

PROGNOSTIČKI UTJECAJ NF- κ B EKSPRESIJE KOD PODSKUPINA DIFUZNOG B-VELIKOSTANIČNOG LIMFOMA

ŽELJKA ŠKUNCA i ANA PLANINC-PERAICA¹

Opća bolnica Zadar, Odjel za hematologiju, Zadar i Klinička bolnica Merkur, Klinika za unutarnje bolesti, Zagreb, Hrvatska

Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL) s fenotipom germinalnog centra B stanica (GCB) ima bolju prognozu nego limfom aktiviranih zrelih B-stanica (ABC) fenotip ili tip 3 podskupina. Prethodne studije su navodile da nuklearni faktor- κ B (NF- κ B) ima značajnu ulogu kod ABC i tip 3 fenotipa, dok GCB fenotip karakteriziraju česte REL amplifikacije. Upotrebom imunohistokemijske metode analizirali smo kod 99 bolesnika kojima je postavljena dijagnoza DLBCL prisutnost DC10, BCL6 i MUM1, da bismo mogli bolesnike podijeliti u GCB, ABC i tip 3 podskupine, te smo zatim analizirali prisutnu ekspresiju NF- κ B u jezgri i u citoplazmi. Kod 22 (22 %) slučajeva prisutna je ekspresija NF- κ B u jezgri kod svih podskupina DLBCL. NF- κ B ekspresija u citoplazmi prisutna je u svim podskupinama DLBCL i nalazi se kod 77 (77%) bolesnika, i rezultat je značajan. Analizirali smo prisutnost CD10, Bcl6 i MUM1 i prisutnost NF- κ B u jezgri i rezultati nisu značajni. Analiza nuklearne akumulacije NF- κ B nije povezana ni s jednim kliničkim parametrom uključujući dob, spol, stadij bolesti, primijenjenu terapiju i MPI. Bolesnici s prisutnim NF- κ B u citoplazmi bez obzira na podskupine prema Hansu i sur. imaju značajno lošije preživljenje nego bolesnici koji nemaju prisutan NF- κ B i rezultati su značajni. Bolesnici s GCB fenotipom i negativnom ekspresijom NF- κ B u jezgri imaju bolje preživljenje nego bolesnici s GCB fenotipom i pozitivnom ekspresijom NF- κ B u jezgri i rezultati su značajni. Bolesnici koji su primali kemoterapiju po shemi R-CHOP i imaju pozitivan NF- κ B u jezgri imaju bolje preživljenje, ali rezultati nisu značajni. Ovi rezultati ukazuju na to da NF- κ B ekspresija u jezgri i citoplazmi može biti prognostički čimbenik kod DLBCL i to može pojasniti slojevitost rizika kod bolesnika u kombinaciji s GCB / ne-GCB fenotipom. Naša analiza pokazuje da je NF- κ B aktivnost kod svih podskupina DLBCL ključna i na taj način može predstavljati obećavajući molekularni cilj za buduće terapije.

Ključne riječi: nuklearni faktor - κ B, difuzni B-velikostanični limfom, prognoza

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Željka Škunca, dr. med.
Opća bolnica Zadar
Odjel za hematologiju
Bože Peričića 3
23 000 Zadar, Hrvatska
E-pošta: skunca.zeljka@gmail.com
Mob: 098 9504180

UVOD

Difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL) je najučestaliji tip limfoma u bolesnika odrasle dobi u zapadnim zemljama. Bolest se očituje različitom prezentacijom bolesti, različitim kliničkim tijekom, morfološkim i biološkim osobinama, te iz toga proizlazi i različita prognoza. Nezadovoljavajuća histopatološka reproducibilnost morfoloških tipova centroblastičnog i imunoblastičnog limfoma prepoznatih u prethodnim klasifikacijama, te agresivan klinički tijek i sličan na-

čin liječenja doveli su do definiranja novog histološkog tipa limfoma - difuzni B-velikostanični (DLBCL) u novoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) 2008. godine (Swerdlow i sur. 2008.) (1,3). Na temelju genske ekspresije proteina (GEP) otkrivene su tri velike podskupine DLBCL i to su: limfomi stanica germinalnog centra B-stanični (GCB), limfom aktiviranih zrelih B-limfocita (ABC) i tip 3 ili primarni medijastinalni B-stanični limfom podskupina (PMBCL). Kako je tehnički jednostavnije odrediti stanično podrijetlo na temelju imunohistokemijskih analiza, nego

metodom genske ekspresije koju su koristili Alizadeh i sur. (2), otkriven je algoritam pomoću kojeg se imunohistokemijskim metodama mogu grupirati podtipovi ovog limfoma u one germinalnog centra i one ne-germinalnog centra. Prema najčešće korištenom algoritmu (Hans i sur.) koristi se imunohistokemijsko bojenje za CD10, BCL-6 i MUM1/IRF4 (4). Ove 3 podskupine DLBCL povezane su s bitno različitim kliničkim ishodima i 5-godišnje preživljavanje je 59 %, 30 % i 64 % kod pacijenata s GCB-DLBCL, ABC-DLBCL i PMBCL. GCB-DLBCL karakteriziraju česte REL amplifikacije, BCL2 translokacije i somatske hipermutacije imunoglobulinskih gena. Kao kontrast, ABC-DLBCL i PMBCL imaju konstitutivnu aktivaciju NF- κ B puta, koji je potreban za opstanak, što nije značajka GCB-DLBCL (5). U našem smo radu stavili u istu skupinu bolesnike klasificirane kao ABC i tip 3 tj. PMBCL tj. ne-GCB bolesnike. I drugi autori isto tako grupiraju bolesnike (4,5,8), ma da ima autora koji jasno odvajaju te tri skupine (5,16).

