 x); [94°C 1 min, 66°C 1 min, 72°C 1 min] (39 x); [94°C 1 min, 66°C 1 min, 72°C 1 min] (1 x)	480 bp
<i>GSTM1</i>	5'-TTGGGAAGGCGTCCAAGCGT- 3' 5'- GCTTCACGTGTTATGAAGGTTC- 3'	94°C 4 min. (1 x); [94°C 45 sek, 62°C 1 min, 72°C 1 min 30 sek] (5 x); [94°C 30 sek, 62°C 30 sek, 72°C 45 sek] (1 x)	132 bp
<i>GSTP1</i>	5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3' 5'-AGCCACCTGAGGGGTAAG-3'	94°C 3 min. (1 x); [94°C 15 sek, 64°C 30 sek, 72°C 1 min] (5 x); [94°C 15 sek, 59°C 30 sek, 72°C 1 min] (30	329 bp

		x); 72°C 5 min (1 x)	
<b>CD14</b>	5'-TGCCAGGAGACACAGAACCC- 3' 5'-TGTCATTCAGTTCCTCCTC-3'	96°C 3 min. (1 x); [96°C 40 sek, 56°C 40 sek, 72°C 50 sek] (38 x); 72°C 10 min (1 x)	166 bp
<b><math>\beta</math>-aktin</b>	5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3' 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA- 3'		289

#### 4 СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

За анализе повезаности полиморфизма у испитиваним генима са клиничким карактеристикама болести и резултетима лечења, употребљавани су стандардни параметријски и непараметријски тестови:  $\chi^2$  или Fisher-ов тест, Kolmogorov-Smirnov и Mann-Whitney тест. Ризик да болесници са одређеним полиморфизмима имају неку клиничку карактеристику је исказан рачунањем *OR* (*odds ratio*) и *RR* (*risk ratio*) вредности за интервал поузданости од 95% (95% *CI*).

Укупно преживљавање (*OS*) се рачуна од дана дијагнозе до датума смрти или датума последње контроле. Преживљавање без болести (*DFS*) се рачуна од тренутка постизања комплетног одговора до релапса, смртног исхода или датума последње контроле. Време до неповољног догађаја током лечења (*EFS*) укључује период од датума започињања лечења до датума релапса, прогресије болести или смрти од било којег узрока. Процена вероватноће преживљавања, *DFS* и *EFS* је израчунавана према *Kaplan-Meier* – овој методи (1958). За упоређење крива преживљавања између група од интереса коришћен је *log-rank* тест. За удруженост прогностичких параметара са резултатима лечења примењиваће се униваријантна и мултиваријантна *Cox* регресиона анализа.

За одређивање cut-off у случају одређивања апсолутног броја лимфоцита, апсолутног броја моноцита и лимфоцитно/моноцитног односа коришћена је Рос анализа.

За статистичку значајност ( $p$ ) је узета вредност  $< 0.05$ .

Сви резултати испитивања су статистички обрађени коришћењем SPSS software for Windows, version 15 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

## IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

### 1. АНАЛИЗА *GST* ГЕНА

#### 1.1 Учесталост *GST* генотипова

Генотипизација сва три *GST* (*GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1*) гена је била успешна код 82 болесника са *DLBCL* (успешне амплификације и подударање резултата у дупликатима за сва три гена). У овој групи, *GSTT1-null* генотип је детектован код 20 (24,4%) болесника док су *GSTM1-null* генотип имала 52 (63,4%) болесника. У групи *GSTM1*-позитивних болесника ( $n=30$ ), 16 (19,5 %) је имало *GSTM1 AA* генотип, четири (4,9 %) *GSTM1 AB*, а 10 (12,2 %) болесника је имало *GSTM1 BB* генотип. Код 20/82 (24,4 %) болесника је детектован *GSTP1 Ile/Ile* генотип, *Ile/Val* генотип су имала 44/82 (53,6 %) болесника, док је 18/82 (22,0 %) болесника имало *Val/Val* генотип. Добијене учесталости *GSTP1* генотипова су биле у *Hardy-Weinberg* - овој равнотежи ( $p=0.83$ ,  $\chi^2$  тест).

#### 1.2 Повезаност *GST* генотипова са клиничким карактеристикама

Дистрибуција *GST* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама је приказана у табели 6.

**Табела 6.** Дистрибуција *GST* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама *DLBCL*

КАРАКТЕРИСТИКЕ БОЛЕСНИКА	<i>GST1</i>			<i>GSTM1</i>			<i>GSTP1</i>		
	+	<i>Null</i>	P	+	<i>null</i>	p	<i>IleIle</i>	<i>Ile/Val+ Va/Val</i>	P
Пол, бр. М/Ж	36/26	8/12		17/13	27/25		13/7	31/31	
Старост > 60 година, бр. (%)	15 (18)	4 (5)	0,77	11 (13)	8 (10)	<b>0,03*</b>	4 (5)	15 (18)	0,77
CS III/IV, бр. (%)	47 (57)	12 (15)	0,17	19 (23)	40 (49)	0,19	15 (18)	44 (54)	0,73
Присутни В симптоми, бр. (%)	44 (54)	14 (17)	0,92	19 (23)	39 (48)	0,26	41 (50)	17 (21)	0,16
ИР <i>ИН/Н<sup>а</sup></i> , бр. (%)	34 (42)	10 (12)	0,71	16 (20)	28 (34)	1,00	10 (12)	34 (42)	0,71
Екстранодална места $\geq 2$ , бр. (%)	52 (63)	12 (15)	0,21	24 (29)	40 (49)	0,74	17 (21)	47 (57)	0,54
Туморски обл. болести ( <i>Bulky disease</i> ), бр. (%)	29 (35)	10 (12)	0,81	15 (18)	24 (29)	0,74	12 (14)	27 (33)	0,20

p вредности су добијене помоћу  $\chi^2$  теста или *Fisher*-овог егзактног теста;

<sup>а</sup>И/Н – средњи-висок/висок (*intermediate-high/high*)

\**GSTM1 null* генотип је био чешће присутан код болесника код којих се *DLBCL* развио пре 60године (OR 3,12, 95% CI 1,11–9,17; p=0,03); p вредност је добијена помоћу  $\chi^2$  теста;



### 1.3 Повезаност *GST* генотипова са одговором на терапију и током болести

У групи 82 болесника којима је извршена генотипизација *GST*, одговор на терапију (*overall response rate* - *ORR*) је забележен код 70 (85,4%) болесника, код 69 (84,1%) болесника постигнута је комплетна клиничка ремисија (*CR*), док је код једног (1,2%) болесника постигнута парцијална ремисија (*PR*). Код 12 (14,6%) болесника је дошло до прогресије болести током примене *R-CHOP* терапије.

Примењеним обликом лечења, *CR* је постигнута код 85 % болесника са *GSTT1-null* генотипом, односно 88 % *GSTT1* –позитивних болесника; 80 % болесника са *GSTM1-null* генотипом, као и 89 % болесника са *GSTM1*-позитивним генотипом; 82 % болесника са *GSTP1 Ile/Ile* генотипом и 88 % болесника који су носиоци барем једног *GSTP1 Val* алела. Статистичком анализом је показано да *GST* генотиповине утичу на одговор на терапију (комплетна ремисија, парцијална ремисија или прогресија болести) одлагањима терапијских циклуса ( $p=1$  за сва три гена)..

Када је анализиран период до постизања ремисије, утврђено је да је истим модалитетом лечења *CR* брже постигнута код болесника са *GSTT1* –позитивним (90-390 дана, медијана 210 дана) него код болесника са *GSTT1-null* генотипом (180-330 дана, медијана 300 дана), међутим, ова разлика у броју дана до постизања комплетног одговора није била статистички значајна ( $p=0,22$ ).

Када је анализиран *GSTP1* генски полиморфизам у односу на брзину постизања *CR*, уочена је статистички значајна разлика у трајању периода до постизања *CR*. Медијана постизања *CR* у болесника са *Val* алелом *GSTP1* полиморфизма (*Val/Val* и *Ile/Val* генотипом) је била 219 дана (90-360), и значајно краћа у односу на болеснике са *Ile/Ile* генотипом (150-390 дана, медијана 300 дана) ( $p=0,05$ , *Mann-Whitney U test*).

Упоредјујући период до постизања *CR* у болесника са DLBCL у односу на полиморфизам *GSTM1* гена, није уочена статистички значајна разлика између болесника са *GSTM1-null* генотипом (90-390, медијана 210) у односу на болеснике носиоце *GSTM1*-позитивног генотипа (90-360, медијана 210),  $p=0,53$ .

Такође, у анализираној групи болесника, различити *GST* генотипови нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама, као ни са значајним одлагањима терапијских циклуса ( $p=1$  за сва три гена)..

У групи болесника код којих су постигнути *CR* или *PR* ( $n=70$ ), до релапса је дошло код 15 (21%) болесника. Учесталост релапса није била повезана са одређеним *GST* генотиповима ( $p=0.47$  за *GSTT1*;  $p=0.44$  за *GSTM1*;  $p=0.48$  за *GSTP1*). Исто тако, *GST* генотипови нису утицали на *OS* ( $p=0.45$

за *GSTT1*;  $p=0.79$  за *GSTM1*;  $p=0.27$  за *GSTP1*) и *DFS* ( $p=0.33$  за *GSTT1*;  $p=0.61$  за *GSTM1*;  $p=0.73$  за *GSTP1*). Анализирајући параметре који су утицале на дужину *OS* болесника са *DLBCL*, у униваријантној анализи сигнификантни утицајје имао узрапредовали *CS* (log-rank,  $p=0,04$ ) и недовољан, интермедијално-висок/висок *IPI* скор (log-rank test,  $p=0,01$ ). Међутим, мултиваријантна анализа (*Cox*-ов модел регресије) је издвојила само *IPI* скор као независни прогностички параметар за *OS* [средњи-висок/висок *IPI* vs низак/низак-средњи *IPI*; hazard ratio (HR) 3,1, 95% CI 1,26-7,6;  $p=0,01$ ].

## 2. АНАЛИЗА *CD14* ГЕНА

### 2.1 Учесталост *CD14* генотипова

Анализа *CD14* гена је била успешна код 114 болесника са *DLBCL* (успешне амплификације и подударање резултата у дупликатима). У овој групи су добијене следеће учесталости *CD14* генотипова: 23% *CC*, 41% *CT* и 36% *TT*. Добијене учесталости генотипова су биле у Hardy-Weinberg – овој равнотежи ( $p=0.38$ ,  $\chi^2$  тест).

### 2.2 Повезаност *CD14* генотипова са клиничким карактеристикама

Резултати су приказани у табели 7.

**Табела 7.** Дистрибуција *CD14* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама *DLBCL*

КАРАКТЕРИСТИКЕ БОЛЕСНИКА	<i>CD14</i>		
	<i>CC</i>	<i>CT+TT</i>	P
Пол, бр. М/Ж	16/10	43/45	
Старост > 60 година, бр. (%)	7 (20)	28 (80)	0,63
<i>CS</i> III/IV, бр. (%)	12 (22)	42 (78)	0,89
<i>IPI</i> <i>III/IV<sup>a</sup></i> , бр. (%)	8 (21)	31 (79)	0,67
Екстранодална места, бр. (%)	13 (16)	67 (84)	<b>0,01</b>

Туморски обл. болести ( <i>Bulky disease</i> ), бр. (%)	12 (23)	41 (77)	1
---	---------	---------	---

р вредности су добијене помоћу  $\chi^2$  теста или Fisher-овог егзактног теста;

<sup>a</sup>И/Н – средњи-висок/висок (*intermediate-high/high*)

\**CD14 CT/TT* генотипови су били чешће присутни код болесника са екстранодалним *DLBCL* (OR 3,19, 95% CI 1,28–7,94;  $p=0,01$ );  $p$  вредност је добијена помоћу  $\chi^2$  теста;

Имајући у виду улогу *CD14* молекула у имунском одговору, анализирана је и повезаност *CD14-159* генотипова са иницијалним вредностима С-реактивног протеина (*CRP*), седиментације еритроцита и фибриногена (подаци су били доступни за 101 болесника). Код болесника са *CC* генотипом ( $n=24$ ), вредности *CRP* – а су се кретале у опсегу 2,5 - 122 mg/l (средња вредност 24) док су код болесника са *CT/TT* генотиповима ( $n=77$ ) биле у опсегу 2,2 - 266 mg/l (средња вредност 39,5). Повезаност између *CRP* вредности и *CD14* генотипова је тежила статистички значајној вредности (one-tailed t-test  $p=0,038$ ; two-tailed t-test  $p=0,078$ ). Измерени нивои других параметара запаљења (седиментација еритроцита и фибриноген) нису били статистички значајно повезани са *CD14* генотиповима -159 генског полиморфизма ( $p=0,77$ , односно  $p=0,66$ ).

### 2.3 Повезаност *CD14* генотипова са одговором на терапију и током болести

У групи од 114 болесника са *DLBCL*, одговор на *R-CHOP* је постигнут код 98 (86%); код 69 (61%) је постигнута *CR* док је код 29 (25%) постигнут парцијални одговор. Прогресија болести током терапије је била присутна код 16 (14%) болесника. У групи болесника код којих је постигнут одговор на терапију, до релапса је дошло код 28/98 болесника, а 34/114 (30%) је умрло од *DLBCL*. Статистичка анализа је показала да *CD14* генотипови (*CC* vs *CT+TT*) нису били повезани са одговором на терапију ( $p=0,74$ ), учесталошћу релапса ( $p=0,47$ ).

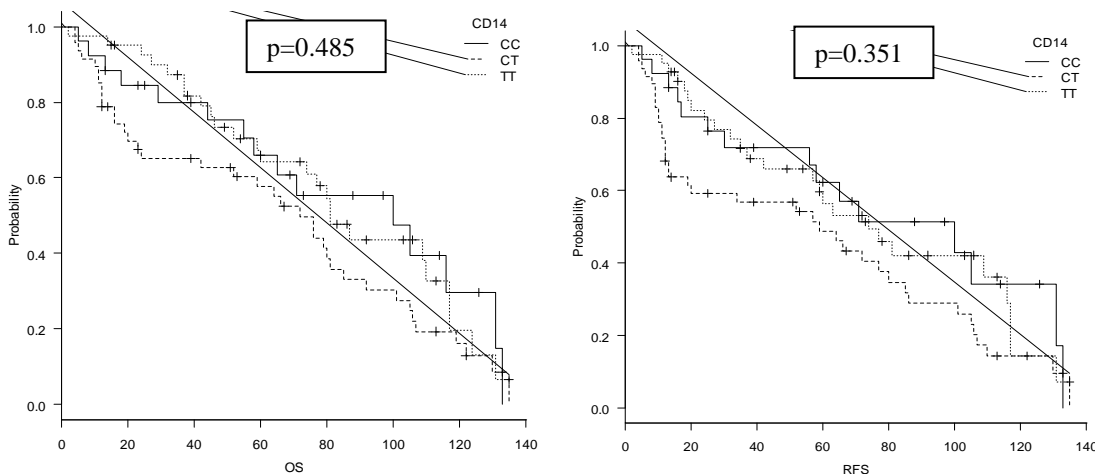
Присуство инфекција током терапије је забележено код 29 (25%) болесника. Инфекције су биле чешће код болесника са *CC* него код болесника са *CT/TT* генотиповима (39% vs 22%), а повезаност инфекција и *CD14* генотипова је тежила статистичкој значајности ( $p=0,083$ ). Такозване ране компликације везаних за терапију (*early-treatment-related complications*) [присутне код 31 (27%) болесника] су уочене код 42% болесника са *CC* и код 24% болесника са *CT/TT* генотиповима ( $p=0,079$ ).

У групи болесника са *DLBCL*, *CD14* -159 генотип није утицао на *DFS* ( $p=0,351$ ) као ни на *OS* ( $p=0,485$ ) (слика 1). У овој групи болесника, у униваријантној анализи на *OS* су утицали *IPI* скор ( $p<0,001$ ), клинички стадијум болести ( $p<0,001$ ), апсолутни број лимфоцита ( $p=0,001$ ) и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p<0,001$ ). Мултиваријантна анализа је показала да је од свих наведених фактора највећи утицај на *OS* имао *IPI* скор ( $p=0,006$ ).

