



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI

MEDICINSKI FAKULTET



Danijela Mandić 

**ZNAČAJ EKSPRESIJE ABC PROTEINA,
SURVIVINA I BCL-2 KOD DIFUZNOG B
KRUPNOĆELIJSKOG NE-HOČKIN LIMFOMA U
NASTANKU REZISTENCIJE NA
HEMIOTERAPIJU**

Doktorska disertacija

Banja Luka, 2022



UNIVERSITY OF BANJA LUKA

SCHOOL OF MEDICINE



Danijela Mandić

**SIGNIFICANCE OF EXPRESSION OF ABC
PROTEINS, SURVIVIN, AND BCL-2 IN
CHEMOTHERAPY RESISTANCE IN PATIENTS
WITH DIFFUSE LARGE B-CELL NON-HODGKIN
LYMPHOMA**

Doctoral Dissertation

Banja Luka, 2022

Mentor: Prof. dr Milena Todorović-Balint, redovni profesor iz oblasti interne medicine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komentor: Prof. dr Lana Nežić, vanredni profesor iz oblasti farmakologije, toksikologije i kliničke farmakologije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, predsjednik

Naslov doktorske disertacije: Značaj ekspresije ABC proteina, survivina i Bcl-2 kod difuznog B-krupnoćelijskog ne-Hoćkin limfoma u nastanku rezistencije na hemioterapiju

Rezime: Difuzni B krupnoćelijski limfom (DLBCL), veoma heterogena grupa limfoma, liječi se sa preporučenim protokolima rituksimaba plus ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednison (R-CHOP). Međutim, približno 40% pacijenata dožive rezistenciju na terapiju i nezadovoljavajući ishod. ATP vezujući kasetni (ABC) transporteri i survivin igraju ulogu u rezistenciji na veći broj hemoterapeutika (MDR) kod različitih tipova tumora. Cilj istraživanja je bio da se dođe do uvida u mehanizme rezistencije na trenutne tretmanske opcije kod DLBCL. U istraživanju je urađena je analiza ekspresije Bcl-1, survivina i tri ABC transportera: Pg glikoprotein/ABCB1, MRP1/ABCC1, i BCRP/ABCC2, korištenjem imunohistohemije kod 73 uzorka tkiva pacijenata sa DLBCL, klasifikovani kao refraktorni, relapsirajući i u remisiji. Svi pacijenti su dobili prvu terapijsku liniju R-CHOP ili ekvivalentni protokol. Visoka ekspresija survivina, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 je bila utvrđena kod refraktorne bolesti, i bila je granično povezana sa lošim preživljavanjem bez progresije ($p = 0.05$). Kod relapsa bolesti, rebiopsija je pokazala povećanu ekspresiju oba markera, i MRP1/ABCC1 i survivina kod 42% pacijenata. Bcl-2 je bio u jakoj korelaciji ($r^2=0.82$, $p = 0.01$) sa ovim biomarkerima. Pgp/ABCB1 je pokazao citoplazmatsku ekspresiju kod svih DLBCL uzoraka, bez znatnih razlika u intenzitetu ekspresije kroz grupe. Štaviše, značajna povezanost je otkrivena između ekspresije MRP1/ABCC1 i survivina, i prisustva bolesti u koštanoj srži uz redukciju kompletnih remisija. Prisustvo markera MRP1/ABCC1 i survivin zajedno sa uznapredovalim kliničkim stadijumom kod DLBCL pacijenata može predvidjeti rezistenciju na R-CHOP imunohemioterapiju, zbog čega se ovaj protokol ne bi trebao primjenjivati kao standardna terapije prve linije.

Ključne riječi: difuzni B krupnoćelijski limfom, rezistencija na lijekove, survivin

Naučna oblast: Interna medicina

Naučno polje: Medicina

Klasifikaciona oznaka za naučnu oblast prema CERIF šifrarniku: B 490

Tip odabrane licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za način korišćenja sadržaja doktorske disertacije: Autorstvo-nekomercijalno-dijeliti pod istim uslovima

Mentor: Milena Todorović-Balint, MD, PhD, professor, Faculty of medicine, University of Belgrade

Comentor: Lana Nežić, MD, PhD, Associate professor, Faculty of medicine, University of Banja Luka

Title of the doctoral dissertation: Significance of expression of ABC proteins, survivin and Bcl-2 in chemotherapy resistance in patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma

Summary: Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), a highly heterogeneous lymphoma, is treated with the recommended regimen of rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone regimen (R-CHOP). However, approximately 40% of the patients experience treatment resistance and unsatisfactory clinical outcome. ATP binding cassette (ABC) transporters and survivin play role in multidrug resistance (MDR) in multiple tumour types. The study aimed to give molecular insight into the mechanisms of resistance to the current treatment options in DLBCL. We analysed expression of Bcl-1, survivin and three ABC transporters: P-glycoprotein/ABCB1, MRP1/ABCC1, and BCRP/ABCC2, using immunohistochemistry in 73 tumour specimens obtained from patients using immunohistochemistry in 73 tumour specimens obtained from patients with DLBCL, classified as refractory, relapsed and in remission. All patients received first-line standard therapy with R-CHOP or equivalent regimen. Survivin, MRP1/ABCC1 and BCRP/ABCG2 intense expression were associated with refractory disease, and was marginally associated with poor failure-free survival ($p = 0.05$). After relapse, re-biopsy showed increased expression of both, MRP1/ABCC1 and survivin in 42% patients. Standard Bcl-2 was in strong correlation ($r^2=0.82$, $p = 0.01$) with these biomarkers. Both P-gp/ABCB1 showed cytoplasmic expression in all DLBCL specimens without substantial difference in the intensity of expression across the groups. Moreover, a significant association were revealed between MRP1/ABCC1 and survivin expression, and presence of bone marrow involvement together with reduced complete remission. If DLBCL patients harbour certain specific molecular signatures such as MRP1/ABCC1 and survivin along with advanced clinical stage that can predict resistance to R-CHOP, they must not be recommended standard first line therapy.

Keywords: Diffuse large B-cell lymphoma, multidrug resistance (MDR), survivin

Scientific area: Internal medicine

Scientific field: Medicine

Classification code of the scientific area by CERIF codebook: B 490

Type of the selected licence of the Creative Commons how to use the content of the doctoral dissertation: Attribution-NonCommercial-ShareAlike

Zahvalnica

Hvala mojim učiteljima na podršci i vjeri u trenucima kada sam bila nesigurna, emotivna i umorna.

Hvala mojim najmilijim koji ni u jednom trenutku nisu prestali da me bodre i bezuslovno da me vole.

I naravno, hvala mojoj dragoj prijateljici bez koje bi sve ovo bilo mnogo, mnogo teže!

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Definicija.....	1
1.2. Epidemiologija DLBCL.....	1
1.3. Etiologija difuznog DLBCL.....	1
1.4. Patohistološke karakteristike DLBCL.....	2
1.5. Kliničke manifestacije DLBCL.....	8
1.6. Dijagnostička obrada pacijenata sa DLBCL.....	8
1.7. Procijena odgovora na liječenje.....	9
1.8. Liječenje pacijenata sa DLBCL.....	11
1.9. Klasična rezistencija na lijekove.....	13
1.9.1. Biologija tumorske rezistencije na R-CHOP.....	14
1.9.1.1. Porijeklo ćelija DLBCL.....	14
1.9.1.2. Klonalna evolucija.....	15
1.9.1.3. Mikrookruženje tumora.....	15
1.9.2. Farmakokinetika i rezistencija na lijekove.....	18
1.9.3. Kinetika tumorskih ćelija.....	19
1.9.4. Regulacija ćelijskog ciklusa i apoptoze.....	20
1.9.5. Višestruka rezistencija na lijekove.....	22
1.9.5.1. P-glikoprotein.....	22
1.9.5.2. MRP1/ABCC1.....	26
1.9.5.3. BCRP/ABCG2.....	27
1.9.5.4. Bcl-2 protein.....	29

1.9.5.5. Survivin.....	30
2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	32
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	33
4. ISPITANICI I METODOLOGIJA.....	34
4.1. Ispitanici.....	34
4.2. Dizajn ispitivanja.....	34
4.3. Metodologija.....	34
4.3.1. Histološka analiza.....	38
4.3.2. Imunohistohemijska analiza.....	38
4.3.3. Imunohistohemijska analiza ekspresije.....	40
4.4. Statistička metodologija.....	41
5. REZULTATI.....	43
5.1. Demografski podaci.....	43
5.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije kod pacijenata sa DLBCL.....	52
5.2.1. Ekspresija Bcl-2 kod pacijenata sa DLBCL.....	52
5.2.2. Ekspresija Pgp/ABCB1 kod pacijenata sa DLBCL.....	57
5.2.3. Korelacija ekspresije Bcl-2 i Pgp/ABCB1.....	62
5.2.4. Ekspresija survivina kod pacijenata sa DLBCL.....	63
5.2.5. Ekspresija MRP1/ABCC1 kod pacijenata sa DLBCL.....	68
5.2.6. Korelacija ekspresije survivina i MRP1/ABCC1 kod pacijenata sa DLBCL.....	72
5.2.7. Ekspresija BCRP/ABCG2 kod pacijenata sa DLBCL.....	76
5.2.8. Komparativna analiza ispitivanih markera.....	79

5.3. Prediktabilna vrijednost kliničkih, laboratorijskih i imunohistochemijskih parametara na pojavu određenog tipa DLBCL.....	95
6. DISKUSIJA.....	97
6.1. Značaj kliničkih i metaboličkih parametara u predviđanju rezistencije DLBCL na prvu liniju imunohemioterapije.....	97
6.2. Prognostički značaj esencijalnih molekula apoptoze i ABC-efluks pumpi u nastanku rezistencije kod DLBCL.....	103
6.3. Status rezistencije prema imunohemioterapiji i ciljanoj molekularnoj terapiji...	109
7. ZAKLJUČCI.....	114
8. LITERATURA.....	115
BIOGRAFIJA	
IZJAVA 1	
IZJAVA 2	
IZJAVA 3	

1. UVOD

1.1 Definicija

Difuzni B krupnoćelijski non-Hodgkin limfom (DLBCL) je grupa agresivnih limfoma, koji su izgrađeni od transformisanih krupnih B ćelija, i predstavlja grupu tumora koja je heterogena po svom kliničkom ishodu, morfologiji, imunofenotipu, molekularnoj genetici i citogenetici [1,2]. Tumorsko tkivo je izgrađeno od difuznog infiltrata velikih limfocita, koji su dva puta veći od malih limfocita, a odlikuju se velikim jedrom iste veličine ili većim od jedra makrofaga [1,3].

U klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) postoji nekoliko varijanti i specifičnih podtipova DLBCL, a više od od 90% čine tri najčešće varijante, i to: difuzni B krupnoćelijski limfom bez posebnih obilježja ili DLBCL-NOS (*not otherwise specified*), difuzni B krupnoćelijski limfom bogat T-limfocitima ili histiocitima i primarni medijastinalni difuzni B krupnoćelijski limfom. DLBCL-NOS je najčešća varijanta i na njega otpada oko trećina svih slučajeva non-Hodgkin limfoma. Unutar ovog tipa limfoma razlikuju se i tri patohistološka podtipa: centroblastni, imunoblastni i anaplastični [4].

1.2. Epidemiologija DLBCL

Difuzni B krupnoćelijski non-Hodgkin limfom je najčešći podtip limfoma i čini 25-30% svih non-Hodgkin limfoma kod odraslih [1,5-11], a uključuje heterogenu grupu poremećaja sa promjenljivim kliničkim i patološkim karakteristikama, odgovorom na liječenje i prognozom [12-14]. Prema podacima HEMACARE studije, incidenca ovog tipa limfoma na području Evrope iznosi 3,81/100.000 stanovnika. Najmanju incidencu na istom području imaju regioni Istočne Evrope (1,79/100.000) i Sjeverne Evrope (0,79/100.000). U odnosu na polove, incidenca DLBCL je nešto veća kod muških osoba (4,06/100.000) u odnosu na žene (3,57/100.000) [5]. Incidenca DLBCL se povećava starenjem uz srednju životnu dob oboljelih od 60 godina, a epidemiološki podaci ukazuju da se bolest češće javlja kod muškaraca [6,15].

1.3 Etiologija DLBCL

Etiologija DLBCL je u najvećem broju slučajeva nepoznata. Difuzni B krupnoćelijski limfom se može javiti kao *de novo* ili primarni DLBCL ili kao sekundarni, kada nastaje kao posljedica transformacije limfoma nižeg gradusa agresivnosti [1,16].

Postoje i faktori rizika koji su povezani sa češćim pojavljivanjem non-Hodgkin limfoma. Pozitivna porodična anamneza za pojavu hematoloških oboljenja, kao što su leukemije, Hodgkin limfom ili non-Hodgkin limfom, je povezana sa većim rizikom za nastanka DLBCL. Takođe, DLBCL je mnogo češći kod pacijenta sa istorijom autoimunih oboljenja (reumatoidni artritis, Sjegrenov sindrom, sistemski eritemski lupus i autoimune hemolitičke anemije). Primarne i sekundarne imunodeficijencije imaju povećan rizik za pojavu non-Hodgkin limfoma. Poznato je da osobe sa HIV infekcijom češće oboljevaju od malignih oboljenja i non-Hodgkin limfoma. Pojava DLBCL može biti povezana sa infekcijama poput: *Epstein-Barr virus*, *HHV8*, *human T-cell lymphotropic virus*, hepatitis C, *Helicobacter pylori* i *C. Psittaci* [17].

Primjena imunosupresivne terapije nakon transplantacije organa takođe može biti povezane sa većim rizikom za nastanak non-Hodgkin limfoma, kao i prethodna izloženost radioterapiji ili hemioterapiji, kao i izloženost toksinima iz okolne sredine (herbicidi, vinil hlorid i organski rastvarači) [17].

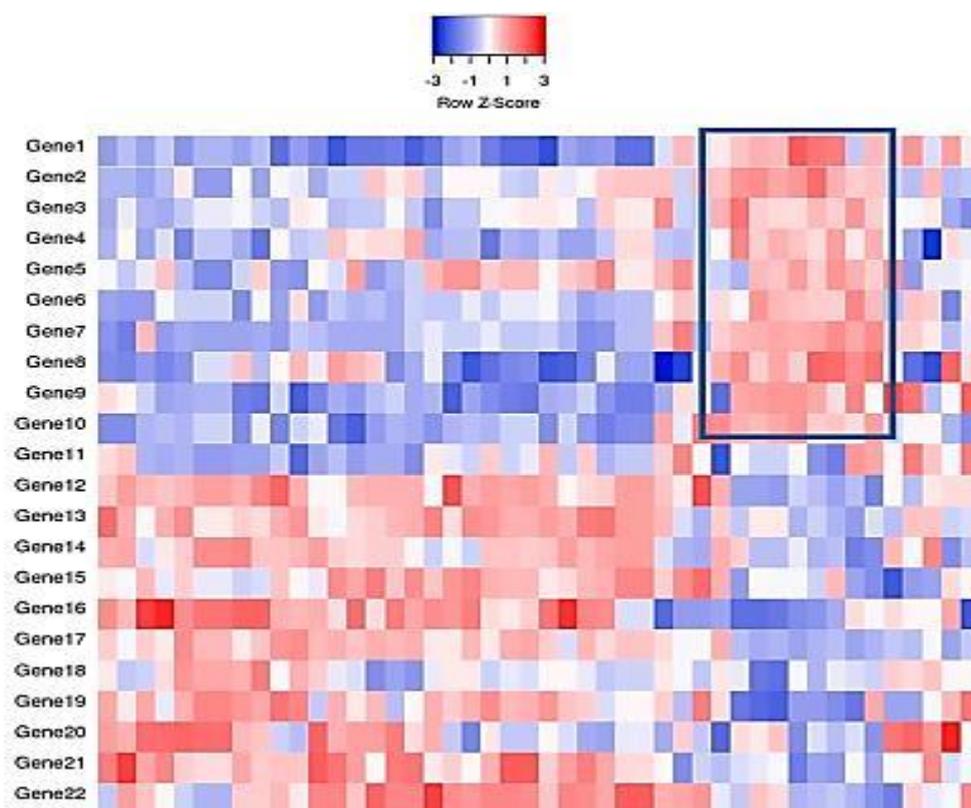
Postoji rizik da kod pacijenata sa različitim tipovima limfoma poput spleničnog limfoma, limfom marginalne zone (MALT) i hronična limfocitna leukemija dođe do transformacije u agresivniju formu bolesti (*Richter transformation*).

1.4 Patohistološke karakteristike DLBCL

DLBCL je neoplazma difuznog tipa rasta sastavljena od krupnih transformisanih limfoidnih ćelija koje eksprimiraju B ćelijske antigene (CD20, CD79 α , ili Pax-5) [1]. Klonalna proliferacija i difuzan rast krupnih transformisanih B limfocita potpuno narušavaju normalnu arhitektoniku limfnog čvora [18].

Klasifikacija tumora hematopoetskog i limfoidnog tkiva navodi različite morfološke varijante, molekularne i imunohistohemijske podgrupe, kao i različite kliničke entitete DLBCL, a revizijom ove klasifikacije od strane Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) za limfoidne neoplazme iz 2016.godine uvedene su i određene promjene, koje se odnose na razlikovanje GCB (porijekla germinativnog centra) i ABC tipa (aktiviranih B ćelija) primjenom imunohistohemijskog algoritma, što može uticati na izbor terapije [4].

Stadijum diferencijacije B limfocita na kome se dešava neoplastična transformacija može definisati biološko ponašanje i ishod bolesti kod pacijenata sa DLBCL. Poslednje dvije decenije testiranje porijekla ćelija (COO, *Cell of origin*) je zauzelo posebno mjesto u procjeni pacijenata sa DLBCL, dovodeći do tačne subklasifikacije kod 80-85% svih DLBCL [19]. Na osnovu istraživanja u oblasti molekularne genetike i imunohistohemije, DLBCL je subklasifikovan u klinički relevantne grupe: GCB (30%), i non-GCB ili ABC (50%). Ovakva subklasifikacija je pokazala da su prognostički podtipovi bolje i tačnije definisani u odnosu na standardnu primjenu IPI skora kao kliničkog prediktora [20].

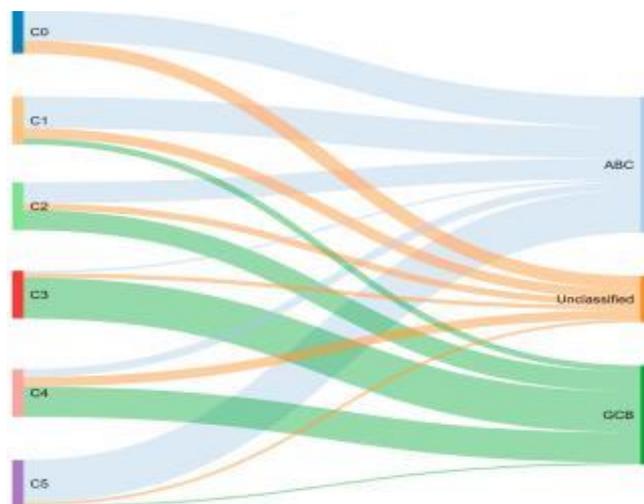


Slika 1. Primjer profilisanja genske ekspresije uz upoređivanje relativnih nivoa ekspresije gena i grupisanje po klasterima. Označeno područje pokazuje da geni 1-10 imaju relativno veću ekspresiju, i takvi slučajevi se grupišu u cilju klasifikacije [19].

Grupe GCB i ABC se razlikuju po svojim hromozomskim alteracijama, aktivacijama signalnih puteva i kliničkom ishodu [21-24, 25, 26]. Primjenom tehnike mikročipova može se subklasifikovati DLBCL. Dokazano je da su geni koji definišu ABC podgrupu: MUM-1/IRF-4 (*multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4*), FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*), i Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), normalno indukovani tokom B ćelijske proliferacije i aktivacije. Podgrupu GCB definišu geni koji su ispoljeni u germinalnom centru kao što su: CD10 (*cluster*

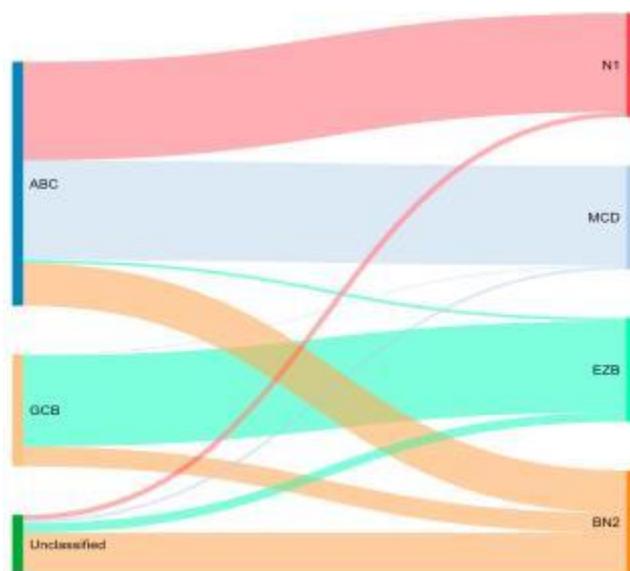
of differentiation 10), LMO2 (*LIM domain only 2*) i Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6*) [20]. U GCB podgrupi se često javljaju i: EZH2 (*recurrent enhancer of zoster 2*) mutacija, PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) delecija, Bcl-2 translokacija/mutacija i cREL amplifikacija, dok su one rijetko opisane u ABC podgrupi. Mnoge studije su pokazale da podjela DLBCL na ove dvije grupe tumora ima klinički značaj, odnosno da pacijenti iz GCB grupe imaju značajno bolje trogodišnje ukupno preživljavanje (OS) ukoliko se liječe R-CHOP protokolom (85%) u odnosu na ABC podgrupu (69%). Ovakvi rezultati proizilaze iz činjenice da se GCB tip odlikuje visokim apoptotskim indeksom, visokim stepenom ekspresije proapoptopskih proteina Bax, Bak i Bid, i niskom ekspresijom antiapoptoskog proteina Bcl-XL [27], ali i različitim mehanizmom R-CHOP rezistencije u ABC podgrupi [25,26].

Chapuy i saradnici su identifikovali 5 grupa DLBCL sa posebnim genetskim obilježjima: C1-niskorizični ABC-DLBCL sa čestim mutacijama u NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) putu (Bcl-10, TNFAIP3 [*tumor necrosis factor alpha-induced protein 3*]), NOTCH2 (*Notch Receptor 2*), i Bcl-6 aktivacije; C2-ABC/GCB nezavisna podgrupa sa 17p delecijom i TP53 inaktivacijom; C3-GCB DLBCL podgrupa sa učestalim mutacijama u epigenetskim enzimima (KMT2D [*lysine methyltransferasa 2D*], CREBBP [*CREB-binding protein*], i EZH2), Bcl-2 i PTEN; C4-GCB DLBCL podgrupa sa mutacijama u NF- κ B parametrima (CARD11 [*caspase recruitment domain-containing protein 11*], NFKBIE [*NFKB inhibitor epsilon*], NFKBIA [*NFKB inhibitor alpha*], CD83 i STAT 3 [*signal transducer and activator of transcription*]); i C5-ABC DLBCL podgrupa sa podudaranjem CD79B (48%)/MYD88^{L265P} (50%) mutacijom i učestalo pozitivnim Bcl-2, koji je povezan sa ekstranodalnom lokalizacijom [28], (Slika 2).



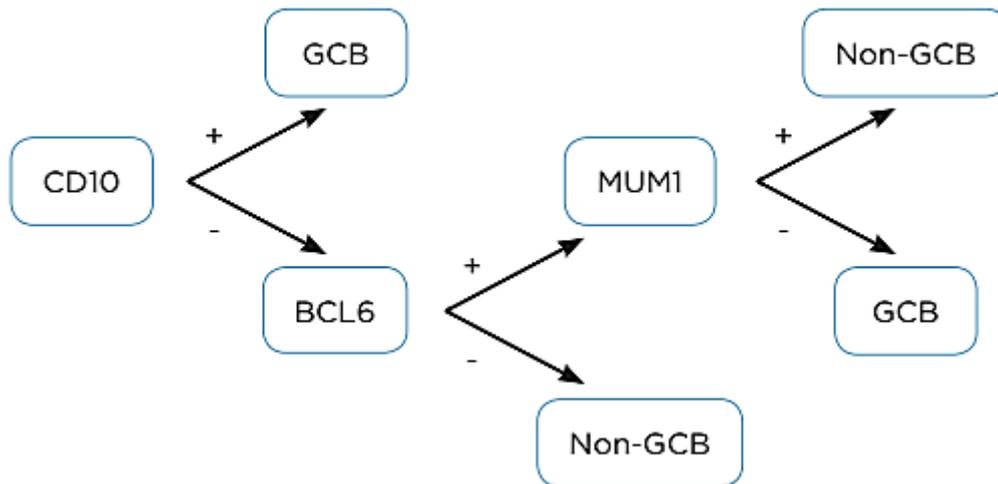
Slika 2. Genetska *cluster* klasifikacija DLBCL u poređenju sa COO po Chapuy i saradnici [19]

Jedan od klasifikacionih sistema za pacijente sa DLBCL je predložio *Schmitz* sa saradnicima. Ovaj sistem klasifikacije se zasniva na istovremenim prisustvom genetskih aberacija, i prisutvo 3 osnovne podgrupe kod ABC DLBCL: MCD podgrupa kod 23,1% (MYD 88 i CD79b mutacijama); BN2 podgrupa kod 13,6% (Bcl-6 fuzija i NOTCH2 mutacije), N1 podgrupa kod 6,1% (NOTCH1 mutacije). Međutim, kod GCB DLBCL 37,2% pacijenata pripada EZB podgrupi (EZH2 mutacija i Bcl-2 translokacija), 11,6% je iz podgrupe BN2, dok je 51,1% neklasifikovanih [26], (Slika 3).



Slika 3. Genetska subklasifikacija DLBCL u komparaciji sa COO po *Schmitz* i saradnicima [19].

Hans i saradnici su predložili imunohistohemijsku analizu ekspresije samo tri proteina (CD10, Bcl-6 i MUM 1) kao adekvatnu zamjenu za DNK mikročip analizu. CD10 je GCB marker, Bcl-6 je povezan sa oba tipa i GCB i ABC, a MUM-1 je marker postgerminativnog centra. Difuzni B krupnoćelijski limfom porijekla germinativnog centra (GCB) su imunohistohemijski CD10+ (>30% ćelija) ili CD10-, BCL-6+ i IRF4/MUM-1, dok svi ostali slučajevi predstavljaju non-GCB tip [29]. Iako se MUM-1 koristi kao marker postgerminativnog centra, postoje slučajevi koekspresije CD10 i MUMU-1 (CD10⁺ MUM-1⁺) koji se po Hansovom algoritmu klasifikuju u GCB grupu. Trostruko negativni DLBCL po Hansovom algoritmu su tipovi DLBCL bez pozitivnog bojenja ova tri markera, i oni pripadaju ABC grupi (Slika 4).



Slika 4. Hansov model klasifikacije DLBCL na osnovu imunohistohemije [29].

Klinička korisnost multiplatformskih genomskih analiza je veoma jasna, posebno ako se uzme u obzir veliko interesovanje za personalizovanu medicinu. Međutim, implementacija složenih genomskih procedura u kliničkoj praksi je bila veoma teška, te su bile neophodne jednostavnije metode poput imunohistohemijskih bojenja kojim bi se prevazišle poteškoće. Prema aktuelnoj Klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije za maligne bolesti hematopoetskog i limfoidnog tkiva DLBCL se dijagnostikuje primjenom imunohistohemijskih analiza, korišćenjem standardnog panela antitijela, uz primjenu kriterijuma po Hansu za subklasifikaciju po COO. Hansov model ima 80% podudarnost sa subklasifikacijom dobijenom profiliranjem genskom ekspresijom (GEP) [19].

Citogenetska i FISH analiza identifikuje genetske abnormalnosti vezane za DLBCL, ali i postojanje visoko agresivnih oblika DLBCL poput *doubl hit* odnosno *tripl-hit* limfoma.

Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije iz 2016.godine je DLBCL kao klinički, molekularno i patohistološki heterogenu bolest podijelila u nekoliko entiteta (Tabela1).

Tabela 1. DLBCL i drugi agresivni B-ćelijski limfomi revizija SZO [4]

Klasifikacija B-ćelijskih limfoma
Difuzni B-krupnoćelijski limfom bez posebnih obilježja, DLBCL, NOS <ul style="list-style-type: none"> - Morfološke varijante (centroblastni, imunoblastni, anaplastični) - Druge rijetke morfološke varijante (<i>double-expresser DLBC-NOS</i>; <i>CD30-positive DLBCL</i>; <i>CD5-positiv DLBCL-NOS</i>; <i>cyclin D1-positiv DLBCL-NOS</i>) - Molekularni podtipovi (GCB podtip; ABC podtip)
T-ćelijama/histiocitima bogat B krupnoćelijski limfom
Primarni DLBCL centralnog nervnog sistema
Primarni kožni DLBCL, <i>leg type</i>
Primarni medijastinalni B krupnoćelijski (PMBCL)
Primarni efuzijski limfom
Intravaskularni B-krupnoćelijski limfom
Plazmoblastni limfom
EBV ⁺ DLBCL, NOS
DLBCL povezan sa hroničnom inflamacijom
Limfomatoidna granulomatoza
ALK ⁺ B krupnoćelijski limfom
Plazmoblastni limfom
DLBCL sa IRF4 rearanžmanom
<i>Burkitt</i> limfom

1.5. Kliničke manifestacije DLBCL

Bolest se klinički manifestuje kao brzorastuća nodalna ili ekстранodalna tumorska masa, a kliničke manifestacije bolesti su različite i zavise od lokalizacije tumora [1,2]. DLBCL je najčešće lokalizovan u limforetikuloendotelijalnom tkivu (limfni čvorovi, slezena, jetra i koštana srž).

Nodalni limfomi se najčešće prezentuju brzo rastućim bezbolnim limfnim čvorovima, najčešće na vratu. Međutim, kod oko 40% pacijenata se javlja ekстранodalna bolest. Primarno ili sekundarno mogu biti zahvaćena brojna ekстранodalna mjesta, kao što su: centralni nervni sistem, pluća, gastrointestinalni trakt, genitourinarni trakt, kosti, testisi, štitna žlijezda, koža, jetra, ili dojke.

Simptomi i znaci bolesti se mogu podijeliti u tri grupe: uzrokovani tumorskom masom, poremećajem hematopoetskog i imunološkog sistema, i opšti simptomi i znaci.

Otpuštanjem citokina iz tumorske ćelije nastaju tzv. B simptomi bolesti (povišena tjelesna temperatura preko 38°C, noćno preznojavanje i gubitak u tjelesnoj težini). Na početku bolesti jedna trećina pacijenata ima neki od B-simptoma bolesti, a kod 15% se bolest na početku prezentuje infiltracijom koštane srži [30].

1.6. Dijagnostička obrada pacijenta sa DLBCL

Dijagnostička obrada pacijenta sa DLBCL non-Hodgkin limfomom ima nekoliko ciljeva, čije određivanje je neophodno kako bi se primijenio optimalan terapijski modalitet. Prvo je neophodno odrediti tačan podtip limfoma, nakon čega slijedi procjena raširenosti bolesti i procjena vrijednosti prognostičkih pokazatelja aktivnosti bolesti.

Biopsija limfnog čvora ili zahvaćenog tkiva sa imunohistohemijskom analizom je inicijalna pretraga kojom se dijagnostikuje non-Hodgkin limfom. Danas su sve više u upotrebi i citogenetske i molekularne tehnike, kojima se vrši dodatna podklasifikacija.

Proširenost limfoma se procjenjuje CT-om (odnosno PET-CT-om) i biopsijom kosti. Step proširenosti bolesti se određuje prema modifikovanoj *Ann Arbor* klasifikaciji, po kojoj se prvi stadij smatra lokalizovanom bolešću, a ostali stadijumi proširenom bolešću, (Tabela 2). Otprilike polovina pacijenata je dijagnostikovana u trećem ili četvrtom stadijumu bolesti [30].