Neovisno o dobro utemeljenim prognostičkim čimbenicima kao što je Međunarodni prognostički indeks (MPI) (11,12), bolesnici s genskom ekspresijom profila nalik GCB podskupini imaju značajno bolje preživljenje nego oni s ABC podskupinom (5,9,11-15,18,19,21). Tip 3 podskupina ili PMBCL ima također lošu prognozu. Ta je skupina zastupana s heterogenom kategorijom koja još uvijek nije dobro definirana, mada ima autora koji jasno definiraju te tri podskupine (5,8,16). Prediktivna vrijednost klasifikacije Hans i sur. (2004.) pokazala se korisnom te su neka istraživanja pokazala dobru prediktivnu vrijednost (4,5,10,12,13,19), dok drugi autori to nisu mogli potvrditi (11,15,19).

NF- κ B predstavlja skupinu srodnih homodimernih i heterodimernih transkripcijskih čimbenika koji mogu aktivirati različite skupine ciljnih gena uključenih u stanično preživljenje, proliferaciju i imunološki odgovor (6,17,26).

To je skupina strukturno povezanih proteina koju sačinjavaju 5 članova:

RelA (p65), RelB, cRel, NF- κ B1 (p50; p105), i NF- κ B2 (p52; p100) koji dolaze u raznim homodimernim i heterodimernim oblicima (6). RelA, c-Rel i RelB imaju transaktivacijsku domenu C-terminalnog dijela. NF- κ B1/p105 i NF- κ B2/p100 su inaktivni prekursori p50 i p52 proteina i smješteni su u citoplazmi (29). Proteolitički proces pomiče C-terminalnu inhibitornu domenu, što dovodi do pomicanja proteina u jezgru (25,26). P50 i p52 dolaze obično u obliku homodimera ili heterodimera, vezani s jednim od ta tri proteina, koji imaju transaktivacijsku domenu. RelA i p50 postoje u divljem obliku staničnog tipa, dok je c-Rel ekspresija ograničena na hematopoetske stanice i limfocite

(6,25). Ekspresija RelB ograničena je na visoko specifična mjesta kao što su timus, limfni čvorovi i Peyerove pločice. NF- κ B je izražen u citoplazmi kod gotovo svih vrsta stanica, gdje je njegovo djelovanje pod kontrolom obitelji regulatornih proteina koji se zovu inhibitori NF- κ B (I κ B) (6,17).

NF- κ B signalni put ima važnu ulogu u reguliranju preživljenja normalnih i malignih B stanica kontrolirajući mnoge regulacijske puteve za smrt stanice. NF- κ B može poboljšati preživljenje stanica moduliranjem tumor nekrosis faktora tip 1/2 receptora (TNFR1/2) signala inhibiranjem apoptoze posredstvom FAS i ograničavanjem aktivnosti BCL2 gena.

NF- κ B (NF- κ B) signalni put ima značajnu ulogu u reguliranju ekspresije gena bitnih za stvaranje urođenog i adaptivnog imunološkog odgovora. To su TNF, VEGF, IL-1, IL-6, ciklin D1, c-MYC (6).

U neaktivnom stanju, NF- κ B heterodimeri (c-REL ili RELA homolog i NF- κ B1) postoje u citoplazmi vezani na inhibitor kappa B (I κ B). Tijekom NF- κ B aktivacije I-kappa-kinaze (I κ K) fosforilacijom I κ B dovodi do razgradnje inhibitora u citoplazmi NF- κ B heterodimera. Aktivirani NF- κ B heterodimer je translociran u jezgru gdje potiče transkripciju NF- κ B okrenutu ciljnim genima (5,17). Prisutnost NF- κ B molekularne ekspresije kod podskupina DLBCL je različito izražena.

Cilj ovog rada je procijeniti utjecaj NF- κ B ekspresije prisutne u citoplazmi i jezgri kod podskupina GCB i ne-GCB DLBCL koristeći imunohistokemijsku analizu i s obzirom na kliničke značajke bolesnika. Zatim smo kod naših bolesnika na retrospektivnom uzorku analizirali primjenu imunokemoterapije, rituksimaba i CHOP, i samo kemoterapije po protokolu CHOP i prisutnost NF- κ B u citoplazmi i u jezgri.

BOLESNICI I METODE

Bolesnika s dijagnozom DLBCL uključenih u ovu studiju u razdoblju od 2000. do 2009., od kojih su retrospektivno sakupljeni podatci iz povijesti bolesti, bilo je 99 (53 – 54 % žena i 46 – 45 % muškaraca u dobi od 24 do 87 god., medijan dobi 59,3), prethodno neliječenih u Klinici za unutarnje bolesti Kliničke bolnice "Merkur" u Zagrebu i Općoj bolnici Zadar. Bolesnici su imali adekvatne kliničke podatke i patohistološki uzorak koji omogućuje analize. Bolesnici s prethodnom dijagnozom indolentnog limfoma ili oni koji primaju imunosupresivnu terapiju ili imaju AIDS/HIV infekcije isključeni su iz studije. Također nisu uključeni bolesnici s primarnim limfomom centralnog nervnog sistema DLBCL, primarni kutani DLBCL, Epste-

in-Barrov virus pozitivni DLBCL ili medijastinuma. Svi su slučajevi klasificirani po klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) (Swerdlow i sur. 2008) (1).