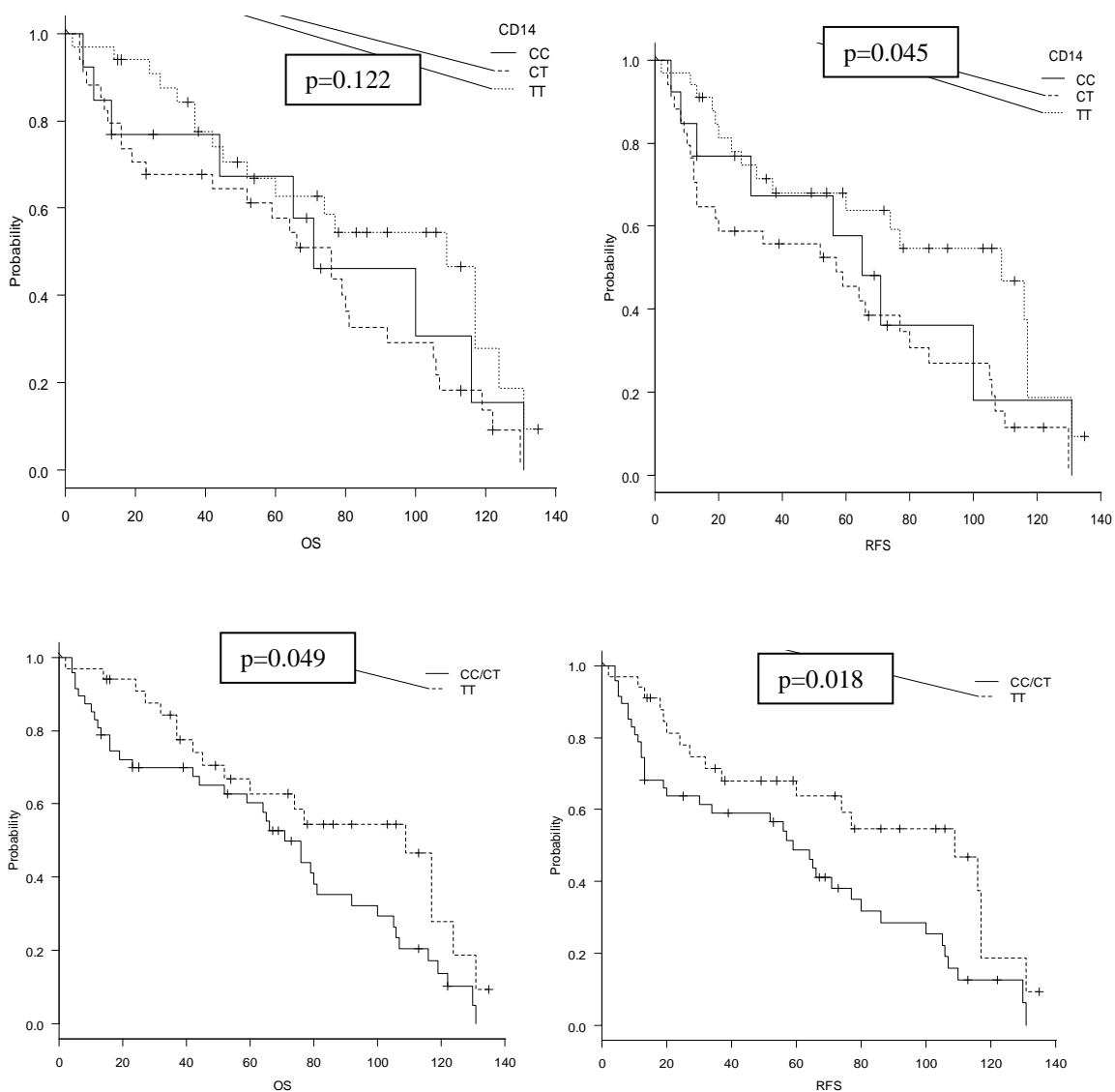
У групи болесника са екстранодалним *DLBCL*, дуже укупно преживљавање (*OS*) је уочено код болесника са *TT* генотипом (3-годишње *OS* 84%) него код болесника *CC* (3-годишње *OS* 77%) и *CT* генотипом (3-годишње *OS* 68%). Међутим, статистичка анализа није документовала статистички значајну повезаност између *CD14* генотипова и *OS* ( $p=0,122$ ). Када смо анализирали *OS* између болесника са *TT* (3-годишње *OS* 84%) и болесника са *CC/CT* генотиповима (3-годишње *OS* 70%), статистичка анализа је показала значајну повезаност између генотипова и *OS* ( $p=0,049$ ). Сличан образац је уочен је и за *DFS* (*CC* vs *CT* vs *TT*,  $p=0,045$ ; *CC/CT* vs *TT*,  $p=0,018$ ). У униваријантној анализи за *OS* болесника са *DLBCL* уз *TT* генотип, издвојени су *IPI* скор ( $p<0,001$ ), клинички стадијум ( $p=0,015$ ), присуство туморског облика болести ( $p=0,032$ ), апсолутни број лимфоцита ( $p=0,01$ ) и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p=0,001$ ). У мултиваријантној анализи *IPI* [*hazard ratio* (HR) 2,422, 95 % CI 1,114 – 5,264;  $p=0,026$ ) и *CD14 TT* генотип (HR 0,503, 95 % CI 0,262 – 0,963;  $p=0,038$ ) су издвојени као једини параметри који су били повезани са *OS* код болесника са екстранодалним *DLBCL*.

На слици 7 је представљена повезаност *CD14* генотипова и преживљавања.

**Слика 7.** *OS* (А) и *DFS* (Б) болесника са различитим *CD14* генотиповима.



**Слика 8.** *OS* и *DFS* болесника са екстранодалним лимфомом у зависности од *CD14* генотипа.



А: OS болесника са екстранодалним *DLBCL* у односу на *CD14* -159 генотип.

Б: *DFS* болесника са екстранодалним *DLBCL* у односу на *CD14* -159 генотип.

В: OS болесника са екстранодалним *DLBCL* у односу на *CD14* -159 генотип. (*CC/CT* vs *TT*).

Г: *DFS* болесника са екстранодалним *DLBCL* у односу на *CD14* -159 генотип. (*CC/CT* vs *TT*).

### 3. АНАЛИЗА *IL6* ГЕНА

#### 3.1 Учесталост *IL6* генотипова

Анализа *IL6-597G*/Аполиморфизма је била успешна код 143 болесника са *DLBCL* (успешне амплификације и подударање резултата у дупликатима). У овој групи је 39.9% испитаника имало *GG* генотип, а 60.1% *GA* генотип. Добијене учесталости генотипова су биле у Hardy-Weinberg –овој равнотежи ( $p=0.38$ ,  $\chi^2$  тест).

#### 3.2 Повезаност *IL6* генотипова са клиничким карактеристикама

Резултати статистичке анализе су приказани у табели 8.

**Табела 8.** Дистрибуција *IL6-597* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама *DLBCL*

КАРАКТЕРИСТИКЕ БОЛЕСНИКА	<i>IL6</i>		
	<i>GG</i>	<i>GA</i>	P
Пол, бр. М/Ж	28/29	42/44	
Старост > 60 година, бр. (%)	56 (65)	30 (35)	0,84
CS III/IV, бр. (%)	25 (37)	42 (63)	0,56
ИPI ИH/H <sup>a</sup> , бр. (%)	15 (31)	33 (69)	0,14
Екстранодална места, бр. (%)	40 (42)	56 (58)	0,53
Туморски обл. болести ( <i>Bulky disease</i> ), бр. (%)	22 (35)	40 (65)	0,35

p вредности су добијене помоћу  $\chi^2$  теста;

<sup>a</sup>ИH/H – средњи-висок/висок (*intermediate-high/high*)

#### 3.3 Повезаност *IL6* генотипова са одговором на терапију и током болести

У групи од 143 болесника са *DLBCL*, одговор на R-CHOP је постигнут код 117 (82%); код 117 (81%) је постигнута CR док је код једног болесника (7%) постигнут парцијални одговор. Прогресија болести током терапије је

регистрована код 26 (18%) болесника. У групи болесника код којих је постигнут одговор на терапију, до релапса је дошло код 25/117 (21%) болесника. Статистичка анализа је показала да генотипови *IL6-597 G/A* генског полиморфизма нису били повезани са одговором на терапију ( $p=0.14$ , Fisher-ов егзактни тест), учесталосту релапса ( $p=0.89$ , Fisher-ов егзактни тест), и исходом болести ( $p=0.22$ , Fisher-ов егзактни тест).

Такође, у анализираној групи болесника, GG и GA генотипови *IL6-597SNP* нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама, као ни са значајним одлагањима терапијских циклуса ( $p=0.11$ , Fisher-ов егзактни тест).

У групи болесника са *DLBCL*, нити GG нити GA генотип *IL6-597* полиморфизма није био удружен са *DFS* ( $p=0,57$ ) као ни са *OS* ( $p=0,74$ ). У униваријантној анализи у овој групи болесника, на *OS* су утицали *IPI* скор ( $p<0,001$ ), клинички стадијум ( $p<0,001$ ), апсолутни број лимфоцита ( $p=0,001$ ) и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p<0,001$ ). Мултиваријантна анализа је од свих наведених параметара издвојила за *OS* издвојила само *IPI* скор.

## 4. АНАЛИЗА *IL2* ГЕНА

### 4.1 Учесталост *IL2* генотипова

Анализа *IL2-330* гена је била успешна код 143 болесника са *DLBCL* (успешне амплификације и подударање резултата у дупликатима). У овој групи болесника детектоване су следеће учесталости генотипова: 51% испитаника је имало *TT* генотип, 45% је имало *TG* генотип, а код 4% испитаника је детектован *GG* генотип. Добијене учесталости генотипова су биле у Hardy-Weinberg –овој равнотежи ( $p=0.27$ ,  $\chi^2$  тест).

### 4.2 Повезаност *IL2* генотипова са клиничким карактеристикама

Резултати статистичке анализе су приказани у табели 9.

**Табела 9.** Дистрибуција *IL2-330* генотипова код болесника са различитим клиничким карактеристикама *DLBCL*

КАРАКТЕРИСТИКЕ БОЛЕСНИКА	<i>IL6</i>		
	<i>TT</i>	<i>TG+GG</i>	P



Пол, бр. М/Ж	34/39	36/34	
Старост > 60 година, бр. (%)	24 (49)	25 (51)	0,72
CS III/IV, бр. (%)	32 (48)	35 (52)	0,46
IPI И/И <sup>а</sup> , бр. (%)	24 (50)	24 (50)	0,86
Екстранодална места, бр. (%)	49 (51)	47 (49)	1
Туморски обл. болести ( <i>Bulky disease</i> ), бр. (%)	31 (50)	31 (50)	0,35

р вредности су добијене помоћу  $\chi^2$  теста;

<sup>а</sup>И/И – средњи-висок/висок (*intermediate-high/high*)

#### 4.3 Повезаност *IL 2* генотипова са одговором на терапију и током болести

Анализирајући генотипове у гену за *IL2-330* у односу на терапијски одговор, није забележена статистички значајна разлика у болесника са *TT* генотипом у односу на болеснике са *TT/GG* генотипом у погледу одговора на терапију, учесталост релапса, и исходом болести.

Такође, *IL2* генотипови нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама или са значајним одлагањима терапијских циклуса ( $p=0.21$ , Fisher-ов егзактни тест).

У групи болесника са *DLBCL*, *IL2-330* генотип није утицао на *DFS* ( $p=0,46$ ) као ни на *OS* ( $p=61$ ). У односу на *OS*, у униваријантној анализи сигнификантни утицај је имао *IPI* скор ( $p<0.001$ ), клинички стадијум ( $p<0.001$ ), апсолутни број лимфоцита ( $p<0.001$ ), и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p<0.001$ ). Међутим, у мултиваријантној анализи једини параметар који је био повезан са *OS* је био *IPI* скор.

## V ДИСКУСИЈА

Дифузни Б лимфом великих ћелија (DLBCL) су агресивне неоплазме лимфоног ткива и чине око 30-35% свих Б-ћелијских NHL лимфома. Ови лимфоми се карактеришу веома хетерогеном клиничком сликом, одговором на терапију и преживљавањем. У основи ове разноликости лежи комплексна биологија тумора.

DLBCL могу бити подељени на основу цитоморфопатолошких особина, месту примарног настанка болести (нодална и екстранодална болест) и имунолошкој подлози оболелог. Оваква разноликост доприноси широком спектру клиничке презентације болести и веома разноликим резултатима лечења. Последњих година студије експресије гена су издвојиле три различита молекуларна типа болести: DLBCL порекла герминативног центра (GCB), лимфоме са молекуларним профилем активисаних Б ћелија (ABC) и примарне медијастиналне Б ћелијске лимфоме (PMBL) (Rosenwald, и сар., 2002; Lenz, и сар., 2008). Ипак, иако су студије експресије гена донекле разоткриле комплексну молекуларну природу болести, већина лимфома је и даље класификовано у *not otherwise specified* DLBCL (NOS).

Процена агресивности болести која диктира и одлуку о терапији, данас је најчешће базирана на клиничким карактеристикама, стању оболелог и биологији тумора. Међутим, ни један од установљених прогностичких параметара није показао да је у потпуности повезан са преживљавањем оболелих од DLBCL. Годинама уназад комбинована хемиотерапија садржана у CHOP (*doxorubicin, cyclophosphamide, vincristin, prednisone*) протоколу је основна терапија у лечењу DLBCL и представља први хемиотерапијски режим са куративним потенцијалом. У раним 2000. годинама, *rituximab*, моноклонско анти *CD20* придодато CHOP хемиотерапији је постао, и за све ове године, остао златни стандард у лечењу новодијагностикованих болесника са DLBCL (Coiffier, и сар., 2002). И поред напретка у лечењу DLBCL увођењем моноклонског *CD20* антитела у спреси са CHOP хемиотерапијом, више од 30% оболелих неће реаговати на имунохемиотерапију или ће релапсирати, односно испољити резистентан ток болести. Премда су студије експресије гена делимично разоткриле комплексну биологију тумора, разумевање хетерогености представља критичан корак ка даљем напретку у контроли болести, која остаје клинички изазов за бројне научне дисциплине и предмет је

истраживања великог броја епидемиолошких, клиничких и биолошких студија (Turturro, 2015).

Полиморфизми гена су варијације у DNA секвенцама гена и појављују се у општој популацији са учесталошћу већом од 1% (Robert, и сар., 2014) и могу да доведу до промена у експресији, структури и активности протеинског продукта гена. SNP су најчешће присутни у протеин-кодирајућим секвенцама гена које су круцијалне за *microRNA* везивање и регулацију експресије протеина, и исто тако у нивоу секвенци егзона и интрона. Док *missense* полиморфизми доводе до замене једне аминикиселинске резидуе другом и модификују секвенцу протеина, *silent* полиморфизми могу да утичу на функцију протеинског продукта. Такође, *frameshift* полиморфизми као последица инсерције или делеције једног нуклеотида, могу да резултирају настанком ослабљеног или потпуно инактивног протеина (Falduto, и сар., 2017).

Етиологија DLBCL и даље остаје непозната. Ипак, између бројних потенцијалних и знаних фактора ризика, дисрегулација имуног система је најбоље показана (Cunningham-Rundles, 2012). Студије спроведене у појединим фамилијама и близанцима нису потвдиле строгу пенетрацију једног гена (Vajdic, и сар., 2010). Повећан ризик за настанак лимфома је највероватније узрокован наследним променама генотипа, који укључује више генетских варијанти испољених у виду бројних алела који комбиновано чине високо-ризичан фенотип. Велики број до сада спроведених студија је истраживао повезаност наследних генетских фактора како у погледу ризика за настанак лимфома, тако и у погледу резултата лечења (Rothmani сар., 2006; Wang, и сар., 2007; Cerhan, и сар., 2014; Warzocha, и сар., 2012; Ascherbrook-Kilfooy, и сар., 2012). Међутим, резултати наведених студија нису конзистентни.

Сазнања о генетској подлози сваког појединачног болесника са DLBCL, укључујући полиморфизме гена, може нам помоћи да предвидимо ефикасност и токсичност примењене терапије и омогући рационалан и индивидуалан приступ сваком болеснику. У основи, многи гени удружени са одговором на терапију имају улогу у комплексним путевима повезаним са транспортом, метаболичком активношћу и детоксикацијом цитостатика. Они могу кодирати не само протеине укључене у дистрибуцију и метаболизам лекова, већ такође рецепторе, ензиме, протеине укључене у ћелијски циклус и поправку ДНА.

У нашем истраживању анализирани су полиморфизма у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2 -330T/G*, *IL6 -597G/A* и *CD14 -159C/T* код новодијагностикованих болесника са DLBCL лечених R-CHOP терапијом.

У првом делу истраживања анализирана је учесталост *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2 -330T/G*, *IL6 -597G/A* и *CD14 -159C/T* генотипова у болесника са DLBCL. У наставку истраживања, анализирали смо да ли постоји повезаности између полиморфизма у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2 -330T/G*, *IL6 -597G/A* и *CD14 -159C/T* са клиничким карактеристикама болести, одговором на терапију, током и исходом лечења у оболелих од DLBCL.

Резултати до сада објављених студија указују да полиморфизми у ензимама фазе II фамилије *GSTs* су повезани са ризиком од бројних малигнух оболења (Bin and Luo, 2013; Wang, и сар., 2016; He, и сар., 2018). Ради се о фамилији ензима који учествују у детоксикацији широког спектра ксенобиотика, укључујући карциногене агенсе као што су бензени, органохлориди, органофосфати, пестициди и дуван. Такође, неопходни су за метаболизам и детоксикацију великог броја значајних и широко заступљених хемиотерапеутика у лечењу лимфома. Путем коњугације са глутатионом повећава се солубилност лекова, чиме се олакшава њихова екскреција. Њихова детоксикациона активност је круцијална за ефикасност и токсичност *cyclophosphamide* и *doxorubicin*-а који су садржани у R-CHOP имунохемиотерапији која је стожер индукционе терапије у лечењу DLBCL.