Tabela 2. Ann Arbor klasifikacija proširenosti limfoma [31]

Stadijum	Zahvaćena područja
I	Limfomom zahvaćena jedna regija limfnih čvorova ili ekstralimfatičnih organa (IE)
II	Zahvaćene dvije ili više regija limfnih čvorova sa iste strane dijafragme ili zahvaćenost jednog ekстранodalnog organa te dvije ili više regija sa iste strane dijafragme
III	Zahvaćeno više regija limfnih čvorova sa obje strane dijafragme što može biti praćeno lokalizovanim zahvatanjem jednog ekстранodalnog organa ili mjesta (III E), slezena (III S) ili oboje (III SE)
IV	Difuzno zahvaćen jedan ili više ekstralimfatični organ sa ili bez popratnog zahvatanja limfnih čvorova

Najčešće primjenjivani prognostički model kod pacijenata sa non-Hodgkin limfomom je Internacionalni prognostički indeks (*International Prognostic Index-IPI*), koji se bazira na pet lako dostupnih kliničkih karakteristika: životna dob, klinički stadijum, performans status i broj ekстранodalnih lokalizacija. Prema broju nepovoljnih prognostičkih faktora pacijenti mogu da budu svrstani u grupe nepovoljnog rizika (skor 0-1), srednje nizak rizik (skor 2), srednje visok rizik (skor 3) i visok rizik (skor 4-5). Revidirani Internacionalni prognostički indeks (R-IPI) je razvijen nakon uvođenja rituksimaba uz hemioterapiju u cilju predviđanja ishoda pacijenata koji se liječe imunoheмотerapijom. Maksimalan broj bodova je 5, a pacijenti mogu da budu svrstani u 3 podgrupe: „veoma dobra“ prognostička grupa (skor 0), „dobra“ prognostička grupa (skor 1-2) i „loša“ prognostička grupa (skor >2). Za procjenu R-IPI sa jednim bodom se boduju: III/IV klinički stadijum bolesti, godine života >60, povišen nivo LDH, ECOG performans status ≥ 2 , i više od jedne ekстранodalne lokalizacije bolesti [32].

1.7. Procjena odgovora na liječenje

Procjena odgovora tokom liječenja pacijenata sa DLBCL non-Hodgkin limfomom se obično provodi nakon provedene jedne polovine do jedne trećine liječenja, kao i na kraju liječenja. Cilj liječenja je da se nakon primijenjenih nekoliko ciklusa imunoheмотerapije

postigne minimalno parcijalna remisija bolesti, a nakon završenog liječenja kompletna remisija.

Odgovor na primijenjeno liječenje bi trebalo procjenjivati u skladu sa definisanim kriterijumima. Međunaradna radna grupa, koju su činili kliničari, patolozi i radiolozi, je 1999. godine objavila smjernice za procjenu odgovora na liječenje pacijenata sa limfomima koje su se temeljile na upotrebi CT-a [33], (Tabela 3).

Tabela 3. Kriterijumi odgovora na terapiju [33]

Kriterijumi odgovora na terapiju
Kompletan odgovor (CR): regresija limfnih čvorova većih od 1,5 cm na $\leq 1,5$ cm i na ≤ 1 cm (ili više od 75% za limfne čvorove veličine 1-1,5 cm prije terapije, regresija ili održavanje normalne veličine na drugim lokalizacijama, odsustvo infiltracije koštane srži.
Kompletan odgovor neutvrđen (CRu): mogući rezidualni čvorovi veći od 1,5 cm najvećeg transferalnog dijametra, ali sa regresijom $>75\%$ najvećeg promjera lezije ili održavanje normalne veličine, koštana srž normalna ili neodređen nalaz (povećan broj ili veličina agregata ćelija bez morfološke ili arhitektonske atipije).
Parcijalni odgovor (PR): smanjenje $>50\%$ šest najvećih čvorova ili nodalnih masa i bez povećanja veličine drugih limfnih čvorova. Jetra i slezena nisu uvećane, regresija nodula u organima ($>50\%$). Nema novih mjesta bolesti. Nalaz u koštanoj srži nije relevantan
Relaps (za bolesnike sa CR i CRu na kraju terapije): pojava novih limfnih čvorova ili povećanje za $>50\%$ veličine prethodno nezahvaćenih čvorova. Pojava novih lezija i/ili povećanje za $>50\%$ veličine prethodno nezahvaćenih organa. Pojava ili ponovna pojava zahvaćenosti koštane srži.
Progresija (za bolesnike na terapiji ili sa PR ili one sa lošim odgovorom na kraju terapije): povećanje $>50\%$ nekog od prethodno zahvaćenih limfnih čvorova. Pojava lezija u organima. Pojava ili ponovo zahvatanje koštane srži.

Nove, revidirane smjernice koje se temelje na upotrebi PET-CT-a, su objavljene 2007. godine [34]. Pozitronska emisiona tomografija sa FDG-om (PET) je najbolja metoda za procjenu proširenosti bolesti, kao i za procjenu odgovora na kraju antitumorskog liječenja.

Pozitronska emisiona tomografija ima određene prednosti, ali i nedostatke. Prednosti upotrebe PET-CT-a se odnosi na veću senzitivnost u odnosu na CT i NMR da razlikuje prisutnost tumora od nekroze ili fibroznih promjena u rezidualnim masama koje su često prisutne nakon liječenja. Nedostaci ove *imaging* metode su lažno pozitivni rezultati kod hiperplazije timusa, sarkoidoze i nekih infekcija. Takođe, pojačano nakupljanje FDG-a može se vidjeti i u koštanoj srži nakon primjene hematopoetskih faktora rasta. Prema smjernicama radne grupe PET-CT je neophodno uraditi inicijalno, prije početka liječenja, da bi se utvrdio stepen raširenosti bolesti i nakon završenog liječenja kako bi se utvrdio odgovor na antitumorsko liječenje. Preporuke za upotrebu PET-CT metode kod pacijenata koji se aktivno liječe ili su završili liječenje se odnosi na vremenski period koji je neophodno ispoštovati nakon primjene hemioterapije, i to minimalno 3 sedmice nakon posljednje hemioterapije, a najbolje nakon 6-8 sedmica.

1.8. Liječenje pacijenata sa DLBCL

Difuzni B krupnoćelijski limfom je potencijalno izlječiva bolest, ali je i dalje fatalna za 50% pacijenata. Iako značajan procenat pacijenata sa DLBCL može biti uspješno liječen kombinacijom različitih terapijskih procedura, ne postoji dostupan ni biološki, ni klinički skor koji bi razlikovao pacijente koji mogu biti liječeni standardnom terapijom i one koji zahtijevaju novi terapijski pristup [35,36]. Ranih 80-tih godina, standard liječenja je bila zračna terapija, a primjena kombinovane terapije (hemioterapija+zračna terapija) je dovela do poboljšanja ishoda liječenja [37-39]. Hemioterapija koja se primjenjuje u toku prvih 12 nedjelja liječenja određuje preživljavanje pacijenata.

Više od tri decenije protokol baziran na antraciklinima (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin i prednison-CHOP) predstavljao je standard u liječenju pacijenata sa DLBCL, a primjena intenzivnijih hemioterapijskih protokola nije rezultirala poboljšanjem rezultata liječenja [40].

Uvođenje monoklalnog anti-CD20 antitijela, rituksimaba, u terapiju značajno je poboljšalo rezultate liječenja pacijenata sa DLBCL, zbog čega je R-CHOP protokol (rituksimab, ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin i prednison) standardna terapija za bolesnike sa novodijagnostikovanim DLBCL [1,23,36,41-46]. Rituksimab je anti-CD20 monoklonsko antitijelo koji se isključivo veže za transmembranski antigen CD20, koji predstavlja neglikolizirani fosfoprotein smješten na pre-B i zrelih B-limfocitima. Antigen je

izražen u >95% svih B non-Hodgkin limfoma. Fab (*fragment anigen binding*) domen rituksimaba se veže na antigen CD20 na B-limfocitima, a Fc (*fragment crystallizable*) domena može pokrenuti funkcije lize B-ćelija posredovane mehanizmima imunološkim efektorima: citotoksičnost ovisna o komplementu, nastala kao rezultat vezanja C1q, i ćelijska citotoksičnost ovisna o antitijelima, a posredovana jednim ili više Fc γ receptora na površini granulocita, makrofaga i NK-ćelija [47].

Utvrđeno je da dodavanjem rituksimaba poboljšava rezultate liječenja u grupi Bcl-2 pozitivnih pacijenata. Njemačka grupa za agresivne limfome (*High-Grade Non-Hodgkins Lymphoma Deutch Study Group*, DSHNHL) je pokazala da dodavanje etopozida CHOP protokolu i redukcija intervala liječenja sa tri na dvije nedjelje poboljšava ishod liječenja kod mladih pacijenata sa dobrom prognozom [48]. Uprkos poboljšanjima u ukupnom preživljavanju nakon primjene R-CHOP protokola, značajan broj pacijenata i dalje umire od ove bolesti, a skoro polovina pacijenata vremenom postaje refraktorna na R-CHOP protokol [49-51]. Utvrđeno je da je 10-godišnje ukupno preživljavanje oko 40% kod pacijenta preko 60 godina u II-IV stadiju bolesti [52]. Nepovoljni ishodi liječenja poslije primjene prve linije terapije mogu se kategorizovati u tri grupe: relaps bolesti poslije postignute kompletne remisije, pacijenti koji su postigli parcijalnu remisiju i perzistentnom bolešću i pacijenti sa rezistentnom bolešću. Nakon tretmana R-CHOP terapijom, kompletna remisija se postiže kod 70-80% pacijenata [41]. Ipak, 20-30% od tih pacijenata će doživjeti relaps, a oko 20% pacijenata će postići parcijalnu remisiju ili će biti rezistentno na prvu liniju terapije [53].

Visokodozna hemioterapija sa autolognom transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze (TMČH) je standardna terapija za bolesnike sa relapsirajućom ili primarno rezistentnom bolešću. Strategija primjene intenzivne *salvage* terapije nakon čega slijedi autologna TMČH predstavlja šansu za izliječenje relaps/refrakternih pacijenata. Kao *salvage* terapijski protokoli za DLBCL se uglavnom primjenjuju protokoli koji ne posjeduju ukrštenu rezistenciju (ifosfamid, karboplatin, etopozid – ICE; deksametazon, citarabin, cisplatina – DHAP; mesna, ifosfamid, novantron, etopozid - MINE) sa ili bez rituksimaba [54].

Međutim, manje od polovine pacijenata sa relapsom/refrakternim DLBCL će biti kandidati za TMČH zbog godina života i komorbiditeta. Životna dob ne predstavlja kontraindikaciju za autolognu transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze kod pacijenata starijih od 60 godina, mada je njena primjena u ovoj starosnoj grupi ograničena imajući u vidu lošiju prognozu u ovoj grupi pacijenata. Od pacijenata koji su kandidati za primjenu terapije

druge linije, manje od 50% će ostvariti optimalan terapijski odgovor na *salvage* terapiju i nastavak liječenja sa transplantacijom. Istraživanja pokazuju da manje od polovine pacijenata, koji uspješno završe transplantaciju, postižu dugotrajno preživljavanje bez bolesti.

Posljednjih godina se sve više primjenjuje adoptivna imunoterapija CAR (*chimeric antigen receptor*- CAR) T ćelijama, koja je pokazala izuzetno dobro djelovanje. Liječenje se sastoji u izolovanju bolesnikovih T limfocita, u koje se putem virusnog vektora unosi sintetički receptor CAR. Na ovaj način CAR-T limfociti bivaju preusmjereni da prepoznaju određene proteine i antigene na malignim ćelijama. Ipak, iako ova vrsta terapije pokazuje određena obećanja za pacijente sa rezistentnim DLBCL non-Hodgkin limfomom, mnogi pacijenti nisu podobni za ovaj vid liječenja i zahtjevaju alternativne opcije liječenja [55,56]. CAR-T terapija je poboljšala terapijske izgleda kod pacijenata sa refraktornim DLBCL, postigavši ukupnu stopu odgovora od 50–82% [57]. Međutim, pacijenti koji imaju refraktornu bolest i primili su više od četiri prethodna režima liječenja imaju lošiju efikasnost i teže neželjene efekte pri primjeni CAR-T terapije u poređenju sa ostalim pacijentima [55,58]. Stoga je ključno identifikovati hemorezistentne pacijente, rano tokom standardne imunochemoterapije, a koji mogu imati koristi od alternativnih terapijskih strategija.

1.9. Klasična rezistencija na lijekove

Krajem sedamdesetih godina XX vijeka, *Goldie* i *Coldman* su predložili hipotezu da je pojava rezistencije na lijekove u humanim tumorima povezana sa stopom spontanih mutacija specifičnih gena rezistencije na lijekove [59]. Ekstrapolacijom su došli do saznanja da će nastanak rezistentnih ćelija biti dodatno ubrzan genomskom nestabilnošću tumorskih ćelija. Ova nestabilnost nastaje usljed mutacija u regulatornim genima ćelijskog ciklusa kao što je tumor-supresorski onkogen p53 i izlaganjem mutagenima kao što su hemioterapija i zračenje [60]. Na taj način nastaju otporni klonovi koji prevladaju sa proliferacijom tumora. Ovo sve može da se poveća pod selektivnim pritiskom hemioterapije. Ova hipoteza je dala racionalnu osnovu za principe kao što je inverzni odnos između tumorske mase i izliječenja, i povećane efikasnosti kombinovane u odnosu na mono-hemioterapiju.

Ova hipoteza je bila osnova za tzv. terapijske protokole “nove generacije” koji su se počeli pojavljivati krajem 70-ih. Prvi kurativni tretman za agresivne limfome bio je hemioterapijski protokol CHOP, koji je pružio čvrste dokaze da kombinovana hemioterapija

povećava efikasnost kod agresivnih limfoma. Težilo se poboljšanju ishod liječenja prevazilaženjem pojave ćelija rezistentnih na lijekove, uz dodavanje novih citostatika u protokole kasnijih generacija, kao što je M-BACOD (metotreksat, bleomicin, doksorubicin, ciklofosfamid, vinkristin i deksametazon) i naizmjenično ne-unakrsno rezistentni citostatici, kao oni prisutni u protokolima ProMACE (prednizon, doksorubicin, ciklofosfamid i etopozid) i CytaBOM (citarabin, bleomicin, vinkristin i metotreksat) [61].

1.9.1. Biologija tumorske rezistencije na R-CHOP

1.9.1.1 Porijeklo ćelija DLBCL

Profilisanje genske ekspresije (*gene expression profiling* – GEP) definisalo je dva glavna podtipa DLBCL prema porijeklu ćelija, i to DLBCL aktiviranih B-ćelija (ABC) i DLBCL B-ćelija germinativnog porijekla (GCB). GEP studije su pokazale da se geni koji definišu ABC podgrupu, kao što je regulatorni faktor interferona 4 (IRF4), FLICE-like inhibitorski protein (FLIP) i B-ćelijski limfom 2 (Bcl-2), normalno indukuju tokom proliferacije B-ćelija i aktivacije plazma ćelija [20]. Nasuprot tome, GCB podgrupa se odlikuje genima koji su prvenstveno ekspimirani u B-ćelijama germinativnog centra, kao što su CD10, LIM domen 2 (LMO2) i Bcl-6 [20]. S druge strane, EZH2 mutacije, delecije homologa fosfataze i tenzina (PTEN), translokacije/mutacije Bcl-2 i cREL amplifikacija, koje su uobičajene u podtipu GCB, rijetko se opisuju u podtipu ABC [62]. Istraživanja provedene do sada su pokazala da GCB podgrupa ima značajno bolje trogodišnje ukupno preživljavanje na primjenu R-CHOP protokola od ABC podgrupe (85% naspram 69%), što ukazuje na različite mehanizme rezistencije na R-CHOP protokol u ABC podgrupi [25,26].

Prema novom klasifikacionom sistemu koji su predložili *Schmitz* i saradnici [26] na osnovu istovremene pojave genetskih aberacija, 23,1% pacijenata sa ABC-DLBCL pokazalo je MCD podtip (MYD88 i CD79B mutacije istovremeno), 13,6% imalo je BN2 (Bcl-6 fuziju i NOTCH2 mutaciju istovremeno), a 6,1% je pokazalo N1 (NOTCH1) mutaciju. U međuvremenu, 37,2% pacijenata sa GCB-DLBCL imalo je EZB podtip (EZH2 mutacije i Bcl-2 translokacije), a 11,6% je pokazalo BN2, dok je preostalih 51,1% bilo neklasifikovano. Nakon tretmana R-CHOP protokolom, pacijenti sa podtipom N1 ili MCD imali su značajno inferiornije ishode u poređenju sa onima sa podtipom EZB ili BN2. Predviđene petogodišnje stope ukupnog preživljavanja za podtipove MCD, N1, BN2 i EZB bile su 26%, 36%, 65% i

68%, respektivno [26]. Lijekovi kojima je target NF κ B (kao što su inhibitori Bruton tirozin kinaze [BTK]) mogu se istraživati u BN2 i MCD podtipovima dok inhibitori imunološke kontrolne tačke izgledaju obećavajući kod N1 podtipa [26].

1.9.1.2 Klonalna evolucija

Sve je više dokaza da je povećanje rezistencije na R-CHOP u DLBCL povezano s procesom klonske evolucije. Melchardt i saradnici [63] su analizirali 104 gena kod 28 DLBCL pacijenata i opisali glavne obrasce klonalne evolucije primjenom sekvencionisanja visoke propusnosti (HTS). Fluktuacije subklonova koji sadrže mutacije gena su uočene kao rezultat imunohemioterapije i povezane su sa otpornošću na R-CHOP (npr. Bcl-2 i proto-onkogen serin/treonin-protein kinaza 1). Više nesinonimnih genetskih mutacija kod pacijenata sa DLBCL je bilo povezano sa kraćim medijanom ukupnog preživljavanja. Primjećeno je da je R-CHOP djelovao na subklonove koji su eksprimirali mutacije gena (npr. tumorski protein 53 [TP53]) a koji su pogodovali progresiji tumora [63].

Usljed stresa pri tretmanu rituksimabom, rezistentni podklonovi mogu evoluirati tako da izgube površinski CD20 antigen (na nivou RNK ili proteina) ili da razviju genetske mutacije četiri transmembranskih domena [64]. Smatra se da Fc γ R polimorfizmi jednog nukleotida mogu odabrati rezistentne subklonove limfoma tako da prilikom primjene rituksimaba se smanjuje ćelijska citotoksičnost zavisna od antitijela izazvana rituksimabom [64].

1.9.1.3 Mikrokruženje tumora

Mikrokruženje tumora definiše diferencijaciju B-ćelija i tumorogenezu DLBCL, uključujući imune ćelije, stromalne ćelije i ekstracelularne komponente. Imune ćelije DLBCL mikrokruženja sadrže: citotoksične T ćelije, folikularne dendritične ćelije, regulacijske T ćelije, ćelije prirodne ubice, makrofage i retikulinske ćelije, koje su važne za mnogobrojne cikluse B ćelijske proliferacije, maturacije, selekcije i imunološkog izbjegavanja. Stromalne ćelije tumorskog mikrokruženja čine: mezenhimalne stromalne ćelije, *lymphoma-associated* makrofazi, *myeloid-derived* supresorske ćelije, i dendritične ćelije, dok ekstracelularne komponente sačinjavaju: matriks, hemokini, citokini, egzozomi i krvni sudovi (Slika 5). Mikrokruženje tumora je različito građeno na nivou gena i proteina kada se poredi DLBCL

osetljiv na R-CHOP protokol sa rezistentnim DLBCL [65]. U rezistentnim slučajevima na malignim B-ćelijama su uočeni deficit CD37, ligand programirane ćelijske smrti 1 (PD-L1) i povećanje regulacije CD47 [66-68]. Povećanje regulacije CD47 je u korelaciji sa lošijom prognozom kod pacijenata sa podtipom ABC DLBCL u poređenju sa GCB podtipom, što ukazuje da postoji različito mikrokruženje kod različitog porijekla ćelija [69]. Blokada CD47 od strane Hu5F9-G4 može sinergistički djelovati sa rituksimabom kako bi se savladala otpornost na R-CHOP u DLBCL [68]. Transduktor signala Janus kinaze i aktivator transkripcije 3 (JAK-STAT3) na nekoliko načina dovodi do interakcije između tumorskih ćelija i imunološkog mikrokruženja a u cilju regulacije angiogeneza, inflamacija, imunosupresija i onkogeneza [70]. Utvrđen je da se JAK aktivacija kod ABC-DLBCL vrši fosforilacijom histon H3 tirozin 41 umjesto STAT regulacije [71].

Jedan od osnovnih mehanizama rezistencije na primjenu R-CHOP protokola u DLBCL je adhezija na stromalnim ćelijama koja štiti od apoptoze (celularna adhezija posredovana rezistencijom na lijekove – CAM-DR) [72]. Otkriveno je da CAM-DR korelira sa rezistencijom na rituksimab kroz regulaciju ADAM metaloproteinaznog domena 12 (ADAM-12) i modulaciju signalizacije fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI3K)-Akt [73].

Inhibicija BTK (Brutonova tirozin kinaza) ima letalan efekat na „uzvodne“ (*upstream*) CD79 mutirane ćelije, ali ne u potpunosti na „nizvodne“ (*downstream*) CARD11 mutirane ćelije DLBCL, koje bivaju eliminisane blokadom nizvodnog NF- κ B signalnog puta.

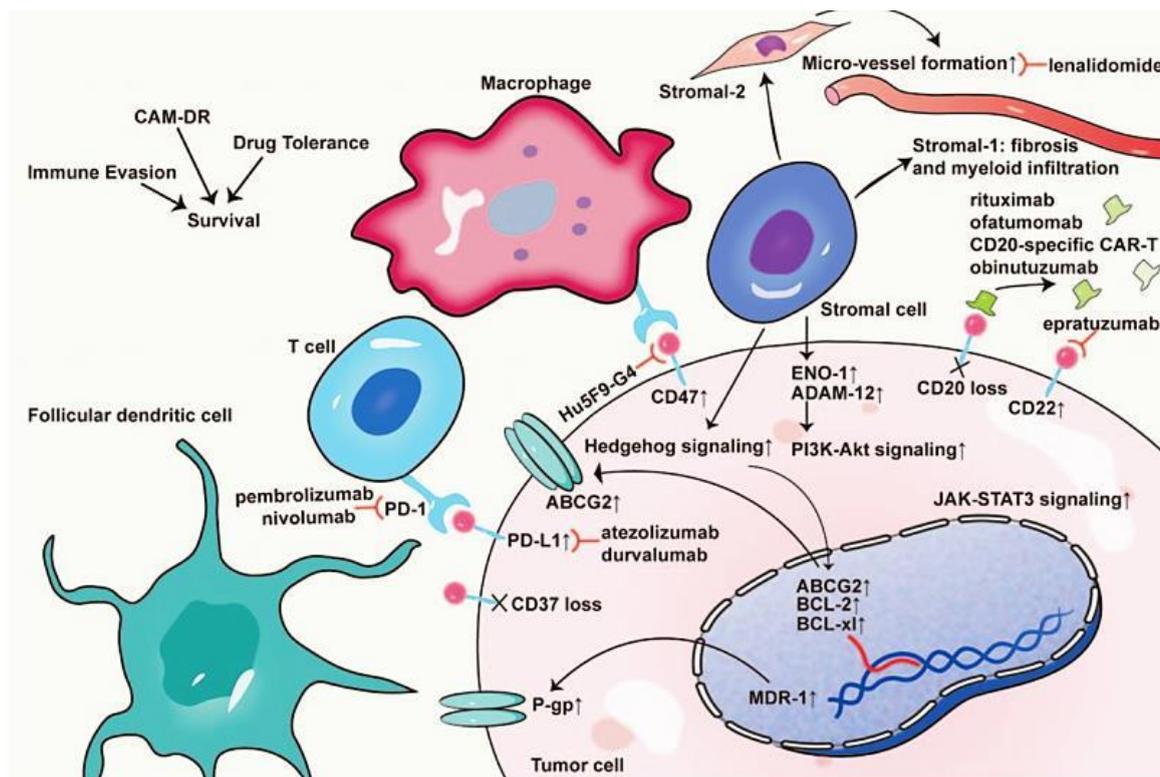
NF- κ B predstavlja grupu homodimernih i heterodimernih transkripcionih faktora koji mogu aktivirati različite grupe ciljnih gena koji su uključeni u preživljavanje, proliferaciju i imunološki odgovor ćelije [74-76]. Ovu grupu strukturno povezanih proteina čini pet članova: RelA(p65), RelB, cRel, NF- κ B1 (p50; p105) i NF- κ B2 (p52;p100) a koji se odlikuju različitim heterodimernim i homodimernim oblicima (6 u 3.) RelA, RelB i c-Rel imaju transaktivacijski domen C-terminalnog dijela, dok se NF- κ B1/p105 i Nf- κ B2/p100 nalaze u citoplazmi i inaktivni su prekursori p50 i p52 proteina [74,77]. Proteoliza dovodi do pomicanja C-terminalne inhibitorne domene uz posljedično pomicanje proteina u jezgru [76,78]. NF- κ B je prisutan u citoplazmi gotovo svih vrsta ćelija i njegovo djelovanje je pod kontrolom familije regulatornih proteina koji se nazivaju inhibitori NF- κ B [74,75].

NF- κ B signalni put ima važnu ulogu u regulaciji preživljavanja normalnih i malignih B ćelija, a kroz kontrolu mnogobrojnih regulacijskih puteva apoptoze. Inhibicija apoptoze NF-

κ B može se javiti moduliranjem tumor nekrosis faktor tip $\frac{1}{2}$ receptora (TNFR1/2) signala posredstvom FAS i ograničavanjem aktivnosti BCL-2 gena.

NF- κ B signalni put ima značajnu ulogu u regulisanju ekspresije gena bitnih za stvaranje urođenog i adaptivnog imunološkog odgovora: TNF, VEGF, IL-1, IL-6, ciklin D1, c-MYC [74]. Neaktivni NF- κ B se nalazi u citoplazmi vezan za inhibitor kappa B (I κ B). Tokom NF- κ B aktivacije I-kappa-kinaza (I κ K) fosforilacijom I κ B dovodi do razgradnje inhibitora u citoplazmi NF- κ B. Aktivirani NF- κ B se premješta u jezgru gdje potiče transkripciju NF- κ B otkrenutu ciljnim genima [75,79].

NF- κ B signalizacija se aktivira osnovnim (aktivacija *p50/rel* i *p50/relA*) i sporednim (aktivacija *p52/relB*) putem koji imaju i apoptotičku i antiapoptotičku funkciju. Prisutnost NF- κ B molekularne ekspresije je različito izražena kod podgrupa DLBCL. Kao nizvodni efektori hronične aktivacije BCR signala, ravnomjerna aktivacija NF- κ B signalizacije vrši sigurno preživljavanje tumorskih ćelija kod ABC-DLBCL ali ne i kod GCB-DLBCL [80,81].



Slika 5. DLBCL mikrookruženje kod rezistencije na R-CHOP. Na R-CHOP odgovor utiče dejstvo tumorskog mikrookruženja u uslovima ćelijske adhezije za stromalne ćelije, angiogeneza, povećana multiple rezistencijom na lijekove i imunološko izbjegavanje. ABCG-2: ATP vezujući kasetni član porodice G; ENO-1: enolaza 1; CAM-DR: cell adhesion-mediated drug resistance; CAR-T: Chimeric antigen receptor-T-cell; DLBCL: Diffuse large B cell lymphoma; P-gp: P glikoprotein; PD-1: protein programirane ćelijske smrti 1; PD-L1: ligand pogramirane smrti 1; R-CHOP: rituksimab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednison [1].

1.9.2. Farmakokinetika i rezistencija na lijekove

Sastavni dio ćelijskog ciklusa kao što su topoizomeraza II i p53 su ciljna mjesta dejstva lijekova. Ova ciljna mjesta mogu imati promjenjiv uticaj ovisno o rasporedu primjene lijekova. Uočeno je da se kod primjene doksorubicina, on pomijera od formiranja slobodnih radikala i alkilacije prema topoizomerazi II kako se koncentracije lijeka pomjeraju sa bolus doza na primjenu u vidu kontinuirane infuzije [82]. Lijekovi takođe imaju granične koncentracije koje su bitne za primjenu infuzionih rastvora u kojim su koncentracije u stanju dinamičke ravnoteže niske [83]. Praktična primjena ovakvog koncepta mora uzeti u obzir klirens lijekova među pacijentima, koji može premašiti i 10 puta veće, odnosno manje razlike [84]. Takvi koncepti bi predvidjeli da će terapijski protokoli fiksne raspodjele doza, kao što je R-CHOP protokol, imati niži kurativni potencijal kod pacijenata sa brzim klirensom lijeka i srednje osjetljivim tumorima.

Intenzitet doze (*dose intensity* – DI), definisan je kao doza po jedinici vremena, i smatra se rješenjem za odnos doze i odgovora. Klinički značaj DI je ispitivan ranijim retrospektivnim studijama kao što je analiza 115 neliječenih DLBCL gdje je najvažniji prediktor preživljavanja bio relativni (R)DI doksorubicina [85]. Različite zaključke su dala prospektivna randomizovana ispitivanja koja su upoređivala protokole koji se razlikuju u DI. [86-88]. Neke od ovih studija nisu uspjele pokazati korist koja se dobija od DI, jer veće doze imaju koristi samo za određenu podgrupu pacijenata, dok se nepotrebnim povećavanjem doze povećava i toksičnost lijekova. Ovo se može objasniti činjenicom da DI precizno ne određuje brzinu doze ili izloženost, i ne razlikuje brzinu doze i frekvencu primjene doze, od kojih svaka ima različitu teorijsku korist. Brzina doze nije ekvivalentna izloženosti lijeku zbog varijabilne farmakokinetike, a frekvencija primjene (gustina) doze će vjerovatnije uticati na kinetiku tumora [86-88].

Kao alternativa doziranju zasnovanom na farmakokinetici, usvojen je pristup zasnovan na farmakodinamici prema kojem se doziranje zasniva na najnižem nivou neutrofila. Prednost farmakodinamskog doziranja je što odražava farmakokinetiku plazme i intracelularno djelovanje lijeka, na koje utiču genetski polimorfizmi. Adekvatne koncentracije lijeka u plazmi su posebno važne za infuzione protokole u kojima koncentracija lijeka u stanju dinamičke ravnoteže može pasti ispod efektivne granične koncentracije kod osoba sa brzim metabolizmom lijekova [83]. Ovo bi bilo manje važno kod bolus protokola kao što je CHOP

gde se postižu tzv. vršne koncentracije. Klinički, farmakodinamičko doziranje takođe dozvoljava povećanje DI bez pretjerane toksičnosti [89].

1.9.3. Kinetika tumorskih ćelija

Ulogu kinetike tumorskih ćelija su šezdesetih godina XX vijeka istakli Skipper i saradnici. Oni su uočili dio ćelija koje prolaze kroz replikaciju DNK, nazvan „frakcija rasta“, u velikoj mjeri utiče na osjetljivost na lijekove [90]. Iako bi visoka frakcija rasta predviđela veću osjetljivost na lijekove, to bi također moglo dovesti do veće proliferacije tumora između ciklusa. Tako kod Burkitt limfoma, koji se odlikuje visokim procentom ćelija u ciklusu, primjena CHOP protokola ima visoku stopu neuspjeha, dok su protokoli s intenzivnim dozama i gustim dozama visoko kurativni [91].

Kod agresivnih limfoma, visoka proliferacija tumora određena imunohistohemijskim markerom Ki-67 ili MIB-1, pokazala se nepovoljnim prognostičkim nalazom ukoliko se primjenjuje CHOP hemioterapijski protokol. Ovakav nalaz sugerira da je problem "kinetički" neuspjeh [92,93]. Jedna od strategija za prevazilaženje "kinetičkog" neuspjeha je povećanje gustine doze kroz čestu primjenu hemioterapije. Ovaj koncept je prvi put opisan kod primjene MACOP-B protokola (metotreksat, doksorubicin, ciklofosfamid, vinkristin, prednizon i bleomicin), koji je primjenjivan sedmično tokom 12 sedmica. Međutim, u poređenju sa CHOP protokolom u randomizovanoj studiji, MACOP-B je imao sličan ishod [94]. Grupa *German High Grade Lymphoma Study Group* je takođe opisala ovaj koncept u randomizovanoj studiji CHOP-14 u odnosu CHOP-21, sa i bez etopozida. U ovoj studiji, na 831 pacijentu starijem od 60 godina sa agresivnim limfomima, CHOP protokol koji je primjenjivan na svakih 14 dana (CHOP-14) bio je značajno bolji od CHOP protokola primjenjivanog na svakih 21 dan (CHOP-21), sa ukupnom stopom preživljavanja od 53,3% i 40,6% [95].

Smanjenje broj tumorskih ćelija koje mogu preživjeti i proliferisati između ciklusa mogu se postići alternativnim strategijama za gustinu doze uz povećanje frakcijske smrti ćelija ili efikasnost hemioterapije. Duža izloženost lijekovima može iskoristiti prednost povećane osjetljivosti ćelija u ćelijskom ciklusu, a in vitro studije su pokazale da produženo izlaganje niskim koncentracijama vinkristina i doksorubicina, u poređenju s kratkotrajnim izlaganjem višoj koncentraciji istih lijekova, može značajno povećati citotoksičnost [96]. Ovaj pristup je ugrađen u primjenu DA-EPOCH protokola, pri čemu se doksorubicin, vinkristin i etopozid

kontinuirano primjenjuju u infuziji tokom 96 sati. Ipak, kada je DA-EPOCH protokol testiran kod neliječenih pacijenata sa DLBCL, visoka proliferacija tumora je bila povezana sa nešto boljim ishodom [89]. Kada je DA-EPOCH protokol s rituksimabom testiran na 83 pacijenta sa DLBCL, doveo je do preživljavanja bez progresije i ukupnog preživljavanja od 82% za 32 mjeseca, a studija studijske grupe *Cancer and Leukemia Group B* na 71 pacijentu sa DLBCL pokazala preživljavanje bez progresije i ukupno preživljavanje od 83% i 90%, nakon 20 mjeseci, što ukazuje na potencijalno poboljšanje u odnosu na primjenu R-CHOP protokola [89,97].