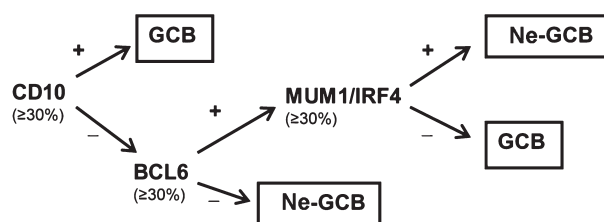
Početno su učinjene kliničke i morfološke analize, laboratorijske (hematološke i biokemijske) analize, biopsija kosti, ultrazvučni nalaz abdomena, kompjutorska tomografija vrata, abdomena, toraksa. Klinički stadij je određen prema klasifikaciji Ann Arbor i MPI ocijenjen je na negativnim prognostičkim čimbenicima. Svi su bolesnici liječeni kemoterapijom po shemi CHOP s primjenom rituksimaba ili bez primjene.

MORFOLOŠKA ANALIZA

Patohistološka analiza je postavljena na temelju histoloških i imunofenotipskih karakteristika tumorskog tkiva prema klasifikaciji SZO (1). Iz parafinskih su kocki uzeta dva reprezentativna cilindra tumorskog tkiva bioptičkom iglom (*Tissue microarray* 8010 Sakura Finetek). Rezovi debljine 2 μm bojeni su standardnim bojenjem: H&E, Giemsa, PAS, Gomori. Rezovi iste debljine obrađeni su imunohistokemijskim metodama.

IMUNOHISTOKEMIJSKE METODE

Na svim je uzorcima određena ekspresija biljega CD20 (klon 1.26, razrijeđenje 1:200 – Dako Glostrup Danska); CD3 (poliklonalno MoAb razrijeđenje 1:400 – Dako); CD10 (klon 56C6 RTU- Dako); Bcl6 (klon PG-bcl6p RTU – Dako); MUM1 (klon MUM1p RTU – Dako, te anti-NFκB (Santa Cruz, USA kat. br. sc8008). Postupci deparafiniranja kao i demaskiranja proteina rađeni su u PT-linku (Dako-Cytomation) na +97 °C tijekom 20 minuta kod pH 9.0. Za vizualizaciju ekspresije biljega korišten je komercijalni kit EnVision™ Flex High pH uz kromogen 3,3' diamino benzidin (DAB) u automatiziranom sustavu Dako Autostainer.



Sl. 1. Podjela prema imunohistokemijskom algoritmu prema Hansu i sur. (2004.) (4)

GCB skupina – tumori koji su CD10+ i bcl6+ ili CD10 -, bcl6+, MUM1 -

ABC skupina – tumori koju su CD10 -, bcl6 -, MUM1+ ili CD10 -, bcl6+, MUM1+

Tip3- tumori koji su CD10 -, bcl6 -, MUM1 -

Sve analize provedene su korištenjem statističkog paketa STATISTICA verzija 9.0.

REZULTATI

Svi su analizirani bolesnici liječeni po shemi CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednison) s imunoterapijom rituksimab ili bez nje. U citoplazmi je NF-κB bio pozitivan u 77 (77 %) bolesnika i nađena je značajna razlika između navedenih podskupina. Na temelju tih rezultata 26 (26 %) bolesnika imalo je GCB fenotip, a 52 (52 %) ne-GCB fenotip. U rezultatima nalazimo značajnu razliku u frekvenciji ekspresije NF-κB koji se nalazi u citoplazmi između GCB i ne-GCB fenotipa (p=0,017) (tablica 1). Analizirali smo ekspresiju CD10, Bcl6, MUM1 i s obzirom na podjelu na GCB i ne-GCB fenotip, te prisutnost NF-κB u jezgri. Ekspresija CD10, Bcl6 i MUM1 bila je prisutna kod 21 od 99 (22 %) bolesnika, 52 od 99 (52 %) i 59 od 99 (59 %) bolesnika. GCB fenotip je imalo 26 (26 %), a ne-GCB 73 (73 %) bolesnika upotrebom klasifikacije Hansa i sur. (2004.). Dvadeset i dva bolesnika (22 %) su imala pozitivnu NF-κB nuklearnu ekspresiju. Naši rezultati nisu značajni (tablica 2). Zatim smo analizirali mnoge kliničke parametre koji su povezani s prisutnom ili odsutnom ekspresijom NF-κB u jezgri. Nije nađena značajna povezanost između prisutnosti NF-κB u jezgri i dobi, spola, stadija bolesti, terapije, te MPI. Osamdeset i četiri (85 %) bolesnika su imala niski MPI (≤2 niski i niski intermedijarni) i 16 (16 %) bolesnika je imalo visoki (>3 visoki intermedijarni i visoki) čimbenik rizika za smrtni ishod (tablica 3).

Tablica 1.