Гени за *GSTs* су веома полиморфни. Засупљеност мутација је релативно висока у хуманој популацији и варира између географских региона и етничких група (Klusek, и сар., 2018; Bin and Luo, 2013). Наше истраживање варијација у генима ензима *GSTs* је укучивало *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* полиморфизме. Оба, *GSTT1* и *GSTM1* полиморфизма се презентују са две алелске варијанте, *null* варијантом (*GSTT1-null*; *GSTM1-null*), у којима је делеција гена повезана са потпуним изостанком функционалног ензима, и *positive* варијантом (*GSTT1-positive*; *GSTM1-positive*), које кодирају функционалан ензим. Резултати мета анализе спроведене у оболелих од карцинома дебелог црева указују да *mi* класа *GSTM1* је најнефикаснија у неутрализацији цитотоксичних материја и реактивних комплекса (Li, и сар., 2015).

Учесталост *GSTT1-null* и *GSTM1-null* у већине анализираних студија је висока, и креће се у распону од 20-50%. Упоредјујући фреквенције *GSTT1-null* и *GSTM1-null* генотипа широм света, различите етничке групе показују различиту учесталост генотипова, укључујући азијску, европску и афричку популације испитаника. У нашој групи испитаника са DLBCL, *GSTT1-null* генотип је детектован код 24.4% болесника, док су *GSTM1-null* генотип имала 63.4% болесника. Упоредјујући резултате нашег истраживања са резултатима студија спроведеним међу европским становништвом, заступљеност *GSTT1-null* генотипа у нашој групи болесника од 24.4% је била слична са учесталошћу *null* генотипа у становника Италије (14.5-29.5%) и Шпаније (20.5-33.7%). Уочена је нешто већа стопа *GSTT1-null* генотипа међу становницима афричког порекла у односу на европљане, и кретала се у рангу од 19.7-44.9%.

Анализирајући групу болесника са DLBCL, Chiu, са сарадницима је нашао нешто мању стопа *GSTT1-null* генотипа која је била 18% у односу на нашу стопу од 24.4%, и значајно мању стопу, укључујући како нашу студију, тако и студију Chiu, и сарадника у односу на корејску популацију оболелих од DLBCL, где је учесталост *GSTT1-null* генотипа била 55.3% заступљена (Cho, 2010). Студију Chio, и сарадника је сачињавало 95% болесника припадника беле расе (Chiu, и сар., 2005; Bin and Luo, 2013).

*GSTM1-null* генотип је утврђен код 63.4% болесника. Такође, у групи *GSTM1*-позитивних болесника 19.5 % је имало *GSTM1 AA* генотип, 4.9 % *GSTM1 AB* и 12.2 % болесника је имало *GSTM1 BB* генотип. Фреквенција *GSTM1-null* генотипа у италијанској популацији становника се кретала од 30.4-65.3%, са сличном дистрибуцијом *GSTM1-null* генотипа и међу афричким становништвом где је била у распону од 22.9-60.8%. Уочена фреквенција у нашој студији у погледу *GSTM1-null* генотипа од 63.4% је била на горњој граници уочене фреквенције међу италијанском популацијом, и нешто веће фреквенције у односу на резиденте афричког континента (Bin and Luo, 2013). У студији Chiu, и сарадника спроведеној на 89 оболелих од DLBCL који су припадали белој раси, *GSTM1-null* генотип је уочен у 47% оболелих, што је око 16% мања учесталост у односу на наше болеснике са DLBCL (Chiu, и сар., 2005). Студија корејске групе на челу са Cho, и сарадницима је анализирао сличну популацију болесника, како у погледу броја анализираних 94 болесника, тако и у погледу иницијалног лечења DLBCL. Ова студија је, такође, нашао дискретно

нижу учесталост *GSTM1-null* генотипа од 56.4% у односу на нашу студију, али и вишу у односу на студију Chiu, и сарадника (Cho, и сар., 2010).

Функционалан полиморфизам *GSTP1* гена укључује А-Г супституцију у егзону 5 и конверзију изолеуцина у валин у позицији 105 аминокиселинског ланца (*Ile105Val*), при чему присуство *Val* алелске варијанте умањује способност детоксикације карценогених субстанци. Резултати нашег испитивања указују да је *wild* варијанта *GSTP1* гена, *Ile/Ile* генотип детектован у 24.4%, *Ile/Val* генотип је имало 53.6 % болесника, и 22.0 % болесника је имало *Val/Val* генотип. У односу на студију Chiu, и сарадника која је обухватала белу расу DLBCL болесника, дистрибуција *GSTP1* генотипова је била значајно различито заступљена у односу на дистрибуцију добијену у нашој студији. Резултати ове студије говоре да је *wild* варијанта *GSTP1* гена, *Ile/Ile* генотип детектован у 53% оболелих, *Ile/Val* генотип је имало 44% болесника, и нешто мало више од 2.0 % болесника је имало *Val/Val* генотип (Chiu, и сар., 2005). Може се запазити да је *wild* варијанта *GSTP1* гена, *Ile/Ile* генотип у нашој студији више него два пута мање заступљен (24.4% наспрам 53%) и исто тако, да је *Val/Val* генотип био десет пута учесталији у наших болесника са DLBCL (22.0% наспрам 2%) у односу на исту популацију болесника беле расе (Chiu, и сар., 2005). Корејска популација болесника са DLBCL је према дистрибуцији генотипова *GSTP1* гена (*Ile/Ile* генотип 58.9%, *Ile/Val* генотип у 37.5% оболелих и *Val/Val* генотип у 3.3% пацијената) била сличнија испитиваној популацији у студији Chiu, и сарадника него нашој групи болесника (Cho, и сар., 2010). И исто тако, анализа учесталости *GSTP1* полиморфизама у популацији становништва северне Индије је нашла да је *Ile/Ile* генотип заступљен са учесталошћу од 44.3%, *Ile/Val* генотип у 50.3% и *Val/Val* генотип у 5.4% испитаника (Bin and Luo, 2013). Међутим, асоцијациона мета-анализа између *GSTP1* генског полиморфизма и процене ризика за оболевање од карцинома простате је нашла да је преваленца стопе *Val* алела у здравој популацији била 27.1-27.6% у становника Азије, 38.9-61.1% у популацији становника беле расе и 72.1-93.3% у Афро-Америчког становништва (Mo, и сар., 2009). Дистрибуција *Val* алела (*ValVal+IleVal*) међу нашом групом испитаника је била око 48.8%, што је у складу са његовом заступљеношћу међу становништвом беле расе и говори да је заступљеност различитих полиморфизама значајно различита међу различитим расама и поднебљима.

Наследни имунитет као и стечени имунски одговор зависе од биолошке улоге цитокина који функционишу као медијатори имунских и запаљенских реакција. Цитокини имају важну улогу у пролиферацији и диференцијацији бројних ћелија имунског система, укључујући пролиферацију и диференцијацију нормалних Б ћелија (Cohen, и сар., 2012). У микросредини лимфног чвора делују многе ћелије које луче различите проинфламаторне и антиинфламаторне цитокине који заједно доприносе Б-ћелијском развоју. Поремећај у регулацији Б-ћелијског развоја је главни патогенетски чинилац у бројним аутоимуним болестима, и бројне аутоимуне болести имају двоструки ризик за настанак Б-ћелијског NHL, највероватније услед хроничне Б-ћелијске активације и стимулације под дејством медијатора инфламације (Dias and Isenberg, 2011; Bugatti, и сар., 2014). Објављени резултати указују да удружено деловање различитих цитокина у проинфламаторном миљеу лимфног чвора може да допринесе негативном утицају за ризик за настанак појединих тумора или на резултате лечења (Dave, 2010; Johnsen, и сар., 2013).

Имајући у виду значајну улогу цитокина у патогенези DLBCL, велики број до сада објављених студија је истраживао наследне факторе ризика, полиморфизме у генима за различите цитокине и њихову повезаност са ризиком за настанак лимфома. Најчешће до сада експлорисани полиморфизми у асоцијационим студијама лимфома укључивали су полиморфизме у генима за фактор некрозе тумора (*TNF*) алфа, *IL10* и *IL6* (Smith, и сар., 2012; Rothman, и сар., 2006; Wang и сар., 2007).

У нашој студији спроведеној на болесницима са новодијагностикованим DLBCL, анализирали смо учесталост генотипова/алела у генима за *IL2 -330T/G* и *IL6 -597G/A*.

У гену за *IL2* откривена су два полиморфна места, један од њих, *IL2-330T/G* је предмет истраживања ове студије и налази се у промотер региону *IL2* гена у близини важног транскрипционог фактора активисаних Т ћелија (John и сар., 1998). Резултати објављених студија указују да се ради о функционалном SNP који може утицати на продукцију *IL2* или експресију протеина и на тај начин допринети ризику за настанак различитих болести (Hoffmann, и сар., 2001). Више асоцијационих студија је доказало да *IL2SNP* у позицији -330 је повезан са ризиком за настанак различитих карцинома и лимфома (Zhao, и сар., 2015; Song, и сар., 2012;

Rahman, и сар., 2018), и исто тако, више асоцијационих студија спроведених на болесницима са NHL нису потврдиле удруженост *IL2-330* генског полиморфизма са ризиком за настанак болести (Wang, и сар., 2006; Rothman, и сар., 2006) Такође, резултати нове мета-аналитичке студије нису потврдиле повезаност *IL2-330* генског полиморфизма са повећаним ризиком за настанак карцинома (Wang, и сар., 2015).

У нашој студији анализирали смо учесталост генотипова у *IL2-330T/G* гену и запазили следећу дистрибуцију: 51% испитаника је имало *TT* генотип, 45% је имало *TG* генотип и код 4% испитаника је детектован *GG* генотип. Упоређујући наше резултате са резултатима дистрибуције генотипова/алела у популацији Азијског становништва са NHL, уочена је значајна разлика. Резултати Song-а и сарадника указују да је у азијској популацији оболелих од NHL, присуство *T* и *G* варијанте алела било заступљено у 59,1% и 40,9% (*TT* 31,1%, *TG* 56,2%, *GG* 12,7%), док је у популацији наших болесника запажена превага учесталости *T* алела 73,5% у односу на значајно мању фреквенцију *G* алела од 26,5%. Слична дистрибуција алела као у студији Song-а и сарадника је добијена у NHL болесника из Египта (*T* алел 55%, *G* алел 45%) (Rahman, и сар., 2017). Дистрибуција *T/G IL-330* алела у становника Мађарске са туморима коже је била у складу са нашим резултатима (*T* алел 65,8%, *G* алел 34,2%), и такође, није се разликовала од учесталости *T/G* алела у здравој популацији становништва Мађарске (Rizzato, и сар., 2011).

Откривена су 4 SNP у промотор региону гена за *IL6* један од њих, *IL6-597G/A* је SNP који је предмет истраживања наше студије.

Анализирајући учесталост генотипова у *IL6* гену на позицији -597 запазили смо да је 39,9% оболелих са DLBCL имало *GG* генотип, и 60,1% *GA* генотип. Ни један од наших болесника није био хомозигот за *AA* генотип *IL6 -597* полиморфизма.

Студија Lan-а и сарадника је истраживала повезаност полиморфизама у генима за различите цитокине у особа женског пола са подручја северне Америке оболелих од NHL. У овој студији 94% испитиване популације су чиниле особе беле расе. Резултати студије су потврдиле повезаност генских полиморфизама, како у склопу SNP, тако и у склопу хаплотипова, у *IL4*, *IL5*, *IL6* и *IL10* гену са ризиком за настанак NHL, и појединих подтипова NHL (Lan, и сар., 2006).



У истој студији, дистрибуција *GG*, *GA* и *AA* генотипова у *IL6* -597 гену у оболелих од DLBCL је била 41% наспрам 44% наспрам 16%, и није се значајно разликовала од дистрибуције генотипова *IL6* -597 која је била присутна у здравој популацији становништва северне Америке (Lan, и сар., 2006). Слична учесталост генотипова у *IL6* -597 је запажена и у популацији становника Аустралије (36.8% наспрам 46.9% наспрам 16.2%) (Smallwood, и сар., 2008), и значајно различита од дистрибуције генотипова *IL6* -597 у популацији здравих становника Индије (Saxena, и сар., 2014). Студија Saxena и сарадника је потврдила доминацију *A* алела *IL6* -597SNP међу становништвом Индије која је била заступљена са учесталошћу од 87,14% у односу на *G* алел са учесталошћу од 12.86% (77.14% за *AA*, 20.0% за *AG* и 2.86% за *GG* генотип), што је значајно различито како у односу на резултате дистрибуције генотипова у наших испитаника, тако и у односу на студију Lan-а и Smallwood са сарадницима.

Резултати учесталости *IL2*-330 и *IL6* -597 полиморфизама у нашој анализи су у складу са досадашњим запажањима о различитој дистрибуцији полиморфизама гена везаних са различита поднебља и расе.

Предмет даљег истраживања је био процена учесталости генотипова у гену за *CD14* у позицији-159 у студији наших болесника са DLBCL. Дистрибуција и учесталост генотипова у гену за *CD14* на позицији -159 је била следећа: 23% оболелих је имало *CC* генотип, 41% је имало *CT*, и 36% оболелих су били носиоци *TT* генотипа.

У студији Andrie са сарадницима анализа учесталости генотипа *CD14*-159 полиморфизма је спроведена на популацији деце оболеле од лимфома из регије Грчке, при чему је 65% анализираних болесника припадало старосној доби од 5-12 година. У оболеле деце од NHL учесталост генотипова гена за *CD14* на позицији -159 је била 39.1% наспрам 39.1% наспрам 21.8%, за *CC*, *CT* и *TT* генотип, респективно, и дистрибуција генотипова у контролној групи здраве деце је била 18% наспрам 42% наспрам 23%, у односу на *CC*, *CT* и *TT* генотип (Andrie, и сар., 2009).

Дистрибуција и учесталост генотипова у шпанској популацији оболелих од карцинома дебелог црева је била 22% за *CC*, 53.7% за *CT* и 24.2% за *TT* генотипе, и није се много разликовала од учесталости генотипова у здравој популацији становника Шпаније (Zhou, и сар., 2014).

Упоредјујући учесталост генотипова у гену за *CD14-159*, може се закључити да је уочена дистрибуција генотипова у нашој популацији оболелих од DLBCL била упоредива са дистрибуцијом генотипова у деце Грчке оболеле од NHL, као и упоредива са уоченом дистрибуцијом генотипова добијених међу становницима Шпаније.

Фамилија ензима глутатион *S*-трансфераза *GSTM1*, *GSTT1* и *GSTP1* је значајна у метаболизму и детоксикацији различитих карциногених агенаса, али и антинеопластичних лекова који су стандардна терапија у лечењу лимфома. Функционалне студије генома сугеришу да делеције у *GSTT1* и *GSTM1* генима могу допринети карциногенези променом нивоа имунореактивних протеина (Moyer, и сар., 2007). Такође, резултати експерименталних истраживања полиморфизма гена *GSTP1Ile105Val* су показала да је овај полиморфизам функционално важан, односно да доводи до стварања активних, функционално различитих *GSTP1pi* протеина, и тако могу да имају улогу у метаболизму карциногених агенаса, настанку малигнух и других болести у човека (Bin and Luo, 2013).

Досадашња истраживања указују да изложеност пестицидима, хербицидима и различитим органофосфорним једињењима је повезано са чешћом појавом NHL (Schinasi, и сар., 2014; Сосо, и сар., 2013; Alavanja, и сар., 2014). Претпоставља се да *GSTs* варијације алела са мање ефикасном детоксикацијом потенцијалних карциногених супстанци које су присутне у окружењу, нарочито у условима професионалног рада, могу да допринесу већем ризику за настанак NHL. Ипак, резултати различитих студија су често конфузни и супротни, специјално у условима различитих малигнух оболења и пола. Недавно објављена асоцијациона мета анализа која је пратила болеснике са Ходжкиновим и NHL на серији од 1579 болесника са лимфомима и 2821 здравих субјеката је изнела да *null* генотип *GSTM1* и носиоци *Val* алела нису имали повећан ризик за оболевање од лимфома. Ипак, иста мета-анализа је издвојила значајан ризик за оболевање од лимфома у носиоца *GSTT1null* генотипа (*odds ratio* 2.22; *p* мање од 0.001) (Bin and Luo, 2013). Такође је објављено да носиоци двоструког *null* генотипа (*GSTT1* и *GSTM1*) додатно повећавају ризик за настанак NHL.