1.9.4. Regulacija ćelijskog ciklusa i apoptoze

Klinički važni mehanizmi rezistencije na lijekove pri primjeni DLBCL protokola je posljedica promjena u ćelijskom ciklusu i putevima apoptoze. Mutacija p53 tumor-supresornog gena, transkripcionog faktora uključenog u zaustavljanje ćelijskog ciklusa i apoptozu, povezana je sa neuspjehom liječenja i lošim preživljavanjem kod pacijenata sa DLBCL [98,99]. P53 kontrolira ćelijske odgovore pri oštećenju DNK, zaustavljanjem ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa tako da se reparacija oštećenja DNK dešava pre nego što ćelija nastavi kroz sintezu DNK i mitozu [60]. Hipermutabilno stanje koje može biti rezultat inhibicije normalnog p53 teoretski može podstaći brzu pojavu rezistentnih klonova. Važnost p53 u razvoju malignog fenotipa sugerira da postoji prisustvo p53 mutacija u većini karcinoma, uključujući i do četvrtine DLBCL [98].

Povećana ekspresija proteina ciklina D2 i D3, koji regulišu tranziciju G1 u S fazu ćelijskog ciklusa, takođe je povezana sa lošom prognozom kod DLBCL [100,101]. S lošim ishodom su takođe povezani i pojava gubitak regulatornih proteina ćelijskog ciklusa, p16 (INK4: inhibitor CDK4) i p14, koji inhibiraju progresiju ćelijskog ciklusa [102]. Ovakav gubitak kontrole ćelijskog ciklusa je povezan sa lošim ishodom u DLBCL i u skladu je sa korelacijom između tumorskih ćelija sa visokim nivom Ki-67 i lošeg ishoda bolesti [92,93].

Apoptoza je posljednji uobičajeni put kroz koji većina antitumorskih lijekova ispoljava svoje terapijske efekte kod DLBCL, pružajući na taj način biološko objašnjenje unakrsne rezistencije na lijekove. Identifikovana su dva glavna puta za apoptozu: intrinzički i ekstrinzički. Intrinzički put se aktivira endogenim molekulima i ovisi o mitohondrijskom oslobađanju citohroma C u citosol, koji zauzvrat aktivira terminalne kaspaze i dovodi do

ćelijske smrti, te se pokreće kao odgovor na ćelijski stres. Ekstrinzički put se aktivira signalima iz receptora smrti kao što je FAS, koji aktivira kaspaze i dovodi do apoptoze. Proces apoptoze može biti pokrenut višestrukim događajima, uključujući citotoksični ćelijski stres, gubitak esencijalnih faktora rasta, negativnih regulatora kao što su faktor nekroze tumora i transformirajući faktor rasta (TGF), te gubitak ili indukciju specifičnih gena kao što je c-myc i p53 [103].

Više gena i proteina regulišu apoptotički odgovor na ćelijski stres i povezani su s rezistencijom na lijekove. Anti-apoptotički protein Bcl-2 je često prekomjerno eksprimiran kod DLBCL ćelija zbog raznih mehanizama, uključujući t(14;18) translokaciju i amplifikaciju ili aktivaciju nuklearnog faktora kB (NFκB) [92]. Ekspresija Bcl-2 utiče na osjetljivost na lijekove, a in vitro, ćelije sa povećanim nivoima Bcl-2 su otporne na apoptozu izazvanu zračenjem i hemioterapijom dovodeći na taj način i do lošijih ishoda kod pacijenata [104]. Prekomjerna ekspresija Bcl-2, ali ne i translokacija, korelira s lošijim ishodom, što sugerira da sam Bcl-2 nije primarni uzrok rezistencije na lijekove, već biomarker za druge mehanizme [92,105].

Bcl-2 biomarker je bitan za konstitutivnu aktivaciju NFκB koji može povećati ekspresiju više anti-apoptotičkih proteina, uključujući Bcl-2. Utvrđeno je da je prekomjerna ekspresija Bcl-2 povezana s t(14;18) translokacijom pronađenom u podtipu GCB DLBCL, koji ima povoljnu prognozu. Takođe, utvrđeno je da je visoka ekspresija Bcl-2 povezana s NFκB u podtipu ABC DLBCL, koji ima lošu prognozu [89,92].

Rezultati kliničkih ispitivanja sugeriraju da loši prognostički efekti visoke ekspresije Bcl-2 mogu biti prevaziđeni primjenom rituksimaba [106,107]. Efikasnost primjene rituksimaba kod pacijenta sa visokom ekspresijom Bcl-2 je prvi put uočen u maloj studiji DA-EPOCH sa i bez rituksimaba. Veća studija od 292 pacijenta iz ključne randomizovane studije koja je ispitala primjenu CHOP naspram R-CHOP protokola kod starijih pacijenata, verificovala je prisutnu visoku ekspresiju Bcl-2 kod 66% pacijenata. Ekspresija Bcl-2 je bila u korelaciji sa ishodom [107] U prosječnom praćenju od dvije godine, primjena R-CHOP protokola je bila povezana sa značajno boljim ukupnim preživljavanjem u poređenju sa primjenom CHOP protokola kod Bcl-2-pozitivnih pacijenata (67% prema 48%), ali ne i kod Bcl-2-negativnih pacijenata.

Primjena rituksimaba dovodi do povoljnih odgovora kod pacijenata sa DLBCL koji eksprimira NFκB. Primarni medijastinalni B krupnoćelijski limfom prekomjerno

ekspimiraju NF κ B, i ukoliko ga liječimo rituksimab+hemioterapija značajno se poboljšava ishod pacijenata [108,109] *In vitro* studije takođe sugerišu da rituksimab može inhibirati NF κ B put u B-ćelijama limfoma i senzibilisu ih na apoptozu izazvanu hemioterapijom [110]

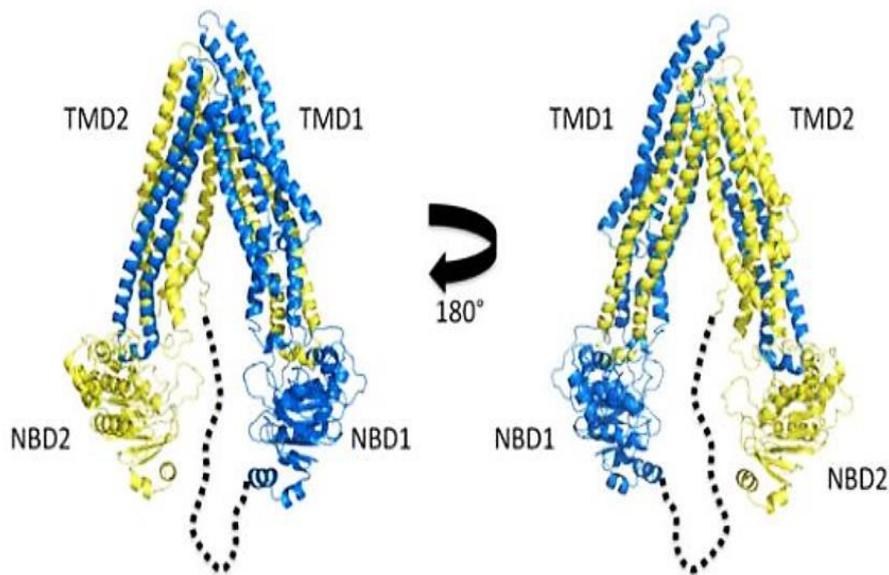
1.9.5. Višestruka rezistencija na lijekova

Jedan od najvećih prepreka uspješne hemioterapije tumora leži u nastanku spontanih mutacija u ćelijama, koje dovode do rezistencije mutiranih ćelija na terapiju lijekovima. Rezistencija na više međusobno različitih komponenti terapijskog protokola se naziva višestruka rezistencija na lijekove (*multidrug resistance*, MDR) [16]. Dejstvo efluksnih ATP-vezujućih kasetnih proteina (*ATP binding cassette transporter-ABC*) samo je jedan od brojnih mehanizama predloženih kako bi se objasnila višestruka rezistencija na lijekove. ABC proteini predstavljaju najveću familiju proteina, a u ljudskom organizmu 48 gena i njihovih polimorfizama kodiraju 7 podfamilija ABC proteina: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE/ABCF i ABCG [111]. Za razvoj rezistencije na hemioterapiju najbitnija su tri proteina: P-glikoprotein (Pgp/ABCB1), *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1/ABCC1) i *bresat cancer resistance protein* (BCRP/ABCG2). Pored influksnog oblika, ABC proteini imaju i efluks-oblike, koji imaju sposobnost da „ispumpaju“ širok spektar supstanci iz ćelija, uzrokujući smanjenu efikasnost međusobno hemijski različitih komponenti koje čine hemioterapijske protokole. Do sada su sprovedena brojna istraživanja kojim se nastojalo utvrditi postojanje mogućnosti blokiranja njihove efluksne sposobnosti, ili postojanja inhibitora ovih proteina.

1.9.5.1. P-glikoprotein

Familiji ABCB (MDR/TAP) pripada i jedan od najvažnijih ABC-proteina, za koga je utvrđeno da učestvuje u razvoju višestruke rezistencije na hemioterapiju kod tumorskih ćelija. Pgp/ABCB1 se odlikuje važnom fiziološkom efluksnom aktivnosti. Intenzitet transkripcije ABCB1 gena je u direktnoj korelaciji sa ispoljavanjem višestruko rezistentnog fenotipa ćelije. Do prekomjerne ekspresije ABCB1 gena može doći usljed uticaja raznih faktora na sam gen ili spontane selekcije onih mutiranih ćelija koje prirodno pokazuju prekomjernu ekspresiju ABCB1 gena. Brojna tkiva pokazuju visok nivo ekspresije ABCB1 gena, kao što su apikalne membrane epitelnih ćelija proksimalnih tubula, tankog crijeva i pluća, a takođe se nalaze na

kupaste pore nalazi se otvor za lateralni ulaz hidrofилnih supstrata u vodenu sredinu pore [113], (Slika 6,7).



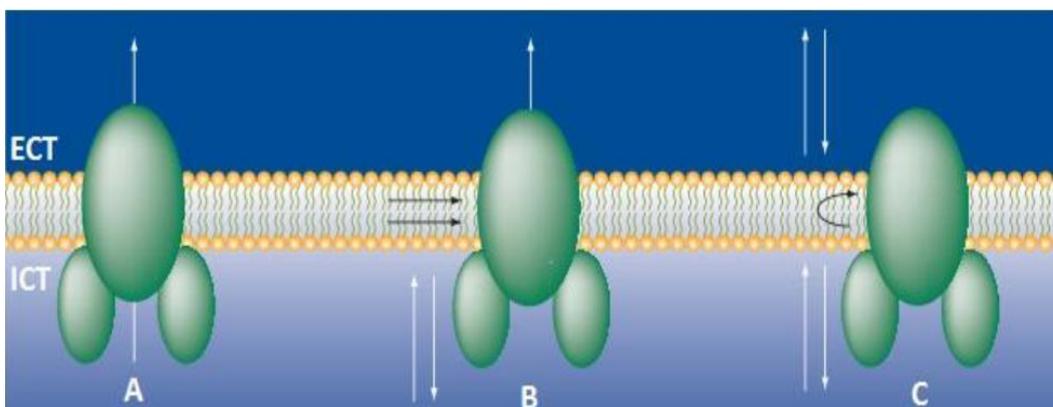
Slika 7. Trodimenzionalna struktura Pgp/ABCB1. TMD1-transmembranski domen , TMD2-transmembranski domen 2, NBD1-nukleotid-vezujući domen 1, NBD2-nukleotid-vezujući domen 2. *Linker*-region obilježen crnom isprekidanom crtom. Homologe polovine Pgp/ABCB1 su obilježene različitim bojama: amino-terminalna polovina plavom, karboksiterminalna polovina žutom [115].

Postoje tri osnovna mehanizma kojim se objašnjava efluktorna aktivnost Pgp/ABCB1: mehanizam klasične pumpe, usisivača i flipaza [116].

Transport supstrata kroz membranu dejstvom ABC proteina ima dva stepena. Prvi stepen je zajednički za sva tri mehanizma i obuhvata vezivanje ATP za nukleotid-vezujuće regione i stvaranje „sendvič dimera nukleotid-vezujućih regiona. Ovim mehanizmom se vrši hidroliza ATP do ADP i fosfata čime se obezbjeđuje energija za aktivni transport molekula supstrata kroz membranu. Drugi stepen procesa transporta se razlikuje za svaki od 3 najčešća mehanizma transporta. Model klasične efluks pumpe se sastoji od vezivanja supstrata za transmembranske segmente 5-6 i 11-12 u pori koju čini par transmembranskih domena Pgp/ABCB1. Nakon vezivanja supstrat prolazi na drugu stranu membrane, odnosno Pgp/ABCB1 aktivno transportuje molekule u vanćelijsku tečnost ili ih sekvestira u unutarćelijskim vezikulama koje se potom stapaju sa ćelijskom membranom i oslobađuju svoj sadržaj u vanćelijske tečnosti [116], (Slika 8).

Mehanizmom usisivača Pgp/ABCB1 skuplja molekule koje difuzijom dospjevaju u lipidni dvosloj ćelijskih membrana ili membrana organela. Molekule bočnim otvorom dospjevaju unutar pore koju čine TMD1 i TMD2, i kroz poru se izbacuju u vanćelijsku tečnost [116], (Slika 8).

Treći mehanizam je flipazni mehanizam efluksa ksenobiotika. Postojanje ravnoteže između vodene sredine unutarćelijske tečnosti i unutrašnjeg sloja lipidnog dvosloja membrane je uslovljena particionim koeficijentom supstanci-supstrata. Usljed interakcije Pgp/ABCB1 i supstrata iz unutrašnjeg sloja u vanjski sloj membrane, olakšava se difuzija supstrata iz unutrašnjeg sloja u vanjski sloj membrane i difunduje se u vodenu sredinu vanćelijske tečnosti [116], (Slika 8).



Slika 8. Mehanizmi dejstva Pgp/ABCB1. A-mehanizam klasične pumpe, B-mehanizam hidrofobnog usisivača, C-mehanizam flipaze. ECT-ekstracelularna tečnost, ICT-intracelularna tečnost [116].

Istovremena rezistencija na više klasa antikancerskih lijekova, poznata kao plejotropna rezistencija na lijekove, je važan koncept koji nastoji da objasni neuspjeh kombinovane hemioterapije. Glavni mehanizam plejotropne rezistencije na lijekove, povezan s rezistencijom na klase lijekova zasnovane na prirodnim proizvodima, kao što su antraciklini, epipodofilotoksini i *vinca* alkaloidi, rezultat je povećane ekspresije gena za multirezistentnost na lijekove (MDR) [117]. Povećani nivoi MDR-1 RNK i Pgp/ABCB1 pronađeni su i kod neliječenim i liječenih pacijenata sa limfomom, i sugeriraju da rezistencija na više lijekova igra ulogu u razvoju kliničke rezistencije na lijekove kod ovih tumora [117,118].

Multirezistencija na lijekove (MDR) opisuje stečenu unakrsnu rezistenciju na širok spektar strukturno i funkcionalno nepovezanih agenasa. Integrirani membranski kasetni protein Pgp/ABCB1 služi kao ATP-zavisna *efluks* pumpa za aktivno uklanjanje supstrata kroz lipidni dvosloj i za smanjenje intracelularne citotoksične koncentracije lijekova, što dovodi do MDR

[119]. Pgp/ABCB1 je kodiran MDR-1 genom, jednim od najistraženijih MDR gena koji se nalaze na hromozomu 7q21.12, gdje postoje značajni polimorfizmi [120]. Pored Pgp/ABCB1, identifikovani su i drugi transporteri u porodici kasetnih transportera koji se vezuju za ATP i doprinose rezistenciji na lijekove, kao što je MRP1/ABCC1 povezan s višestrukom otpornošću na lijekove [119]. Doksorubicin, vinkristin i prednizon su supstrati za Pgp/ABCB1 i poznato je da indukuju ekspresiju MDR-1 [121]. Pacijenti sa DLBCL koji imaju visoku ekspresiju Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 ili BCRP/ABCG2 pokazali su značajno lošije rezultate [122,123].

Supstrate za Pgp/ABCB1 predstavljaju sljedeći hemioterapeutici: vinca-alkaloidi (vinblastin i vinkristin), antraciklini (doksorubicin i daunorubicin) kao i inhibitori tirozin kinaze (imatinib i gefitinib) [116,124].

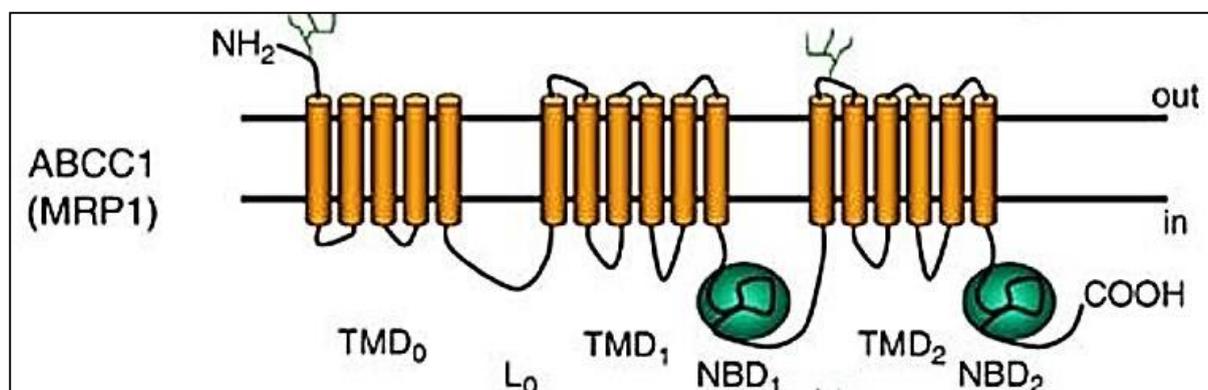
Studijska grupa *Southwest Oncology Group* ispitala je otpornosti na Pgp/ABCB1 dvije studije faze II, u kojim se primjenjivao CVAD protokol (ciklofosamid, vinkristin, doksorubicin i deksametazon), sam ili s verapamilom i kininom kod neliječenih agresivnih limfoma [125]. Rezultati su pokazali da kod ukupno 162 ispitivana pacijenata nije bilo razlike u ukupnom preživljavanju ili preživljavanju bez progresije bolesti, a ishodi su bili slični ranije objavljenim rezultatima liječenja sa CHOP protokolom. Iako ove studije nisu sa sigurnošću dokazale da je Pgp/ABCB1 glavni uzrok rezistencije na lijekove kod limfoma, nije mogla biti isključena i mogućnost da se radilo o neadekvatnu inhibiciju Pgp/ABCB1 [96].

1.9.5.2. MRP1/ABCC1

ABCC podfamilija je poznata i kao podfamilija proteina povezanih s višestrukom rezistencijom na lijekove (*multidrug resistance-associated proteins-MRP*).

Multidrug resistance related protein 1 (MRP1/ABCC1) je jedini član podfamilije ABCC za koji se sa sigurnošću može tvrditi da učestvuje u ekspresiji MDR fenotipa kod pojedinih ćelijskih loza određenih tipova tumora. Mada se i za druge članove ove podfamilije smatra da bi mogli učestvovati u razvoju višestruke rezistencije na hemioterapiju, o njima se za sada premalo zna. Međutim, iako je MRP1/ABCC1 najbolje proučeni član ABCC podfamilije, njegova struktura, a samim tim i mehanizam efluksne aktivnosti, i dalje su nedovoljno razjašnjeni, a ove nejasnoće su posljedica poteškoća u izolovanju i prečišćavanju kristala ovog proteina koji bi poslužili za kristalografsko ispitivanje njegove strukture.

Gen koji kodira MRP1/ABCC1 kod čovjeka je lokalizovan na hromozomu 16p13.1, i otkriveno je u devet različitih izoformi ovog gena. Čini ga oko 6500 parova baza, koje obuhvataju 31 egzon, a krajnji proizvod nakon posttranslacionih izmjena polipeptida jeste protein koji čini 1531 aminokiselinskih ostataka. Za razliku od gena koji kodira Pgp/ABCB1, signalni putevi koji upravljaju transkripcijom MRP-1 gena nisu još dovoljno poznati [116].



Slika 9. Redoslijed pojedinih domena MRP1/ABCC1 od N-terminalnog kraja do C-terminalnog kraja [114].

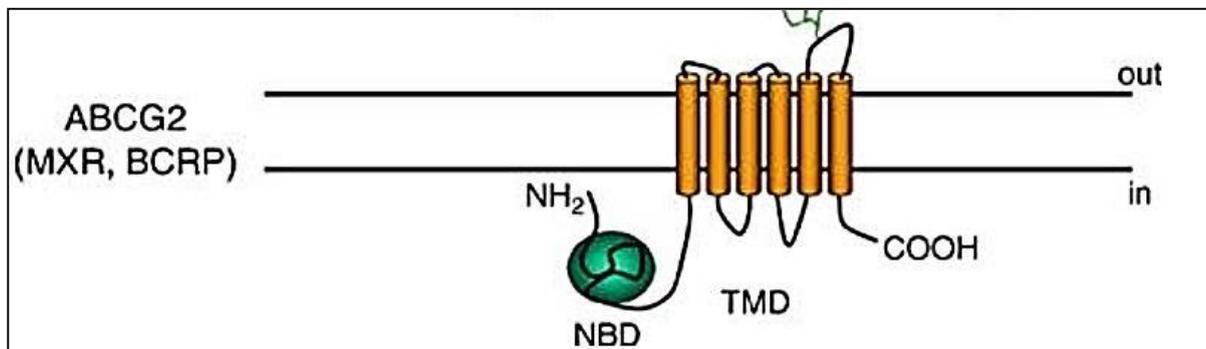
Spektar supstrata MRP1/ABCC1 obuhvata vinca-alkaloide, antracikline, i inhibitore tirozin kinaze, dok za metotreksat predstavljaju efluks pumpu [116].

Prekomjerna ekspresija MRP1/ABCC1 može da dovede do višestruke rezistencije ćelija tumora na doksorubicin, daunorubicin, vinkristin i kolhicin. Određeni citokini, poput IL-6, mogu upravljati intenzitetom transkripcije MRP-1 gena, a njegovu ekspresiju mogu povećati toksični ksenobiotici, ali i faktori koji se oslobađaju nakon oštećenja tkiva. MRP1/ABCC1 štiti osjetljiva tkiva, poput koštane srži, pluća, sabirnih kanala bubrega od ksenobiotika, učestvuje u eliminaciji lijekova iz cerebrospinalne tečnosti, tubula testisa i iz peritoneuma, a neophodan je za oslobađanje LTC₄, koji je bitan za pravilnu migraciju dendritskih ćelija iz perifernih tkiva u parakorteks limfnih čvorova, koji su bogati T-ćelijama.

1.9.5.3. BCRP/ABCG2

Najviše proučavani ABC-protein podfamilije ABCG je *breast cancer resistance protein* (BCRP/ABCG2). Ćelije čini rezistentne na mitoksantron, ali i na terapiju antraciklinima. Nalazi se na membranama određenih subpopulacija hematopoetskih ćelija. Najveća ekspresiju BCRP pokazuju tkiva bogata makrofagima, poput slezene, pluća, timusa i mozga [126,127]. Smatra se da je mehanizam efluksne aktivnosti BCRP -proteina funkcioniše na principu hidrofobnog usisivača. Utvrđeno je da učestvuje u sprečavanju resorpcije

ksenobiotika, pojačanju njihove ekskrecije, kao i zaštiti osjetljivih tkiva od nakupljanja toksina i oštećenja.



Slika 10. Redoslijed pojedinih domena BCRP/ABCG1 od N-terminalnog kraja do C-terminalnog kraja [114].

ABCG2 ima sličan spektar kao Pgp/ABCB1 i MRP1/ABCC1. Transportuje podofilotoksine (etopozid i tenipozid), mitoksantron, inhibitore tirozin kinaze (imatinib, gefitinib, nilotinib, erlotinib i kanertinib) [104], a mutirani oblik R482G transportuje i antracikline (daunorubicin i doksorubicin) [128]. Neka tkiva pokazuju veću ekspresiju Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 ili BCRP/ABCG2, te ukoliko dođe do maligne transformacije ćelije, ona će biti primarno rezistentna na primjenu antitumorskih lijekova. Druga tkiva mogu imati niži stepen rezistencije, međutim, ukoliko se hemioterapijom unište senzitivne ćelije tumora, a opstanu rezistentne diferencirane ćelije tumora ili tumorske matične ćelije, može doći rekolinizacije tumora rezistentnim ćelijama. Greaves i saradnici su istraživali značaj ekspresije 5 ABC proteina kod klasičnog Hočkin limfoma, i utvrdili značajan nivo ekspresije MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 kod klasičnog Hočkin limfoma [41]. Detekcija MRP1/ABCC1 ekspresije je u ovom istraživanju bila značajno povezana sa povećanim rizikom za progresiju bolesti, rezistenciju na primjenjenu terapiju ili smrt kod klasičnog Hočkin limfoma. Slične rezultate su tokom istraživanja dobili i Steidl i saradnici [46], zbog čega je kao zaključak ovog istraživanja navedeno da se ekspresija MRP1/ABCC1 može uspješno koristiti kao indikator lošeg odgovora na terapiju kod klasičnog Hočkin limfoma, koji su liječeni standardnim hemioterapijskim protokolima [45]. Značaj ekspresije ABC membranskih proteina u DLBCL, u prognozi bolesti i terapijskom ishodu su nedostatne.

1.9.5.4. Bcl-2 protein

Proteini familije *B-cell leukemia/lymphoma 2* (Bcl-2) su najvažniji intracelularni regulatori procesa apoptoze. Prvi otkriveni član ove familije je bio protein Bcl-2. Otkriven je 1984.godine tokom ispitivanja B akutne leukemije sa hromozomskom translokacijom t(14;18). Gen za Bcl-2 protein je lokalizovan na dugom kraku hromozoma 18(q21.3), a prisustvo translokacije t(14;18) dovodi do premještanja gena BCL2 u blizinu lokusa teškog lanca imunoglobulina uzrokujući visok nivo Bcl-2 ekspresije [129].

Bcl-2 je intracelularni protein molekularne težine 26 kDa, lokalizovan u membranama mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i spoljašnjoj membrani nukleusa [130,131].

Bcl-2 protein je antiapoptotski protein, a u ovu grupu spadaju i sljedeći proteini: Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 i Bfl-1/A1. Antiapoptotski proteini su vezani za spoljašnju membranu mitohondrija i imaju ulogu očuvanja njenog integriteta [131].

S druge strane, zavisno od strukture BH domena (engl. Bcl-2 homology domains) osim grupe antiapoptotskih proteina BCL-2 familiji pripadaju još 2 grupe proteina i to proapoptotski proteini (BH1, BH2, BH3) i grupa „BH-3-only“ ili „straža“ (Bid, Bad, PUMA i NOXA). Proapoptotski proteini se nalaze u spoljnoj membrani mitohondrija i zahtjevaju aktiviranje putem „BH-3-only“ proteina. Proteini „BH-3-only“ su u fiziološkim uslovima neaktivni i imaju ulogu aktiviranja proapoptotskih proteina BCL-2 familije [131].

Nakon što prime signal smrti, nastupa konformacijska promjena proapoptotskih članova familije Bcl-2. Ovakva konformacijska promjena omogućava da se proapoptotski proteini integrišu u membranu mitohondrija. Različite članove familije Bcl-2 odlikuje i različit mehanizam aktiviranja. Aktiviranje proteina Bax podrazumjeva unutarćelijski transport i dimerizaciju. Pod uticajem signala smrti protein Bax, koji se nalazi u formi monomera u citoplazmi ili labavo vezan za membrane, prelazi u mitohondrije i postaje integralni membranski protein, i mijenja izloženost svog integralnog N-terminalnog domena. Prisustvo antiapoptotskog molekula može da inhibira aktivaciju proteina Bax. U prisustvu faktora preživljavanja protein Bcl-2 se fosforiliše *in vivo* i ovakva modifikacija utiče na njegovu antiapoptotsku aktivnost [129,131].

Centralnu regulaciju apoptotskog puta preko mitohondrija vrše proteini Bcl-2 familije. Ovi proteini mogu suprimirati ili promovisati promjene u permeabilnosti membrane mitohondrija i dovesti do oslobađanja citohroma C i drugih apoptotskih proteina. U fiziološkim

uslovima spoljašnja membrana mitohondrija je barijera koja sprečava oslobađanje apoptotskih proteina. Permeabilizacija spoljašnje mitohondrijalne membrane može dovesti do smrti ćelije na dva načina. Prvi način je oslobađanje citohroma C u citoplazmu i posljedično aktiviranje kaspaza 3 i 7, koje ulaze u međumembranski prostor mitohondrija i narušavaju aktivnost respiratornog lanca. Narušena funkcija respiratornog lanca dovodi do gubitka sinteze ATP-a, nastanka reaktivnih vrsta kiseonika, što za posljedicu ima permeabilizaciju mebrane mitohondrija. Drugi način pojave smrti ćelije je permeabilizacija spoljašnje membrane mitohondrija bez učešća kaspaze. Ukoliko se naruši integritet spoljašnje membrane, proces ćelijskog disanja će se nastaviti jer u citoplazmi postoji dovoljna količina citohroma C. Nakon određenog vremena, citohrom C iz citoplazme podliježe degradaciji u proteozomima, smanjene aktivnosti enzima respiratornog lanca i pojave stanja energetske iscrpljenosti ćelije [131].

Povećana ekspresija Bcl 2 se smatra vrlo pouzdanim markerom hemoterapijske rezistencije jer njegova povećana ekspresija štiti ćelije od procesa programirane ćelijske smrti [129,130, 132,133].

1.9.5.5 Survivin

Survivin ili BIRC5 (*Baculo viral Inhibitor Apoptosis Protein Repeat-Containing 5*), je intracelularni molekul koji pripada familiji inhibitora apoptoze, inhibiše kaspazu i blokiraju ćelijsku smrt. Utvrđeno je da je survivin uključen u mnogobrojne signalne puteve u tumorskim ćelijama, i njegova značajna ekspresija kod mnogobrojnih tumora je povezana sa lošijim ishodom. Osim uticaja na apoptozu, survivin je uključen i u diobu ćelija. Ekspresija survivina je regulisana proteinom p53 i transduktorom signala i aktivatora transkripcije (STAT 3), dok je stabilnost survivina ovisna o ciklin zavisna kinaza 1 i protein toplotnog šoka 90 [134].

Survivin se sastoji od 142 aminokiselinska ostatka i najmanji je IAP (protein inhibitor apoptoze), koji ima samo jedan BIR domen (Baculoviral IAP Repeat-containing proteini). Tokom fetalnog razvoja postoji ekspresija survivina, ali se ona ne može detektovati u diferenciranim tkivima. Ekspresija survivina u ćelijama tkiva odraslih se smatra patološkim, jer je rijetko ekspresiran u ćelijama zdravih tkiva. Povećana ekspresija survivina je uočena u ćelijama solidnih karcinoma: pluća, debelog crijeva, dojke, prostate, mokraćnog mjehura, ždrijela, maternice, jetre, bubrega, gušterače, štitne žlijezde i nuroblastomu, a ekspresija survivina je relevantna za prognozu ili terapijski odgovor ovih karcinoma [131,134].

Nedavno objavljena istraživanja su pokazala da se polimorfizam gena za survivin može koristiti kao važan način u određivanju prognoze bolesti i terapijskog ishoda [135,136]. Razlika u ekspresiji survivina u ćelijama tumora u poređenju sa normalnim tkivima, danas ga čini veoma bitnim „target“ ili ciljanim mjestom djelovanja za različite antitumorske lijekove [135]. Povećana ekspresija survivina se dovodi u korelaciju i djelimično objašnjava mehanizam rezistencije prema hemoterapiji i to različitim mehanizmima kao što su disregulacija apoptoze, stečena izmjena osjetljivosti na antitumorske lijekove i stimulacija preživljavanja tumorskih ćelija. Disregulacije apoptoze survivinom se objašnjava njegovim direktnim vezivanjem i inhibicijom protezne aktivnosti kaspaza 3 i 7. On takođe sprečava ćelijsku smrt indukovanu TRAIL-om (ligand koji indukuje apoptozu povezanu sa tumor nekroza faktorom [TNF] ili Bax-om (Bcl-2 asocirajući protein x) [131].