Podjela NF-κB biljega u citoplazmi dobivenih imunohistokemijskom analizom kod podskupina DLBCL prema Hansu i sur. (2004).

| PHD/Hans | NF-κB citoplazma | | Sve skupine | p |
|----------|------------------|----------|-------------|-------|
| | Poz | Neg | | |
| GCB | 25 (25%) | 1 (1%) | 26 | 0,017 |
| Ne GCB | 52 (52%) | 21 (21%) | | |
| Ukupno | 77 | 22 | | |

Legenda: GCB- limfom germinalnog centra B stanica, ne GCB (ABC-aktivirani B- stanični limfom, tip 3 - primarni medijastinalni B-stanični limfom) $\chi^2=12,1$, p=0,003

Tablica 2.

Usporedba ekspresije NF-κB u jezgri s drugim imunohistokemijskim biljezima kod DLBCL

| Parametar | n | NF-κB | | hi-kvadrat | p |
|---------------------------|----|----------------|----------------|------------|-------|
| | | Negativni (77) | Pozitivni (22) | | |
| CD10 | | | | | |
| Neg | 74 | 55 | 15 | 0,922 | 0,337 |
| Poz | 25 | 18 | 7 | | |
| Bcl6 | | | | | |
| Neg | 47 | 32 | 15 | 4,603 | 0,327 |
| Poz | 52 | 45 | 7 | | |
| MUM1 | | | | | |
| Neg | 40 | 33 | 7 | 0,983 | 0,321 |
| Poz | 59 | 44 | 15 | | |
| GCB vs. ne-GCB vs. | | | | | |
| Ne-GCB | 73 | 56 | 17 | 0,157 | 0,692 |
| GCB | 26 | 21 | 5 | | |

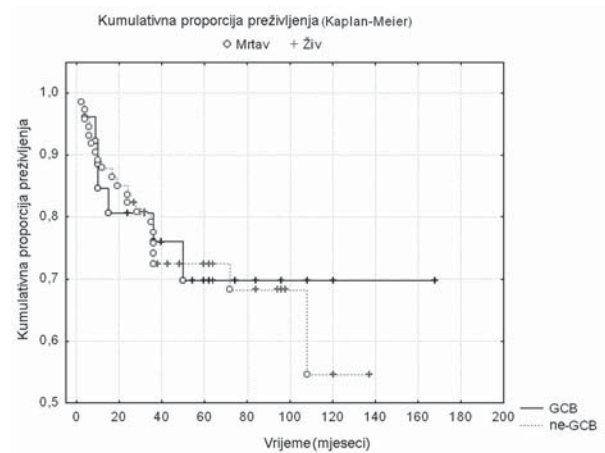
Tablica 3.

Usporedba kliničkih obilježja i primijenjene terapije u bolesnika s pozitivnom i negativnom NF-κB ekspresijom u jezgri

| Parametar | N | Ekspresija NF-κB u jezgri | | hi-kvadrat | p |
|-----------------|----|---------------------------|------------------|------------|-------|
| | | Negativni (77) | Pozitivni (n=22) | | |
| Dob | | | | | |
| <60 | 45 | 38 | 7 | 2,284 | 0,131 |
| ≥60 | 54 | 39 | 15 | | |
| Spol | | | | | |
| Muški | 45 | 37 | 8 | 1,05 | 0,305 |
| Ženski | 54 | 40 | 14 | | |
| Stadij | | | | | |
| I i II | 53 | 43 | 10 | 0,743 | 0,389 |
| III i IV | 46 | 34 | 12 | | |
| Terapija | | | | | |
| CHOP | 45 | 40 | 5 | 5,261 | 0,174 |
| R- CHOP | 54 | 37 | 17 | | |
| MPI | | | | | |
| Niski (≤2) | 83 | 66 | 17 | 0,950 | 0,320 |
| Visoki (3-5) | 16 | 11 | 5 | | |

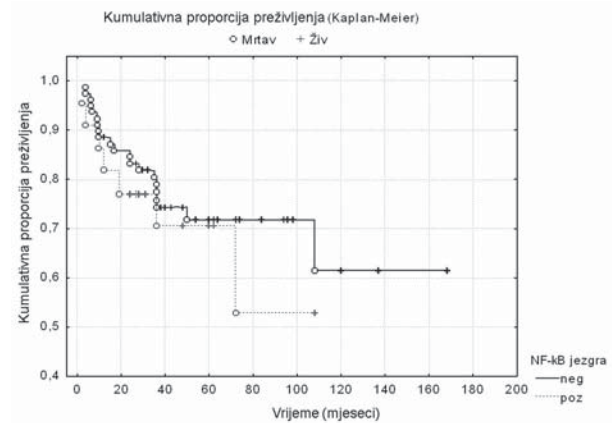
Analizirali smo preživljenje bolesnika s podskupinama DLBCL prema Hansu i sur. (2004.) i nije nađena značajna razlika u preživljenju (sl. 2). Rezultati su učinjeni prema klasifikaciji Hansa i sur. (2004.) za definiranje GCB i ne-GCB fenotipa. Nadalje, analizirali smo preživljenje bolesnika s NF-κB pozitivnim nalazom u jezgri i podskupinama DLBCL prema Hansu i sur. i nije nađena značajna razlika (sl. 3).

Analizirali smo očekivano preživljenje bolesnika s DLBCL-om s obzirom na prisutnost NF-κB u jezgri bez obzira na podskupine DLBCL i rezultat nije značajan (sl. 4).