Додатној конфузности доприносе студије *GSTs* полиморфизма спроведене на оболелима од хематолошких болести које износе потпуно опречне резултате у погледу терапијског одговора, од веома повољних до

неповољних резултата лечења. Једно од објашњења за различите резултате би могло да буде да присуство *null* генотипа у *GSTs* ензимском систему може довести до пораста ефикасности хемиотерапије, и тако побољшати резултате лечења. Са друге стране, смањен детоксикациони капацитет повезан са *null* генотипом може проузрочити акомулацију генетских оштећења, доводећи до више испољене агресивне природе болести и резистентности на хемиотерапију (Cho, 2010).

У погледу удружености *GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1* генотипова и клиничких карактеристика у презентацији лимфома у нашој студији [пол, старост  $\leq 60$  vs.  $>60$  година, CSI/II наспрам III/IV, присуство Б симптома, туморски облик болести, присуство лимфома у више од 1 екстранодалне локализације и *IPI* скор низак/низак-средњи наспрамсредњи-висок/висок] није уочена статистички значајна повезаност. Међутим, уочили смо статистички значајно већа учесталост *GSTM1-null* генотипа у болесника са *DLBCL* који су имали мање од 60 година [odds ratio (OR) 3.12(3.12-9.17);  $p=0.03$ ].

Неколико до сада објављених студија је истраживало повезаност клиничких карактеристика лимфома у односу на *GSTs* полиморфизме (Cho, у и сар., 2010; Ноhaus, и сар., 2003). У студији Cho, и сарадника значајна повезаност је уочена између неповољног перформанс статуса оболелог ( $p=0.038$ ) и високог *IPI* score ( $p=0.012$ ) уколико су имали *GSTT1-null* генотип. Друга студија која је пратила болеснике са *DLBCL*, студија Yri, и сарадника је потврдила удруженост *GSTM1-positive* генотипа и нискоагресивног *IPI* score, док остале клиничке карактеристике у презентацији болести нису показале асоцијацију са другим *GSTs* полиморфизмима (Yri, и сар., 2013). Такође, присуство *GSTT1 null* генотипа у оболелих од Хочкиновог лимфома је било повезано са ниским *CS* болести и смањеним параметрима упале, односно ниском седиментацијом еритроцита (Ноhaus, и сар., 2003). У студији Ноhaus и сарадника, значајно чешће присуство *null* генотипа *GSTT1* гена је уочено у особа женског пола, млађих од 45 година живота (Ноhaus, и сар., 2003). Резултати наше студије су показали да је *GSTM1 null* генотип значајно чешће био присутан у оболелих млађих од 60 година, које уједно предсављају старосну границу садржану у *IPI* скору ( $\text{cut off} < 60$  година), односно године мање од 60 у дијагнози лимфома представљају повољнији прогностички параметар. Једно од могућих објашњења за чешћу појаву лимфома у оболелих који су

били носиоци *GSTM1-null* генотипа може да буде да је одсуство *GST* ензимске активности представљало фактор ризика на настанак DLBCL у особа млађих од 60 година. Међутим, резултати до сада објављених студија и мета-анализе нису потврдили удруженост *GSTM1* полиморфизма и појаве DLBCL (Chiu, 2005; Vin and Luo, 2013).

У наставку истраживања анализирали смо да ли постоји повезаност између полиморфизама у генима за *IL2 -330T/G* и *IL6 -597G/A* са клиничким карактеристикама оболелих од DLBCL.

Анализирајући повезаност *IL2 -330T/G* и *IL6-597G/A* генотипова са клиничким карактеристика оболелих од DLBCL (пол, старост, клинички стадијум, туморски облик болести, присуство екстранодалних локализација и *IPI* скор), нисмо доказали значајну удруженост ни једне наведене клиничке карактеристике са генотиповима *IL2* и *IL6* генског полиморфизма.

Неколико до сада објављених студија је истраживало повезаност клиничких карактеристика оболелих од NHL, укључујући DLBCL у односу на *IL2-330* полиморфизам. У студији Rahman и сарадника једина клиничка карактеристика која је значајно била удружена са *IL2-330SNP* је био перформанс статус оболелог од NHL (Rahman, и сар., 2018). Перформанс статус (PS) осликава реакцију оболелог организма на болест, као и способност болесника да толерише примењену терапију. У наведеној студији, болесници који су били носиоци нискосекреторног *G* алела су имали значајно чешће узнапредовао PS ( $\geq 2$ ) у односу на болеснике носиоце *T* генотипа *IL2-330* полиморфизма. Друга студија, Song-а и сарадника није утврдила ни једну повезаност клиничких карактеристика са *IL2-330 SNP*, што је у складу и са резултатима нашег истраживања (Song, и сар., 2015).

Анализирајући повезаност *IL6 -597 G/A* полиморфизма са клиничким карактеристикама оболелих, ни један од анализираних параметара болести у дијагнози лимфома није показао повезаност са *GG* или *AG* генотиповима *-597 IL6* полиморфизмом.

Анализирајући даље повезаност *CD14-159* полиморфизма са клиничким карактеристикама оболелих од DLBCLу дијагнози болести, уочена је значајна удруженост *CD14* полиморфизма са екстранодалним присуством болести ( $p=0.01$ ). У поређењу са хомозиготима *C* алела (*CC* генотип)

*CD14-159* полиморфизма, присуство *T* алела (*CT/TT* генотип) је било повезано са значајно чешћом екстранодалном презентацијом болести (OR 3.191, 95% CI, 1.282-7.94). Најчешће екстранодално место, односно орган је био желудац, који је био захваћен у 29% оболелих са екстранодалним присуством болести.

Резултати до сада објављених студија су указивали на повезаност *CD14-159* полиморфизма са карциномом желуца (Li, и сар., 2013). Резултати мета-аналитичке студије од стране Wang-а и сарадника су потврдили да *CD14-159* полиморфизам може бити удружен са повећаним ризиком од развоја карцинома желуца у појединаца са инфекцијом *H.pylori* (Wang, и сар., 2014). Друга студија, студија Türe-Özdemir и сарадника је потврдила повезаност између *CD14 T алела -159* генског полиморфизма са развојем гастричног МАЛТ лимфома (Türe-Özdemir, и сар., 2008). Везивање *CD14* антигена заједно са TLR за бактеријски липополисахарид (LPS) узрокује ослобађање цитокина који доводе до хроничне антигене стимулације и инфламације што представља увод у гастричну карциногенезу и лимфомагенезу. Хронична стимулација антигеном је највероватније и механизам који се наводи у развоју примарног DLBCL желуца. У извештајима о улози *CD14* као протективног антигена у погледу заштите домаћина од инфекције, Zanoni и Granucci су закључили да протективна улога *CD14* је зависна од врсте микроорганизма, али и од места инфекције (Zanoni, и сар., 2013).

Анализирајући претретманску вредност CRP као параметра упале у односу на генотипове *CD14-159* полиморфизма, уочена је разлика у средњој вредности CRP тако да је у носиоца *CC* генотипа CRP био 24(2.5-122)mg/l и 39.5 (2.2-266) mg/l у болесника са *CT/TT* генотипом, али без статистичке значајности ( $p=0.078$ ). Вредности осталих параметара упале као што су седиментација и фибриноген нису били повезани са различитим генотиповима *CD14-159* полиморфизма.

Трећи, и последњи циљ нашег истраживања је обухватао анализирање удружености полиморфизама у генима за *GST(GSTT1, GSTP1, GSTM1)*, *IL2-330T/G*, *IL6 -597G/A* и *CD14 -159C/T* са одговором на терапију, током и исходом лечења у оболелих од DLBCL.

У нашој студији болесника са DLBCL униформно лечених R-CHOP терапијом, нисмо потврдили повезаност *GST* генотипова са одговором на

примењену терапију, како у погледу стопе CR, тако и у погледу стопе прогресије болести и релапса.

Међутим, резултати нашег истраживања су показали да је *GSTP1* генски полиморфизам био повезан са дужином потребног периода до постизања CR, односно да је медијана до постизања CR у болесника са *Val* алелом *GSTP1* полиморфизма (*Val/Val* и *Ile/Val* генотипом) била статистички значајно краћа у односу на болеснике са *Ile/Ile* генотипом (219 дана наспрам 300 дана;  $p=0.05$ ). И исто тако, али без потврђене статистичке значајности, утврђено је да је истим модалитетом лечења медијана до постизања CR код болесника са *GSTT1* –позитивним генотипом била краћа у односу на носиоце *GSTT1-null* генотипа (210 наспрам 300 дана;  $p=0.22$ ). Исто тако, *GST* генотипови нису утицали на OS и DFS у наших болесника са лимфомом. Анализирајући параметре који су утицале на дужину OS болесника са DLBCL, у униваријантној анализи сигнификантни утицај је имао узнапредовали CS ( $p=0.04$ ) и неповољан, интермедијално-висок/висок IPI скор ( $p=0.01$ ). Међутим, мултиваријантна анализа је издвојила само IPI скор као независни прогностички параметар за OS [средњи-висок/висок IPI vs низак/низак-средњи IPI; HR 3.1, 95% CI 1.26-7.6;  $p=0.01$ ].

Иако детоксикациона активност *GST* штити ћелије од одређених болести, такође, може да умањи ефикасност одређених хемотерапеутских лекова који се користе у терапији тумора. Поједини цитостатици из групе алкилирајућих лекова припадају класама електрофилних једињења која су супстрати за *GSTs* (Eklund и сар., 2007). Прекомерна експресија *GST* изоензима је повезан са резистенцијом на лекове и, обрнуто, недостатак *GST* изоензима повећава осетљивост на канцерогене (Sau и сар., 2010).

Резултати до сада спроведених испитивања су показали да ензими из групе *GST* могу да доведу до резистентности на различите хемотерапијске агенсе као што је *melphalan*, *adriamycin*, *cyclophosphamide* (Rorrland, и сар., 2010). Многа малигна ткива имају висок ниво *GSTT1* ензима, независно од примењене хемотерапије и сматра се да могу да представљају битан *multidrug-resistant* фактор (Hayes, 2005). Више студија је до сада показало да је експресија *GSTP1* ензима у лимфном ткиву израженија у односу на друге *GSTs* ензиме и такође да постоји повезаност између нивоа *GSTP1* експресије у ткиву тумора и прогнозе различитих малигнух болести (Thieblemont, и сар., 2008; Kearns, и сар., 2001). Између осталих студија,

Рибраг са сарадницима је уочио значајну корелацију између *GSTT1* експресије у туморском ткиву лимфома и резултата лечења 69 болесника са DLBCL (Ribrag, 2003). Висока *GSTP1* експресија, у више од 50% туморских ћелија, била је повезана са мањом стопом *CR* и краћом дужином преживљавања до прогресије болести, док је одсуство *GSTP1* експресије у ткиву лимфома било удружено са повољним резултатима. У истој студији, *GSTP1* експресија у туморском ткиву је била је једини независтан прогностички параметар сензитивности на *CHOP* терапију (Ribrag, и сар., 2003).

Иако у нашој анализи нисмо одређивали ниво експресије *GSTP1* у лимфном ткиву оболелог, резултати студије Ribraga са сарадницима се могу упоредити са резултатима нашег истраживања које је потврдило повољан терапијски одговор у болесника који су имали *Val* алелску варијанту *GSTP1* гена. Полиморфизам једног нуклеотида, SNP у *GSTP1* гену доводи до супституције изолеуцина у валин у кодону 105 (*Ile105Val*) и повезана је са смањеном ензимском активношћу у поређењу са изолеуцином (Watson, и сар., 1998). Watson са сарадницима је показао да индивидуе са *Val* генотипом имају мању каталитичку активност у односу на индивидуе са *Ile* генотипом.

Већина хуманих туморских ћелијских линија које су резистентне на хемиотерапеутске агенсе прекомерно експримирају класу *GSTP1*. Значајне квантитативне корелације између активности ензима, укупних протеина и mRNA су нађене за *GSTP1*, посебно у оним ћелијским линијама које су отпорне на алкилирајућа средства као што су мелфалан, хлорамбуцил, циклофосфамид, BCNU и цисплатину (Gaziev и сар., 2015).

Такође, студија Katahira и сарадника је потврдила да је плазматски ниво *GSTP1* ензима значајан прогностички маркер за NHL у унапредовалом клиничком стадијуму болести, и исто тако да је укупно преживљавање и преживљавање без болести, као и стопа комплетних ремисија у болесника са повишеним плазматским нивоом *GSTP1* била мања у односу на болеснике са нормалним плазматским нивоом *GSTP1* ензима (Katahira, и сар., 2004). Ова сазнања потврђују чињенице да је *GSTP1* фактор који доприноси резистентности на adriamycin и cyclophosphamide, два основна хемиотерапијска агенса који се користе у лечењу NHL, и која су оба саставни део *CHOP* протокола.

Иста студија је упоредо са праћењем плазматског нивоа *GSTP1* одређивала и експресију *GSTP1* у лимфном ткиву, и није потврдила сигнификантну корелацију између плазматског нивоа и ткивне експресије *GSTP1* (Katahira, и сар., 2004).

У студији спроведеној у болесника са Ходжкиновим лимфом, Ноhaus и сарадници су приказали удруженост између *GSTP1 Ile105Val* полиморфизма и клиничких резултата у 97 болесника након примењене хемиотерапије. Резултати ове студије су потврдили значану разлику у 5-годишњем преживљавању болесника са *Val/Val* генотипом у односу на болеснике са *IleVal* и *IleIle* генотипом (100% према 74% према 43%) (Ноhaus и сар., 2005). Резултати ове студије су били у складу са резултатима других студија изведених на болесницима са различитим малигним болестима, које су такође потвдиле повољну прогнозу у односу на терапијски одговор носиоца *GSTP1 Val* алела (Stoehlmacher, и сар., 2002). Иако у нашем истраживању није уочена повезаност ни једног *GSTs* полиморфизма са дужином преживљавања болесника са DLBCL, ипак, повољан терапијски одговор који се огледао у значајно краћем временском периоду који је био потребан за стицање комплетне ремисије је уочен у болесника са *Val* алелском варијантом *GSTP1* гена, што је у складу са студијом изведеном на оболелима од Ходжкиновог лимфома.

Резултати нашег истраживања су показали да ни један од испитиваних *GST* полиморфизми није био повезан са OS и DFS. Анализирајући параметре који су утицале на дужину OS болесника са DLBCL, у униваријантној анализи сигнификантни утицај је имао узнапредовали CS ( $p=0.04$ ) и неповољан, интермедијално-висок/висок IPI скор ( $p=0.01$ ). Међутим, мултиваријантна анализа је издвојила само IPI скор као независни прогностички параметар за OS (HR 3.1, 95% CI 1.26-7.6;  $p=0.01$ ) у наших болесника, што је у складу са резултатима Cho и сарадника. У студији Yri и сарадника, низак IPI скор је издвојен као независан прогностички параметар за продужено преживљавање болесника са *GSTM1-positive* генотипом (Yri, и сар., 2013). Међутим, резултати нашег истраживања нису потврдили повезаност *GSTM1* генотипа и IPI скорa на укупно преживљавање наших болесника са DLBCL.

Присуство двоструког *null* генотипа *GSTM1/GSTT1* гена може смањити или одложити метаболизам хемиотерапије у оболелих од лимфома и може се очекивати да води бољој ефикасности терапије уз пораст токсичности.



Иако резултати студије Cho и сарадника нису потврдили бољи терапијски одговор у 94 новодијагностикована болесника са двоструким *null* генотипом лечених R-CHOP имунохемотерапијом, ова студија је показала значајну токсичност у болесника са *null* генотипом *GSTT1* гена у односу на *GSTT1-positive* генотип, и исто тако значајну токсичност R-CHOP терапије у болесника са двоструким *null* генотипом (*GSTM1/GSTT1*). Токсични ефекти у болесника са *GSTT1-null* генотипом су се испољили леукопенијом градус III-IV, повишеном температуром и мукозитисом, и у болесника са двоструким *null* генотипом значајно већом стопом изражене тромбоцитопеније. Иако ни један *GSTs* генотип није био повезан са укупним преживљавањем, уочено је значано лошије преживљавање без нежељених догађају у болесника мушког пола са *GSTM1/GSTT1-null* генотипом (Cho, и сар., 2010). Објављени резултати и других студија потврђују да *GSTT1-null* генотип значајно доприноси токсичним ефектима терапије (Morabito, и сар., 2012). У нашој студији R-CHOP терапија у новодијагностикованих болесника није била праћена значајним токсичним ефектима, животнoугрозавајућим инфекцијама или је захтевала значајније одлагање наредног циклуса имунохемиотерапије.