Posljednji rezultati su pokazali da je upravo intenzivna ekspresija survivina u korelaciji sa lošim odgovorom na primjenjenu terapiju kod limfoma [136]. Rezistencija na apoptozu je jedan od važnih mehanizama kojim tumorske ćelije izbjegavaju identifikaciju od strane imunoloških ćelija, što dodatno omogućava preživljavanje maligne ćelije izbjegavanjem imunološke kontrole. Survivin u određenim uslovima može inhibirati apoptozu i bez uticaja na kaspaze te su savremena istraživanja usmjerena na razvoj strategije u kojoj će se survivin koristiti kao ciljna terapija za maligne ćelije [131].

1. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

U istraživanju su postavljene sljedeće hipoteze:

1. Nulta hipoteza

Povećana ekspresija Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2-ATP- kasetnih proteina, survivina i Bcl-2 nema prognostički značaj u utvrđivanju višestruke rezistencije na primjenu hemioterapije (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin i prednison +/- rituksimab) kod pacijenata sa DLBCL.

2. Radna hipoteza

Povećana ekspresija membranskih Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2-ATP- kasetnih proteina, survivina i Bcl-2, i njihove korelacije su potencijalni biomarkeri tumorske rezistencije na primjenjenu hemoterapiju i mogu objasniti molekularni mehanizam nastanka hemorezistencije.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj rada je ispitati značaj potencijalnih biomarkera na rezistenciju na hemioterapiju kod pacijenata sa difuznim B krupnoćelijskim limfomom.

Radi ostvarenja cilja ispitivanja postavljeni su sledeći zadaci istraživanja:

1. Ispitati intenzitet ekspresije membranskih proteina-(ATP- kasetnih proteina, *efflux* pumpe) potencijalno odgovornih za rezistenciju prema hemioterapiji i to: Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2- u difuznom B krupnoćelijskom non-Hodgkin limfomu (*diffuse large B cell lymphoma-DLBCL*) kod relaps/rezistentne bolesti u odnosu na inicijalni nivo ekspresije, i bolesti bez relapsa.

2. Ispitati korelaciju ekspresije Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 proteina i intracelularnih antiapoptotskih proteina survivina i Bcl-2 i objasniti molekularni mehanizam rezistencije na hemioterapiju kod relaps/rezistentnog DLBCL u odnosu na inicijalni nivo ekspresije i bolesti bez relapsa.

3. Utvrditi značaj ekspresije potencijalnih markera rezistencije na hemioterapiju (Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2, survivina, Bcl-2) kod relaps/rezistentne bolesti u odnosu na imnohistohemijsku podjelu DLBCL: limfom porjekla germinativnog centra (*germinal center B cell-GCB*) i limfom aktiviranih B ćelija (*activated B-cell- ABC*).

4. Ispitati korelaciju ekspresije potencijalnih markera rezistencije na hemioterapiju (Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2, survivina i Bcl-2) sa nodalnim i ektranodalnim porijeklom limfoma, stadijumom bolesti, polom, životnom dobi i prognostičkom ocjenom.

4. ISPITANICI I METODOLOGIJA

4.1. Ispitanici

Istraživanje pojave rezistencije na hemioterapijske protokole kod pacijenata sa difuznim B krupnoćelijskim limfomom je provedeno u Univerzitetском kliničkom centru Republike Srpske.

Istraživanjem su obuhvaćeni pacijenti koji su liječeni na Klinici za unutrašnje bolesti, Odjeljenja za hematologiju, Univerzitetскоg kliničkog centra Republike Srpske, u vremenski period od 6 godina (2014 do 2020). Ciljnu grupu su činili pacijenti sa relaps/rezistentnom bolesti i pacijenti koji su tokom istraživanja i dalje bili u kompletnoj remisiji.

4.2. Dizajn ispitivanja

Istraživanje je dizajnirano kao kohortno retrospektivno i prospektivno, u kojem su jednu kohortu svrstani ispitanici sa dijagnostikovanim DLBCL stadijuma I-IV bez relapsa bolesti nakon primjene standardnog hemioterapijskog protokola CHOP sa ili bez rituksimaba, CHOP-like sa ili bez rituksimaba, CVP sa ili bez rituksimaba (n 27), drugu kohortu su činili pacijenti koji su inicijalno bili refrakterni na primjenu standardne imunochemoterapije (n 20), dok su treću grupu činili pacijenti koji su imali relaps bolesti nakon primjene minimalno jednog hemioterapijskog protokola. Unutar grupe pacijenata sa relapsom bolesti, pacijenti su dodatno svrstani u dvije podgrupe, i to podgrupa sa inicijalnom biopsijom limfnog čvora ili tkiva u kome je utvrđena infiltracija DLBCL, odnosno inicijalna biopsija (Relaps biopsija 1) i druga podgrupa sa rebiopsijom limfnog čvora ili tkiva i infiltracijom DLBCL, na osnovu koje je utvrđen relaps bolesti (Relaps biopsija 2).

4.3. Metodologija

Analizom su obuhvaćeni klinički podaci i generalije pacijenata dobijeni iz medicinske dokumentacije (medicinska istorija bolesti, odluke hematološkog konzilijuma, temperaturne liste sa terapijskim protokolima, nalazi patohistološke analize limfnog čvora i drugog limfomskog tkiva) i to:

- Demografski: starost i pol
- Analiza medicinske istorije za svakog pacijenta:
 - metabolički parametri: vrijednosti LDH (povišene/referentan), beta 2 MG (povišen/referentan),
 - klinički stadijum bolesti *Ann Arbor*
 - B simptomi (prisutni/odsutni)
 - opšte stanje pacijenta ocjenjeno prema *The Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) skali,
 - ekстранodalna (prisutna i broj lokalizacija) ili nodalna lokalizacija bolesti
 - revidirani internacionalni prognostički indeks (R-IPI),
 - hemioterapijski protokoli koji su primjenjeni u prvoj liniji terapije,
 - odgovor na prvu liniju imunohemioterapije sa ili bez radioterapije: kompletna remisija, primarno refrakterni i relaps bolesti,
- Analiza patohistoloških rezultata
 - patohistološki nalaz sa imunohistochemijskom analizom biopsije limfnog čvora ili drugog tkiva *de novo* dijagnostikovanih non-Hodgkin limfoma DLBCL,
 - patohistološki nalaz sa imunohistochemijskom analizom rebiopsije limfnog čvora ili drugog tkiva kod relapsa non-Hodgkin limfoma DLBCL
- **Kriterijumi uključenja za sve pacijente su bili:**
 - Svi uključeni pacijenti –potvrđena dijagnoza bolesti, DLBCL *de novo*
 - Stariji od 18 godina
 - Dostupan parafinski uzorak bioptata limfnog čvora ili drugog tkiva zahvaćenog non-Hodgkin DLBCL limfomom, prije početka terapije
 - Medicinska dokumentacija, uključujući patohistološki nalaz sa imunohistochemijskom analizom neophodnom za podjelu limfoma prema Hansovom imunofenotipskom modelu

- Potpisan informisani pristanak pacijenta/zakonskog zastupnika
- **Kriterijumi uključenja za sve pacijente sa relaps/rezistentom bolesti**
- Ispuljeni uslovi za relaps bolesti, i to rani relaps unutar 6 mjeseci od završetka liječenja (ili godinu dana od dijagnostikovanja oboljenja), ili kasni relaps, ukoliko je prošlo više od 6 mjeseci od poslednje primjene hemioterapije; ili primarno rezistentni pacijenti, kod kojih prvom linijom liječenja nije postignuta remisija
- Pristanak na rebiopsiju ili dostupan parafinski uzorak bioptata limfnog čvora ili drugog tkiva zahvaćenog limfomom u relapsu bolesti
- Primjena imunochemoterapije po protokolu R-CHOP ili ekvivalenta
- Medicinska dokumentacija, uključujući patohistološki nalaz sa imunohistochemijskom analizom neophodnom za podjelu limfoma prema Hansovom imunofenotipskom modelu
- Potpisan informisani pristanak pacijenta/zakonskog zastupnika
- **Kriterijumi isključenja/neuključenja su bili:**
- Nedostupnog parafinskog uzorka bioptata prije započinjanja terapije, odnosno kod pacijenata sa relaps/rezistentnom bolesti nedostatak biopsije limfnog čvora ili drugog tkiva limfoma u tom stadijumu
- Pacijenti sa drugim tipovima limfoma i hematoloških maligniteta
- Pacijenti sa nejasnom dijagnozom limfoma ili hematološkog maligniteta
- Nekompletna medicinska dokumentacija uključujući patohistološki nalaz sa imunohistochemijskom analizom neophodnom za podjelu limfoma prema Hansovom imunofenotipskom modelu
- Progorsija bolesti u centralni nervni sistem
- Pacijenti sa relapsom bolesti u terminalnoj fazi koji ne mogu podnijeti rebiopsiju
- Pacijenti koji nisu potpisali informisani pristanak

Svi podaci su uneseni u elektronsku bazu podataka. Na osnovu dobijenih podataka su sastavljene liste ispitivanih pacijenata, koje su unesene u bazu podataka u jednu od dvije grupe

pacijenata, i to grupa bez relapsa bolesti i grupa pacijenata sa refrakternom bolešću ili relapsom, a radi analize postavljenih ciljeva istraživanja. Unutar grupe relaps/refrakтерна bolest dodatno je urađena podjela na grupu pacijenata koji su imali rani/kasni relaps bolesti i grupu koji su primarno bili rezistentni na prvu terapijsku liniju liječenja. Svakom pacijentu je dodjeljena šifra, kako bi se obezbjedila anonimnost i izbjeglo dupliranje podataka. U bazu podataka su uz šifru svakog pacijenta unesene i: godina života u trenutku dijagnostikovanja bolesti (a za pacijente sa relapsom i za relaps bolesti), ECOG status, komorbiditeti, klinički stadijum bolesti, prisustvo/odsustvo B simptoma bolesti, ektranodalne lokalizacije bolesti i njihov broj, prognostički pokazatelj R-IPI, tip terapija prve linije, postignuta remisija bolesti i da li je tokom posmatranog perioda došlo do relapsa bolesti. Za bolesnike sa relapsom bolesti koji su imali rebiopsiju analiza je rađena za sve ove parametre na početku bolesti i u relapsu bolesti. Klinički stadijum bolesti je određen prema *Ann Arbor* klasifikaciji, sa ili bez B simptoma bolesti[31]. Pomoću te klasifikacije limfomi se svrstavaju u stadije od I –IV: prvi stadijum je ukoliko je zahvaćena samo jedna regija limfnih čvorova ili jedan organ koji nije limfatični; drugi stadijum u kome su zahvaćene dvije ili više limfnih regija s iste strane dijafragme ili lokalizovano zahvaćanje jednog nelimfatičnog organa sa ili bez zahvaćenosti limfnih čvorova s iste strane dijafragme; treći stadijum označava zahvaćenost regija limfnih čvorova sa obje strane dijafragme, i četvrti klinički stadijum predstavlja diseminovanu zahvaćenost jednog ili više nelimfatičnih organa sa ili bez zahvaćenosti limfnih čvorova, ili izolovana zahvaćenost nelimfatičnog organa sa zahvaćanjem udaljenih (neregionalnih) limfnih čvorova [31]. Uvidom u odluke hematološkog konzilijuma, dobijeni su podaci o ECOG performans statusu pacijenta [52]. Za sve pacijente je određena prognoza prema broju nepovoljnih prognostičkih faktora (revidirani Internacionalni prognostički indeks, R-IPI), na osnovu kojih će biti svrstani u grupe rizika: nizak (skor 0), srednje visok (skor 1-2) i visok rizik (3-5) [32]. Na osnovu podataka iz medicinske istorije bolesti analizirana je primjenjena hemioterapija, koja podrazumjeva primjenu standardnih protokola sa antraciklinima (CHOP, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon) ili CHOP like(CEOP/IMVP, CHOEP, iCHOP, ESHAP, CNOP, MACOP-B, VACOP-B, and ProMaceCytaBOM) [61] sa ili bez rituksimabo-om, kao i primjena neantraciklinskih protokola (COP, ciklofosamid, vinkristin, prednizolon), ili drugačije kombinacije polihemioterapije. Pacijenti su praćeni do završetka istraživanja 2020.godine, izuzev u slučajevima kada je utvrđeno da je došlo do smrtnog ishoda. Za pacijente kod kojih je utvrđeno da je došlo do relapsa bolesti, po standardnim preporukama je urađena rebiopsiju tkiva ili limfnog čvora. Nakon što su pacijenti potpisali informisani pristanak, rađena je rebiopsija (limfni čvor ili drugi uzorak tkiva zahvaćen limfomom). Nakon

hirurškog odstranjenja limfni čvor i/ili drugi uzorci tkiva je dostavljan na Zavod za patologiju u 10% puferisanom formalinu.

Na svim uzorcima tkiva i limfnih čvorova uzetih tokom rebiopsije analizirana je ekspresija 3 ABC transportera: Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2, i survivina i BCL2, primjenom biohemijškog pristupa (imunohistohemijsko bojenje) i morfološki pristup (elektronska mikroskopija).

4.3.1 Histološka analiza

Tokom istraživanja je za sve navedene pacijente su analizirani limfni čvorovi ili drugo tumorsko tkivo dobijeno inicijalno, u vrijeme dijagnostičkog postupka, prije početka terapije. Za analizu su se koristiti parafinski kalupi limfnih čvorova i drugog tumorskog tkiva koji su se nalazili u arhivi Zavoda za patologiju UKC RS. Pacijenti su bili selektovani na osnovu adekvatne morfologije limfnog čvora i dostupnost histološkog materijala za imunohistohemijsku analizu. Kriterijumi za morfološku analizu limfnog čvora su bili bazirani na preporukama SZO, koja je priznala morfološke potipove DLBCL: anaplastični, centroblastni i imunoblastni, kao i rijetke morfološke varijante DLBCL . Histološke dijagnoze su potvrđene prema kriterijumima SZO klasifikacije limfoidnih neoplazmi iz 2016.godine na histološkim rezovima obojenim hemotoksilin eozin (H&E), *Giemsa* i PAS metodom.

Za analizu su korišteni tkivni uzorci obrađeni na standardan način: fiksirani u 10% puferovanom formalinu, ukalupljeni u parafinske blokove i sječeni na mikrotomu (microTec CUT 4055, SLEE MAINZ). Dobijeni presjeci tkiva, debljine 4-5µm, su najprije sušeni na 60°C, zatim deparafinsisani u ksilolu (dvije izmjene po 5 minuta), rehidrirani u opadajućoj koncentraciji etil alkohola (100%, 96% i 70%, po 5 minuta za svaku izmjenu) i isprani u destilovanoj vodi. Na kraju su histološki presjeci obojeni rutinskom metodom bojenja hemotoksilin-eosin (HE) po protokolu za aparta (ST 4040 Leica M., Leica Microsystems) i analizirani svjetlosnim mikroskopom (Leica DM 2500).

4.3.2 Imunohistohemijska analiza

Za imunohistohemijsku analizuparifinski blokovi su dodatno sječeni na presijek debljine 3-4m, koji su postavljeni na pozitivno naelektrisana Super Frost predmetna stakalca (*Menzel-glaser*) radi stabilnosti u daljem imunohistohemijskom postupku. Nakon sušenja,

deparafinizacije i rehidratacije tkivni presjeci su izloženi toplotnom oporavku antigena. Postupak je izveden u PT modulu (*Thermo Scientific*) zagrijavanjem tkiva u citratnom puferu pH 6.0 (TA-250-PM1X, *Thermo Scientific*), pri temperaturi od 96°C. Kako bi se smanjilo pozadinsko bojenje, aktivnost endogene peroksidaze je blokirana 10 minuta inkubacijom u vodenom rastvoru 3% vodonik peroksida. U cilju sprječavanja nespecifičnog bojenja pozadine i/ili smanjenja nespecifičnog vezivanja endogenih IgG kratko (5-10 minuta) prije aplikacije primarnog antitijela presjeci tkiva su izloženi djelovanju komercijalnog proteinskog bloka (*Abcam*).

Nakon pretretmana i pripreme tkiva, imunohistohemijsko bojenje je sprovedeno ručno, primjenom odgovarajućih monoklonalnih antitijela u optimalnoj koncentraciji (tabela 4.)

Antitijela su isporučena u koncentrovanoj formi. Pomoću sredstava za razrjeđivanje (Ab diluent, *Abcam*) pripremljena su odgovarajuća razrijeđenja prema preporuci proizvođača. Optimalna vrijednost titra, aplicirana je na tkiva limfoma i ostavljena da stoji preko noći na 4°C, u vlažnoj komori. Za detekciju proteina Bcl-2 inkubacija je trajala 60 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije, višak antitijela je ispran TBS puferom (*Tris buffered saline*) pH 7,4.

Tabela 4. Karakteristika primjenjenih antitijela

Broj	Antitijelo	Klon	Razrijeđenje	Proizvođač
1.	Bcl-2	100/D5	1:100	<i>Abcam, ab692</i>
2.	Survivin	EP2880Y	1:250	<i>Abcam, ab76424</i>
3.	P Glycoprotein/ABCB1	EPR10364-57	1:1200	<i>Abcam, ab170904</i>
4.	MRP1/ABCC1	MRPm5	1:100	<i>Abcam, ab24102</i>
5.	BCRP/ABCG2	BXP-21	1:75	<i>Abcam, ab3380</i>

Poslije inkubacije primarnih antitjela, imunoreakcija je izvršena primjenom standardizovane Streptavidin Biotin imunoprekosidaza metode, pomoću sistema za vizualizaciju (*Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit, Abcam ab64264*). Nizom provedenih inkubacija (najprije primarnim antitjelom, zatim biotiniziranim sekundarnim antitjelom, peroksidazom hrena konjugovanom streptovidinom i DAB hromogenom), nastali kompleks razvije smeđu boju u cilju detekcije pozitivne imunološke reakcije.

Da bi i ostale strukture bile vidljive, presjeci tkiva su kontrastirani Majer-ovim hematokilinom (30 sekundi), isprani tekućom vodom, dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (70%, 90% i 100%), bistreni u ksilolu i trajno uklopljeni u kanada balzam. Nakon montiranja obojena tkiva su analizirana na svjetlosnom mikroskopu Leica DM2500 i fotografisana.

Za svako primjenjeno antitjelo, dodatno je korišteno i pozitivno kontrolno tkivo. Za Bcl-2 je korišteno tkivo tonzile, za survivin adenokarcinom kolona, za P-glycoprotein tkivo bubrega, za MRP1 tkivo karcinoma bubrega i za BCRP tkivo karcinoma dojke.

4.3.3 Imunohistohemijska analiza ekspresije

Za procjenu ekspresije analiziranih proteina korišten je semikvantitativni sistem bodovanja baziran na ocjeni intenziteta membranskog i/ili citoplazmatskog i/ili nuklearnog bojenja tumorskih ćelija (A) i procenta obojenih ćelija (B) na 5 odabranih vidnih polja uvećanja 200h (najmanje 300 ćelija).

A: Intenzitet membranskog/citoplazmatskog i/ili nuklearnog bojenja ocjenjen je na sljedeći način:

- 1 (negativno ili slabo bojenje): u slučaju izostanka pozitivnog bojenja ili u slučaju blijedo-žutog bojenja membrane i/ili citoplazme i/ili nukleusa tumorskih ćelija,
- 2 (umjereno bojenje): smeđe obojena membrana i/ili citoplazma i/ili nukleus tumorskih ćelija
- 3 (jako bojenje): tamno smeđe obojena membrana i/ili citoplazma i/ili nukleus tumorskih ćelija kao pokazatelj visoke ekspresije antigena

B: Procenat obojenih ćelija:

- 1 (<50%),
- 2 (50–75%)
- 3 (> 75%).

Množenjem vrijednosti A i B dobijen je indeks bojenja za procjenu ekspresije svakog od analiziranih proteina. Srednja vrijednost indeksa u svim tkivima je korištena kao granična vrijednost za razvrstavanje uzoraka u dvije grupe: u prvoj su uzorci sa visokom ekspresijom (rezultat $\geq 4,5$), a u drugoj sa niskom ekspresijom (rezultat $< 4,5$).

4.4 Statistička metodologija

Svi rezultati su predstavljeni numerički, tabelarno, grafički i na slikama.

U statističkoj obradi podataka korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. Reprezentativne vrijednosti deskriptivne statističke analize numeričkih varijabli su prikazane pomoću medijane i interkvartilnog opsega.

Anova testom je analizaran uticaj jedne ili više kategorijalnih (nezavisnih) varijabli na jednu numeričku kontinuiranu (zavisnu) varijablu. Na ovaj način je upoređena aritmetička sredina više uzoraka, uz određivanje postojanja/nepostojanja značajne razlike između sredina više posmatranih grupa.

Obzirom da primjenom testa homogenosti varijansi (*Test of Homogeneity of Variances*) nije postojala homogenost varijanse te je za *post hoc* test odabrana Tamhane test koji ne pretpostavlja homogenost varijansi.

Pearson-ov koeficijent korelacije je korišten da bi se izračunala relacija dvije kontinuirane varijable. Vrijednost koeficijenta korelacije je izračunat numerički u rasponu -1 do +1, a korelacija je dodatno analizirana i prikazana grafički.

Analiza značajnosti razlika reprezentativnih vrijednosti numeričkih varijabli koje statistički značajno odstupaju od normalne distribucije, kao i kategoričkih varijabli, među različitim grupama ispitanika, sprovedena je *Mann-Whitney U* testom. Analiza značajnosti razlike među kategoričkim nominalnim varijablama je sprovedena uz pomoć χ^2 testa i Fisher-ovog testa tačne vjerovatnoće.

Univarijantnom binarnom logističkom regresionom analizom su ispitivane kauzalno-konsekutivne veze među varijablama od značaja, čime su dobijeni nezavisni prediktori. Varijable koje su pokazale nivo statističke značajnosti jednak ili manji od 0,05 potom su uključene u prediktivni model koji je u drugom stadiju ispitan primjenom multivarijantne Conditional Forward binarne logističke regresione analize.

Nivo statističke značajnosti je definisan vrijednošću jednakom ili manjom od 0,05.

Kreiranje baze podataka i statistička analiza sprovedeni su uz pomoć softverskih paketa SPSS Statistics for Windows v26 (*International Business Machines Corporation, Armonk, NY, U.S.*) i GraphPad Prism for Windows v8 (*GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.*).

5. REZULTATI

5.1 Demografski podaci

U istraživanje je ukupno bilo uključeno 73 pacijenata starijih od 18 godina sa dijagnostikovanim DLBCL non-Hodgkin limfomom, od kojih je 67,1% bilo muškog pola. Medijana godina starosti pacijenata na početku liječenja je iznosila 61 godinu.

Pacijenti su svrstani u tri kohortne grupe. Prvu grupu (n=27) su činili pacijenti sa dijagnostikovanim DLBCL stadijuma I –IV, bez relapsa bolesti (Remisija). Drugu kohortnu grupu (n=20) su činili pacijenti DLBCL stadijuma I –IV sa refraktornom bolesti, a koji su primili minimalno jedan (imuno)hemioterapijski protokol. Treću kohortu (Relaps) su činili pacijenti sa ranim ili kasnim relapsom DLBCL stadijuma I –IV (n=26). Dodatno ova kohorta je bila podjeljena u 2 podgrupe i to grupu sa inicijalnom biopsijom limfnog čvora ili tumorskog tkiva (Relaps B1) (n=13), i grupu sa rebiopsijom limfnog čvora ili tumorskog tkiva na osnovu koje je dijagnostikovao relaps bolesti (Relaps B2) (n=13), a posebno su posmatrane demografske, kliničke i imunohistohemisjke karakteristike unutar ove dvije grupe, (tabela 5A).

Od ukupnog broja pacijenata najveći broj njih (n=26, 35,8%) je bio starosne dobi između 60-69 godina, u grupi 50-59 godina 24,5% (n=18), dok je u starosnoj grupi 70-79 godina bilo 16,9% pacijenata (n=12). Najmanji broj pacijenata je bio u grupi 30-39 godina (7,5%, n=6), grupi 18-29 godina (5,7%, n=4), grupi 40-49 godina (5,7%, n=4), i samo tri pacijenata u grupi 80 i više godina starosti (3,8%).

Utvrđeno je da od ukupnog broja pacijenata u grupi bez relapsa bolesti (n=27) najmlađi bolesnik imao 20 godina, a najstariji 83 godine. Prosječna starost pacijenata ove grupe je bila 60 godina ($\pm 15,87$), (tabela 5A).

Od ukupnog broja pacijenata u grupi sa refraktornom bolešću prosječna starost je bila 63 godine, a raspon godina je bio između 19-77 godina. Prosječna starost u grupi Relaps B1 je bila 59 godina, a u grupi Relaps B2 63 godine, (tabela 5A).

Rezultati su pokazali da je najveći broj pacijenata imao ECOG performans status 1 u momentu dijagnostikovanja bolesti 37,0% (n=27), nešto manji broj pacijenata je imalo ECOG 2 (34,2%, n=25). Značajno malji udio pacijenata je bilo dobrog opšteg stanja u momentu dijagnostikovanja bolesti 11,0% (n=8) ECOG 0, ali i značajno lošijeg opšteg stanja ECOG 3 i 4 (17,8%, n=13), (tabela 5A).

Najveći broj pacijenata u momentu dijagnostikovanja bolesti je bio u uznapredovalim stadijumima bolesti po Ann Arbor klasifikaciji, i to IV klinički stadijum (69,9%, n=51) i III klinički stadijum (19,2%, n=14). Rijetki pacijenti su u momentu dijagnostikovanja oboljenja imali lokalizovanu bolest u I kliničkom stadijumu (5,6%, n=4), ili II stadijumu (5,6%, n=4), (tabela 5A).

Analizirajući pojedine posmatrane grupe pacijenata, utvrđeno je da je najveći broj pacijenata u grupi bez relapsa u momentu dijagnostikovanja DLBCL bilo u četvrtom kliničkom stadijumu (69,0%, n=18), u trećem kliničkom stadijumu je bilo ukupno 17,2% (n=5), a najmanje ih je bilo u prvom (10,3%, n=3) i drugom kliničkom stadijumu (3,4%, n=1), (tabela 5A).

U grupi pacijenata sa refraktornom bolesti, dva pacijenata su bila u drugom kliničkom (7,4%), a 4 pacijenata u trećem kliničkom stadijumu (22,2%). Ukupno 70,4% pacijenata (n=14) iz ove grupe je bilo u četvrtom kliničkom stadijumu bolesti, (tabela 5A).

Istraživanje je pokazalo da je u ukupno posmatrnom broju pacijenata sa DLBCL non-Hodgkin limfomom, više od polovine imalo izražene B simptome bolesti 64,4% (n=47), nasuprot 35,6% (n=26) koji nisu imali jedan ili više simptoma poput povišene tjelesne temperature, noćnog preznojavanja ili gubitka u tjelesnoj težini (klinički stadijum A), (tabela 5A).

Analizirajući pojedine grupe pacijenata utvrđeno je da je B simptome bolesti u grupi bez relapsa bolesti imalo 58,6% (n=15) pacijenata, u grupi pacijenata koji su imali refrakternu bolest 66,7% (n=15), a u grupi sa relapsom bolesti, Relaps B1 (n=7, 53,8%) i Relaps B2 (n=10, 76,9%), (tabela 5A).

Rezultati su pokazali da je od ukupnog broja ispitanika najveći broj pacijenata bio u grupi inicijalno loše prognoze i imao R-IPI skor 3 (28,7%, n=21), R-IPI skor 4 (18,3%, n=13) i R-IPI skor 5 (3,8%, n=3). U grupi dobre prognoze je bilo ukupno 36 pacijenata (47,9%) i to sa R-IPI skorom 2 (n=21) i 18,9% sa R-IPI skorom 1 (n=14). Samo jedan bolesnik je imao „veoma dobru“ prognozu po R-IPI skoru, 0 (1,4%), (tabela 5A).

Rezultati su pokazali da je najveći broj pacijenata u momentu dijagnostikovanja DLBCL imao ekstranodalnu bolest (n=57), a manji broj je imao isključivo nodalnu lokalizaciju bolesti (n=17), (tabela 5B).

U grupi pacijenata koji nisu imali relaps bolesti, ukupno 25,9% (n=7) pacijenata je imalo isključivo nodalnu lokalizaciju bolesti dok je preostalih 74,1% (n=20) imalo ektranodalnu bolest. Analizom grupe pacijenata sa refraktornom bolesti utvrđena je slična distribucija ektranodalno lokalizovane bolesti 80,0% (n=16), nasuprot 20,0% (n=4) koji su imali nodalno lokalizovanu bolest, (slika 5B). Pacijenti iz grupe Relaps B1 su takođe imali veću učestalost ektranodalne lokalizacije bolesti 69,2% (n=9), dok je u grupi Relaps B2 bila 84,6% (n=11), (tabela 5B).

Istraživanje je pokazalo da je najveći broj pacijenata u ukupnoj grupi imalo jednu ektranodalnu lokalizaciju (53,4%, n=39), dok je preostalih 24,7% (n=18) imalo dvije ili više ektranodalnih lokalizacija limfoma, (tabela 5B).

Analizom pojedinih grupa pacijenata je utvrđeno da je u grupi bez relapsa bolesti ukupno 11 pacijenata imalo jednu ektranodalnu lokalizaciju bolesti (55,2%), 8 pacijenata dvije (37,9%), a jedan bolesnik tri ektranodalne lokalizacije bolesti (6,9%). Slična učestalost je utvrđena i grupi pacijenata sa DLBCL koji su imali refraktornu bolest, i to 51,9% sa jednom ektranodalnom lokalizacijom (n=10), 29,6% pacijenata sa dvije ektranodalne lokalizacije (n=6), a jedan bolesnik (7,4%) je imao 5 utvrđenih ektranodalnih lokalizacija DLBCL. U podgrupama Relaps B1 takođe je najučestalija bila jedna ektranodalna lokalizacija (61,5%, n=8), dok je u grupi Relaps B2 učestalost jedne ektranodalne lokalizacije bila najveća 76,9% (n=10). U ove dvije grupe po jedan bolesnik je imao dvije ektranodalne lokalizacije bolesti (7,7%), (tabela 5B).

Rezultati su pokazali da je vrijednost LDH bila povišena iznad referentnog ranga (>250 U/L) kod 63% svih pacijenata sa DLBCL. U grupi pacijenata bez relapsa bolesti ukupno 15 pacijenata (58,6%) je imalo povišene vrijednosti LDH, a u grupi sa refraktornom bolesti 14 pacijenata (66,7%). Povišene vrijednosti LDH sa većom učestalošću su imali i pacijenti iz grupe relapsa, i to Relaps B1 (61,5%, n=8) i Relaps B2 (69,2%, n=9), (tabela 5B).

U ovom istraživanju je analizirana i vrijednost β -2 mikroglobulina kod svih istraživanih grupa pacijenata sa DLBCL. Utvrđeno je da je kod ukupno 41,0% pacijenata (n=30) vrijednost β -2 mikroglobulina bila povišena (>2,5 mg/l). Povišene vrijednosti β -2 mikroglobulina su sa najvećom učestalošću utvrđene u grupi Relaps B2 (53,8%, n=7) i u grupi refraktornih pacijenata 48,1% (n=9), (tabela 5B).

Analizata rezultata je utvrdila da je u ukupnoj grupi pacijenata sa DLBCL non-Hodgkin limfomom 91,8% (n=67) liječeno monoklonskim antitjelom tip I, rituksimabom u kombinaciji sa hemioterapijom, dok je 8,2% (n=6) pacijenata liječeno samo hemioterapijom. Utvrđeno je da je najveći broj pacijenata liječen imunochemioterapijom po protokolu R-CHOP i to 76,6% (n=46), dok je kombinacijom sa etopozidom (R-CHOEP) liječeno 11,7% pacijenata (n=7). Rijetko su primjenjivani protokoli R-DA-EPOCH kod 3,4% (n=2) pacijenata, R-CNVP kod 1,7% (n=1) pacijenata, R-COP kod 1,7% (n=1). Kod samo pet pacijenata nije bio primjenjen rituksimab i ovi pacijenti su primili protokol CHOP (4,1%, n=3) i monoterapiju lijekom endoksanom (1,7%, n=1).

Utvrđeno je da je u grupi bez relapsa bolesti najveći broj pacijenata liječen imunochemioterapijom po protokolu R-CHOP (69,0%, n=19) i R-CHOEP protokolom (18,5%, n=5). Najmanji broj pacijenata, i to po jedan, je liječen R-COP i R-DA-EPOCH protokolom, (tabela 5B). U grupi pacijenata koji su bili refraktorni, najveći broj je liječen sa R-CHOP imunochemioterapijom (70,4%, n=16), dok su ostali protokoli za liječenje DLBCL bili rijetko primjenjivani: R-CHOEP (14,8%, n=2), CHOP (7,4%, n=1) i R-DA-EPOCH (7,4%, n=1), (tabela 5B).