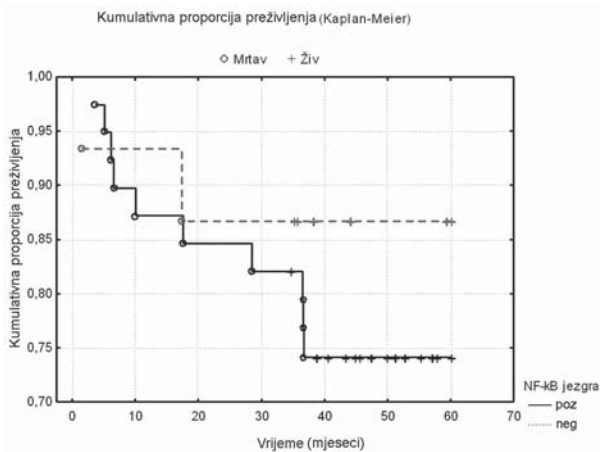
Sl. 2. Analiza preživljenja bolesnika s podskupinama DLBCL prema Hansu i sur. (2004.)

Legenda: GCB - limfom germinalnog centra B stanica, ne-GCB (aktivirani B stanični limfom, i tip 3 - primarni medijastinalni B-stanični limfom). $\chi^2=0,872988$, $p=0,714$



Sl. 3. Analiza preživljenja bolesnika s prisutnim NF-κB u jezgri i podskupinama DLBCL prema Hansu i sur. (2004.)

Legenda: GCB - limfom germinalnog centra B stanica, ne-GCB (aktivirani B stanični limfom, i tip 3 - primarni medijastinalni B-stanični limfom). $\chi^2=0,872988$, $p=0,714$

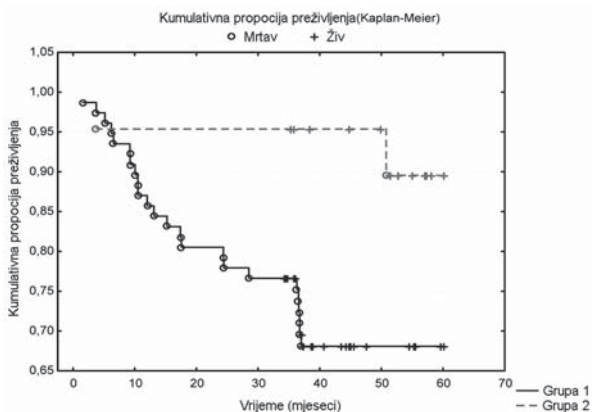


Sl. 4. Očekivano preživljenje bolesnika s NF-κB negativnom i NF-κB pozitivnom ekspresijom u jezgri neovisno o Hans algoritmu Gehan's Wilcoxon test
 WW = 103,00 Sum = 1787E2 Var = 30973,
 Test statistic = 0,5824152 p = 0,56029

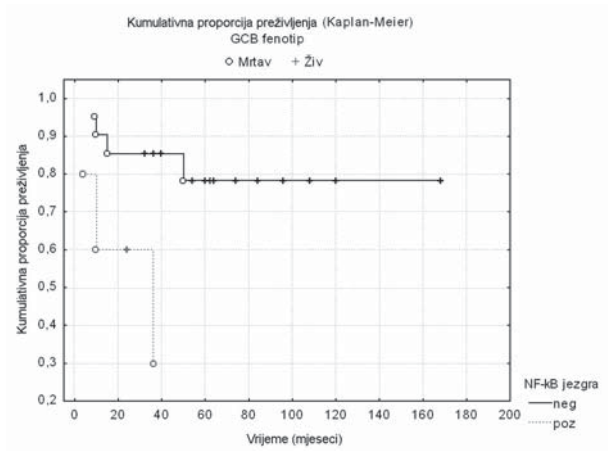
Analizirali smo preživljenje bolesnika s DLBCL-om i prisutnim NF-κB u citoplazmi i rezultati su značajni. Bolesnici koji nemaju pozitivan NF-κB u citoplazmi imaju značajno bolje preživljenje (analiza preživljenja Kaplan-Meier, p=0,037) (sl. 5).

Analiza očekivanog preživljenja bolesnika s GCB fenotipom i prisutnim NF-κB u jezgri pokazala je da bolesnici s GCB fenotipom i negativnim NF-κB imaju značajno bolje preživljenje (analiza preživljenja Kaplan-Meier, p=0,044) (sl. 6).

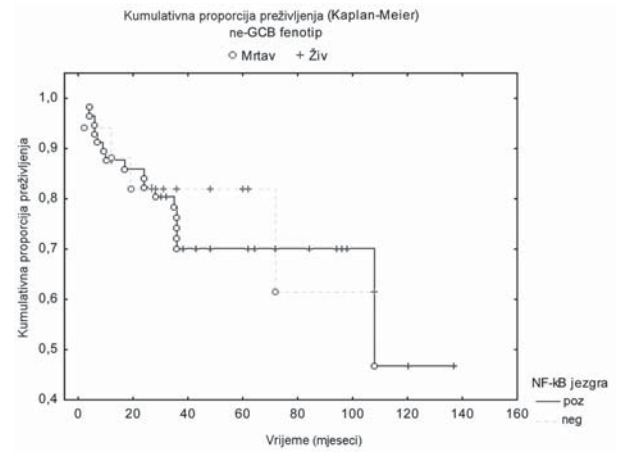
Rezultati analize očekivanog preživljenja bolesnika s ne-GCB fenotipom i prisutnom ekspresijom NF-κB. U našim analizama kod bolesnika s ne-GCB fenotipom prisutna NF-κB ekspresija nije se pokazala značajnom (sl. 7). Rezultati analize očekivanog preživljenja bolesnika liječenih kemoterapijskom shemom CHOP i imunokemoterapijom R-CHOP, i prisutnom ekspresijom NF-κB u jezgri nisu se pokazali značajnima (sl. 8).