Резултати до сада спроведених истраживања су показали да метилација *GSTP1* може имати значајну улогу у патогенези Б-ћелијских лимфома (Rossi, и сар., 2004). Инактивација *GSTP1* у гастричном MALT лимфому изазива акумулацију слободних радикала што промовише лимфогенезу. Nakamichi са сарадницима је запазио да учестале абератне метилације *GSTP1* у DLBCL могу да доприносе резистенцији на хемиотерапију (Nakamichi, и сар., 2007). Према овом аутору, *GSTP1* метилација може да буде индикатор одговора на терапију и прогностички параметар за DLBCL. Сходно томе, развој инхибитора *GST* сепојављује као рационални одговор за превазилажење резистенције многих антитуморских лекова, и повећање њихове ефикасности. Недавно је објављен преглед који сумира напредак у развоју *GST* инхибитора (Ruzza, и сар., 2010). С друге стране, прекомерна експресија неких *GST* ензима даје могућност примене пролека у терапији лимфома. *GST* активира прекурсоре лекова и ослобађа се активна антитуморска супстанца која делује на тумор. Први пример *GST* зависне активације прекурсора лека је *cis-3-(9H-purin-6-ylthio)* акрилна киселина (Laschak и сар., 2012), прекурсор цитотоксичног агенса 6-меркаптопурина, ослобађа активни лек након реакције са *GST* и *in vitro* и *in vivo*, преко два различита пута. Ову активацију обезбеђују *GSTA1-1*,

GSTM1-1 и GSTP1-1 (Laschak, и сар., 2012). Међутим, овај механизам терапије доводи до нежељених ефеката, пре свега леукопеније и агранулоцитозе (Dornian, и сар., 2013). Недавно откривени 7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол деривати спадају у веома ефикасне инхибиторе глутатионС-трансферазе (GSTP1), ензима који испољава антиапоптоличку активност, и такође умањује ћелијски отпор туморске ћелије на хемиотерапију. Ови нови инхибитори показују липофилна својства погодна за пролаз кроз плазма мембрану. Western Blot и имунопреципитацијске анализе су показале да 6 - (7-нитро-2,1,3-бензокадиазол-4-илтио) хексанол промовише у обе ћелијске линије дисоцијацију GSTP1 комплекса са JNK. Овај процес повећава реактивне врсте кисеоника и (ROS)-независноактивирање JNK-посредованог пута што резултира процесом апоптозе. Ниска концентрација овог новог једињења је потребна да покрене цитотоксичне ефекте у ћелији тумора и ниска токсичност на мишевима указују на то да нови 7-нитро-2,1,3-бензокадиазол дериват обећава у терапији тумора (Economiks, и сар., 2010).

У последњих неколико година све више се придаје значај ензимског система GSTs у терапији канцера. Многи антиканцерски лекови су супстрати за GST и могу бити коњуговани са GST. Стога, прекомерна експресија GSTs у туморској ћелијској линији, посебно GSTP1-1, одговорна је за отпорност ћелије на одређене хемиотерапеутске лекове (Tripathy, и сар., 2006). Из ових разлога, постоје више покушаја да се пронађе инхибитор GST са циљем да модулира ћелијску отпорност на антиканцерске лекове и побољша цитотоксичне ефекте антинеопластичних агенаса. Најбоље окарактерисан инхибитори GST су диуретици, етакринска киселина и глутатион аналогни TER199. Етакринска киселина се везује за Н-site, има низак афинитет за ензим, и коњугована са GSH, лако се излучује из ћелије. Клиничка испитивања су показала озбиљну токсичност етакринске киселине, укључујући диурезу, метаболичке поремећаје и мијелосупресију (Guneidy, и сар., 2014). Други инхибитор (TER 199) је глутатионпептидомиметик који брзо улази у ћелије, и као пролек, се активира интрацелуларном естеразом. Различите класе цитотоксичних GSH аналога неинхибирају GST већ користе њен каталитичке моћи да се активирају. Пример је TER 286, чија структура има капацитет везивања за GST и активиран овим ензимом показује антиканцерско дејство (Townsend, и сар., 2005).

У наставку, анализирали смо *IL2-330* генски полиморфизам и његову повезаност са одговором на терапију, учесталост релапса и исходом лечења оболелих од DLBCL лечених *R-CHOP* терапијом. Резултати нашег истраживања нису показали значајну повезаност *IL2-330 T/G* генотипова са стопом остварених комплетних ремисија и учесталост релапса у болесника са *DLBCL*. Такође, генски полиморфизам *IL2-330* није био удружен са *DFS* и *OS* у односу на дистрибуцију генотипова. У мултиваријантној анализи једина варијабла која је утицала на *OS* је био *IPi* скор. Такође, *IL2* генотипови *-330* полиморфизма нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама или са значајним одлагањима терапијских циклуса.

У погледу других студија, објављени резултати истраживања генских полиморфизама у болесника са Б-ћелијским NHL су показали да полиморфизам *IL2* гена на позицији *-330* је удружен са резултатима лечења оболелих од фоликуларног лимфома (Serhan, и сар., 2007), односно, да је присуство *TT/GT* генотипова у позицији *-330 IL2* гена било значајно повезано са преживљавањем оболелих од фоликуларног лимфома. Друга студија, студија Rahman и сарадника није потврдила повезаност *IL2-330* полиморфизма са резултатима лечења оболелих од NHL (Rahman, и сар., 2017). Иако су носиоци *G* варијанте алела (*GG/TG*) имали краће 5-годишње преживљавање без присуства болести (*DFS*), није уочена статистички значајна разлика у *DFS* у односу на носиоце *TT* генотипа (45.3% наспрам 69.2%;  $p=0.211$ ), што је у складу са резултатима нашег истраживања у којима нисмо потврдили удруженост *DFS* са дистрибуцијом генотипова *IL2-330* полиморфизма.

Физиолошка улога *IL2* је у генерисању антитуморског одговора стимулацијом раста ефекторних (цитотоксичних) Т лимфоцита и НК ћелија. Обзиром на ову физиолошку улогу, његова смањена секреција може бити један од параметара у туморској прогресији. Механизам којим полиморфизам *IL2* гена на позицији *-330T / G* може да утиче на појаву NHL није у потпуности јасан. Са једне стране, *IL2* је укључен у диференцијацију Б ћелија, и на другој страни, *IL2* промовише експресију и повећава интринзичну цитотоксичност НК ћелија (Mehrool, и сар., 1998; Einsebes, и сар., 2004). Познато је да НК ћелије посредују у антителима-зависној ћелијској цитотоксичности (ADCC) путем експресије активирајућег рецептора за Fc део IgG антитела (Cooper и сар., 2001a).

Могуће да смањени ниво *IL-2* повезан са генским полиморфизмом *IL2* гена може умањити антитуморски одговор путем ADCC код болесника са NHL-ом и, стога, повећати осетљивост на појаву NHL.

Rituximab, химерично IgG1 моноклонско антитело управљено против CD20 антигена је ушло на велика врата почетком 2000 година за лечење Б-ћелијских лимфома. Иако прецизан механизам са којим *rituximab* испољава своју ефикасност није у потпуности разјашњен, све већи број података сугерише доминантну улогу од антитела зависну ћелијску цитотоксичност (ADCC). Други механизми деловања укључују директну индукцију апоптозе и комплементом посредовану цитолузу. ADCC је посредована бројним ефекторним ћелијама, укључујући макрофаге и NK ћелије које експримирају *IL2R (IL2Rbeta)* са интермедијарним афинитетом. Интермедијарне дозе *IL2* су способне да доведу до експанзије CD16+(FcγRIIIa) NK ћелије и активишу цитотоксичне ефекторне механизме, укључујући ADCC активност. Резултати спроведених студија фазе 1 и фазе 2 указују да додаток *IL2* може повећати цитотоксичност и ефикасност rituximaba и побољшати терапијски одговор у болесника са Б-ћелијским лимфомима (Gluck, и сар., 2004). У нашем истраживању није потврђен значајно различит терапијски одговор у болесника лечених R-CHOP терапијом у односу на различите генотипове *IL2-330* полиморфизма, како у погледу стопе остварених комплетних ремисија, тако и у погледу дужине преживљавања.

Солубилни *IL2Ralfa (sIL2Ralfa)* је солубилни облик *IL2Ralfa* ланца (CD25) који се ослобађа са активисаних Т и Б лимфоцита, и исто тако, може да води порекло од неопластичних лимфомских ћелија. Студије спроведене у болесника са различитим облицима лимфома су показале удруженост између јасне позитивне експресије CD25 на мембрани лимфомских ћелија и високог нивоа *sIL2Ralfa*, сугеришући да су извор *sIL2Ralfa* не само реактивне инфламаторне ћелије у окружењу лимфоног чвора већ и лимфомске неопластичне ћелије (Hashimoto, и сар., 2013). Резултати више објављених студија су показали да повишен ниво *sIL2R alfa* у серуму оболелих од DLBCL је повезан је са лошијом прогнозом и мањим терапијским одговором (Goto и сар., 2012; Hashimoto, и сар., 2013; Tomita, и сар., 2012). Такође, Tomita са сарадницима је показао да је висок ниво *sIL2Ralfa* заједно са унапредовалим клиничким стадијумом и повишеним нивоом лактичне дехидрогеназе, независтан прогностички параметар за

преживљавање болесника са DLBCL лечених имунохемио R-CHOP терапијом.

Поред улоге *IL2* у генерисању антитуморског одговора стимулацијом раста ефекторних (цитотоксичних) Т лимфоцита и NK ћелија, *IL2* је такође веома битан у генерисању CD4+FOXP3+ регулаторних ћелија (Treg) које имају супресорну улогу и посредују у енергији имуног система. Такође, *IL2* има инхибиторну улогу на Т фоликуларне хелпер (Tfh) ћелије герминативног центра лимфног чвора где Tfh ћелије промовишу *class switch* рекомбинације и стицање антигенског репертоара Б ћелија. На другој страни, и саме лимфомске ћелије могу да продукују различите факторе са имуносупресивном функцијом као што су *IL10*, *TGFbeta1* који чине неповољну микросредину за очекивану функцију Т лимфоцита у антитуморском одговору (Liao, и сар., 2013).

Сазнања о улози *IL2* стицана током базичних истраживања доприносила су развоју нових потенцијалних терапијских приступа у лечењу различитих болести. Тако промовишућа улога *IL2* може да оствари жељени терапијски одговор у лечењу малигних оболења са једне стране, док блокада ефекторских функција *IL2* или повећање Трег активности имају потенцијалну улогу у превенцији аутоимуности или масивног инфламаторног одговора. Директна манипулација активности *IL2* би могла да импликује његову улогу у контроли комплексног имуног одговора и за имуну терапију широког спектра болести (Liao, и сар., 2013).

У наставку, анализирали смо *IL6-597* генски полиморфизам и његову повезаност са одговором на терапију, учесталост релапса и исходом лечења оболелих од DLBCL лечених R-CHOP терапијом. Резултати нашег истраживања нису показали значајну повезаност *IL6-597 GG* и *GA* генотипова са стопом остварених комплетних ремисија и учесталост релапса у болесника са DLBCL. Такође, генски полиморфизам *IL6-597* није био удружен са DFS и OS у односу на дистрибуцију генотипова. У униваријантној анализи у наших болесника, на OS су значајно утицали IPI скор ( $p < 0.001$ ), клинички стадијум болести ( $p < 0.001$ ), апсолутни број лимфоцита ( $p = 0.001$ ) и однос апсолутног броја лимфоцита и моноцита ( $p < 0.001$ ). Међутим, у мултиваријантној анализи једини параметар који је значајно био повезан са OS је IPI скор.

Такође, GG и GA генотипови *IL6* гена на позицији-597 нису били повезани са нежељеним и/или токсичним ефектима терапије, инфекцијама или са значајним одлагањима терапијских циклуса.

У погледу резултата других студија, студија Aschebrook-Kilfoi и сарадника процењивала је удруженост полиморфизама у генима за различите цитокине са прогнозом оболелих од NHL. Студија је укључила 496 особа женског пола са NHL, од којих су 155 имале DLBCL. Анализирана су три најчешћа SNP у промотер региону гена за *IL6* у позицији -597G/A (*rs1800797*), -174G/C (*rs1800795*) и -572 G/C (*rs1800796*) за које је претходним истраживањима показано да припадају функционалним полиморфизмима који су у *linkage disequilibrium*-у. Резултати ове студије показују повезаност полиморфизама гена за *IL6* са укупним преживљавањем и преживљавањем без присуства болести за укупну популацију оболелих од NHL. Ова студија је потврдила да је *IL6* -572 полиморфизам значајно удружен (HR 0.42; 95%CI, 0.23-0.77) са смањеним ризиком за смртни исход, и исто тако са смањеним ризиком за настанак релапса између оболелих од NHL. Док је смањени ризик за релапс и смртни исход уочен за болеснике са DLBCL и *IL6*-572 полиморфизмом (HR 0.2, 95%CI, 0.05-0.83), анализа удружености SNP *IL6* гена на позицији -597 и резултата лечења DLBCL није потврђена (HR 1.61, 95% CI, 0.91-2.83) (Aschebrook-Kilfoi, и сар., 2012).

Друга студија, студија Giachelia и сарадника је истраживала повезаност *IL6* полиморфизма *rs1800795* са резултатима болесника са DLBCL лечених R-CHOP имунохемотерапијом. Резултати студије спроведене на популацији оболелих беле расе су потврдили да је *IL6* полиморфизам био удружен са укупним преживљавањем и преживљавањем без прогресије болести. Такође, повишена концентрација *IL6* у серуму оболелих је била удружена са неповољном прогнозом и инфериорнијим терапијским одговором код DLBCL (Giachelia и сар., 2012). Иста студија, међутим, није потврдила повезаност серумског нивоа *IL10* са резултатима лечења оболелих. Студија Giachelia и сарадника, такође, није потврдила генотипску-фенотипску повезаност између *IL6* концентрације у серуму оболелих од DLBCL са *IL6* rs 1800795 SNP. Међутим, резултати ове студије су такође указали да болесници који имају делецију у гену за NF- $\kappa$ B (*delATTG*, rs 28362491) су имали виши серумски ниво *IL6* и *IL10*, што

указује да полиморфизам у гену за NF- $\kappa$ B може имати улогу у прогнози болесника лечених R-CHOP терапијом.

Познато је да *IL6* стимулише синтезу протеина акутне фазе и подстиче раст Б лимфоцита. Фактор некрозе тумора (*TNF*) је један од првих цитокина који се ослобађа као одговор на инфламаторне процесе, и генерише каскаду даљих дешавања која укључује секрецију *IL1*, *IL6*, као и друге медијаторе. Резултати објављених студија указују да *IL6* повећава експресију антиапоптоличног bcl-2 у туморском лимфном ткиву (Tumangi сар., 2002). Резултати више студија говоре да полиморфизми у генима за *IL6* и *IL10* могу бити повезани са ризиком за појаву болести и прогнозу оболелих од Ходжкиновог и NHL (Hohaus, и сар., 2007).

Молекул *CD14*, рецептор за липополисахарид има значајну улогу у регулацији имунског одговора и инфламацији (Türe-Özdemir сар.; 2008). Солубилни *CD14* има способност да мења целуларни и хуморални имунски одговор директном интеракцијом са Т и Б лимфоцитима. Повишени ниво солубилног *CD14* је нађен у различитим облицима инфекција, инфламаторних болести као и у пацијената са NHL. Подаци из литературе указују да је присуство одређених алелских облика гена за *CD14* удружено са нивоом солубилног *CD14* у серуму, као и да је ниво *sCD14* значајно повећан у болесника са агресивним NHL (Aoun, и сар., 2004 ; Aга, и сар., 2010).

У даљем току нашег истраживања испитивали смо удруженост *CD14-159* полиморфизма са одговором на примењену R-CHOP имунохемиотерапију. Резултати нашег истраживања су показали да генотипови *CD14-159* полиморфизма нису били повезани са стопом комплетних ремисија, нити удружени са стопом испољене резистентне болести и релапса.

Анализирајући повезаност терапијског одговора у болесника са DLBCL у односу на генотипове *CD14-159* полиморфизма, нисмо потврдили статистички значајну повезаност дужине преживљавања без релапса болести (RFS) и OS у односу на *CD14-159* генски полиморфизам. Разматрајући параметре који су утицали на OS наших болесника, у униваријантној анализи издвојен је IPI скор, CS болести, апсолутни број лимфоцита и лимфоцитно/моноцитни однос, међутим, у мултиваријантној анализи IPI скор је био једини параметар повезан са OS у наших болесника.

Солубилни облик CD14 детектабилан је и у крви здравих појединаца. Пораст вредности *sCD14* је повезана са различитим инфламаторним болестима. Baseggio са сарадницима је утврдио да болесници са NHL имају значајније веће концентрације *sCD 14* у крви него здрави појединци. Такође, интересантно запажање ове студије је да су болесници са агресивним Б-ћелијским лимфомима, као што су DLBCL или Burkitt лимфоми, имали мање вредности *sCD14* у односу на болеснике са индолентним облицима лимфома. У додатку, вредности *sCD14* су биле значајно повезане са вредностима CRP и TNF, указујући на значај цитокина у инфламаторном одговору оболелог.

У нашем истраживању показали смо да су болесници са високо-продукујућом Т алелском варијантом (*CT/TT* генотип) *CD14-159* полиморфизма имали више вредности CRP, мада нисмо установили статистичку значајност. Резултати претходних студија су показали да су више вредности CRP при дијагнози болести биле неповољан прогностички параметар за клинички исход (Torgan, и сар., 2014).