Početno liječenje u grupu Relaps B1 nije se razlikovalo u odnosu na prethodne dvije grupe. I u ovoj grupi najveći broj pacijenata je liječen sa R-CHOP protokolom (76,9%, n=10), dok su samo dva pacijenata liječena CHOP hemioterapijom (15,4%). Liječenje pacijenata grupe Relaps B2 se zasnivalo na primjeni *salvage* protokola, i to R-DHAP za bolesnike koji su kandidati za autologu transplantaciju matičnim ćelijama hematopoeze (38,46%, n=5). Ostali pacijenti iz ove grupe su liječeni: hirurška intervencija, primjena CCEP ili R-MINE protokola, (tabela 5B). Svi pacijenti koji su liječeni sa R-CHOP ili R-CHOEP imunochemioterapijom, protokole su dobijali na 21 dan, osim ukoliko zbog postterapijskih komplikacija isti nije bio odgođen. Nisu utvrđeni pacijenti koji su liječeni u kraćim terapijskim intervalima.

Na osnovu Hansovog algoritma za klasifikaciju DLBCL je utvrđeno da je od ukupnog broja pacijenata 52,4% pripadalo GCB DLBCL podtipu, dok je 47,6% bilo iz ABC DLBCL podgrupe.

Tabela 5A. Demografske karakteristike pacijenata sa DLBCL, ukupno i po grupama

Grupe	UKUPNO (n=73)	Bez relapsa (n=27)	Relaps B1 (n=13)	Relaps B2 (n=13)	Refraktorni (n=20)
Godine					
Mediana	61	60	59	63	63
Rang	19-83	20-83	52-77	54-77	19-77
>60 godina	34 (46,6%)	11 (40,7%)	5 (38,46%)	7 (53,8%)	11 (55%)
Pol					
Muško/žensko	49/24	21/6	9/4	9/4	10/10
Klinički stadijum					
I	4 (5,6%)	3 (10,3%)	1 (7,7%)	0	0
II	4 (5,6%)	1 (3,4%)	1 (7,7%)	0	2 (7,4%)
III	14 (19,2%)	5 (17,2%)	3 (23,1%)	2 (15,4%)	4 (22,2%)
IV	51(69,9%)	18 (69,0%)	8 (61,5%)	11 (84,6%)	14 (70,4%)
ECOG					
0	8 (11,0%)	5 (17,2%)	3 (23,1%)	0	0
1	27 (37,0%)	12 (44,8%)	9 (69,2%)	4 (30,8%)	2 (11,1%)
2	25 (34,2%)	10 (37,9%)	1 (7,7%)	5 (38,5%)	9 (44,4%)
3	11 (15,1%)	0	0	4 (30,8%)	7 (33,3%)
4	2 (2,7%)	0	0	0	2 (11,1%)
B simptomi	47 (64,4%)	15 (58,6%)	7 (53,8%)	10 (76,9%)	15 (66,7%)
R-IPI skor					
0	1 (1,4%)	1 (3,4%)	0	0	0
1-2	35 (47,9%)	14 (51,7%)	10 (76,9%)	10 (76,9%)	1 (5,0%)
>2	37 (50,7%)	12 (44,4%)	3 (23,1%)	3 (23,1%)	19 (95%)

Relaps B1-pacijenti iz grupe sa relapsom bolesti i biopsijom na početku bolesti DLBCL; **Relaps B2**-pacijenti iz grupe sa relapsom bolesti sa rebiopsijom kojom je utvrđen relaps DLBCL; **ECOG**-*The Eastern Cooperative Oncology Group*; **R-IPI skor**- revidirani internacionalni prognostički indeks

Tabela 5B. Demografske karakteristike pacijenata sa DLBCL, ukupno i po grupama

GRUPE	UKUPNO (n=73)	Bez relapsa (n=27)	Relaps B1 (n=13)	Relaps B2 (n=13)	Refraktorni (n=20)
Ekstranodalna lokalizacija					
1	39 (53,4%)	11 (55,2 %)	8 (61,5%)	10 (76,9%)	10 (51,9%)
2	16 (21,9%)	8 (37,9%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	6 (29,6%)
3	1 (1,4%)	1 (6,9 %)	0	0	0
4		0	0	0	0
5	1 (1,4%)	0	0	0	1 (7,4%)
LDH↑	46 (63,0%)	15 (58,6%)	8 (61,5%)	9 (69,2%)	14 (66,7%)
β-2 MG ↑	30 (41,0%)	10 (34,5%)	4 (30,8%)	7 (53,8%)	9 (48,1%)
Terapija					
R-CHOP	46 (76,6%)	19 (69,0%)	10 (76,9%)	1 (7,7%)	16 (70,4%)
R-CHOEP	7 (11,7%)	5 (18,5%)	0	0	2 (14,8%)
R-miniCHOP	1 (1,7%)	1 (3,7%)	0	0	0
R-COP	1 (1,7%)	1 (3,7%)	0	0	0
R-DA-EPOCH	2 (3,4%)	1 (3,7%)	0	0	1 (7,4%)
CHOP	3 (4,1%)	0	2 (15,38%)	0	1 (7,4%)
R-DHAP*	5 (38,5%)	0	0	5 (38,46%)	0
Ostali	8 (10,9%)	0	1 (7,7%)	7 (61,5%)	0
GCB DLBCL/	38 (52,4%)/	16 (59,3%)	7 (53,8%)	7 (53,8%)	8 (40%)
ABC DLBCL	35 (47,6%)	11 (40,7%)	6 (46,1%)	6 (46,1%)	12 (46,1%)

LDH-laktat dehidrogenaza; **β-2 MG**-beta 2 mikroglobulin; **R-CHOP**-rituksimab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon; **R-CHOEP**-rituksimab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, etopozid, prednizolon; **R-miniCHOP**-rituksimab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon, u redukovanim dozama; **R-COP**-rituksimab, ciklofosamid, vinkristin, prednizolon; **R-DA-EPOCH-dose adjusted** rituksimab, etopozid, prednizolon, vinkristin, ciklofosfamid, doksorubicin; **CHOP**-ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon; **R-DHAP***-rituksimab, citarabin, cisplatin, deksametazon, *primjenjen u relapsu; **Ostali**-R-CNVP; R-MINE, CCEP, Endoksan; hirurški tretman; **GCB**- DLBCL porijekla germinalnog centra; **ABC**- DLBCL porijekla aktiviranih B ćelija

Kruskal-Wallis Test je pokazao da postoji statistički značajna razlika u vrijednostima parametara ECOG i R-IPI između grupa istraživanja: bez relapsa, refraktorni i relaps. Ova analiza je pokazala i da se klinički stadijum i broj ekстранodalnih lokalizacija nije statistički značajno ($p>0,05$) razlikovao između grupa istraživanja, (tabela 6).

Tabela 6. *Kruskal-Wallis H* testa poređenja parametara (ECOG, klinički stadijum, broj ekстранodalnih lokalizacija, R-IPI skor) između svih posmatranih grupa

	ECOG	Klinički stadijum	Broj ekстранodalnih lokalizacija	R-IPI
<i>Kruskal-Wallis H</i>	34,820	2,162	6,011	29,888
df	3	3	3	2
p	,000	,540	,111	,000

ECOG-The Eastern Cooperative Oncology Group; **R-IPI skor**- revidirani internacionalni prognostički indeks

U istraživanju su analizirane i vrijednosti parametara (B simptomi, primjena R-CHOP protokola, LDH i β 2-mikroglobulin) u svim studijskim grupama: bez relapsa, refraktorni i relaps pacijenti. *Kruskal-Wallis Test* je pokazao da je postojala statistički značajna ($p<0,05$) razlika u vrijednostima parametara R-CHOP između grupa, dok se parametri B simptomi, LDH i β 2-mikroglobulin nisu statistički značajno ($p>0,05$) razlikovali između studijskih grupa, (tabela 7).

Tabela 7. *Kruskal-Wallis H* testa poređenja parametara (B simptomi, R-CHOP, LDH i β 2-mikroglobulin) između svih posmatranih grupa

	B simptomi	R-CHOP	LDH ↑	β 2- MG↑
<i>Kruskal-Wallis H</i>	1,922	18,452	,612	2,483
df	3	3	3	3
p	,589	,000	,894	,478

U dodatnoj analizi kliničkih karakteristika pacijenata iz grupe Relaps B1 i Relaps B2, analizirani su i poređeni parametri (životna dob, ECOG status, klinički stadijum bolesti i broj ekстранodalnih lokalizacija). Utvrđeno je da je u odnosu na parametar životna dob srednji rang u podgrupi Relaps B1 iznosio 11,92, dok je u podgrupi Relaps B2 bio 15,08. Srednji rang za vrijednost ECOG performans statusa je u grupi Relaps B1 iznosio 8,88, a u grupi Relaps B2 18,12. Analizom parametara koji se odnosi na klinički stadijum je utvrđeno da je srednji rang u grupi Relaps B1 bio 11,85 naspram 15,15 koliko je iznosio u grupi Relaps B2. Srednji rang vrijednosti broja ekстранodalnih lokalizacija bolesti je bio 12,58 u grupi Relaps B1, a 14,42 u grupi Relaps B2.

Na osnovu rezultata *Mann-Whitney U* testa došlo se do zaključka da nije postojala statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između podgrupa Relaps B1 i Relaps B2 u odnosu na životnu dob, klinički stadijum bolesti i broju ekстранodalnih lokalizacija bolesti. Utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između podgrupa Relaps B1 i Relaps B2 u medijalnoj vrijednosti parametra ECOG. Rezultati su pokazali da je 50% pacijenata imalo vrijednost ECOG ispod 8,88, dok je u grupi Relaps B2 50% pacijenata imalo vrijednost ECOG ispod 18,12, (tabela 8).

Tabela 8. *Mann-Whitney U* testa poređenja parametara (životna dob, ECOG, klinički stadijum, broj ekстранodalnih lokalizacija) između grupa Relaps B1 i Relaps B2

	Životna dob	ECOG	Klinički stadijum	Broj ekстранodalnih lokalizacija
<i>Mann-Whitney U</i>	64,000	24,500	63,000	72,500
p	0,291	0,001	0,156	0,448

Utvrđeno je da je bez B simptoma bolesti u grupi Relaps B1 bilo 46,2% ($n=6$), dok je u grupi Relaps B2 bilo 23,1% ($n=3$) pacijenata. Najveći broj pacijenata je imalo B simptome i u grupi Relaps B1 i Relaps B2 (53,8% naspram 76,9%). Na osnovu rezultata *Fisher's Exact Test* ($p=0,411$) zaključeno je da nije postojala ($p > 0,05$) statistički značajna razlika između podgrupa Relaps B1 i Relaps B2 u odnosu na B simptome bolesti.

Istraživanje je pokazalo da je ekстранodalna/nodalna lokalizacija DLBCL u grupi Relaps B1 bila prisutna kod 69,2%/30,8% pacijenata ($n=9/n=4$). Takođe, značaj procenat pacijenata iz grupe Relaps B2 je imao ekстранodalnu lokalizaciju bolesti 84,6% ($n=11$), u odnosu na 15,4% pacijenata kod kojih je bolest isključivo bila lokalizovana u limfnim čvorovima.

Na osnovu rezultata Fisher's Exact Testa ($p=0,645$) zaključeno je da nije postojala ($p > 0,05$) statistički značajna razlika između podgrupa Relaps B1 i Relaps B2 u odnosu na ekстранodalnu bolest.

Takođe, rezultati su pokazali da je 76,9% pacijenata ($n=10$) iz grupe Relaps B1 liječen R-CHOP imunohemioterapijskim protokolom, dok su ostali pacijenti 23,1 ($n=3$) liječeni drugim CHOP-like protokolima sa ili bez anti-CD20 monoklonskog antitijela rituksimaba. U grupi Relaps B2 samo 1 bolesnik je liječen R-CHOP protokolom, dok su ostali pacijenti 92,3% ($n=12$) liječeni nekim od *salvage* hemioterapijskih protokola sa ili bez primjene rituksimaba.

Na osnovu rezultata *Pearson Chi-Square* testa ($\chi^2 = 12,764$; $p=0,000$) utvrđeno je da je postojala ($p < 0,05$) statistički značajna razlika između Relaps B1 i Relaps B2 podgrupa u odnosu na primjenu imunohemioterapije po protokolu R-CHOP.

Najveći broj pacijenata 65,4% (n=17) u grupi Realps je imalo povišene vrijednosti LDH. Dodatno je analizirana vrijednost LDH u obe podgrupe Realps, i utvrđeno, da je 61,5% pacijenata (n=8) u grupi Relaps B1 i 69,2% (n=9) u grupi Relaps B2 imalo povišene vrijednosti LDH.

Na osnovu rezultata Fisher's Exact Testa (p=1,000) je zaključeno da nije postojala statistički značajna razlika između Relaps B1 i Relaps B2 podgrupe u odnosu na vrijednosti LDH.

U ovom istraživanju je analizirana i vrijednost β -2 mikroglobulina i u grupi Relaps B1 i Relaps B2. Utvrđeno je da je β -2 mikroglobulin povišen kod ukupno 30,8% (n=4) pacijenata grupe Realps B1 i kod 53,8% pacijenata (n=7) grupe Relaps B2. Uredne vrijednosti β -2 mikroglobulina je imalo 69,2% (n=9) pacijenata iz grupe Relaps B1 i 46,2% (n=6) iz grupe Relaps B2.

Na osnovu rezultata *Pearson Chi-Square* testa ($\chi^2=1,418$; p=0,234) utvrđeno je da nije postojala statistički značajna razlika između Relaps B1 i Relaps B2 podgrupe u odnosu na β -2 mikroglobulin.

Istraživanje je pokazalo da je 62,3% pacijenata (n=45) pri postavljanju dijagnoze DLBCL imalo komorbiditete od značaja. Ukupno 16 pacijenata iz grupe bez relapsa bolesti i 17 pacijenata u grupi sa relaps/refraktornom bolešću je imalo komorbiditete. Od ukupnog broja pacijenata sa komorbiditetima 48,5% (n=22) je imalo samo jedan komorbidite, 36,4% (n=16) je bilo sa 2 komorbiditeta, a 15,0% (n=7) je bilo sa 3 i više udruženih oboljenja.

Rezultati ispitivane populacije su pokazali da je arterijska hipertenzija bila najučestalija hronična bolest kod pacijenata sa DLBCL (n=26 pacijenata), endokrinološke bolesti (n=10), i komplikacije u vidu dubokih venskih tromboza (n=4), (tabela 9).

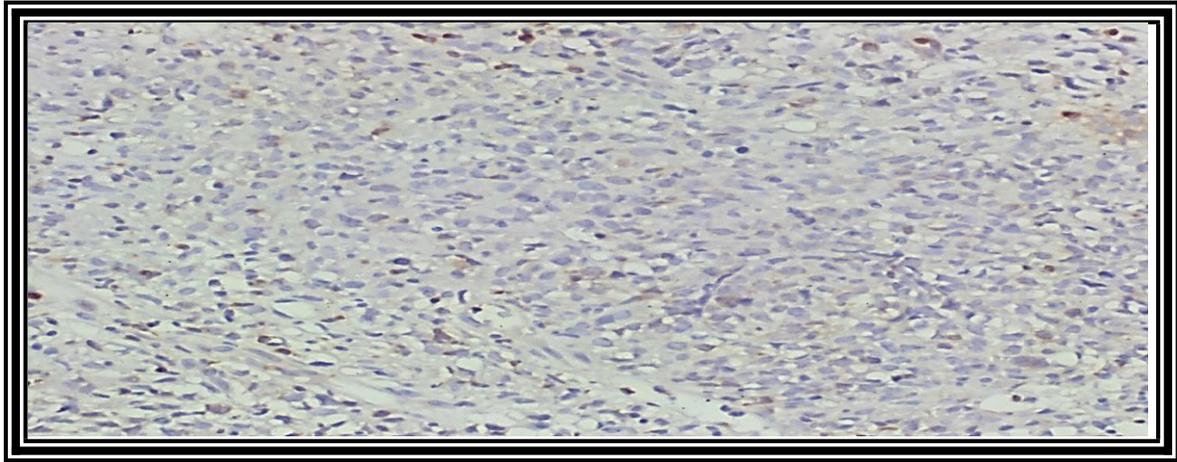
Tabela 9. Distribucija komorbiditeta kod ispitanika

Dijagnoza	Učestalost n (%)
Bronhijalna astma	3 (5,7%)
Arterijska hipertenzija	26 (49,1%)
Tireoiditis	3 (5,7%)
Plućni emfizem	1 (1,9%)
Hipotireoza	1 (1,9%)
Akutni infarkt miokarda	1 (1,9%)
<i>Diabetes mellitus tip 2</i>	7 (13,2%)
Psorijaza	1 (1,9%)
Hronična ishemijska bolest srca	1 (1,9%)
Srčana slabost	1 (1,9%)
Gastritis	1 (1,9%)
Tromboza dubokih vena nogu	3 (5,7%)
Diabetes mellitus tip 1	1 (1,9%)
Angina pectoris	1 (1,9%)
Hronični virusni hepatitis	1 (1,9%)
Atrijalna fibrilacija	2 (3,6%)
Plućna tromboembolija	1 (1,9%)
Parkinsonova bolest	1 (1,9%)

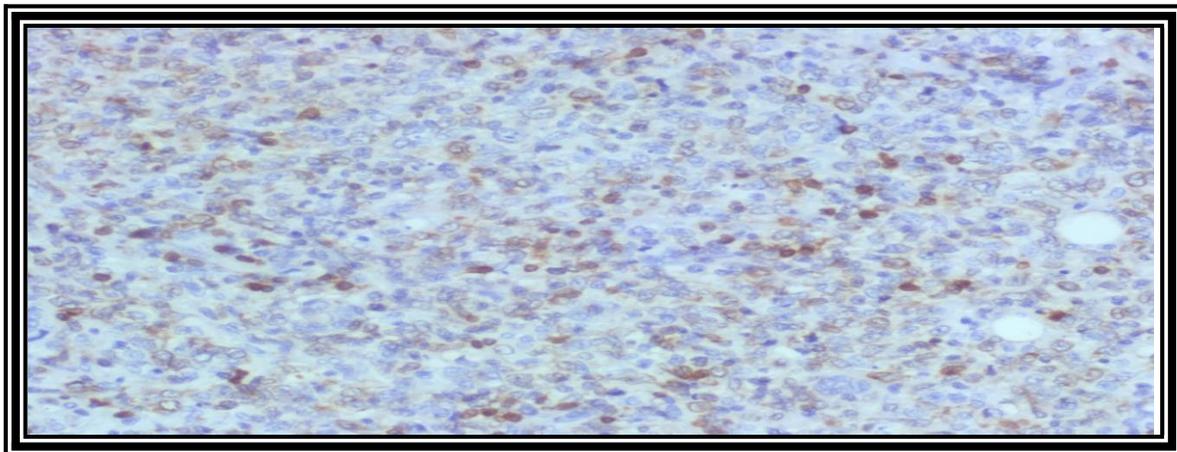
5.2. Imunohistohemijska analiza ekspresije kod pacijenata sa DLBCL

5.2.1. Ekspresija Bcl-2 kod pacijenata sa DLBCL

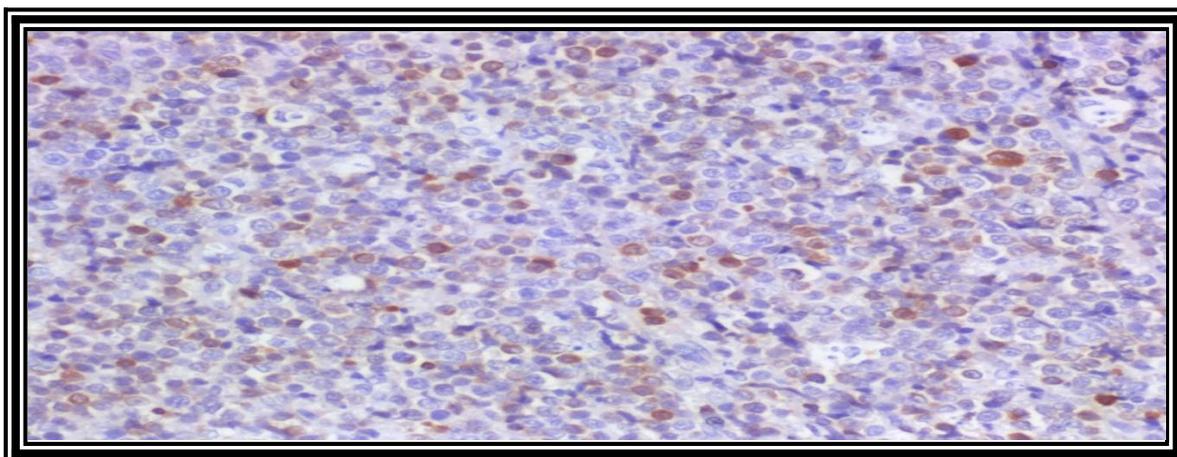
Ekspresija Bcl-2 proteina je detektovana kod 94,5% pacijenata. Rezultati istraživanja su pokazali da je od ukupnog broja pacijenata najveći broj imao nisku ekspresiju Bcl 2, srednja vrijednost indeksa ekspresije 1-4, (64,15%, n=47), a 5,7% nije imao ekspresiju Bcl 2 (n=4). Visoka ekspresija Bcl 2 antiapoptotičkog proteina utvrđena je kod 30,2% pacijenata (n=22), srednje vrijednosti indeksa 6 i 9, (slike 11-18).



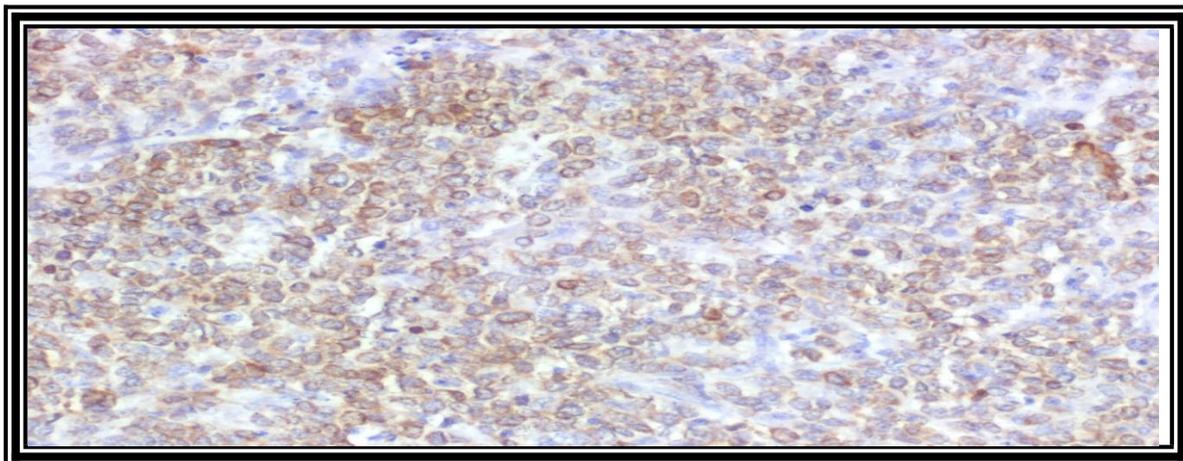
Slika 11. Imunohistohemijška ekspresija Bcl-2 proteina kod DLBCL-negativna ekspresija tumorskih ćelija (0)



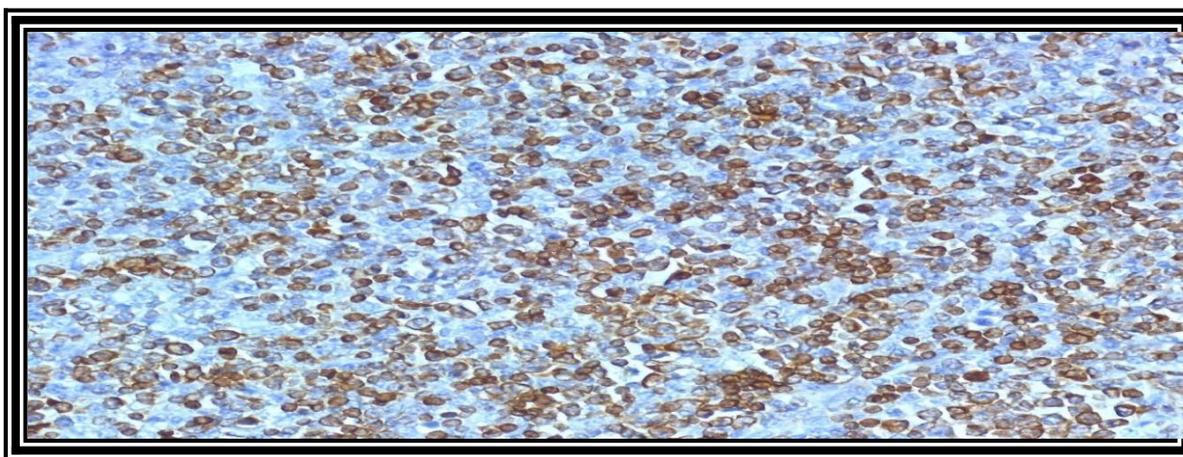
Slika 12. Imunohistohemijška ekspresija Bcl-2 proteina kod DLBCL-niska ekspresija (1)



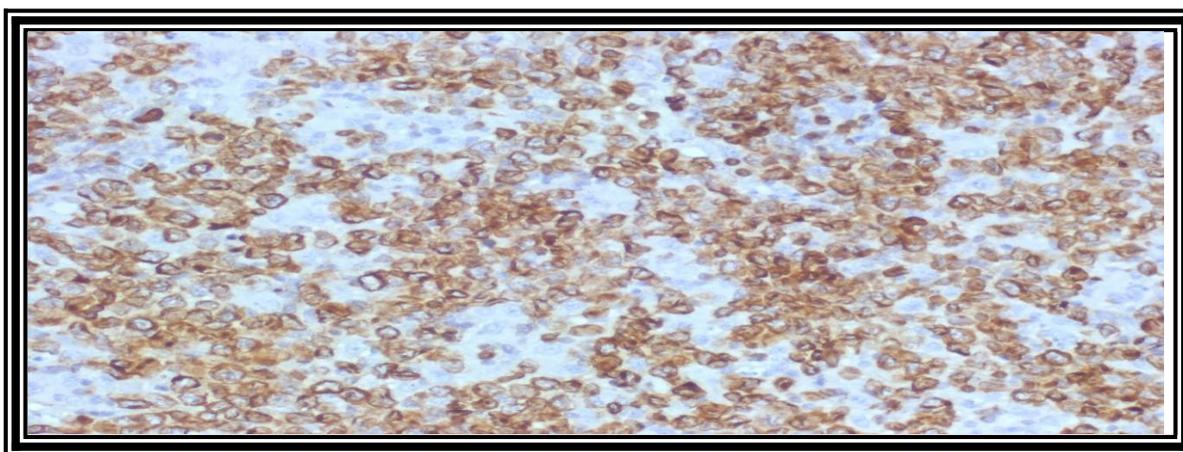
Slika 13. Imunohistohemijška ekspresija Bcl-2 proteina kod DLBCL-niska ekspresija (2)



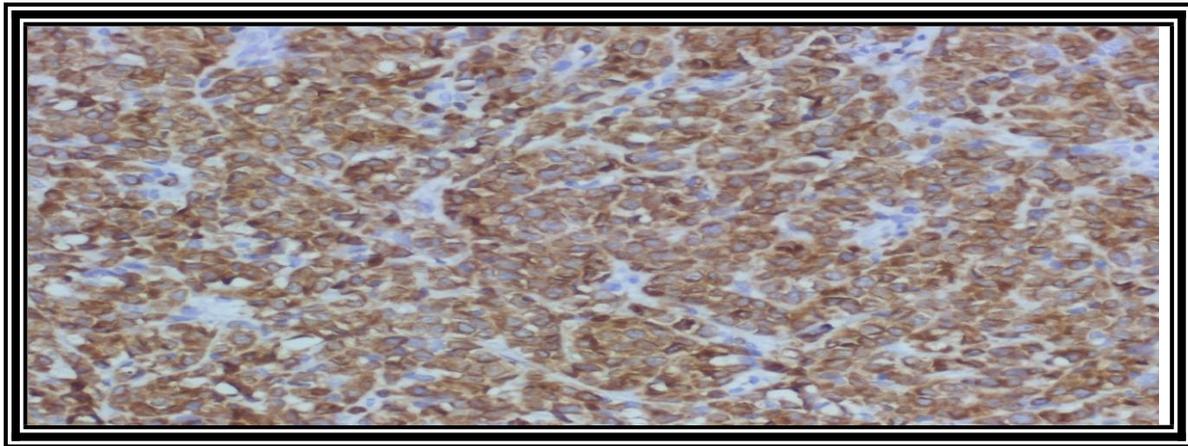
Slika 14. Imunohistohemijška ekspresija Bcl-2 proteina kod DLBCL-niska ekspresija (3)



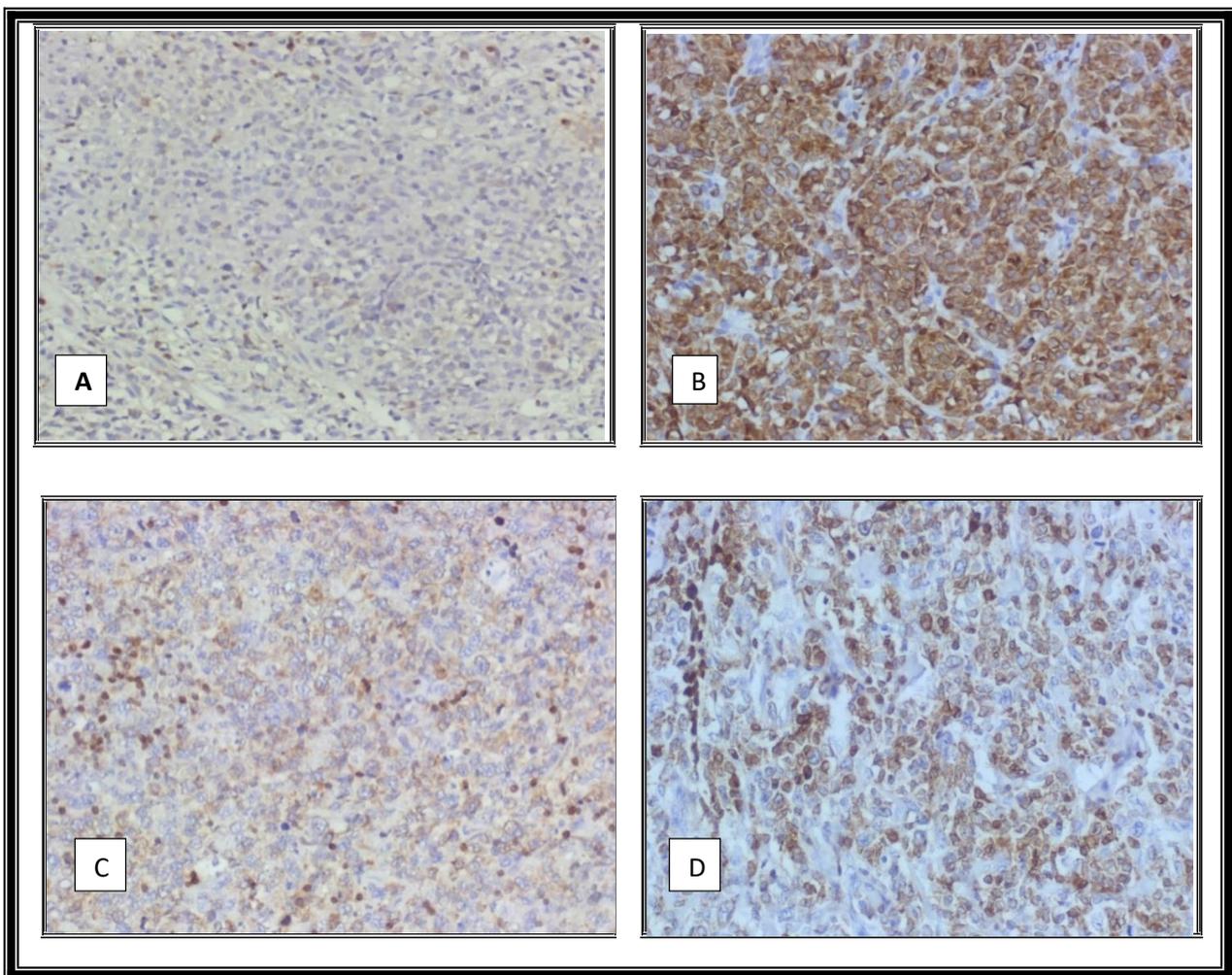
Slika 15. Imunohistohemijška ekspresija Bcl-2 proteina kod DLBCL-niska ekspresija (4)



Slika 16. Imunohistohemijška ekspresija Bcl-2 proteina kod DLBCL-visoka ekspresija (6)



Slika 17. Imunohistohemijaska ekspresija Bcl-2 proteina kod DLBCL-visoka ekspresija (9)



Slika 18. Imunohistohemijaska ekspresija Bcl-2 proteina. A. DLBCL sa negativnom ekspresijom Bcl-2 proteina u grupi Remisija. **B.** Visoka ekspresija Bcl-2 proteina (indeks bojenja 9) u grupi Refraktorni. **C.** Niska ekspresija Bcl-2 proteina kod DLBCL u grupi Relaps B1 (indeks bojenja 2). **D.** Niska ekspresija Bcl-2 kod Relaps B2 DLBCL (indeks bojenja 4). **DLBCL**-difuzni B krupnoćelijski non Hodgkin limfom. **Relaps B1**-grupa pacijenata sa inicijalnom biopsijom, koji su naknadno imali relaps. **Relaps B2**-grupa pacijenata sa rebiopsijom na osnovu koje je utvrđen relaps.