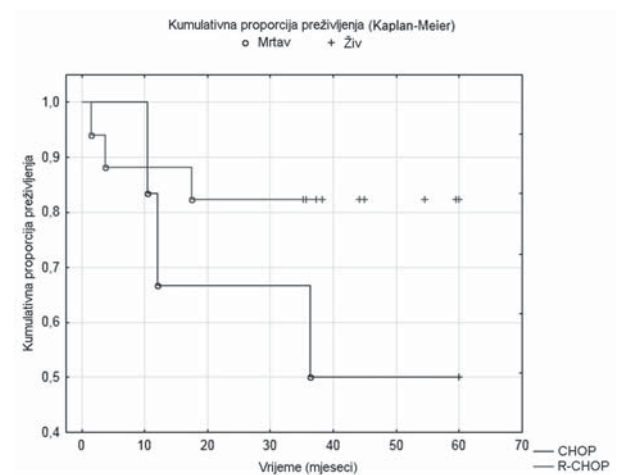
Sl. 5. Preživljenje bolesnika s prisutnošću NF-κB u citoplazmi
 Legenda: Grupa 1: - NF-κB poz, Grupa 2: - NF-κB neg.
 $\chi^2=2,076$, p=0,037



Sl. 6. Očekivano preživljenje bolesnika s GCB fenotipom i NF-κB negativnom i NF-κB pozitivnom ekspresijom u jezgri
 $\chi^2= 2,012589$ p=0,04416



Sl. 7. Očekivano preživljenje bolesnika s ne-GCB fenotipom i NF-κB negativnom i NF-κB pozitivnom ekspresijom u jezgri
 $\chi^2= -0,416599$ p =0,67697



Sl. 8. Očekivano preživljenje bolesnika liječenih kemoterapijom po shemi CHOP i R-CHOP i pozitivnim NF-κB u jezgri.
 $\chi^2=5,49647$ p=0,175

RASPRAVA

Genska ekspresija difuznog B-velikostaničnog limfoma ima dvije velike prognostički različite podskupine - limfome germinalnog centra i aktivirani B-stanični limfom, i treću miješanu kategoriju tip 3, koja također ima lošu prognozu. Algoritam koji se temelji na kombinaciji ekspresije CD10, Bcl6 i MUM1/IRF4 razlikuje dvije klinički relevantne podskupine bolesnika. U našem radu imamo veći broj bolesnika s ne-GCB podskupinom. Nađena učestalost ne-GCB fenotipa analiziranih slučajeva je podudarna u odnosu na literaturne podatke prema kojima 30 % do 65 % slučajeva DLBCL predstavlja fenotipsku ne-GCB skupinu (4,5,8,10-12,22), dok neki drugi autori imaju više bolesnika s GCB fenotipom (8,11,13,14,18). ABC DLBCL i GCB DLBCL imaju jasnu genetsku i biološku razliku, GCB DLBCL nastaje podrijetlom od centroblastičnog germinalnog centra (GC), dok ABC DLBCL nastaje konstitutivnom aktivacijom NF- κ B signalnog puta i nastaje ekspresija NF- κ B ciljnih gena, koji imaju utjecaj na aktivnosti NF- κ B na proliferaciju i preživljenje (5,18) (sl. 2).

U našim rezultatima u citoplazmi je NF- κ B pozitivan u 77 (77 %) bolesnika i u 52 (52 %) bio je prisutan ne-GCB fenotip. Naša analiza ekspresije proteina NF- κ B u citoplazmi dala je značajne rezultate. NF- κ B obitelj transkripcijskih faktora ima centralnu ulogu u imunom procesu, inflamatornom i akutnoj fazi odgovora. NF- κ B je uključen u kontrolu aktivacije limfocita, proliferaciju i apoptozu. Aktivacija NF- κ B može dovesti do različitih signalnih puteva koji su okidač za različite citokine, faktore rasta i tirozin kinaze (26). NF- κ B sačinjavaju dimeri od pet članova i većina je vezana u citoplazmi pomoću inhibitornih I κ B proteina (6). Nuklearna translokacija NF- κ B događa se kada ekstracelularni stimulansi aktiviraju kompleks I κ B kinaze (IKK). Budući da NF- κ B postoji i u citoplazmi i u jezgri, samo je nuklearni oblik sposoban za vezivanje na DNA i reguliranje genske ekspresije (29). ABC DLBCL ima visoku nuklearnu NF- κ B DNA vezanu aktivnost. To je konstitutivna I κ B kinaza (IKK) aktivnost, i nagli I κ B α pad nije viđen u staničnim linijama koje predstavljaju drugu DLBCL podgrupu, a to je GCB (6). (tablica 1).