Инфективне компликације настале током примене R-CHOP терапије су се испољиле код 25% лечених болесника, и биле су чешће удружене са *CC* него са *CT/TT* генотиповима (39% наспрам 22%), међутим ова разлика није показала статистичку значајност ( $p= 0.083$ ). Такође, праћењем раних компликација током трајања активног лечења (посттерапијски мукозитис, агранулоцитоза, анемија, тромбоцитопенија, акутна бубрежна слабост, повишена температуре, васкуларни и тромбоемболијски конфликти) уочен је тренд њихове чешће појаве у болесника са *CC* генотипом у односу на болеснике са *CT/TT* генотиповима (42% наспрам 24%;  $p= 0.079$ ).

Велики број студија је истраживао повезаност између CD14 експресије и учесталости/дужине трајања инфекција (Keerthivasan, и сар., 2014; Ну, и сар., 2015). Како су резултати нашег испитивања утврдили повезаност између високопродукујућег Т алела -159 полиморфизма гена за *CD14* са екстранодалним присуством болести и повишеним вредностима CRP, можемо закључити да су наши резултати у складу са овим извештајима. Ипак, наши болесници са *CD14-159 T* алелом (*CT/TT* генотип) су имали мању стопу инфективних компликација током примене R-CHOP терапије у односу на *CC* генотип. Такође, и ране компликације које су пратиле имунохемиотерапију су биле чешће у болесника са *CC* генотипом.



Присуство инфективних и раних компликација лечења су према претходним извештајима представљале неповољан клинички догађај ( Pole, и сар., 2017; Jung, и сар., 2015).

Анализирајући целу популацију болесника са DLBCL, нисмо утврдили повезаност *T/C* алела *CD14-159* полиморфизма са дужином преживљавања без појаве релапса болести (RFS) и OS. Ипак, болесници са екстранодалним присуством болести који су били носиоци хомозиготне *T* алелске варијанте *CD14-159* су имали сигнификантно дуже RFS (HR 2.422,  $p=0.026$ ) и OS (HR 0.503,  $p=0.038$ ).

Резултати претходних студија које су пратиле повезаности између *CD14* генотипова/продукције и преживљавања болесника са малигним болестима су контрадикторни. Док су поједине студије спроведене на болесницима са туморима солидних органа налазиле удруженост нивоа експресије *CD14* на туморским ћелијама са прогресијом болести и лошим исходом (Cheah, и сар., 2015), студија Seiffert-а и сарадника је закључила да је ниво *sCD14* идентификован као нови прогностички параметар за преживљавање болесника са хроничном лимфоцитном леукемијом (Seiffert, и сар., 2010). Ипак, анализирајући ниво експресије *CD14* на препарату примарног тумора при дијагнози дисеминованог неуробластомом, Stigliani и сарадници су изнели супериорни EFS и OS у болесника са високим нивоом *CD14 mRNA*, док су болесници са ниским степеном експресије *CD14mRNA* имали лошије преживљавање. Увидом у наведене резултате, аутори студије су сугерисали да ћелије (макрофаги и дендритичне ћелије) које експримирају *CD14* могу бити одговорне за активацију Т лимфоцита, што ограничава туморску прогресију (Stigliani, и сар., 2015).

Студије спроведене у болесника са DLBCL су закључиле да је повећано присуство макрофага у туморском ткиву лимфома повезано са неповољним исходом лечења. У нашој студији нисмо анализирали степен инфилтрације макрофага у ткиву лимфома, нити смо одређивали експресију *CD14mRNA* у ткиву тумора. Међутим, резултати наше студије потврђују бољи терапијски одговор у оболелих са високопродукујућим *TT* генотипом, али само у групи болесника са екстранодалним манифестацијама болести.

Студије које су истраживале повезаност *CD14-159* полиморфизма и исхода болесника са солидним туморим, ретке су. Упркос учесталим налазима неповољног исхода у болесника са *TT* генотипом *CD14-159* полиморфизма, Mansur са сарадницима је изнео да је преживљавање код болесника са *T* варијантом алела побољшано у односу на *C* варијанту алела (Mansur, и сар., 2015). Супериорније преживљавање у критично болесних након оштећења опекотинама је, такође, уочено код носиоца *TT* генотипа *CD14-159* гена.

Резултати нашег истраживања указују да полиморфизми у генима укљученим у метаболизам лекова садржаних у R-CHOP протоколу могу, барем делимично, да објасне различит исход терапије. Последњих година се све више истиче да појединачне генетске модификације, као што је полиморфизам једног нуклеотида, нису довољне да објасне толику интериндивидуалну разлику у терапијском одговору, већ да у основи ове разноликости се налазе промене у бројним генима удруженим са транспортом, метаболизмом и детоксикацијом лекова. Генски полиморфизми могу кодирати не само протеине укључене у дистрибуцију и метаболизам лекова, већ и протеинске продукте укључене у рецепторске и сигналне путеве и *DNA repair* механизме. Стицања нових сазнања из области полиморфизма гена могу предвидети ефикасност и токсичност терапије усмерене према појединцу, етничким групама и различитим поднебљима, чиме се све више баве студије фармакогенетике и фармакокинетике.

У наше истраживање је била укључена етнички хомогена популација болесника код којих је дијагноза DLBCL, униформна R-CHOP терапија и систематско праћење спровођено у једном центру.

Увидом у резултате нашег истраживања може се закључити да полиморфизми у генима за *GSTs* (*GSTP1* и *GSTM1*) и *CD14-159* су повезани са иницијалним клиничким карактеристикама оболелих, и удружени са исходом лечења болесника са DLBCL који су примали R-CHOP имунохемотерапију.

## VI ЗАКЉУЧЦИ

- Учесталост генотипова/алела у генима за *GST* (*GSTT1*, *GSTP1*, *GSTM1*), *IL2 -330T/G*, *IL6 -597G/A* и *CD14 -159C/T* код наших болесника са DLBCL није се разликовала од њихове учесталости у популацији оболелих од лимфопрولیферативних болести и здравих испитаника у Европи
- Присуство *GSTM1null genotipa* је значајно чешће у болесника са DLBCL млађих од 60 година
- Болесници са *CD14-159 CT/TT* генотипом су имали значајно чешће присуство болести у екстранодалним локализацијама у односу на болеснике са *CC* генотипом
- У болесика са екстранодалном презентацијом болести присуство *TT* генотипа у гену за *CD14-159* је било удружено са значајно дужим преживљавањем без болести (*DFS*) и укупним преживљавањем (*OS*) у односу на болеснике са *CC/CT* генотипом
- Интернационални прогностички скор (*IPI*) и *CD14-159 TT* генотип су прогностички параметри удружени са преживљавањем болесника оболелих од DLBCL који су имали екстранодалну презентацију болести
- Медијана до постизања комплетне ремисије (*CR*) у болесника са *Val* алелом *GSTP1* полиморфизма (*Val/Val* и *Ile/Val* генотип) је била значајно краћа у односу на медијану у болесника са *Ile/Ile* генотипом
- Полиморфизми у генима за *GSTT1*, *IL2-330T/G* и *IL6 -597G/A* нису били удружени са клиничким карактеристикама и исходом лечења у оболелих од DLBCL.

## VII ЛИТЕРАТУРА

1. Abdellaoui R, Yahyaoui F, Neffati M. Population structure and genetic diversity of a medicinal plant species *Retama raetam* in southern Tunisia. *Pak J Biol Sci.* 2014;17(2):182-9.
2. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-511.
3. Dias C, Isenberg DA. Susceptibility of patients with rheumatic diseases to B-cell nonHodgkin lymphoma. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7(6):360-368.
4. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(17):9991-9996.
5. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* 2010;327:291–295.
6. Eckmann L, Nebelsiek T, Fingerle AA, Dann SM, Mages J, Lang R, Robine S, Kagnoff MF, Schmid RM, Karin M, et al. 2008. Opposing functions of IKK $\beta$  during acute and chronic intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 105:15058–15063.
7. Bin Q, Luo J. Role of polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma risk: a Human Genome Epidemiology (HuGE) review. *Leukemia and Lymphoma* 2013;54(1):14-20.
8. He F, Liu Ch, Zhang R, Hao Z, Li Y, Zhang N and Zheng L. Association between the glutathione-S-transferase T1 null genotype and esophageal cancer susceptibility: a meta analysis involving 11163 subjects. *Oncotarget* 2018;9(19):15111-121.

9. Klusek J, Nasierowska-Guttmejer A, Kowalik A, Wawrzycka I, Lewitowicz P, Chrapek M, Gluszek S. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and colorectal cancer risk in Polish nonsmokers. *Oncotarget* 2018;9(30):21224-21230.
10. Li J, Xu W, Liu F, Huang S, He M, GSTM1 polymorphism contribute to colorectal cancer in Asian populations:a prospective meta-analysis. *Sci Rep* 2015;5:12514
11. Wang Y, He J, Ma TJ, Lei W, Li F, Shen H, Shen ZY. GSTT1null genotype significantly increases the susceptibility to urinary system cancer: Evidences from 63876 subjects. *J Cancer* 2016; 7(12): 1680-1693.
12. Jostock T, Müllberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem.* 2001;268(1):160-7.
13. Juskevicius D, Ruiz C, Dirnhofer S, Tzankov A. Clinical, morphologic, phenotypic, and genetic evidence of cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphomas with CYCLIN D1 gene rearrangements. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(5):719-27.
14. Kaneko J, Gozu K, Aoyagi H, Matsui T, Yoshida T, Hasegawa K, Isogai J, Maejima S. A case of iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disease in a patient treated with methotrexate for rheumatoid arthritis for 9 consecutive years, which showed natural remission after discontinuation of MTX therapy. *Gan Kagaku Ryoho* 2013;40(12):2454-6.
15. Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer.* 2010;46(7):1223-31.
16. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):749–59.
17. Kawano M., Hirano T., Matsuda T., Taga T., Horii Y., Iwato K., Asaoku H., Tang B., Tanabe O. and Tanaka H. Autocrine generation

- and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988; 332, 83-85.
18. Kuppers R, Dall-a-Favera R: Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 2001; 20(40):5580-94.
19. Kyle PB, Smith SV, Baker RC, Kramer RE. Mass spectrometric detection of CYP450 adducts following oxidative desulfuration of methyl parathion. *J Appl Toxicol.* 2013;33(7):644-51.
20. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:22–33.
21. Laschak, M.; Spindler, K.D.; Schrader, A.J.; Hessenauer, A.; Streicher, W.; Schrader, M.; Cronauer, M.V. JS-K, a glutathione/glutathione S-transferase-activated nitric oxide releasing prodrug inhibits androgen receptor and WNT-signaling in prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2012, 12, 130:1–130:10.
22. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med.* 2010;362(15):1417–1429.
23. Levine EG, King RA, Bloomfield CD. The role of heredity in cancer. *J Clin Oncol* 2009;7:527–40.
24. Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N, Tsai AG. Nonhomologous DNA end joining (NHEJ) and chromosomal translocations in humans. *Subcell Biochem.* 2010;50:279-96.
25. Licciardello C, D'Agostino N, Traini A, Recupero GR, Frusciante L, Chiusano ML. Characterization of the glutathione S-transferase gene family through ESTs and expression analyses within common and pigmented cultivars of *Citrus sinensis* Osbeck. *BMC Plant Biol.* 2014;14:39.
26. Lindsay M Morton, James R Cerhan, Patricia Hartge,1 Mohammad A Vasef, Vishala T Neppalli, Yasodha Natkunam, et al. Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, NIH, DHHS, Rockville, MDJ *Mol Epidemiol Genet.* Aug 30, 2011; 2(3): 245–252.

27. Lossos IS. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005;23(26):6351–6357.
28. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.* 2014;66:75-87.
29. Mackay F1, Tangye SG. The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancers. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(4):347-54.
30. Malinowska K, Neuwirt H, Cavarretta IT, Bektic J, Steiner H, Dietrich H, Moser PL, Fuchs D, Hobisch A, Culig Z. Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor. *Endocr Relat Cancer.* 2009 Mar;16(1):155-69.
31. Marculescu R, Le T, Simon P, Jaeger U, Nadel B : V(D)J-mediated translocations in lymphoid neoplasms: a functional assessment of genomic instability by cryptic sites. *J Exp Med* 2002;195(1):85-98.
32. Aschebrook-Kilfoy B, Zheng T, Foss F, Ma S, Han X, Lan Q, Holford T, Chen Y, et al. Polymorphisms in immune function genes and non-Hodgkin lymphoma survival. *J Cancer Surviv.* 2012; 6(1):102-14.
33. Martin G. V(D)J Recombination : RAG proteins, repair factors, and regulation. *Ann Review Biochemistry* 2002; 71: 101-132.
34. Mashiyama ST, Malabanan MM, Akiva E, Bhosle R, Branch MC, Hillerich B, Jagessar K, Kim J, et al. Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. *PLoS Biol.* 2014;12(4):e1001843.
35. Meier VS, Ruffe A, Gudat F. Simultaneous evaluation of T- and B-cell clonality, t(11;14) and t(14;18), in a single reaction by a four-color multiplex polymerase chain reaction assay and automated high-resolution fragment analysis. *Am J Pathol.* 2008;159(6):2031–2043.
36. Cerchetti L, Leonard JP. Targeting the epigenome and other new strategies in diffuse large B-cell lymphoma: Beyond R-CHOP. *Hematologica* 2013;2013:591-595.
37. Morton LM, Wang SS, Cozen W, et al. Etiologic heterogeneity among non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Blood.* 2008; 112: 5150-5160.

38. Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000;102:553–563.
39. Nakamichi I, Tomita Y, Zhang B, Sugiyama H, Kanakura Y, Fukuhara S. et al. Correlation between promoter hypermethylation of GSTP1 and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma. *Ann. Hematol.* 2007; 86, 557–564.
40. Nagaoka H, Muramatsu M, Yamamura N, Kinoshita K, Honjo T. Activation-induced deaminase (AID)-directed hypermutation in the immunoglobulin Smu region: implication of AID involvement in a common step of class switch recombination and somatic hypermutation. *J Exp Med*. 2002; 195(4):529-34.
41. Nagle SJ, Woo K, Schuster SJ, Nasta SD, Stadtmauer E, Mick R, et al. Outcomes of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma with progression of lymphoma after autologous stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol* 2013;10:890-4.
42. Nakamura S, Matsumoto T. Helicobacter pylori and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: recent progress in pathogenesis and management. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(45):8181-7.
43. Nie Nie , Chen Z, Cao C, Cen Y. Absence of association between GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and melanoma susceptibility: a meta-analysis. *DNA Cell Biol*. 2011; 30(10): p. 783–8.
44. Barry K.H., Koutros S., Lubin J.H., Coble J.B., Barone-Adesi F., Freeman L.E.B., Sandler D.P., Hoppin J.A., Ma X., Zheng T., Alavanja M.C. Methyl bromide exposure and cancer risk in the Agricultural Health Study. *Cancer Cause. Control*. 2012;23:807–818.
45. Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, et al. Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition. *Cancer Med*. 2014; 3(1):143-53.



46. Ozbalak M, Ar MC, Tuzuner N, Salihoglu A, Eskazan AE, Ongoren Aydin S, Baslar Z, Soysal T, Aydin Y, Barak Dolgun A, et al. Detailed analysis of diffuse large B cell lymphoma patients: a single-center, retrospective study. *ISRN Hematol.* 2013; 2013:908191.
47. Pelekanou V, Notas G, Kampa M, Tsenteliero E, Stathopoulos EN, Tsapis A, Castanas E. BAFF, APRIL, TWEAK, BCMA, TACI and Fn14 proteins are related to human glioma tumor grade: immunohistochemistry and public microarray data meta-analysis. *PLoS One.* 2013; 8(12):e83250.
48. Petrizzo A, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L. Prediction of individual immune responsiveness to a candidate vaccine by a systems vaccinology approach. *J Transl Med.* 2014; 12:11.
49. Smith JP, Zheng D, Palmén J, Pang DX, Woo P, Humphries SE. Effects of genetic variation on chromatin structure and the transcriptional machinery: analysis of IL6 gene locus. *Genes Immun* 2012; 13(7):583-586.
50. Smith JP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(1):43-59.
51. Robert J, Le Morvan V, Giovannetti E, Peters GJ. PAMM group of EORTC. On the use of pharmacogenetics in cancer treatment and clinical trials. *Eur J Cancer* 2014;50(15):2532-43.
52. Bassig BA, Lan Q, Rothman N, Zhang Y, Zheng T. Current understanding of lifestyle and environmental factors and risk of non-hodgkin lymphoma: an epidemiological update. *J Cancer Epidemiol.* 2012; 2012:978930.
53. Procházka V, Pytlík R, Janíková A, Belada D, Sálek D, Papajík T, Campr V, Fürst T, Furstova J, Trněný M. A New Prognostic Score for Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP: The Prognostic Role of Blood Monocyte and Lymphocyte Counts Is Absent. *PLoS One.* 2014 Jul 24;9(7):e102594.