Na osnovu rezultata Anova testa došlo se do zaključka da je postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između svih posmatranih grupa (Remisija, Relaps B1, Relaps B2, Refraktorni) u ekspresiji Bcl-2, (tabela 10).

Tabela 10. ANOVA test ekspresije Bcl-2 u grupama: Remisija, Relaps B1, Relaps B2, Refraktorni

		df	F	p
Bcl-2	Između grupa	3	51,469	0,000

Rezultati testa homogenosti varijansi (*Test of Homogeneity of Variances*) su pokazali da kod markera Bcl-2 nije postojala homogenost varijanse te je za *post hoc* test odabran *Tamhan* test koji ne pretpostavlja homogenost varijansi. *Tamhan* test je pokazao da između grupa postoji statistički značajna razlika u odnosu na Bcl-2. Na osnovu ovog testa je utvrđeno da se marker Bcl-2 statistički značajno ne razlikuje ($p > 0,05$) između grupa Remisija i Relaps B1, te Relaps B2 i Refraktorni DLBCL, dok je između ostalih grupa postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$).

Analizom je utvrđeno da je srednja vrijednost ekspresije Bcl-2 pozitivno bojenih ćelija u grupi pacijenata Remisija bila 35,10% sa standardnom devijacijom ($\pm 20,85$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) razlika između ekspresije Bcl-2 u grupi Remisija i Relaps B2 ($p = 0,000$), kao i u grupi Remisija i Refraktorni DLBCL ($p = 0,000$). Nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u ekspresiji Bcl-2 kod pacijenata u grupi Remisija i Relaps B1 ($p = 0,831$).

Utvrđeno je da je u podgrupi Relaps B1 srednja vrijednost ekspresije Bcl-2 pozitivno bojenih ćelija bila 30,04% ($\pm 10,72$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) razlika u nivou ekspresije Bcl-2 u grupi Relaps B1 i Relaps B2 ($p = 0,000$), kao i između grupa Relaps B1 i Refraktorni DLBCL ($p = 0,000$). Nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između ekspresije Bcl-2 u grupi Relaps B1 i Remisija ($p = 0,831$).

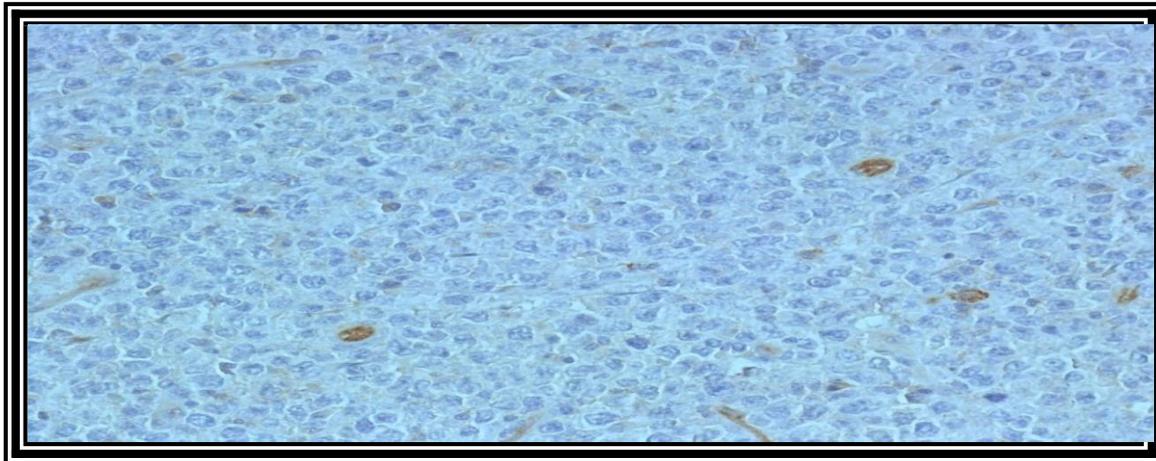
Srednja vrijednost ekspresije Bcl-2 u grupi Relaps B2 iznosio je 72,27% ($\pm 12,26$). Utvrđeno je da nije postojala statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između ekspresije Bcl-2 u grupi Relaps B2 i grupi Refraktorni DLBCL ($p = 0,142$). Postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) razlika u ekspresiji Bcl-2 između grupa Relaps B2 i Remisija ($p = 0,000$), i grupa Relaps B2 i Relaps B1 ($p = 0,000$).

Rezultati su pokazali da je srednja vrijednost ekspresije Bcl-2 pozitivno bojenih ćelija u grupi pacijenata Refraktorni bila 72,27% ($\pm 12,26$). Utvrđeno je postojanje statistički značajne ($p < 0,05$) razlike u nivou ekspresije Bcl-2 između grupa Refraktorni i Remisija ($p = 0,000$), kao i između grupa Refraktorni i Relaps B1 ($p = 0,000$). Nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između nivoa ekspresije Bcl-2 između grupa Refraktorni i Relaps B2 (0,142).

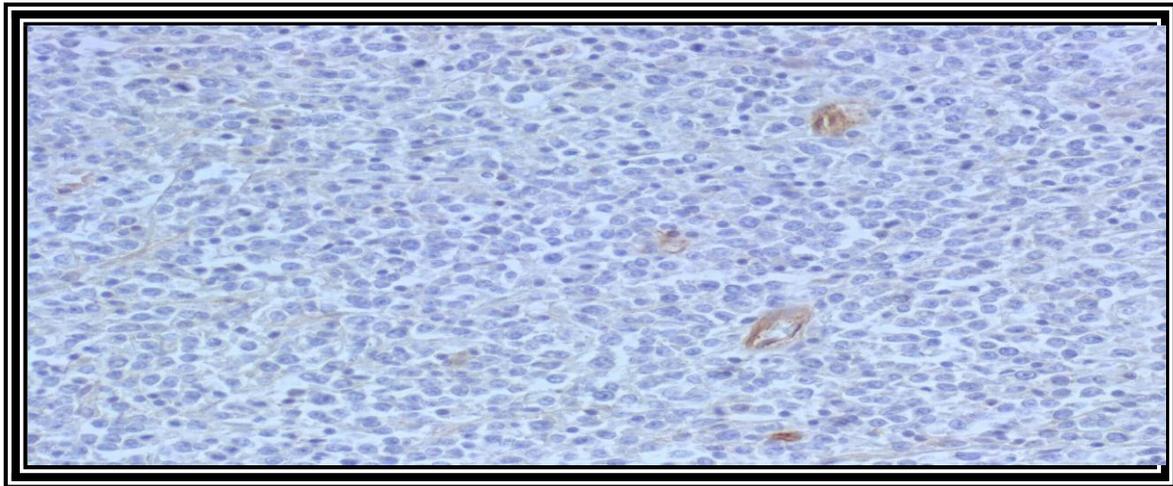
5.2.2. Ekspresija Pgp/ABCB1 kod pacijenata sa DLBCL

U istraživanju je analizirana ekspresija Pgp/ABCB1 u svim grupama pacijenata sa DLBCL.

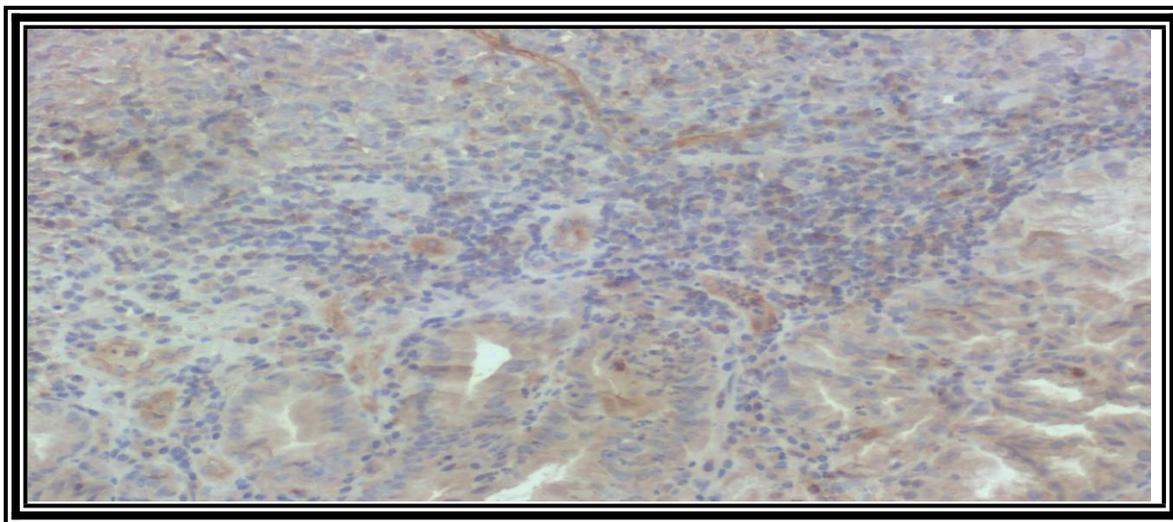
Rezultati su pokazali da je ekspresija Pgp/ABCB1 u ukupno posmatranom broju pacijenata bila niska. Kod ukupno 54 pacijenata nivo ekspresije Pgp/ABCB1 je bio nizak (74,1%), srednja vrijednost indeksa ekspresije 1-4. Kod samo 5 pacijenata je utvrđen visok stepen ekspresije Pgp/ABCB1 (srednja vrijednost indeksa ekspresije 6), a ukupno $n = 14$ pacijenata nije imalo utvrđenu ekspresiju ABCB1 (19,0%), (slika 19-26).



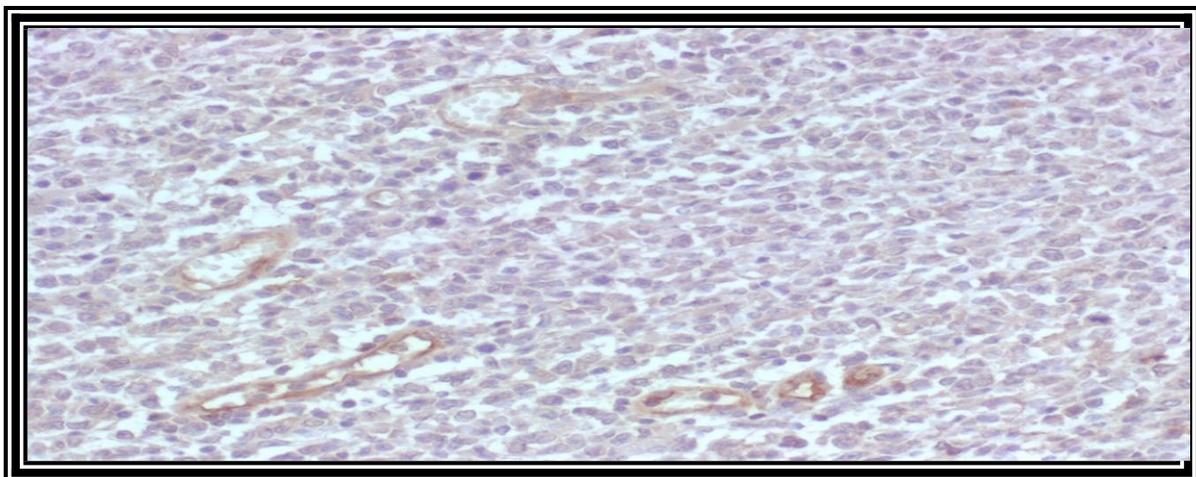
Slika 19. Imunohistohemijska ekspresija Pgp/ABCB1 kod DLBCL-negativna ekspresija (0)



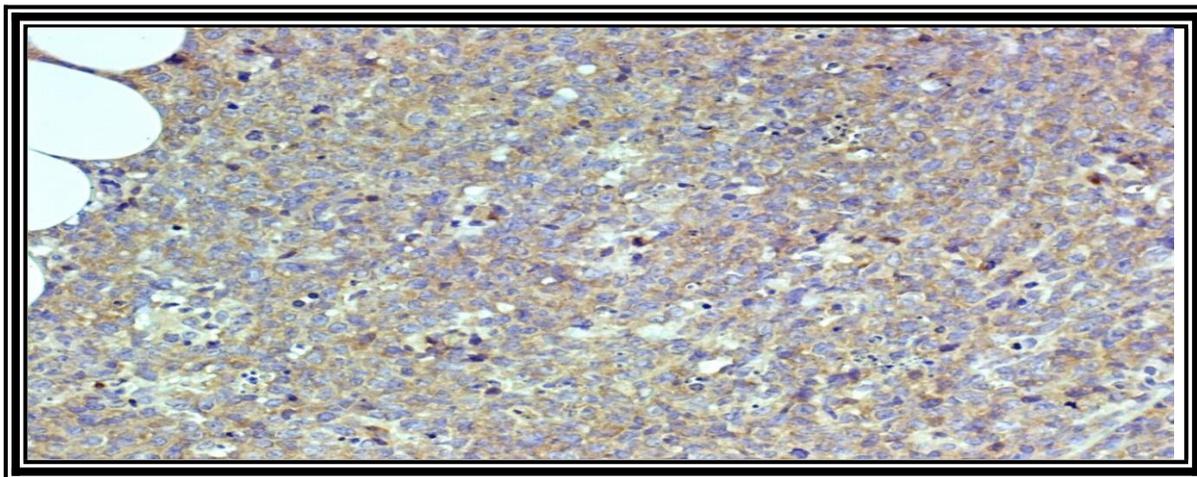
Slika 20. Imunohistohemijska ekspresija Pgp/ABCB1 kod DLBCL-niska ekspresija (1)



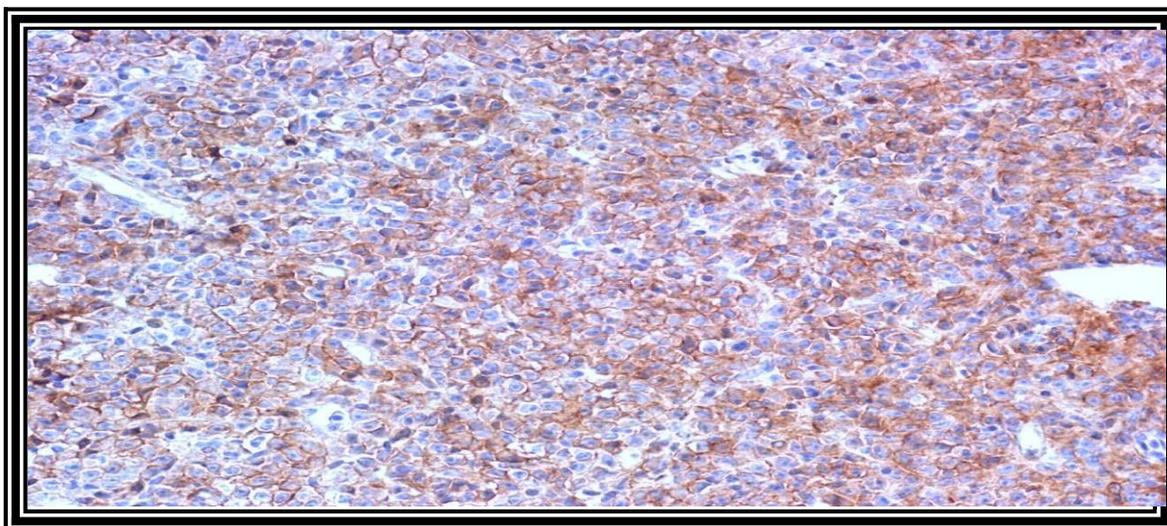
Slika 21. Imunohistohemijska ekspresija Pgp/ABCB1 kod DLBCL-niska ekspresija (2)



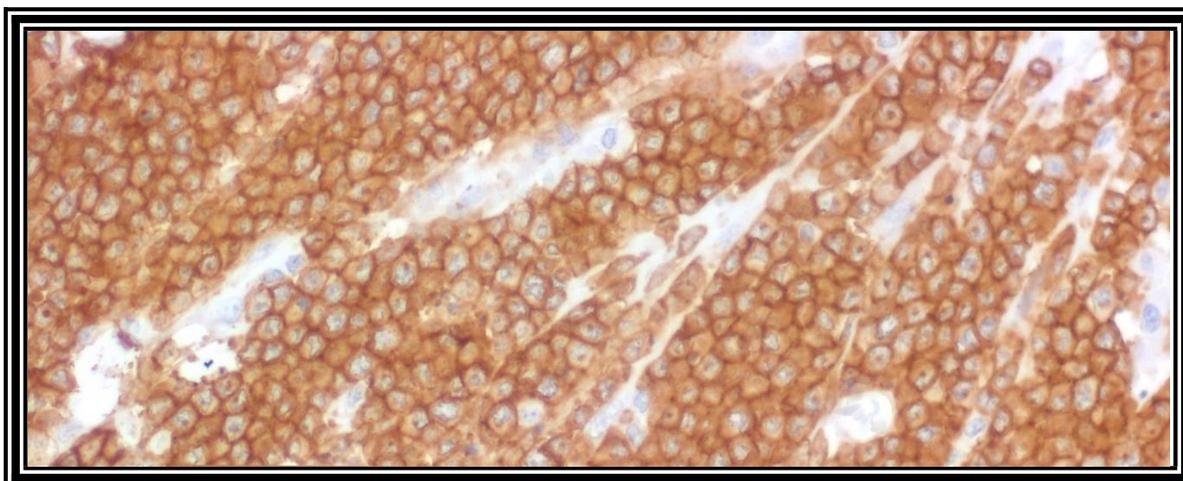
Slika 22. Imunohistohemijska ekspresija Pgp/ABCB1 kod DLBCL-niska ekspresija (3)



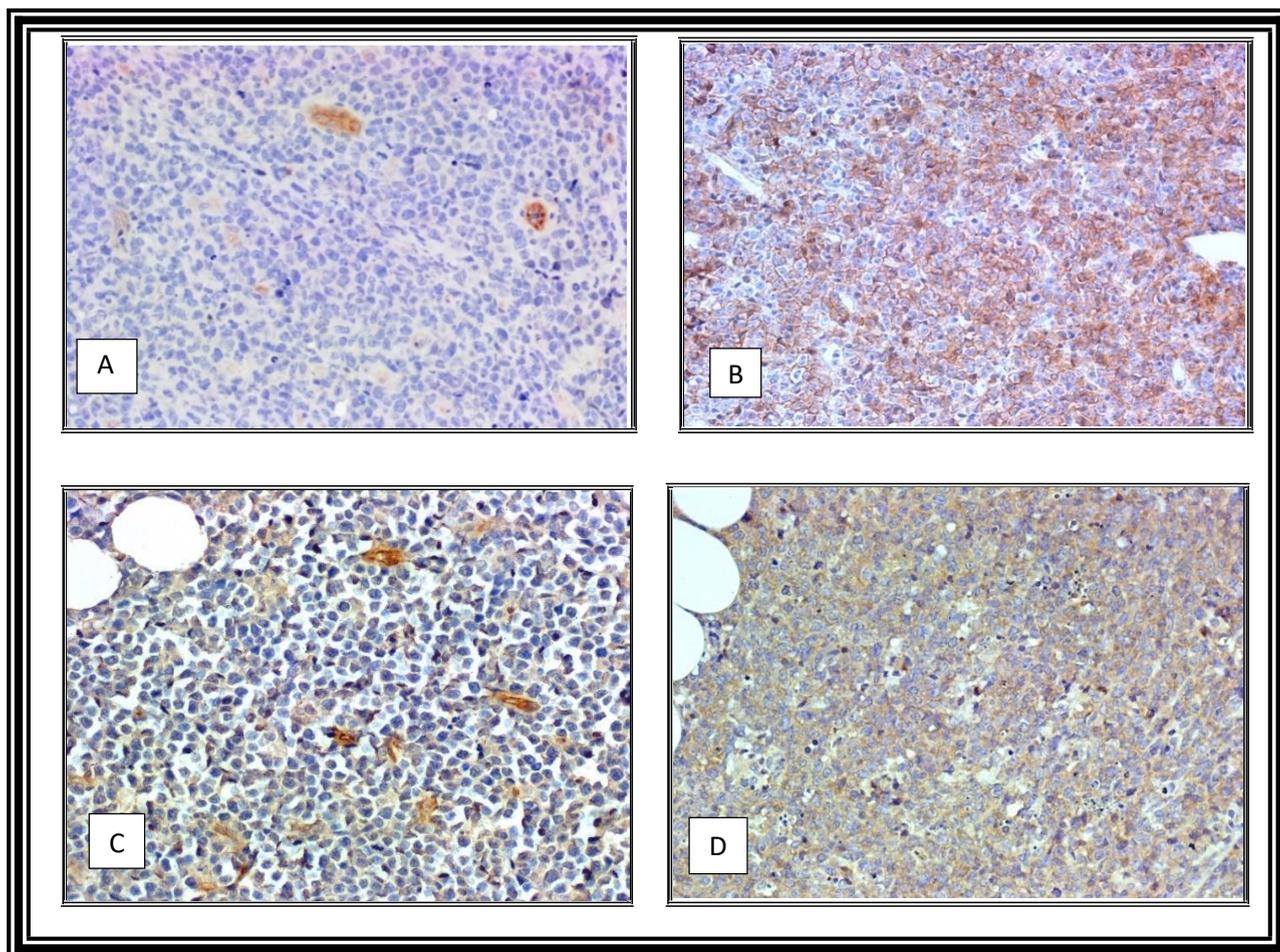
Slika 23. Imunohistohemijska ekspresija Pgp/ABCB1 kod DLBCL-niska ekspresija (4)



Slika 24. Imunohistohemijska ekspresija Pgp/ABCB1 kod DLBCL-visoka ekspresija (6)



Slika 25. Imunohistohemijska ekspresija Pgp/ABCB1 kod DLBCL-visoka ekspresija (9)



Slika 26. Imunohistohemijaska ekspresija Pgp/ABCB1. A. DLBCL sa negativnom ekspresijom PGP/ABCB1 u grupi Remisija. **B.** Visoka ekspresija Pgp/ABCB1 (indeks bojenja 6), kod refraktornog DLBCL. **C.** Niska ekspresija Pgp/ABCB1 kod Relaps B1 DLBCL (indeks bojenja 1). **D.** Niska ekspresija Pgp/ABCB1 kod DLBCL (indeks bojenja 4) kod Relaps B2. **DLBCL**-difuzni B krupnoćelijski non Hodgkin limfom. **Relaps B1**-grupa pacijenata sa inicijalnom biopsijom, koji su naknadno imali relaps. **Relaps B2**-grupa pacijenata sa rebiopsijom na osnovu koje je utvrđen relaps.

Na osnovu rezultata Anova testa došlo se do zaključka da je postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između svih posmatranih grupa (Remisija, Relaps B1, Relaps B2, Refraktorni) u ekspresiji Pgp/ABCB1, (tabela 11).

Tabela 11. ANOVA test ekspresije Pgp/ABCB1 u grupama: Remisija, Relaps B1, Relaps B2, Refraktorni

		df	F	p
Pgp/ABCB1	Između grupa	3	12,827	0,000

Rezultati testa homogenosti varijansi (*Test of Homogeneity of Variances*) su pokazali da kod markera Pgp/ABCB1 nije postojala homogenost varijanse te je za *post hoc* test odabran *Tamhan* test koji ne pretpostavlja homogenost varijansi. *Tamhan* test je pokazao da između grupa postoji statistički značajna razlika u odnosu na Pgp/ABCB1. Na osnovu ovog testa je utvrđeno da se marker Pgp/ABCB1 statistički značajno ne razlikuje ($p>0,05$) između grupa Remisija i Relaps B1, te Relaps B2 i Refraktorni DLBCL, dok je između ostalih grupa postojala statistički značajna razlika ($p<0,05$).

Analizom je utvrđeno da je srednja vrijednost ekspresije Pgp/ABCB1 pozitivno bojanih ćelija u grupi pacijenata Remisija bila 30,76% sa standardnom devijacijom ($\pm 9,37$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p<0,05$) razlika između ekspresije Pgp/ABCB1 u grupi Remisija i Relaps B2 ($p=0,004$), kao i u grupi Remisija i Refraktorni DLBCL ($p=0,000$). Nije utvrđena statistički značajna ($p>0,05$) razlika u ekspresiji Pgp/ABCB1 kod pacijenata u grupi Remisija i Relaps B1 ($p=0,996$).

Utvrđeno je da je u podgrupi Relaps B1 srednja vrijednost ekspresije Pgp/ABCB1 pozitivno bojanih ćelija bila 29,23% ($\pm 11,70$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p<0,05$) razlika u nivou ekspresije Pgp/ABCB1 u grupi Relaps B1 i Relaps B2 ($p=0,003$), kao i između grupa Relaps B1 i Refraktorni DLBCL ($p=0,000$). Nije utvrđena statistički značajna ($p>0,05$) razlika između ekspresije Pgp/ABCB1 u grupi Relaps B1 i Remisija ($p=0,996$).

Srednja vrijednost ekspresije Pgp/ABCB1 u grupi Relaps B2 iznosio je 48,85% ($\pm 23,01$). Utvrđeno je da nije postojala statistički značajna ($p>0,05$) razlika između ekspresije Pgp/ABCB1 u grupi Relaps B2 i grupi Refraktorni DLBCL ($p=0,986$). Postojala je statistički značajna ($p<0,05$) razlika u ekspresiji Pgp/ABCB1 između grupa Relaps B2 i Remisija ($p=0,004$), i grupa Relaps B2 i Relaps B1 ($p=0,003$).

Rezultati su pokazali da je srednja vrijednost ekspresije Pgp/ABCB1 pozitivno bojanih ćelija u grupi pacijenata Refraktorni bila 45,56% ($\pm 10,32$). Utvrđeno je postojanje statistički značajne ($p<0,05$) razlike u nivou ekspresije Pgp/ABCB1 između grupa Refraktorni i Remisija ($p=0,000$), kao i između grupa Refraktorni i Relaps B1 ($p=0,000$). Nije utvrđena statistički značajna ($p>0,05$) razlika između nivoa ekspresije Pgp/ABCB1 između grupa Refraktorni i Relaps B2 ($p=0,986$).

5.2.3. Korelacija ekspresije Bcl-2 i Pgp/ABCB1

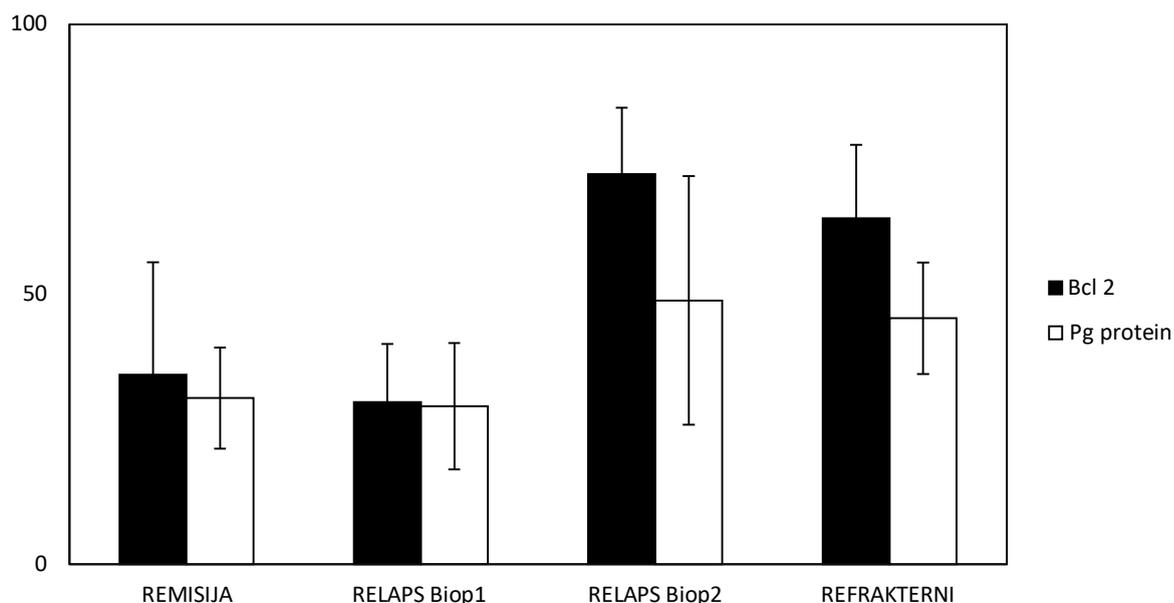
Istraživanjem je utvrđeno a na osnovu rezultata *Pearson*-ove korelacije da je u grupi pacijenata DLBCL Remisija postojala statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između pojave ektranodalne bolesti i Bcl-2 proteina ($r=0,609$; $p=0,000$). Takođe, postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između broja ektranodalnih lokalizacija i Bcl-2 proteina ($r=0,885$; $p=0,000$).

Takođe, na osnovu *Pearson*-ove korelacije je zaključeno da je i u grupi Refraktorni DLBCL postojala statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između pojave ektranodalne bolesti i Bcl-2 proteina ($r=0,550$; $p=0,003$), kao i da je statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija postojala između broja ektranodalnih lokalizacija bolesti i Bcl-2 proteina ($r=0,850$; $p=0,000$).

U grupi pacijenata sa DLBCL Relaps B1 je utvrđeno postojanje statistički značajne ($p < 0,05$) jake pozitivne korelacije između pojave ektranodalne bolesti i Bcl-2 proteina ($r=0,573$; $p=0,041$). Takođe, postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između broja ektranodalnih lokalizacija i Bcl-2 proteina ($r=0,710$; $p=0,007$).

Na osnovu *Pearson*-ove korelacije je zaključeno da u grupi Relaps B2 DLBCL nije postojala statistički značajna ($p > 0,05$) korelacija između pojave ektranodalne bolesti i Bcl-2 proteina ($r=0,488$; $p=0,091$), ali je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija postojala između broja ektranodalnih lokalizacija bolesti i Bcl-2 proteina ($r=0,660$; $p=0,014$).

U svim posmatranim grupama istraživanja (Remisija, Relaps B1, Relaps B2, Refraktorni) maksimalnu ekspresiju Bcl-2 je pratio i Pgp/ABCB1, (slika 27).



Slika 27. Ekspresija Bcl-2 i Pgp/ABCB1 u svim studijskim grupama: Remisija, Refraktorni, Relaps B1, i Relaps B2

U grupi Remisija Bcl-2 i Pgp/ABCB1 su imali slabu pozitivnu korelaciju ($r=0,271$, $p=0,155$) bez statističke značajnosti ($p>0,05$).

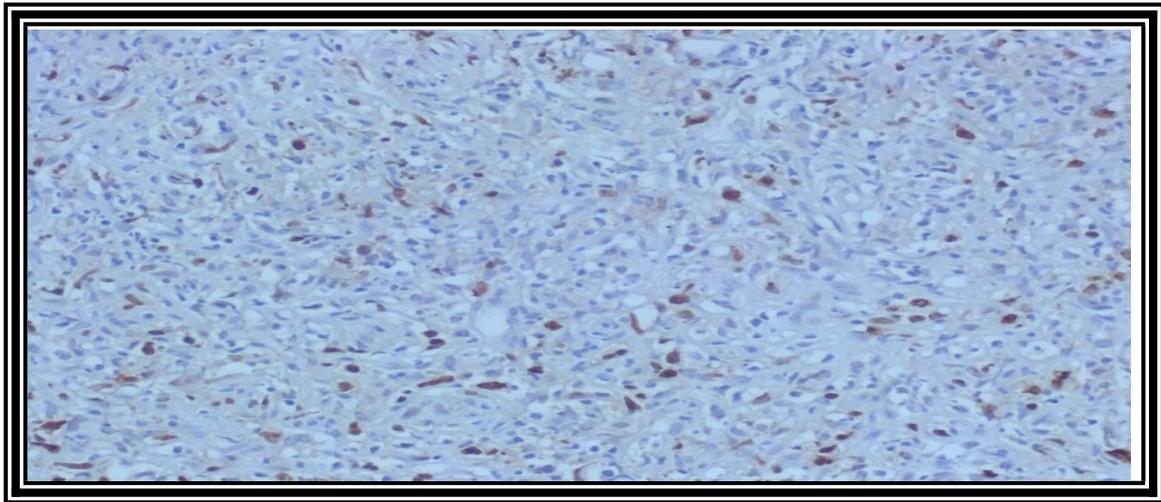
U grupi Relaps B1 postojala je statistički značajna ($p<0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između Bcl-2 i Pgp/ABCB1 ($r=0,461$, $p=0,018$).