Rezultati algoritma Hansa i sur. (2004.) daju bolje predviđanje podrijetla stanica koje je definirano kao GEP. GEP je zlatni standard u definiranju molekularnog podtipa DLBCL. Ta se imunohistokemijska analiza temelji na tri antitijela (CD10, Bcl6 i MUM1) i klasificira DLBCL u dvije podskupine: GCB i ne-GCB, jasno predviđa preživljenje bolesnika (4,5). U našim analizama nismo dokazali prediktivnu vrijednost klasifikacije Hansa i sur. (2004.) i ta se analiza nije pokazala konstruktivnom. Neka su istraživanja poka-

zala dobru prediktivnu vrijednost (12,13,22), dok drugi autori to nisu mogli potvrditi (11,13).

Preživljenje bolesnika s prisutnim NF- κ B u citoplazmi je značajno lošije u našim analizama, mada se u literaturi navodi da je citoplazmatska lokalizacija dimera NF- κ B vezana za inhibitorni I κ B protein, i tako prisutna u inaktivnom obliku (29). Niskihori i sur. (2005.) navode da je ekspresija NF- κ B u citoplazmi prisutna praktički kod svih stanica, gdje je aktivnost kontrolirana pomoću članova regulacijskih proteina nazvanih inhibitori NF- κ B (6,28). Očekivano preživljenje bolesnika s prisutnim NF- κ B u citoplazmi prikazano je na sl. 5. Rezultati su značajni ($p=0,037$).

Naši rezultati pokazuju da DLBCL s GCB fenotipom i negativna NF- κ B ekspresija u jezgri mogu imati bolji klinički ishod. Naša je analiza rađena na uzorku od 21 bolesnika, koji imaju GCB fenotip i negativnu ekspresiju NF- κ B u jezgri. Curry i sur. (2009.) navode da detaljne mehanizme koji vode boljoj prognozi u GCB podtipu bolesnika bez NF- κ B ekspresije tek treba razjasniti. Jedan od mogućih mehanizama može biti povećana osjetljivost stanica na kemoterapiju zbog nedostatka NF- κ B aktivacije i redukcije anti-apoptotičkih signala u neoplastičnim limfocitima (10). Smanjeno preživljenje među bolesnicima GCB fenotipa s prisutnom ekspresijom NF- κ B u jezgri ukazuje da stanice limfoma, čak i uz dobar prognostički fenotip, mogu postati otporne na kemoterapiju kada je NF- κ B put aktiviran (10). Kod bolesnika s ne-GCB fenotipom i prisutnom ekspresijom NF- κ B u jezgri (17 bolesnika) ne nalazimo značajne rezultate. Curry i sur. (2009.) navode da preživljenje bolesnika s ne-GCB fenotipom i prisutnom nuklearnom ekspresijom NF- κ B nije povezano, te to ukazuje da su uključeni neki drugi putevi i vode do agresivnijeg kliničkog tijeka (10).

Analizirali smo povezanost između primijenjene kemoterapije i imunokemoterapije i prisutne NF- κ B ekspresije i u našim analizama nema značajnosti. Bolesnici koji su liječeni imunokemoterapijom po shemi R-CHOP imaju bolje preživljenje, ali rezultati nisu značajni. Rituksimab inhibira konstitutivnu aktivaciju NF- κ B i posljedica toga je osjetljivost tumorskih stanica na kemoterapiju i Fas induciranu apoptozu. Regulacija BCL-xL ekspresije pomoću inhibicije NF- κ B povezana je s osjetljivošću stanica na kemoterapiju (20,21). Poznato je da rituksimab inhibira konstitutivni NF- κ B signalni put. Rituksimab umanjuje fosforilaciju I κ B, smanjuje IKK aktivnost i smanjuje NF- κ B DNA vezanu aktivnost (20). Bortezomib je proteazomski inhibitor koji blokira citoplazmatski I κ B α i pri tome inhibira NF- κ B nuklearnu translokaciju. Taj lijek ima antiproliferativna i proapoptotička svojstva i za sada je našao primjenu u liječenju multiplog mijeloma u prvoj liniji (25).

ZAKLJUČAK

Naše analize upućuju na to da procjena ekspresije NF- κ B u citoplazmi i u jezgri u usporedbi s podskupinama GCB i ne-GCB DLBCL klasificiranima imunohisto-kemijskim metodama po Hansu i sur. (2004.) može poboljšati procjenu rizika za preživljenje. Da bi se potkrijepilo kliničko značenje naših nalaza potrebne su analize na većem broju bolesnika.