54. Ree AH, Saalen MG, Kalanxhi E, Østensen IH, Schee K, Røe K, Abrahamsen TW, Dueland S, Flatmark K. Biomarkers of histone deacetylase inhibitor activity in a phase 1 combined-modality study with radiotherapy. *PLoS One*. 2014; 9(2):e89750
55. Reed JR, Cawley GF, Ardoin TG, Dellinger B, Lomnicki SM, Hasan F, Kiruri LW, Backes WL. Environmentally persistent free radicals inhibit cytochrome P450 activity in rat liver microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 1;277(2):200-9
56. Reina-San-Martin, B., J. Chen, A. Nussenzweig, and M.C. Nussenzweig. 2007. Enhanced intra-switch region recombination during immunoglobulin class switch recombination in 53BP1(-/-) B cells. *Eur. J. Immunol*. 37:235–239.
57. Rendleman J, Antipin Y, Reva B, Adaniel C, Przybylo JA, Dutra-Clarke A, Hansen N, Heguy A, et al. Genetic Variation in DNA Repair Pathways and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *PLoS One*. 2014; 9(7):e101685.
58. Ribrag V, Koscielny S, Carpiuc I, Cebotaru C, Vande Walle H, Talbot M, Fenaux P, Bosq J. Prognostic value of GST-pi expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*. 2003;17(5):972-7.
59. Ritz O, Möller P, Ushmorov A. Targeting the intratumor heterogeneity in PMBL. *Cell Cycle*. 2014;13(15).
60. Rosenwald AG, Wright K, Leroy X, Yu P, Gaulard RD, Gascoyne WC, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003; 198:851–862.
61. Rosenwald AG, Wright WC, Chan JM, Connors E, Campo RI, Fisher RD, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346:1937–1947.

- 62.Rochman Y., Spolski R. and Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by  $\gamma$ c family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9:480-490
- 63.Rothman N, Skibola CF, Wang SS, Morgan G, Lan Q, Smith MT, et al. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol* 2006;7(1):27–38.
- 64.Rusiecki JA, Patel R, Koutros S, Beane-Freeman L, Landgren O, Bonner MR, Coble J, et al. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to permethrin in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect.* 2009; 117(4):581-6.
- 65.Ruzza P, Rosato A, Rossi CR, Floreani M, Quintieri L. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009; 9(7):763-77.
- 66.Sangrajrang S, Renard H, Kuhaprema T, Pornsopone P, Arpornwirat W, Brennan P. Personal use of hair dyes--increased risk of non-Hodgkin's lymphoma in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(9):2393-6.
- 67.Sau A, Pellizzari Tregno F, Valentino F, Federici G, Caccuri AM. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys.* 2010 Aug 15; 500(2):116-22.
- 68.Shaffer AL, 3rd, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. A comprehensive review of the molecular pathogenesis of B-NHL. *Annu Rev Immunol* 2012;30:565–610.
- 69.Shah NN, Harrison N, Stonecypher M, Frank D, Amorosa V, Svoboda J. Extracavitary Primary Effusion Lymphoma Initially Presenting With Hemophagocytic Lymphohistocytosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 15: 92-7.
- 70.Sheehan D, Meade G, Foley VM and Dowd CA. „Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily“. *Biochem. J.* 2001; 360: 1-16.

71. Bergtold A., Desai DD., Gavhane A., Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 2005; 23:503-514.
72. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K, et al. dbSNP: The NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2011;29(1):308–311.
73. Shiels MS, Engels EA, Linet MS, Clarke CA, Li J, Hall HI, Hartge P, Morton LM. The epidemic of non-Hodgkin lymphoma in the United States: disentangling the effect of HIV, 1992-2009. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013 Jun; 22(6):1069-78.
74. Schinasi L, Leon ME. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2014; 11(4):4449-527.
75. Sterne JA, Sutton AJ, Ioannidis JP, Terrin N, Jones DR, Lau J, Carpenter J, Rucker G, Harbord RM, Schmid CH, et al. Recommendations for examining and interpreting funnel plot asymmetry in meta-analyses of randomised controlled trials. *BMJ.* 2011 Jul 22;343:d4002.
76. Sung VM, Shimodaira S, et al: Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol.* 2003; 77(3):2134-46.
77. Swerdlow SH. Lymphoma classification and the tools of our trade: an introduction to the 2012 USCAP Long Course. *Mod Pathol.* 2013 Jan;26 Suppl 1:S1-S14.
78. Sweetenham JW. Molecular signatures in the diagnosis and management of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol.* 2011; 18(4):288-92.
79. Bumera-Ciećkiewicz A, Gałązka K, Szpor J, Rymkiewicz G, Jesionek-Kupnicka D, Gruchała A, et al. Distribution of lymphomas in Poland according to World Health Organization classification: analysis of 11718 cases from National Histopathological Lymphoma

- Register project - the Polish Lymphoma Research Group study. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7(6):3280-6.
80. Thompson CA, Habermann TM, Wang AH, Vierkant RA, Folsom AR, Ross JA, Cerhan JR. Antioxidant intake from fruits, vegetables and other sources and risk of non-Hodgkin's lymphoma: the Iowa Women's Health Study. *Int J Cancer.* 2010; 126(4):992-1003.
81. Tilly H, Dreyling M, (2010) ESMO Guidelines Working Group. Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up *Ann Oncol* (2010) 21(suppl 5): v172-v174.
82. Townsend DM, Findlay VL, Tew KD. Glutathione S-transferases as regulators of kinase pathways and anticancer drug targets. *Methods Enzymol.* 2005;401:287-307.
83. Tsuji T, Hirano T, Yamasaki H, Tsuji M, Tsuda H. A high sIL-2R/ferritin ratio is a useful marker for the diagnosis of lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol.* 2014;93(5):821-6.
84. Venkatesan G, Balamurugan V, Bhanuprakash V. TaqMan based real-time duplex PCR for simultaneous detection and quantitation of capripox and orf virus genomes in clinical samples. *J Virol Methods.* 2014;201:44-50.
85. Vergnaud AC, Norat T, Romaguera D, Mouw T, May AM, Romieu I, Freisling H, Slimani N, et al. Fruit and vegetable consumption and prospective weight change in participants of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Physical Activity, Nutrition, Alcohol, Cessation of Smoking, Eating Out of Home, and Obesity study. *Am J Clin Nutr.* 2012 Jan; 95(1):184-93.
86. Bohers E, Mareschal S, Bouzelfen A, Marchand V, Ruminy P, Maingonnat C, Ménard AL, Etancelin P, Bertrand P, et al. Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53(2):144-53.

87. Wang SS, Slager SL, Brennan P, Holly EA, De Sanjose S, Bernstein L, Boffetta P, Cerhan JR, Maynadie M, Spinelli JJ, Chiu BC, et al. Family history of hematopoietic malignancies and risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL): a pooled analysis of 10 211 cases and 11 905 controls from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood*. 2007;109(8):3479-88.
88. Webb G., Vaska V., Coggan M. and Board, P. Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics* 1996; 33:121-123.
89. Wilkins HM., Brock S., Gray JJ., Linseman DA. Stable over-expression of the 2-oxoglutarate carrier enhances neuronal cell resistance to oxidative stress via Bcl-2-dependent mitochondrial GSH transport. *J. Neurochem*. 2014 Jul; 130(1): 75-86.
90. Wilson WH, Pittaluga S, Nicolae A, Camphausen K, Shovlin M, Steinberg SM, Roschewski M, Staudt LM, Jaffe ES, Dunleavy K. A prospective study of mediastinal gray zone lymphoma. *Blood*. 2014; 124(10):1563-1569.
91. Wright GB, Tan A, Rosenwald EH, Hurt A, Wiestner, and LM Staudt. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100:9991–9996.
92. Xie Y, Bulbul MA, Ji L, Inouye CM, Groshen SG, Tulpule A, O'Malley DP, Wang E, Siddiqi IN. p53 expression is a strong marker of inferior survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma and may have enhanced negative effect with MYC coexpression: a single institutional clinicopathologic study. *Am J Clin Pathol*. 2014;141(4):593-604.
93. Yamamura T, Miyake S. B-cell-directed therapy: which B cells should be targeted and how? *Immunotherapy*. 2012 May;4(5):455-7.
94. Yamauchi T, Matsuda Y, Takai M, Tasaki T, Tai K, Hosono N, Negoro E, Ikegaya S, et al. Early relapse is associated with high serum soluble interleukin-2 receptor after the sixth cycle of R-CHOP

- chemotherapy in patients with advanced diffuse large B-cell lymphoma. *Anticancer Res.* 2012;32(11):5051-7.
95. Bonner M.R., Williams B.A., Rusiecki J.A., Blair A., Freeman L.E.B., Hoppin J.A., Dosemeci M., Lubin J., Sandler D.P., Alavanja M.C.R. Occupational exposure to terbufos and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. *Cancer Cause Control.* 2010;21:871–877.
96. Yang F, Xiong J, Jia XE, Gu ZH, Shi JY, Zhao Y, Li JM, Chen SJ, Zhao WL. GSTT1 deletion is related to polycyclic aromatic hydrocarbons-induced DNA damage and lymphoma progression. *PLoS One.* 2014;9(2):e89302.
97. Yano H, Thakur A, Tomaszewski EN, Choi M, Deol A, Lum LG. Augments antitumor activity of bispecific antibody-armed T cells. *J Transl Med.* 2014;12:191
98. Yee C., Yang W., Hekimi S. The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans*. *Cell.* 2014; 157: 897–909
99. Yoshida H., Hashizume M., Suzuki M. and Mihara M. Anti-IL-6 receptor antibody suppressed T cell activation by inhibiting IL-2 production and inducing regulatory T cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 634:178-183
100. Younes A. The rationale for combining targeted and biological anti-lymphoma drugs. *Hematol Oncol.* 2013;31(Suppl):181–183.
101. Wang H, Wang Y, Jiang X, Wang Z, Zhong B, Fang Y. The molecular mechanism of curcumol on inducing cell growth arrest and apoptosis in Jurkat cells, a model of CD4(+) T cells. *Int Immunopharmacol.* 2014;21(2):375-82
102. Yuan F, Wei X, Yin Q, Li Y, Mi R, Ai H, et al. A multi-center retrospective study of L-asparaginase-based regimens as first-line treatment in newly diagnosed extranodal NK/T-cell lymphoma *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2014;35(7):614-8.

103. Zhang Q, Su B. Evolutionary Origin and Human-Specific Expansion of a Cancer/Testis Antigen Gene Family. *Mol Biol Evol.* 2014 Sep;31(9):2365-75.
104. Zhang ZY, Jin XY, Wu R, Wu LN, Xing R, et al. Meta-analysis of the association between GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms and cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(3): p. 815–9.
105. Zhu D, Lossos C, Chapman-Fredricks JR, Lossos IS. Biased immunoglobulin light chain use in the *Chlamydomonas psittaci* negative ocular adnexal marginal zone lymphomas. *Am J Hematol.* 2013; 88(5):379-84.
106. Bracci PM, Dalvi TB, Holly EA. Residential history, family characteristics and non-Hodgkin lymphoma, a population-based case-control study in the San Francisco Bay Area. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1287-94.
107. Cabanillas F. Non-Hodgkin's lymphoma: the old and the new. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011; 11 (Suppl 1):S87-90.
108. Cao Y, Luetkens T, Kobold S, et al. The cytokine/chemokine pattern in the bone marrow environment of multiple myeloma patients. *Experimental Hematology.* 2010;38(10):860–867.
109. Cerchiatti L, Leonard JP. Targeting the epigenome and other new strategies in diffuse large B-cell lymphoma: beyond R-CHOP. *Hematologica* 2013;2013:591-5.
110. Carbone A, Gloghini A, Kwong YL, Younes A. Diffuse large B cell lymphoma: using pathologic and molecular biomarkers to define subgroups for novel therapy. *Ann Hematol.* 2014; 93(8):1263-77.
111. Ajisawa A. Immunodeficiency related malignant lymphoma. *Nihon Rinsho* 2012;70 Suppl 2:709-14.
112. Charbonneau B. Dangling the carrot of improved survival in non-Hodgkin lymphoma: does carotenoid consumption make a difference? *Leuk Lymphoma.* 2013;54(12):2577-8.



113. Chatenoud L, Gallus S, Altieri A, et al. Number of siblings and risk of Hodgkin's and other lymphoid neoplasms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):552.
114. Chen X, Fu R, Wang Y, Song W, Ruan E, Qu W, Wang H, Wang G, Song J, et al. Plasma DNA methylation of shp1 in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2014;94(14):1071-5.
115. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, Coiffier B, Fisher RI, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25:579-86.
116. Cerhan JR, Berndt SI, Vijai J, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for diffuse large B cell lymphoma. *Nat Genet* 2014; 46(11):
117. Cohen S, Shaachar I. Cytokines as regulators of proliferation and survival of healthy and malignant peripheral B cells. *Cytokine* 2012;60(1):13-22.
118. Chiu BC, Kwon S, Evens AM, Surawicz T, Smith SM, Weisenburger DD. Dietary intake of fruit and vegetables and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control.* 2011; 22(8):1183-95.
119. Cho HJ, Eom HS, Kim HJ, Kim IS, Lee GW, Kong SY. Glutathione-S-transferase genotypes influence the risk of chemotherapy-related toxicities and prognosis in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;198(1):40-6.
120. Chris G. Mueller, Charlotte Boix, Wing-Hong Kwan, Cécile Daussy, Emilie Fournier, Wolf H. Fridman and Thierry J. Molina. Critical role of monocytes to support normal B cell and diffuse large B cell lymphoma survival and proliferation.. *Journal of Leukocyte Biology.*2007; 82(3): 567-575

121. Alavanja M, Hofmann J, Lynch C, Hines C, Barry K, Barker J, et al. Occupational use of insecticides, fungicides and fumigants and risk of non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med* 2014;71 (Suppl 1):A36.
122. Chiu BC, Kolar C, Gapstur SM, Lawson T, Anderson JR, Weisenburger DD. Association of NAT and GST polymorphisms with non-Hodgkin's lymphoma: a population-based case-control study. *Br J Haematol*. 2005;128(5):610-5.
123. Coccia P, Mastrangelo S, Ruggiero A, Scalzone M, Rosolen A, Maurizi P, Riccardi R. Treatment of pharyngeal non-Hodgkin lymphoma in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59(2):318-9.
124. Cocco P, Satta G, Dubois S, Pili C, Pilleri M, Zucca M, 't Mannelje AM, Becker N, et al. Lymphoma risk and occupational exposure to pesticides: Results of the Epilymph study. *Occup Environ Med* 2013;70:91–98.
125. Coeuret S, de La Blanchardière A, Saguet-Rysanek V, Chèze S, Tavernier M, Arsène D, Criscuolo A, Brisse S, Vergnaud M, Verdon R, Lecuit M. *Campylobacter coli* cultured from the stools of a patient with immunoproliferative small intestinal disease. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 908–91
126. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:235–42.
127. Cozen W, Gill PS, Ingles SA, Masood R, Martinez-Maza O, Cockburn MG, et al. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004;103(8):3216–21.
128. Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, Galli E, Giachelia M, Hohaus S. Prognostic factors in hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6(1):e2014053.

129. Cunningham-Rundles C. The many faces of common variable immunodeficiency. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:301-305.
130. Das P, Shaik AP, Bammidi VK. Meta-analysis study of glutathione-S-transferases (GSTM1, GSTP1, and GSTT1) gene polymorphisms and risk of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009; 50(8): p. 1345–51
131. de Miranda NF, Björkman A, Pan-Hammarström Q. DNA repair: the link between primary immunodeficiency and cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1246:50-63.
132. Dave SS. Host factors for risk and survival in lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010(II):255–258.
133. Ali A, Al-Belushi BS, Waly MI, Al-Moundhri M, Burney IA. Dietary and lifestyle factors and risk of non-hodgkin's lymphoma in Oman. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(2):841-8.
134. De Souza TR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Duarte AP, Porter SR, Leão JC, Gueiros LA. Th1 and Th2 polymorphisms in Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Oral Pathol Med*. 2014;43(6):418-26.
135. Dienz O., Eaton SM., Bond JP., Neveu W., Moquin D., Noubade R., Briso EM., Charland C., Leonard WJ. and Ciliberto, G. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *J. Exp. Med*. 2009; 206: 69-78
136. Dillon SR., Sprecher C., Hammond A., Bilsborough J., Rosenfeld-Franklin M., Presnell SR., Haugen HS., Maurer M., Harder B. and Johnston J. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat. Immunol*. 2004; 5:752-760
137. Dorniani, Hussein MZ, Kura AU, Fakurazi S, Shaari AH, Ahmad Z. Preparation and characterization of 6-mercaptapurine-coated magnetite nanoparticles as a drug delivery system. *Drug Des Devel Ther*. 2013; 7:1015-26.