Rezultati su pokazali da je u grupi Relaps B2 postojala srednje jaka pozitivna korelacija između Bcl-2 i Pgp/ABCB1 ($r=0,349$, $p=0,081$), koja nije bila statistički značajna ($p>0,05$).

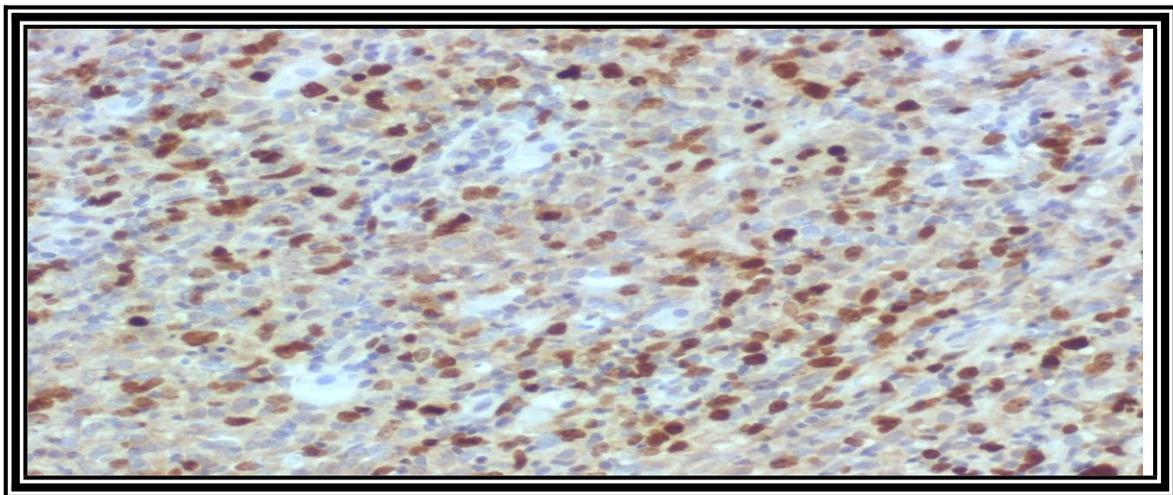
Utvrđeno da je u grup Refraktorni DLBCL postojala statistički značajna ($p<0,05$) srednje jaka pozitivna korelacije između između Bcl-2 i Pgp/ABCB1 ($r=0,463$, $p=0,015$).

5.2.4. Ekspresija survivina kod pacijenata sa DLBCL

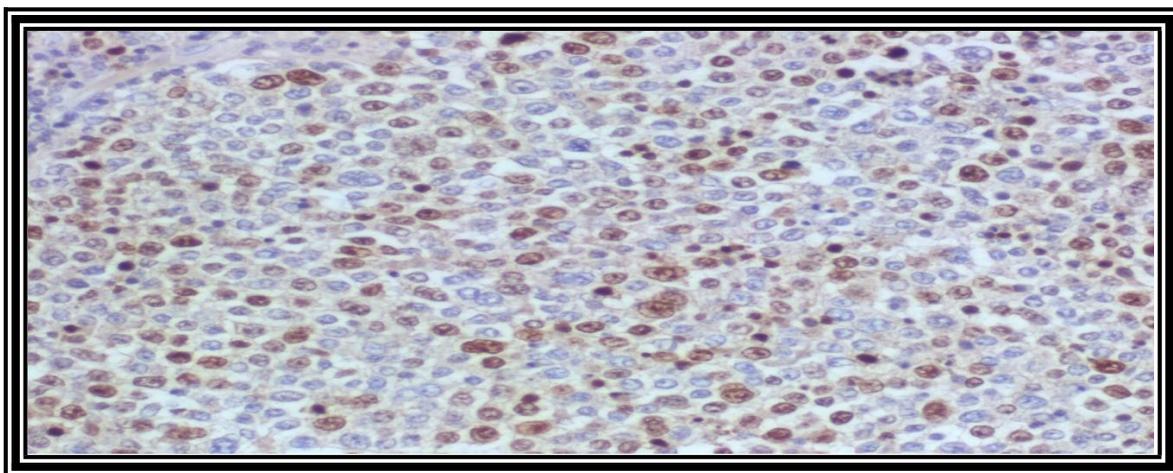
Od ukupnog broja pacijenata sa DLBCL, visok nivo ekspresije je utvrđen kod 30,2% pacijenata ($n=22$), srednje vrijednosti indeksa ekspresije 6 i 9. Nizak nivo ekspresije survivina, srednje vrijednosti indeksa ekspresije 2-4, je utvrđen kod 69,8% pacijenata ($n=51$), (slika 28-33).



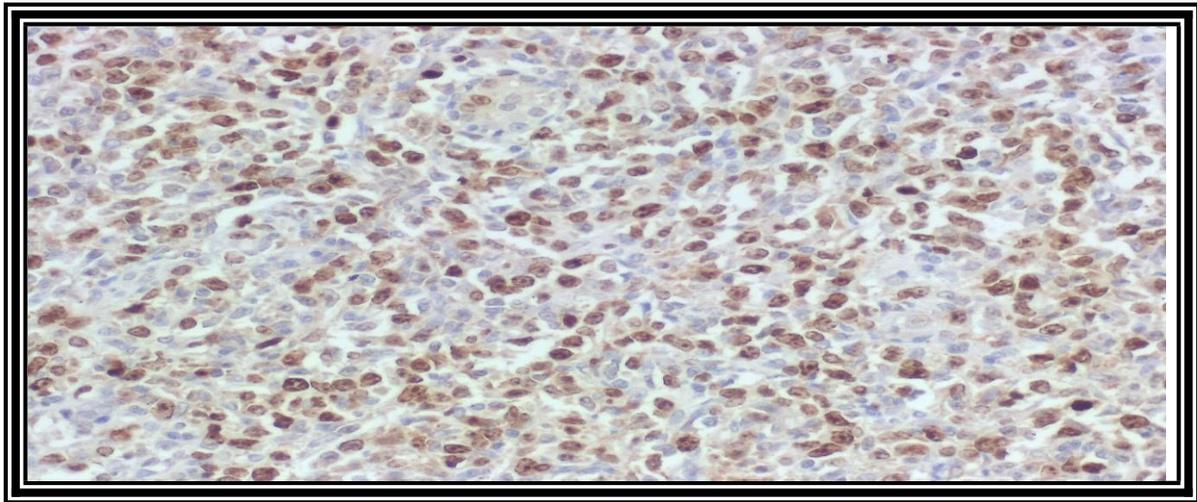
Slika 28. Imunohistohemijška ekspresija survivina kod DLBCL-niska ekspresija (2)



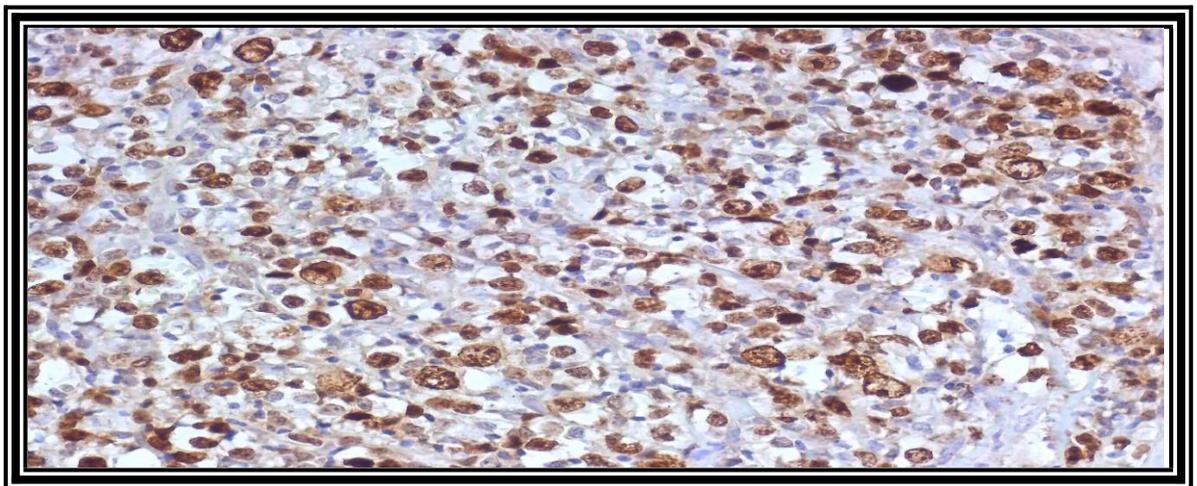
Slika 29. Imunohistohemijška ekspresija survivina kod DLBCL-niska ekspresija (3)



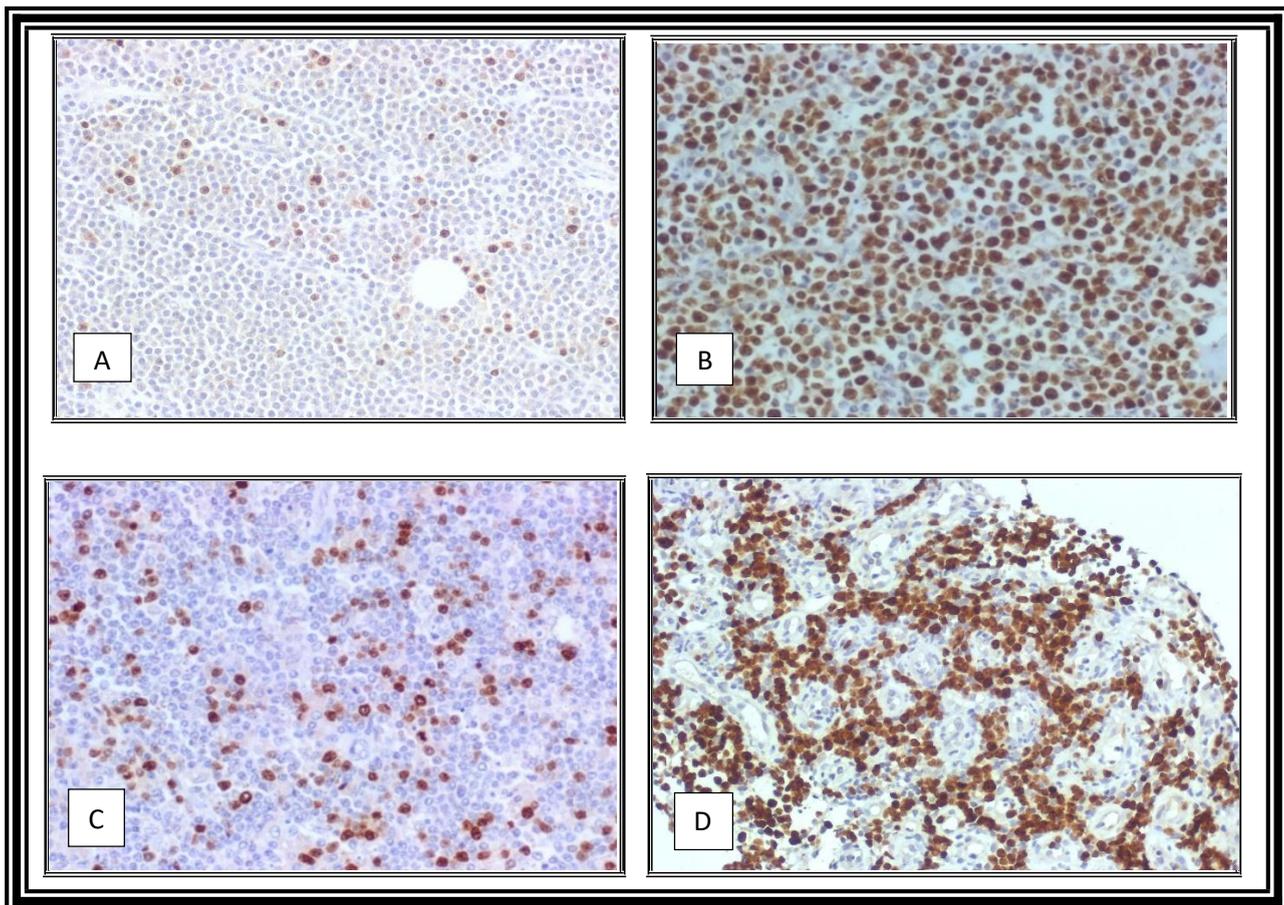
Slika 30. Imunohistohemijška ekspresija survivina kod DLBCL-niska ekspresija (4)



Slika 31. Imunohistohemijska ekspresija survivina kod DLBCL-visoka ekspresija (6)



Slika 32. Imunohistohemijska ekspresija survivina kod DLBCL-visoka ekspresija (9)



Slika 33. Imunohistohemijaska ekspresija survivina. **A.** DLBCL sa niskom ekspresijom survivina u grupi Remisija (indeks bojenja 2). **B.** Visoka ekspresija survivina (indeks bojenja 9), kod refraktornog DLBCL. **C.** Niska ekspresija survivina kod Relaps B1 DLBCL (indeks bojenja 2). **D.** Visoka ekspresija survivina kod DLBCL (indeks bojenja 6) kod Relaps B2. **DLBCL**-difuzni B krupnoćelijski non Hodgkin limfom. **Relaps B1**-grupa pacijenata sa inicijalnom biopsijom, koji su naknadno imali relaps. **Relaps B2**-grupa pacijenata sa rebiopsijom na osnovu koje je utvrđen relaps.

Rezultati testa homogenosti varijansi (*Test of Homogeneity of Variances*) su pokazali da kod markera survivin nije postojala homogenost varijanse te je za *post hoc* test odabran *Tamhan* test koji ne pretpostavlja homogenost varijansi. *Tamhan* test je pokazao da između grupa postoji statistički značajna razlika u odnosu na survivin. Na osnovu ovog testa je utvrđeno da se marker survivin statistički značajno ne razlikuje ($p > 0,05$) između grupa Remisija i Relaps B1, te Relaps B2 i Refraktorni DLBCL, dok je između ostalih grupa postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$).

Analizom je utvrđeno da je srednja vrijednost ekspresije survivin pozitivno bojenih ćelija u grupi pacijenata Remisija bila 48,03% sa standardnom devijacijom ($\pm 13,90$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) razlika između ekspresije survivina u grupi Remisija i Relaps B2 ($p = 0,000$), kao i u grupi Remisija i Refraktorni DLBCL ($p = 0,000$).

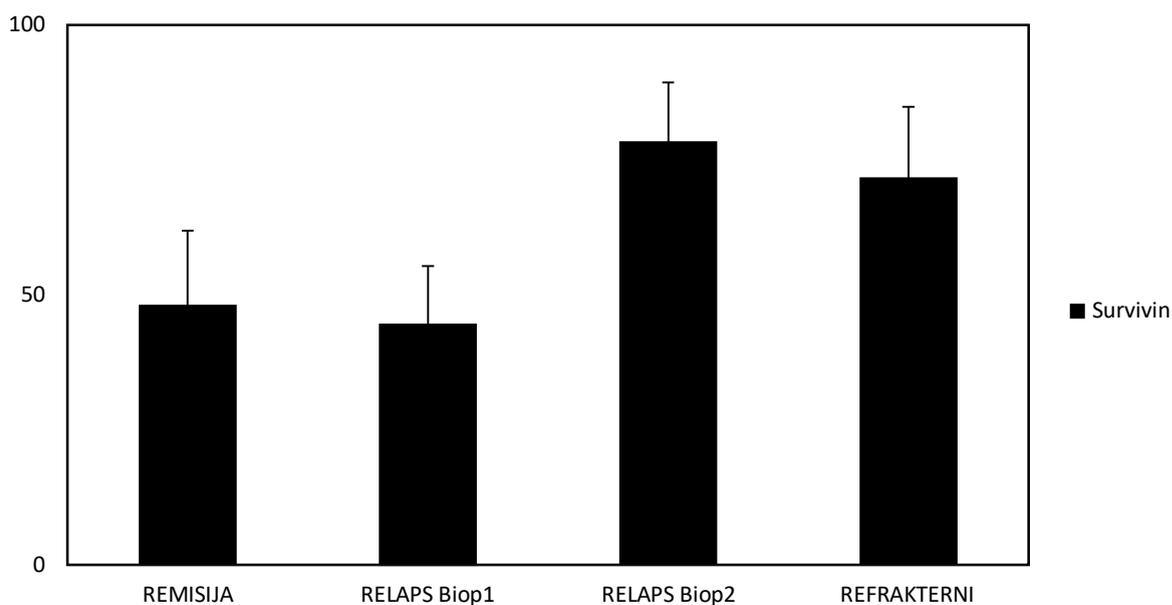
Nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u ekspresiji survivina kod pacijenata u grupi Remisija i Relaps B1 ($p = 0,883$).

Utvrđeno je da je u podgrupi Relaps B1 srednja vrijednost ekspresije survivin pozitivno bojanih ćelija bila 55,54 ($\pm 10,82$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) razlika u nivou ekspresije survivina u grupi Relaps B1 i Relaps B2 ($p = 0,000$), kao i između grupa Relaps B1 i Refraktorni DLBCL ($p = 0,000$). Nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između ekspresije survivina u grupi Relaps B1 i Remisija ($p = 0,883$).

Srednja vrijednost ekspresije survivina u grupi Relaps B2 iznosio je 78,31 ($\pm 11,03$). Utvrđeno je da nije postojala statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između ekspresije survivina u grupi Relaps B2 i grupi Refraktorni DLBCL ($p = 0,271$). Postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) razlika u ekspresiji survivina između grupa Relaps B2 i Remisija ($p = 0,000$), i grupa Relaps B2 i Relaps B1 ($p = 0,00$).

Rezultati su pokazali da je srednja vrijednost ekspresije survivin pozitivno bojanih ćelija u grupi pacijenata Refraktorni bila 71,63 ($\pm 13,25$). Utvrđeno je postojanje statistički značajne ($p < 0,05$) razlike u nivou ekspresije survivina između grupa Refraktorni i Remisija ($p = 0,000$), kao i između grupa Refraktorni i Relaps B1 ($p = 0,000$). Nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između nivoa ekspresije survivina između grupa Refraktorni i Relaps B2 ($0,271$).

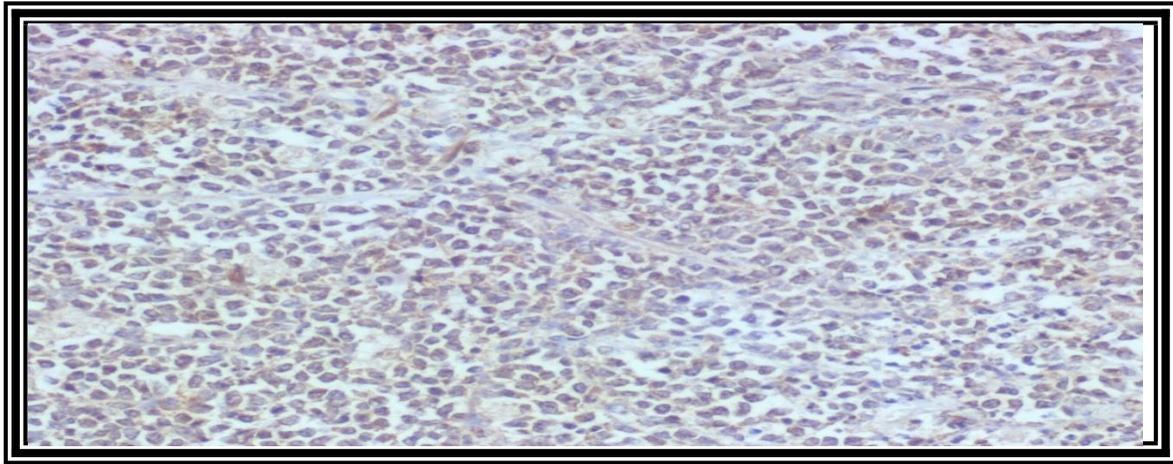
U svim posmatranim grupama istraživanja (Remisija, Relaps B1, Relaps B2, Refraktorni) survivin je imao maksimalnu ekspresiju u grupama Relaps B2 i Refraktorni, (slika 34).



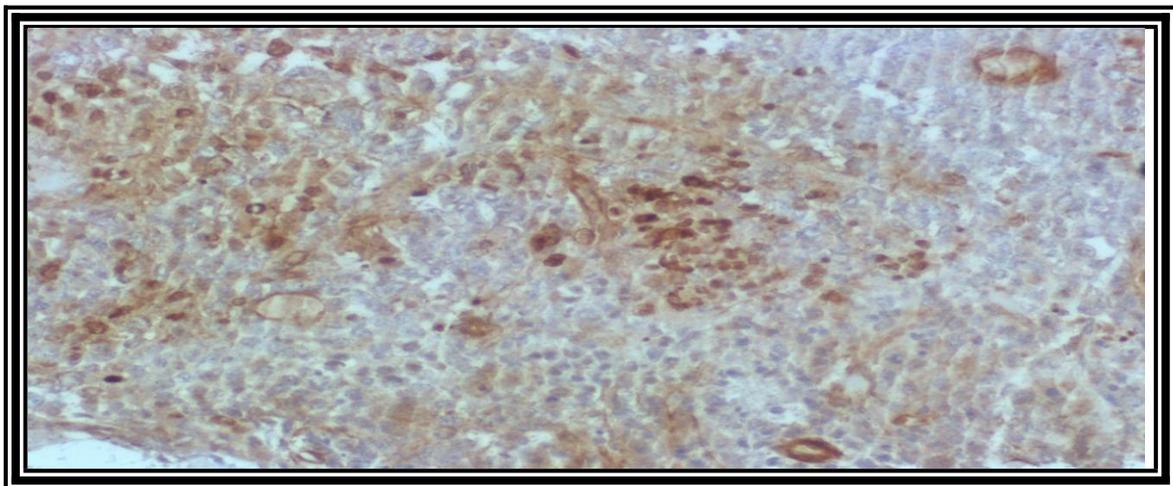
Slika 34. Ekspresija survivina u svim studijskim grupama: Remisija, Refraktorni, Relaps B1, i Relaps B2

5.2.5. Ekspresija MRP1/ABCC1 kod pacijenata sa DLBCL

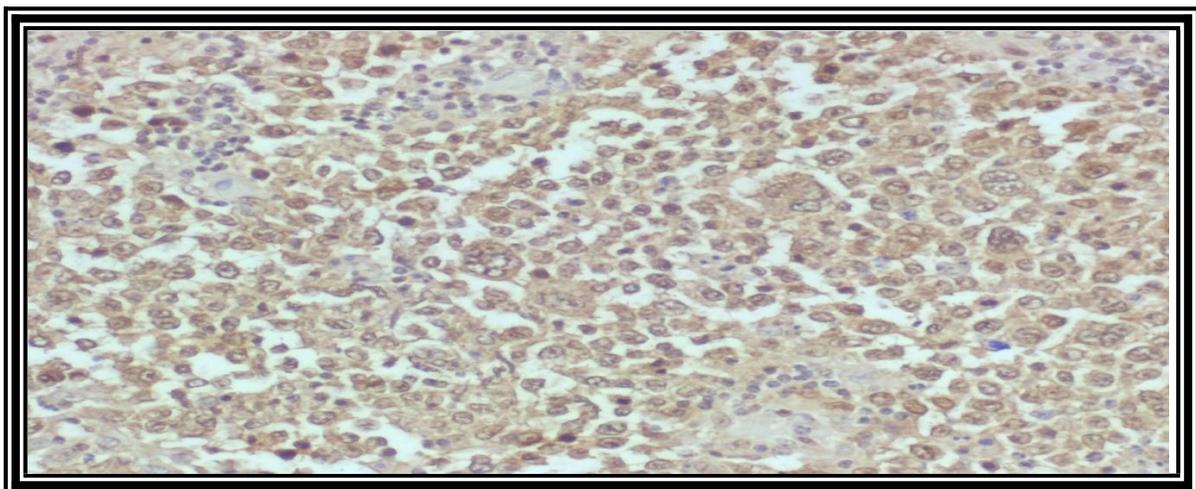
U istraživanju je analizirana ekspresija MRP1/ABCC1, za koji je karakteristično da učestvuje u ekspresiji MDR fenotipa. Rezultati su pokazali da je većina pacijenata imala visok nivo ekspresije (66,0%, n=48), srednja vrijednost indeksa ekspresije 6 i 9. Niska ekspresija MRP1/ABCC1 je utvrđena kod 34,0% pacijenata (n=25), srednje vrijednosti indeksa ekspresije 2-4, (slika 35-40).



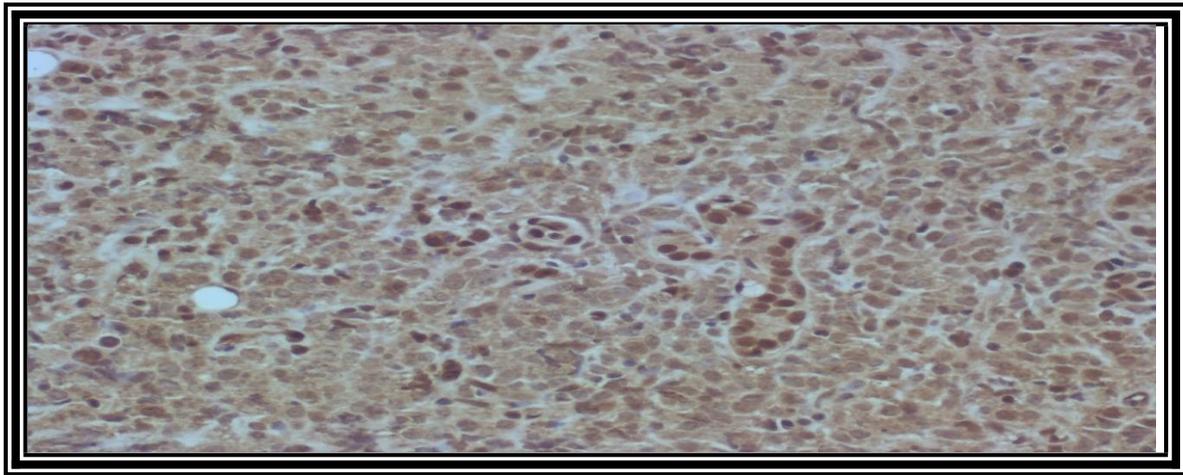
Slika 35. Imunohistohemijška ekspresija MRP1/ABCC1 kod DLBCL-niska ekspresija (2)



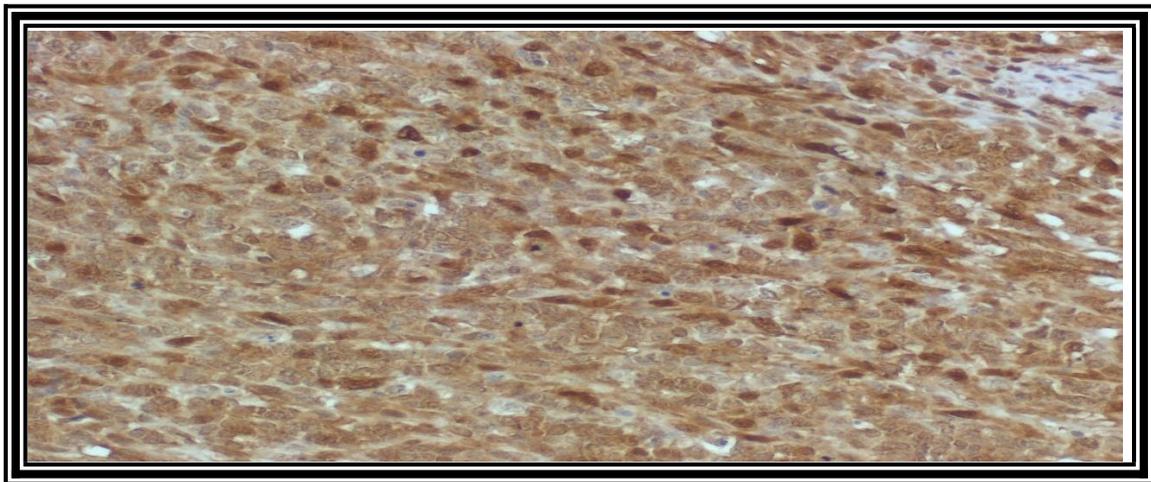
Slika 36. Imunohistohemijška ekspresija MRP1/ABCC1 kod DLBCL-niska ekspresija (3)



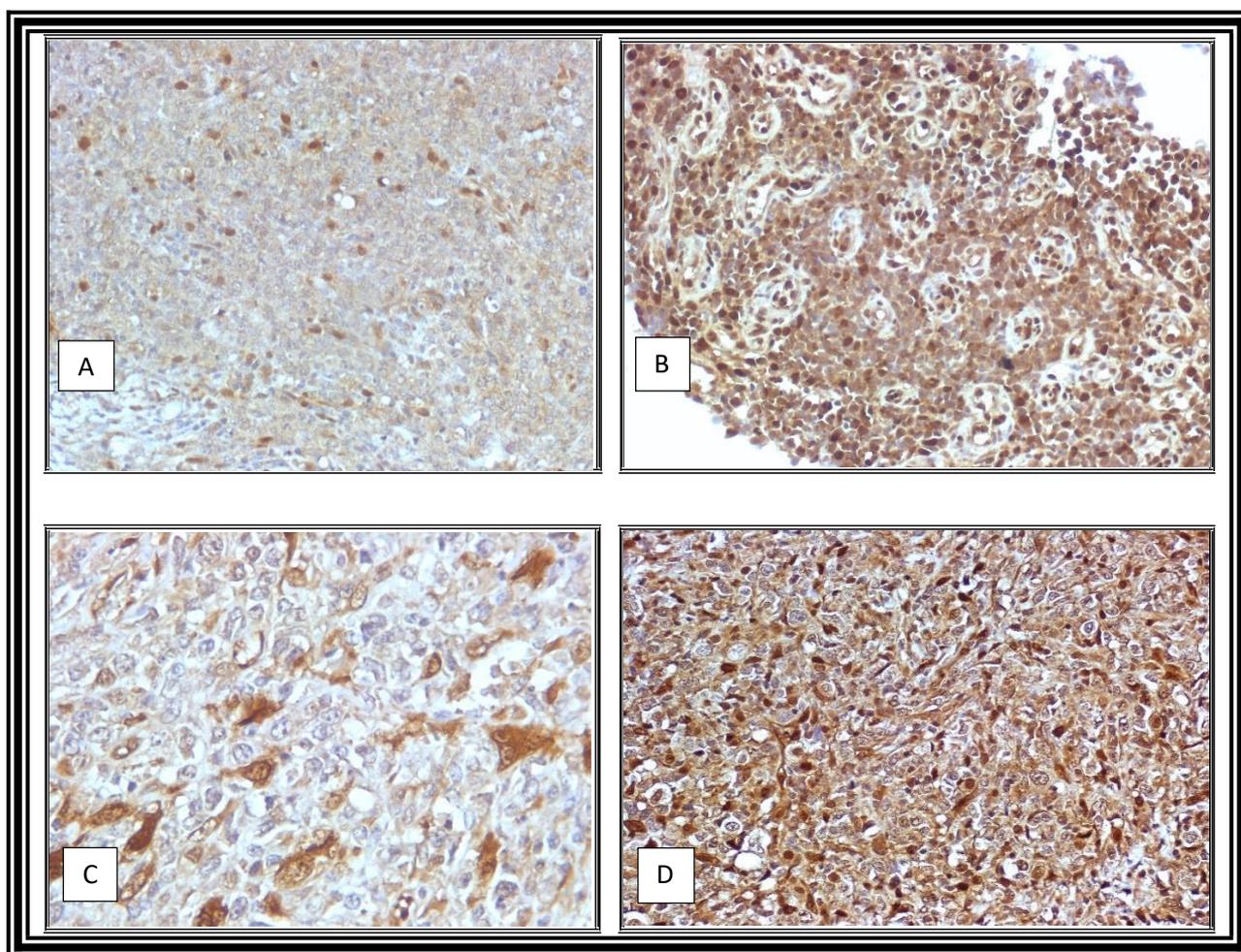
Slika 37. Imunohistohemijška ekspresija MRP1/ABCC1 kod DLBCL-niska ekspresija (4)



Slika 38. Imunohistohemijška ekspresija MRP1/ABCC1 kod DLBCL-visoka ekspresija (6)



Slika 39. Imunohistohemijška ekspresija MRP1/ABCC1 kod DLBCL-visoka ekspresija (9)



Slika 40. Imunohistohemijaska ekspresija MRP1/ABCC1. **A.** DLBCL sa niskom ekspresijom MRP1/ABCC1 u grupi Remisija (indeks bojenja 2). **B.** Visoka ekspresija MRP1/ABCC1 (indeks bojenja 9), kod refraktornog DLBCL. **C.** Niska ekspresija MRP1/ABCC1 kod Relaps B1 DLBCL (indeks bojenja 3). **D.** Visoka ekspresija MRP1/ABCC1 kod DLBCL (indeks bojenja 6) kod Relaps B2. **DLBCL**-difuzni B krupnoćelijski non Hodgkin limfom. **Relaps B1**-grupa pacijenata sa inicijalnom biopsijom, koji su naknadno imali relaps. **Relaps B2**-grupa pacijenata sa rebiopsijom na osnovu koje je utvrđen relaps.