L I T E R A T U R A

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon; - i sur. 233-237.
2. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE i sur. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
3. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, , Pileri SA, Stein H., Jaffe ES. The 2008 WHO Classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011; 117: 5019-32.
4. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275-82.
5. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005; 106: 3183 -90.
6. Nishikori M. Classical and alternative NF- κ B activation pathways and their roles in lymphoid malignancies. *J Clin Exp Haematopathol* 2005; 45: 15-24.
7. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor κ B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1861-74.
8. Rosenwald A, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: S41-S7.
9. Moskowitz C H, Zelenetz A D, Kewalramani T, Hamlin P, Lessac-Chenen S, Houldsworth J. Cell of origin, germinal center versus nongerminal center, determined by immunohistochemistry on tissue microarray, does not correlate with outcome in patients with relapsed and refractory DLBCL. *Blood* 2005; 106: 3383-5.
10. Curry CV, Ewton AA, Olsen RJ i sur. Prognostic impact of C-REL expression in diffuse large B-cell lymphoma. *J Hematopathol* 2009; 2: 20-6.
11. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham A, Leppa S. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Modern Pathol* 2009; 22: 1094-1101.
12. Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, Uike N, Kawano F, Gondo H. Prognostic impact of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci* 2009; 100: 1842-7.
13. Imhoff GW, Boerma EJ, der Holt B, Schuurung E, Verdonck LF, Kluin Nelemans HC. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Am Soc Clin Oncol* 2006; 10: 4135-42.
14. Choi WWL, Weiseburger DD, Grenier TC, Piris MA, Barrharn AH, Delabie J. A new immunostain algorithm classified diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5494-5502.
15. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, Briere J, Baia M, Jais JP. Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: A GELA study. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5573-9.
16. Testoni M, Zucca E, Young KH, Bertoni F. Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2015; 26: 1069-80.
17. Gilmore TD, Kalaitzidis D, Liang MC i sur. The c-REL transcription factor and B- cell proliferation: a deal with devil. *Oncogene* 2004; 23: 2275-86.
18. Compagno M, Lim WK, Grunn A i sur. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009; 459: 717-22.
19. Houldsworth J, Olshen AB, Cattoretti G. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2004; 103: 1862-8.
20. Vega M, Jazirehi AR, Huerta-Yeper S, Bonavida B. Rituximab-induced inhibition of YY1 and Bcl-xL expression in Ramos non-Hodgkin's lymphoma cell line via inhibition of NF-kappa B activity: role of YY1 and Bcl-xL in Fas resistance and chemoresistance, respectively. *J Immunol* 2005; 175: 2174-83.
21. Pavan A, Spina M, Canzonieri V, Sansorsonno S, Toffoli G, De Re V. Recent prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma indicate NF-kappaB pathway as a target for new therapeutic strategies. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 48-58.
22. Meyer PN, Fu K, Greiner TC i sur. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol* 2011; 29: 200-7.
23. Reber R, Banz Y, Garamvolgyi E, Perren A, Novak U. Determination of the molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphomas using immunohistochemistry. A case series from the Inselspital, Bern and a critical appraisal of this determination in Switzerland. *Swiss Med Weekly* 2013; 143: 137-48.
24. Lenz G, Staudt LM. Aggressive Lymphomas. *N Engl J Med* 2010; 362: 1417-29.
25. Juvekar A, Manna S, Ramaswami S i sur. Bortezomib induces nuclear translocation of I κ B α resulting in gene specific suppression of NF- κ B-dependent transcription and induction of apoptosis in CTCL. *Mol Cancer Res* 2011; 9: 183-94.

26. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Guiu XM. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005; 446: 475-82.

27. Li Z, Wang X, Yu RYL i sur. BCL 6 negatively regulates expression of the NF- κ B1 p105/p50 subunit. *J Immunol* 2005; 174: 205-13.

28. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Ståhl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I. MabThera International Trial (MinT)

Group. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MinT) study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 435-44.

29. Schmid JA, Birbach A. I κ B kinase β (IKK β /IKK2/IKBKB)- A key molecule in signaling to the transcription factor NF- κ B. *Citokine & Growth Factor Rev* 2008; 19: 157-65.

SUMMARY

PROGNOSTIC ROLE OF NF- κ B EXPRESSION IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA SUBGROUPS

Ž. ŠKUNCA and A. PLANINC-PERAICA¹

Zadar General Hospital, Department of Hematology, Zadar and ¹Merkur University Hospital, Clinical Department of Internal Medicine, Zagreb, Croatia

Objective: Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) with germinal center B-cell (GCB) phenotype has better prognosis than activated mature B-cell (ABC) phenotype or type 3 subgroup. Previous studies have reported on a major role of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) in ABC and type 3 phenotypes, whereas GCB phenotype is characterized by frequent REL amplifications. **Methods:** In 99 patients diagnosed with DLBCL, the presence of CD10, BCL6 and MUM1 was analyzed by immunohistochemical method to divide them into the GCB, ABC and type 3 subgroups. Then, NF- κ B expression was analyzed in the nucleus and cytoplasm. Nuclear NF- κ B expression was detected in 22 (22%) cases from all DLBCL subgroups. NF- κ B expression in the cytoplasm was recorded in 77 (77%) cases from all DLBCL subgroups and this finding was significant. **Results:** Results on the presence of CD10, BCL6 and MUM1 and the presence of NF- κ B in the nucleus were not significant. Analysis of nuclear NF- κ B accumulation is not associated with any of the clinical parameters including age, sex, stage of disease, therapy administered and IPP. According to Hans *et al.*, patients with NF- κ B expressed in the cytoplasm have significantly poorer survival irrespective of the subgroup than patients without cytoplasmic NF- κ B, and these results are significant. Patients with GCB phenotype and negative nuclear NF- κ B expression have better survival than those with GCB phenotype and positive nuclear NF- κ B expression, and these results are also significant. Patients having received chemotherapy according to the R-CHOP schedule and with positive nuclear NF- κ B expression have better survival; however, these results are not significant. **Discussion and Conclusion:** These data suggest that nuclear and cytoplasmic NF- κ B expression may be a prognostic factor in DLBCL, thus explaining the stratified risk observed in patients in combination with GCB/non-GCB phenotype. Our study showed the NF- κ B activity to be crucial in all DLBCL subgroups, thus potentially representing a promising molecular target for future therapies.

Key words: nuclear factor- κ B, diffuse large B-cell lymphoma, prognosis