138. Dutt SS and Gao AC. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. *Future Oncol.* 2009; 5:1403-1413
139. Dourado D., Fernandes PA., Mannervik B., Ramos MJ. Glutathione transferase: New model for glutathione activation. *Chem. Eur. J.* 2008; 14:9591–9598
140. Eklund, B.I.; Gunnarsdottir, S.; Elfarra, A.A.; Mannervik, B. Human glutathione transferases catalyzing the bioactivation of anticancer thiopurine prodrugs. *Biochem. Pharmacol.* 2007, 73, 1829–1841,
141. Fan Y, Zhang W, Shi CY, Cai DF. Associations of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with pancreatic cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013; 34(2):705-12.
142. Altieri A, Castro F, Bermejo JL, et al. Number of siblings and the risk of lymphoma, leukemia, and myeloma by histopathology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1281-6.
143. Fang T, Li DF, Zhou NY. Identification and clarification of the role of key active site residues in bacterial glutathione S-transferase zeta/maleylpyruvate isomerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;410(3):452-6.
144. Federico M, Molica S, Bellei M, Luminari S. Prognostic factors in low-grade non-Hodgkin lymphomas. *Curr Hematol Malig Rep.* 2009 Oct;4(4):202-10.
145. Findlay, V.J.; Townsend, D.M.; Saavedra, J.E.; Buzard, G.S.; Citro, M.L.; Keefer, L.K.; Ji, X.H.; Tew, K.D. Tumor cell responses to a novel glutathione S-transferase-activated nitric oxide-releasing prodrug. *Mol. Pharmacol.* 2004, 65, 1070–1079,
146. Fisher SG, Fisher RI. The emerging concept of antigen-driven lymphomas: epidemiology and treatment implications. *Curr Opin Oncol.* 2006 Sep;18(5):417–424.
147. Friedberg JW, Fisher RI Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Hematology/Oncology Clinics of North Americ.* 2008; 22: 941-952.

148. Fujiwara S, Muroi K, Tatara R, Matsuyama T, Ohmine K, Suzuki T, Mori M, Nagai T, et al. Clinical features of de novo CD25-positive follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(2):307-13.
149. Ghesquières H, Cartron G, Seymour JF, Delfau-Larue MH, Offner F, Soubeyran P, Perrot A, Brice P, Bouabdallah R, et al. Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms. *Blood*.;120(13):2650-7
150. Alizadeh AA, Eisen RE, Davis C, Ma IS, Lossos A, Rosenwald JC, Boldrick H, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403:503–511.
151. Giachelia M, Voso MT, Tisi MC, Martini M, Bozzoli V, Massini G, D'Alò F, Larocca LM, Leone G, Hohaus S. Interleukin-6 plasma levels are modulated by a polymorphism in the NF- $\kappa$ B1 gene and are associated with outcome following rituximab-combined chemotherapy in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(3):411-6
152. Gopal S, Patel MR, Achenbach CJ, Yanik EL, Cole SR, Napravnik S, Burkholder GA, et al. Lymphoma immune reconstitution inflammatory syndrome in the center for AIDS research network of integrated clinical systems cohort. *Clin Infect Dis* 2014;59(2):279-86.
153. Gloghini A, De Leval L. Immunophenotyping of non-Hodgkin lymphomas. In: Carbone A, Younes A (eds) *Non-Hodgkin lymphomas: advanced diagnostics and personalized therapies*, Future Medicine 2013; pp 32–55.
154. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Dec;11(12):1513–30. Grulich AE,
155. Vajdic CM, Falster MO, Kane E, Smedby KE, Bracci PM, de Sanjose S, Becker N, Turner J, et al. Birth order and risk of non-hodgkin lymphoma--true association or bias? *Am J Epidemiol*. 2010;172(6):621-30.

156. Goto N, Tsurumi H, Goto H, Shimomura YI, Kasahara S, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R) level is associated with the outcome of patients with diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP regimens. *Ann Hematol* 2012; 91: 705–714.
157. Green MR, Vicente-Dueñas C, Romero-Camarero I, Long Liu C, Dai B, González-Herrero I, et al. Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nat Commun.* 2014 Jun 2;5:3904. doi: 10.1038/ncomms4904
158. Green MR, Vicente-Duenas C, Alizadeh A, Sanchez-Garcia I. Hit-and-run lymphomagenesis by the Bcl6 oncogene. *Cell Cycle* 2014;13(12):1831-1832.
159. Amen F, Horncastle D, Elderfield K, Banham AH, Bower M, Macdonald D, et al. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients. *Histopathology.* 2007;51(1):70–79.
160. Guengerich, F. P. (1990) Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 97±153
161. Guneidy RA, Shahein YE, Abouelella AM, Zaki ER, Hamed RR. Inhibition of the recombinant cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* glutathione S-transferase. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(5):528-36.
162. Guo Y, Takeuchi I, Karnan S, Miyata T, Ohshima K, Seto M. Array-comparative genomic hybridization profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alterations. *Cancer Sci.* 2014; 105(4):481-9.
163. Hähnel PS, Enders B, Sasca D, Roos WP, Kaina B, Bullinger L, Theobald M, Kindler T. Targeting components of the alternative NHEJ pathway sensitizes KRAS mutant leukemic cells to chemotherapy. *Blood.* 2014;123(15):2355-66.

164. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*. 2000; 61(3): p. 154–66
165. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 51–88
166. Haukim N, Bidwell JL, Keen LJ, Gallagher G, Kimberly R, Huizinga T, et al. Cytokine gene polymorphisms in human disease: online databases, Supp2. *Genes Immun* 2002;3:313-330.
167. Hentrich M, Hoffmann C, Mosthaf F, Müller M, Siehl J, Wyen C, Hensel M; German Study Group of Physicians in Private Practice Treating HIV-Infected Patients (DAGNÄ); German AIDS Society (DAIG). Therapy of HIV-associated lymphoma-recommendations of the oncology working group of the German Study Group of Physicians in Private Practice Treating HIV-Infected Patients (DAGNÄ), in cooperation with the German AIDS Society (DAIG). *Ann Hematol*. 2014;93(6):913-21.
168. Hill DA, Wang SS, Cerhan JR, Davis S, Cozen W, Severson RK, et al. Risk of Non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes. *Blood*. 2006;108(9):3161-7.
169. Holtan SG, O'Connor HM, Fredericksen ZS, Liebow M, Thompson CA, Macon WR, Micallef IN, Wang AH, Slager SL, Habermann TM, et al. Food-frequency questionnaire-based estimates of total antioxidant capacity and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*. 2012 Sep 1; 131(5):1158-68.
170. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, Liu WM, et al. 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(20):4021-31

171. Huang Y, Zhao Y, Ran X, Wang C. Increased expression of herpesvirus entry mediator in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated mouse bone marrow-derived dendritic cells promotes the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Mol Med Rep.* 2014;9(3):813-8.
172. Ihsan R, Chauhan PS, Mishra AK, Singh LC, Sharma JD, Zomawia E, Verma Y, Kapur S, Saxena S. Copy number polymorphism of glutathione-S-transferase genes (GSTM1 & GSTT1) in susceptibility to lung cancer in a high-risk population from north-east India. *Indian J Med Res.* 2014;139(5):720-9.
173. Ilyas S, Rehman A, Varela AC, Sheehan D. Redox Proteomics Changes in the Fungal Pathogen *Trichosporon asahii* on Arsenic Exposure: Identification of Protein Responses to Metal-Induced Oxidative Stress in an Environmentally-Sampled Isolate. *PLoS One.* 2014;9(7):e102340
174. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(6):961–968.
175. Cooper M.A. Fehniger T.A. Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001a;22:633–640.
176. D'Souza W.N. Lefrancois L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J Immunol.* 2003;171:5727–5735.
177. Eisenbeis CF, Grainger A, Fisher B, Baiocchi RA, Carrodegua L, Roychowdhury S, Chen L, Banks AL, et al. Combination immunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interleukin-2: a preclinical and phase I study. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6101–6110.
178. Gaziev J, Isgro A, Mozzi AF, Petain A, Nguyen L, Ialongo C et al. New insights into the pharmacokinetics of intravenous busulfan in children with sickle cell anemia undergoing bone marrow transplantation. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 680–686



179. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation*. 2001;72:1444–1450.
180. John S, Turner D, Donn R, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, Hutchinson IV, Hajeer AH. Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. *Eur J Immunogenet*. 1998;25:419–420.
181. Katsanis E, Anderson P.M, Filipovich A.H, Hasz D.E, Rich M.L, Loeffler C.M, Ochoa A.C, Weisdorf D.J. Proliferation and cytolytic function of anti-CD3?interleukin-2 stimulated peripheral blood mononuclear cells following bone marrow transplantation. *Blood*. 1991;78:1286–1291.
182. Lenardo M.J. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature*. 1991;353:858–861.
183. Liu Y, He Z, Feng D, Shi G, Gao R, Wu X, Song W, Yuan W. Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4 Polymorphisms and Susceptibility to Osteosarcoma. *DNA Cell Biol*. 2011;30:1051–1055.
184. Ma L, Song H, Zhang M, Zhang D. Lysyl Oxidase G473A Polymorphism Is Associated with Increased Risk of Coronary Artery Diseases. *DNA Cell Biol*. 2011;30:1033–1037.
185. Matesanz F, Delgado C, Fresno M, Alcina A. Allelic selection of human IL-2 gene. *Eur J Immunol*. 2000;30:3516–3521.
186. Matesanz F, Fedetz M, Leyva L, Delgado C, Fernandez O, Alcina A. Effects of the multiple sclerosis associated –330 promoter polymorphism in IL2 allelic expression. *J Neuroimmunol*. 2004;148:212–217.
187. Meropol N.J, Barresi G.M, Fehniger T.A, Hitt J, Franklin M, Caligiuri M.A. Evaluation of natural killer cell expansion and activation in vivo with daily subcutaneous low-dose interleukin-2 plus periodic intermediatedose pulsing. *Cancer Immunol Immunother*. 1998;46:318–326.
188. Okamoto T, Tsuburaya A, Yanoma S, Yoshikawa T, Cho H, Takanashi Y, Noguchi Y. Inhibition of peritoneal metastasis in an animal gastric cancer model by interferongamma and interleukin-2. *Anticancer Res*. 2003;23:149–153.
189. Nielsen KR, Steffensen R, Bendtsen MD, Rodrigo-Domingo M, Baech J, Haunstrup TM, et al. Inherited inflammatory response genes are associated with B-cell non Hodgkins lymphoma risk and survival. *PlosOne* 2015;10(10):e0139329.

190. Nielsen KR, Steffensen R, Haunstrup TM, Bodker JS, Dybkaer K, Baech J, et al. Inherited variation in immune response genes in follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2015; 7:1-10.
191. Pennanen H. Kuitinen O. Turpeenniemi-Hujanen T. Plasma MMP-2 TIMP-2 complex levels measured during follow-up predict a risk of relapse in patients with malignant lymphoma. *Eur J Haematol.* 2008;80:46–54.
192. Poiré X. Kline J. Grinblatt D. Zimmerman T. Conner K. Muhs C. Gajewski T. Van Besien K. Smith S.M. Phase II study of immunomodulation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and rituximab following autologous stem cell transplant in patients with relapsed or refractory lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2010;51:1241–1250.
193. Sakaguchi S. Yamaguchi T. Nomura T. Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133:775–787.
194. Shin WG, Jang JS, Kim HS, Kim SJ, Kim KH, Jang MK, Lee JH, Kim HJ, Kim HY. Polymorphisms of interleukin-1 and interleukin-2 genes in patients with gastric cancer in Korea. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:1567–1573.
195. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer* 2014;14(8):517-534.
196. Terao S. Shirakawa T. Goda K. Kamidono S. Fujisawa M. Gotoh A. Recombinant interleukin-2 enhanced the antitumor effect of ADV=RSV-HSV-tk=ACV therapy in a murine bladder cancer model. *Anticancer Res.* 2005;25:2757–2760.
197. Wang W. Song H. Liu J. Song B. Cao X. CD86 +1057G/A Polymorphism and Susceptibility to Osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* 2011;30:925–929.
198. Wu J, Lu Y, Ding YB, Ke Q, Hu ZB, Yan ZG, Xue Y, Zhou Y, Hua ZL, Shu YQ, et al. Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Mol Carcinog.* 2009;48:626–632.
199. Zhang Y. Luo C.L. He B.C. Zhang J.M. Cheng G. Wu X.H. Exosomes derived from IL-12-anchored renal cancer cells increase induction of specific antitumor response in vitro: a novel vaccine for renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2010;36:133–140.
200. Falduto A, Cimino F, Speciale A, Musolino C, Gangemi S, Saija A, et al. How gene polymorphisms can influence clinical response and toxicity following R-CHOP therapy in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Blood Rev* 2017. In press.

201. Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler AK, Rizzi M. B cell biology: an overview. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2014; 14(5):434.
202. Giltiay NV, Chappell CP, Clark EA. B-cell selection and the development of autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 2012; 14 Suppl 4:S1.
203. Moens L, Tangye SG. Cytokine-mediated regulation of plasma cell generation:IL21 takes center stage. *Front Immunol* 2014;5:1-13. 2011;29(14):1803-1811.
204. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, et al. Human GST theta (GSTT1):cDNA cloning and the characterization of genetic polymorphism. *Biochem* 1994;300:271-276.
205. Yri OE, Ekstrom PO, Hilden V, Gaudernack G, Liestol K, Smeland EB, et al. Influence of polymorphisms in genes encoding immunoregulatory proteins and metabolizing enzymes on susceptibility and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Leuk Lymphoma* 2013;54(10):2205-2214.
206. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Lee Harris N, Srein H, Sieberg R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms, *Blood* 2016; 127:2375-2390.
207. Lenz G, Wright GW, Emre NC, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13520-5.
208. Turturro F. Constitutive NF-kB activation underlines major mechanism of drug resistance in relapsed refractory diffuse large B cell lymphoma. *Biomed Res Int* 2015;2015:484537.
209. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860-867.
210. Bugatti S, Vitolo B, Caporali R, Montecucco C, Manzo A. B cell in rheumatoid arthritis: from pathogenesis players to disease biomarkers. *Biomed Res Int* 2014;2014. doi: 10.1155/2014/681679.
211. Johnsen HE, Bergkvist KS, Schmitz A, et al. Cell of origin associated classification of B-cell malignancies by gene signatures of the normal B-cell hierarchy. *Leuk Lymphoma* 2013;1-10.
212. Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, et al. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkins Lymphoma outcome. 2012:3574-3581. Gene sequence variation and functional genomics. *Clin Cancer Res* 2007;13:7207-7216.
213. Moyer AM, Salavaggione OE, Hebring SJ, et al. Glutathione S transferase T1 i M1:gene sequence variation and functional genomics. *Clin Cancer Res* 2007;13:7207-7216.

214. Mo Z, Gao Y, Cao Y, et al. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate* 2009;69:662-688.
215. Zhao H, Wang R. IL-2 -330T/G polymorphism and cancer risk: a meta analysis. *OncoTargets and Therapy* 2015;8:1753-1760.
216. Wang Y, Shu Y, Jiang H, Sun B, Ma Z, Tang W. Lack of association between interleukin2 (IL2) gene rs 2069762 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8 (8): 12557-565
217. Rahman HAA, Khorshied MM, Khorshid OMR, Mourad HM. Association of Interleukin-2-330T/G and Interleukin-10-1082A/G genetic polymorphisms with B-cell Non-Hodgkin Lymphoma in a Cohort of Egyptians. *Turk J Hematol* 2018;35:99-108.
218. Hashimoto Y, Yokohama A, Saitoh A, Nakahashi H, Toyama K, Mitsui T, et al. Prognostic importance of the soluble form of IL-2 receptor alfa and its relationship with surface expression of IL-2Ralfa(CD25) of Lymphoma cells in diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like regimen with or without Rituximab: a retrospective analysis of 338 cases. *J Clin Exp Hematop* 2013;53(3):197-205.
219. Tomita N, Sakai R, Fujisawa S, Fujimaki K, Taguchi J, Hashimoto Y, Ogawa K, et al. SIL index comprising stage, soluble interleukin-2 receptor, and lactate dehydrogenase is a useful prognostic predictor in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 2012;103:1518-1523.
220. Gluck WL, Hurst D, Yuen A, Levine AM, Dayton MA, Gockerman JP, Lucas J, et al. Phase I studies of Interleukin (IL)-2 and Rituximab in B-cell non-Hodgkins lymphoma: IL-2mediated Natural Killer Cell Expansion correlations with clinical response. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:2253-2264
221. Liao W, Lin JX and Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013; 38(1): 13-25.
222. Smallwood L, Allcock R, van Bockxmeer F, Warrington N, Paalmer LS, Lacopetta B, Norman PE. Polymorphisms of the Interleukin-6gene promotor and abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;35:31-36.
223. Saxena M, Agrawal CG, Srivastava N, Banerjee M. Interleukin-6 (IL6)-597 A/G (rs 1800797) and -174G/C (rs 1800795) gene polymorphisms in type 2 diabetes. *Indian J Med Res* 2014;140(1):60-68.