Rezultati testa homogenosti varijansi (*Test of Homogeneity of Variances*) su pokazali da kod markera MRP1/ABCC1 nije postojala homogenost varijanse te je za *post hoc* test odabran *Tamhan* test koji ne pretpostavlja homogenost varijansi. *Tamhan* test je pokazao da između grupa postoji statistički značajna razlika u odnosu na MRP1/ABCC1. Na osnovu ovog testa je utvrđeno da se marker MRP1/ABCC1 statistički značajno ne razlikuje ($p > 0,05$) između grupa Relaps B2 i Refraktorni DLBCL, dok je između ostalih grupa postojala statistički značajna razlika ($p < 0,05$).

Analizom je utvrđeno da je srednja vrijednost ekspresije MRP1/ABCC1 pozitivno bojenih ćelija u grupi Remisija bila 46,86% sa standardnom devijacijom ($\pm 11,29$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) razlika u ekspresiji MRP1/ABCC1 između svih posmatranih grupa: Remisija i Relaps B1 ($p = 0,006$), zatim Remisija i Relaps B2 ($p = 0,000$), kao i između grupa Remisija i Refraktorni DLBCL ($p = 0,000$).

Utvrđeno je da je u podgrupi Relaps B1 srednja vrijednost ekspresije MRP1/ABCC1 pozitivno bojenih ćelija bila 37,92% ($\pm 7,41$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) razlika u nivou ekspresije MRP1/ABCC1 između grupa: Relaps B1 i Remisija ($p = 0,006$), Relaps B1 i Relaps B2 ($p = 0,000$), i između grupa Relaps B1 i Refraktorni DLBCL ($p = 0,000$).

Srednja vrijednost ekspresije MRP1/ABCC1 u grupi Relaps B2 iznosio je 77,73% ($\pm 11,67$). Utvrđeno je da nije postojala statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u ekspresiji MRP1/ABCC1 u grupama Relaps B2 i grupi Refraktorni DLBCL ($p = 0,158$). Postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) razlika u ekspresiji MRP1/ABCC1 između grupa Relaps B2 i Remisija ($p = 0,000$), i Relaps B2 i Relaps B1 ($p = 0,000$).

Rezultati su pokazali da je srednja vrijednost ekspresije MRP1/ABCC1 pozitivno bojenih ćelija u grupi Refraktorni bila 70,33 ($\pm 12,18$). Utvrđeno je postojanje statistički značajne ($p < 0,05$) razlike u nivou ekspresije MRP1/ABCC1 između grupa Refraktorni i Remisija ($p = 0,000$), kao i između grupa Refraktorni i Relaps B1 ($p = 0,000$). Nije utvrđena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika u nivou ekspresije MRP1/ABCC1 između grupa Refraktorni i Relaps B2 ($p = 0,158$).

5.2.6. Korelacija ekspresije survivina i MRP1/ABCC1 kod pacijenata sa DLBCL

Istraživanjem je utvrđeno a na osnovu rezultata *Pearson*-ove korelacije da je u grupi Remisija postojala statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između pojave ekстранodalne bolesti i ekspresije survivina ($r = 0,880$; $p = 0,000$). Takođe, postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između broja ekстранodalnih lokalizacija i Bcl-2 proteina ($r = 0,679$; $p = 0,000$).

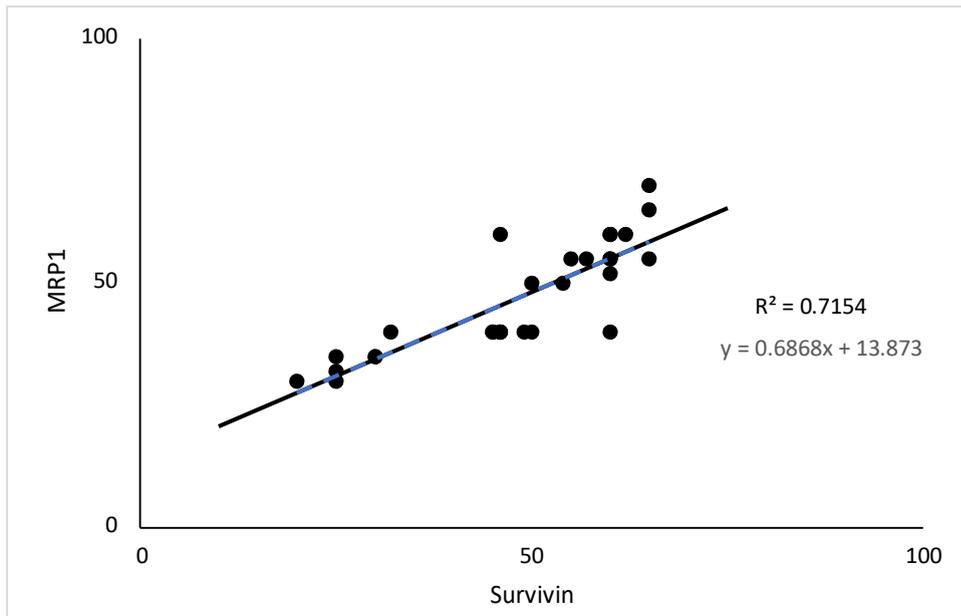
Analizom ekspresije MRP1/ABCC1 u grupi Remisija je utvrđeno postojanje statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između broja ektranodalnih lokalizacija i ekspresije MRP1/ABCC1 ($r = 0,769$; $p = 0,000$).

U grupi Relaps B1 je utvrđeno da nije postojala statistički značajne ($p > 0,05$) korelacije između pojave ektranodalne bolesti i survivina ($r = 0,231$; $p = 0,447$). Takođe, nije postojala statistički značajna ($p > 0,05$) korelacija između broja ektranodalnih lokalizacija i survivina ($r = 0,025$; $p = 0,937$). U istoj grupi analizom ekspresije MRP1/ABCC1 je utvrđeno da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između broja ektranodalnih lokalizacija i MRP1/ABCC1 ($r = 0,829$; $p = 0,000$).

Na osnovu *Pearson*-ove korelacije je zaključeno da u grupi Relaps B2 DLBCL nije postojala statistički značajna ($p > 0,05$) korelacija između pojave ektranodalne bolesti i survivina ($r = 0,433$; $p = 0,139$), niti je postojala statistički značajna ($p > 0,05$) korelacija između broja ektranodalnih lokalizacija bolesti i survivina ($r = 0,012$; $p = 0,970$). Takođe je utvrđeno, da je u grupi Relaps B2 postojala statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između pojave ektranodalne bolesti i MRP1/ABCC1 ($r = 0,573$; $p = 0,041$), ali i broja ekstanodalnih lokalizacija DLBCL i MRP1/ABCC1 ($r = 0,634$; $p = 0,020$).

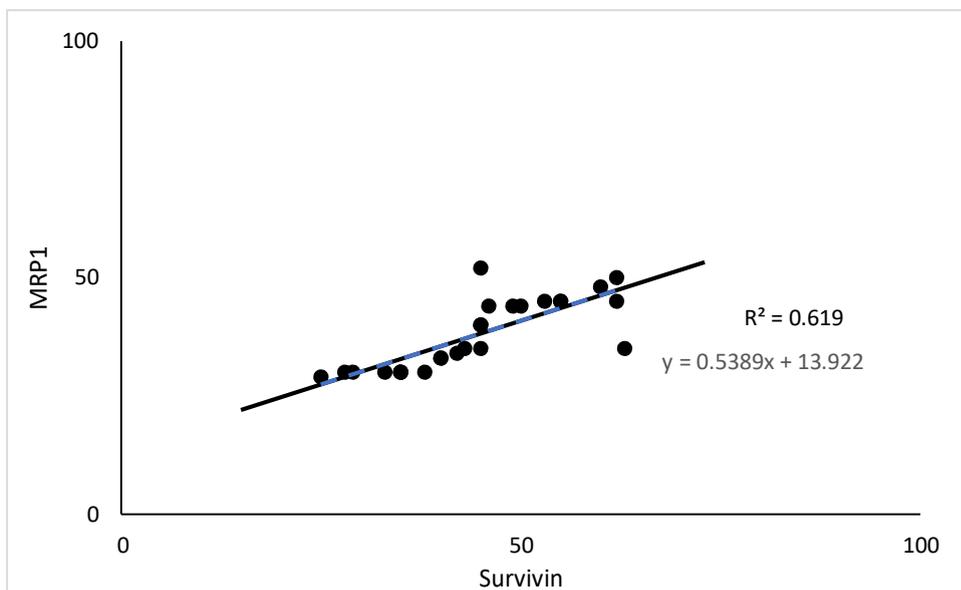
Analizom ekspresije survivina i MRP1/ABCC1 u grupi Refraktorni DLBCL zaključeno je da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između pojave ektranodalne bolesti i survivina ($r = 0,633$; $p = 0,000$), i isto tako statistički značajna ($p < 0,05$) jaka pozitivna korelacija između pojave ektranodalne bolesti i MRP1/ABCC1 ($r = 0,601$; $p = 0,001$). Utvrđeno je postojanje statistički značajne ($p < 0,05$) jake pozitivne korelacije između broja ektranodalnih lokalizacija DLBCL i survivina ($r = 0,766$; $p = 0,000$), i između broja ektranodalnih lokalizacija DLBCL i MRP1/ABCC1 ($r = 0,812$; $p = 0,000$).

U grupi Remisija postojala je značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 ($r = 0,846$, $p = 0,000$), (slika 41).



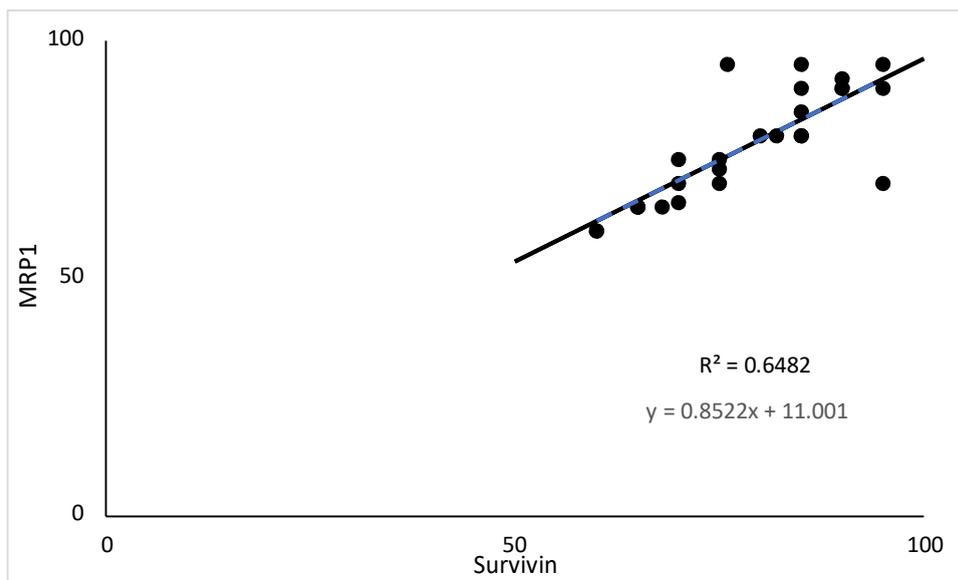
Slika 41. Pearson-ova korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 u grupi Remisija

U grupi Relaps B1 postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 ($r = 0,787$, $p = 0,000$), (slika 42).



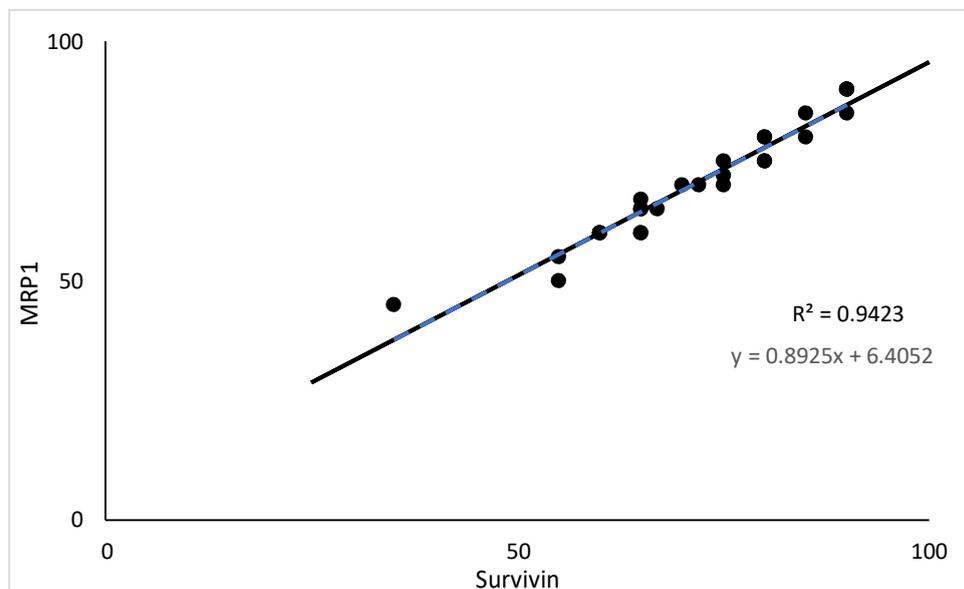
Slika 42. Pearson-ova korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 u grupi Relaps B1

Rezultati su pokazali da je u grupi Relaps B2 postojala statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 ($r = 0,805$, $p = 0,000$), (slika 43).



Slika 43. Pearson-ova korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 u grupi Relaps B2

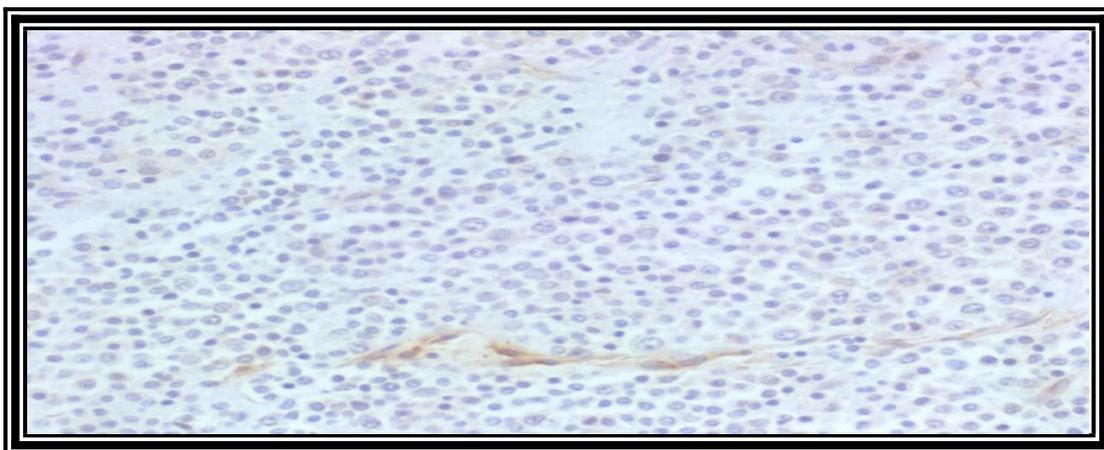
Utvrđeno da je u grupi Refraktorni DLBCL postojala statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 ($r = 0,971$, $p = 0,000$), (slika 44).



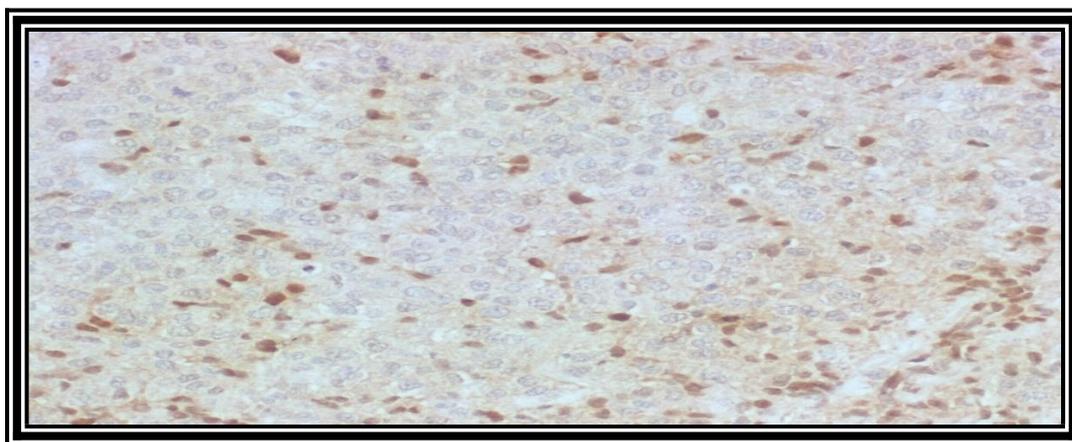
Slika 44. Pearson-ova korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 u grupi Refraktorni

5.2.7. Ekspresija BCRP/ABCG2 kod pacijenata sa DLBCL

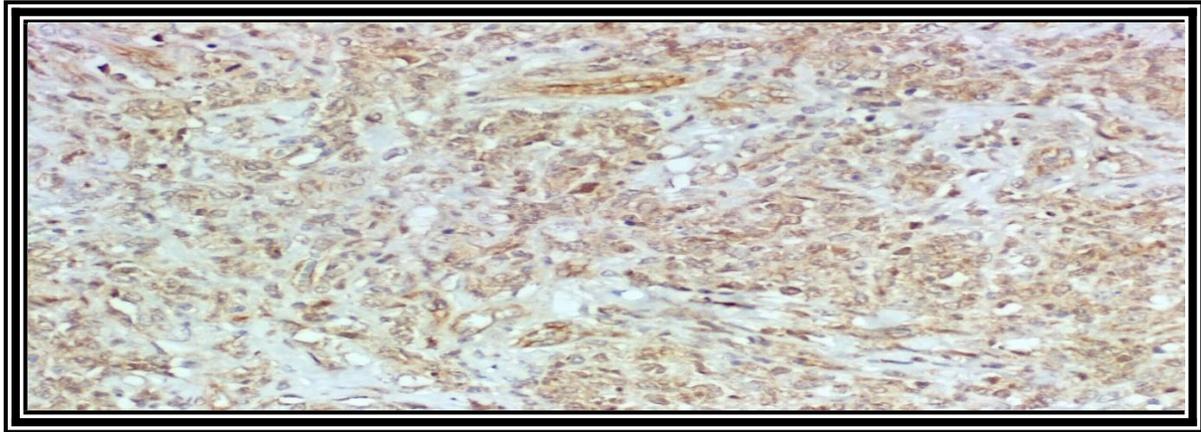
Prisustvo ekspresije BCRP/ABCG2 se vezuje za pojavu višestruke rezistencije na hemioterapiju koja nije posredovana Pgp/ABCB1 i MRP1/ABCC1. Analizom rezultata ukupnog broja pacijenata sa DLBCL non-Hodgkin limfomom je utvrđeno da je većina pacijenata imala nizak nivo ekspresije BCRP/ABCG2 (88,7%, n=65), srednje vrijednosti indeksa ekspresije 1-4. Visoka ekspresija BCRP/ABCG2 je utvrđena kod 11,3% pacijenata (n=8), srednje vrijednosti indeksa ekspresije 6, (Slika 45-50).



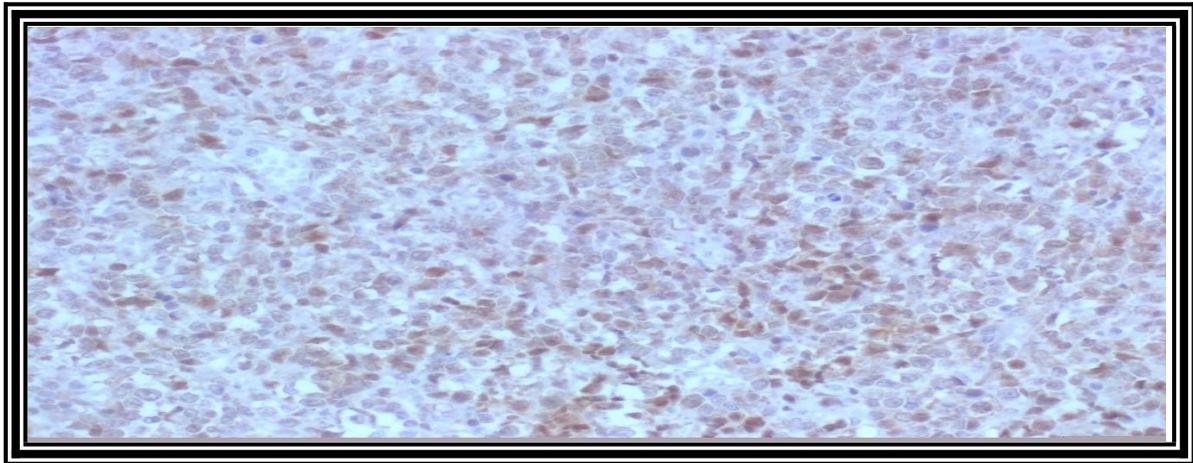
Slika 45. Imunohistohemijska ekspresija BCRP/ABCG2 kod DLBCL-niska ekspresija (1)



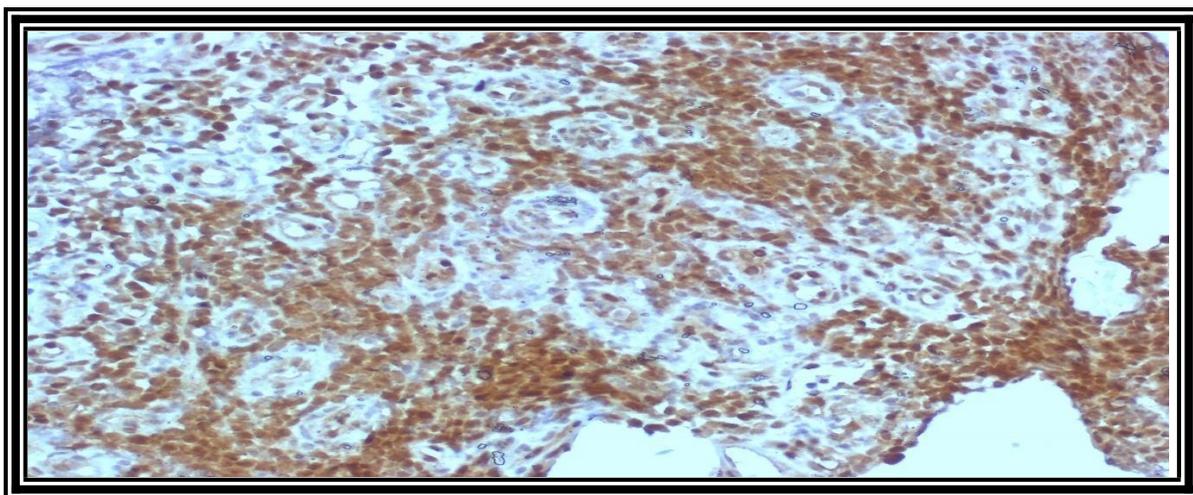
Slika 46. Imunohistohemijska ekspresija BCRP/ABCG2 kod DLBCL-niska ekspresija (2)



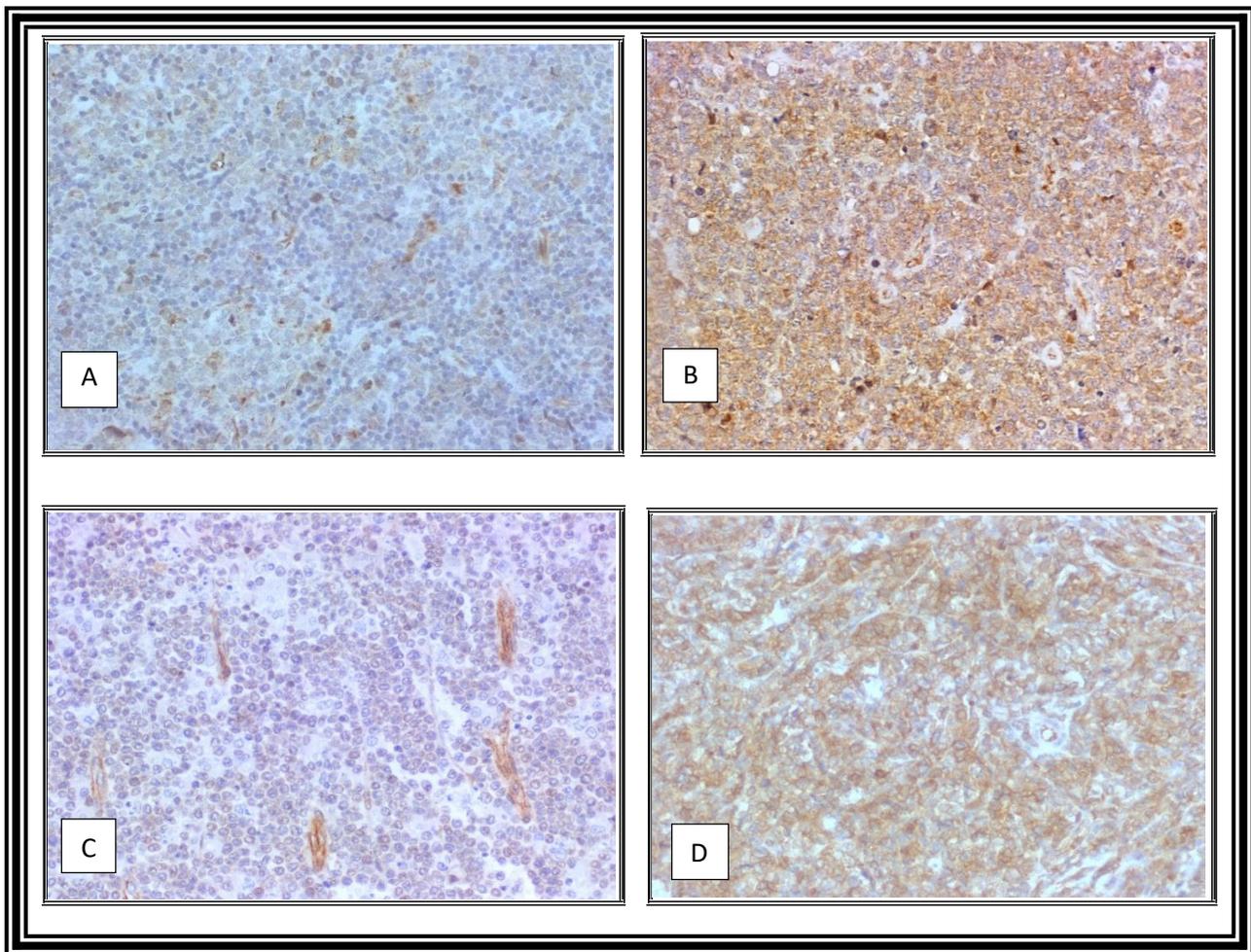
Slika 47. Imunohistohemijška ekspresija BCRP/ABCG2 kod DLBCL-niska ekspresija (3)



Slika 48. Imunohistohemijška ekspresija BCRP/ABCG2 kod DLBCL-niska ekspresija (4)



Slika 49. Imunohistohemijška ekspresija BCRP/ABCG2 kod DLBCL-visoka ekspresija (6)



Slika 50. Imunohistohemijaska ekspresija BCRP/ABCG2. **A.** DLBCL sa niskom ekspresijom BCRP/ABCG2 u grupi Remisija (indeks bojenja 1). **B.** Visoka ekspresija BCRP/ABCG2 (indeks bojenja 6), kod refraktornog DLBCL. **C.** Niska ekspresija BCRP/ABCG2 kod Relaps B1 DLBCL (indeks bojenja 2). **D.** Visoka ekspresija BCRP/ABCG2 kod DLBCL (indeks bojenja 6) kod Relaps B2. **DLBCL**-difuzni B krupnoćelijski non Hodgkin limfom. **Relaps B1**-grupa pacijenata sa inicijalnom biopsijom, koji su naknadno imali relaps. **Relaps B2**-grupa pacijenata sa rebiopsijom na osnovu koje je utvrđen relaps.

Rezultati testa homogenosti varijansi (*Test of Homogeneity of Variances*) su pokazali da kod markera BCRP/ABCG2 nije postojala homogenost varijanse te je za *post hoc* test odabran *Tamhan* test koji ne pretpostavlja homogenost varijansi. *Tamhan* test je pokazao da između grupa postoji statistički značajna razlika u odnosu na BCRP/ABCG2. Na osnovu ovog testa je utvrđeno da se marker BCRP/ABCG2 statistički značajno razlikovao ($p < 0,05$) između svih posmatranih grupa (Remisija, Relaps B1, Relaps B2, Refraktorni DLBCL).

Analizom je utvrđeno da je srednja vrijednost ekspresije BCRP/ABCG2 pozitivno bojenih ćelija u grupi pacijenata Remisija bila 27,03% sa standardnom devijacijom ($\pm 10,68$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) razlika u ekspresije BCRP/ABCG2

između svih posmatranih grupa: Remisija i Relaps B1 ($p=0,000$), Remisija i Relaps B2 ($p=0,000$), kao i između Relaps i Refraktorni DLBCL ($p=0,000$).

Utvrđeno je da je u podgrupi Relaps B1 srednja vrijednost ekspresije BCRP/ABCG2 pozitivno bojenih ćelija bila 38,81% ($\pm 5,06$). Rezultati su pokazali da je postojala statistički značajna ($p<0,05$) razlika u nivou ekspresije BCRP/ABCG2 u grupi Relaps B1 i Remisija ($p=0,000$), Relaps B1 i Relaps B2 ($p=0,000$), kao i između grupa Relaps B1 i Refraktorni DLBCL ($p=0,000$).

Srednja vrijednost ekspresije BCRP/ABCG2 u grupi Relaps B2 iznosio je 55,85 ($\pm 7,08$). Utvrđeno je da je postojala statistički značajna ($p<0,05$) razlika u nivou ekspresije BCRP/ABCG2 između grupa Relaps B2 i Remisija ($p=0,000$), zatim Relaps B2 i Relaps B1 ($p=0,000$), kao i između Relaps B2 i grupa Refraktorni DLBCL ($p=0,009$).

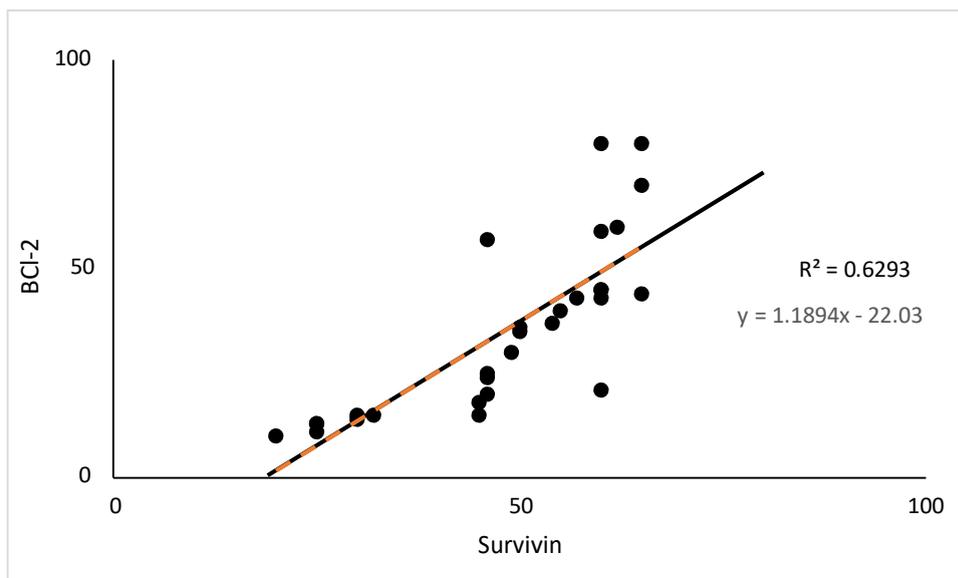
Rezultati su pokazali da je srednja vrijednost ekspresije BCRP/ABCG2 pozitivno bojenih ćelija u grupi pacijenata Refraktorni bila 48,59 ($\pm 8,57$). Utvrđeno je postojanje statistički značajne ($p<0,05$) razlike u nivou ekspresije BCRP/ABCG2 između grupa Refraktorni i Remisija ($p=0,000$), između grupa Refraktorni i Relaps B1 ($p=0,000$), i između Refraktorni i Relaps B2 ($p=0,009$).

5.2.8. Komparativna analiza ispitivanih markera

Na osnovu rezultata Pearson-ove korelacije i analize Bcl-2 u grupi Remisija došlo se do zaključka da su Bcl-2 i Pgp/ABCB1 imali slabu pozitivnu korelaciju ($r=0,271$, $p=0,155$) bez statističke značajnosti ($p>0,05$), dok je u grupi Relaps B2 postojala srednje jaka pozitivna korelacija između Bcl-2 i Pgp/ABCB1 ($r=0,349$, $p=0,081$), koja takođe nije bila statistički značajna ($p>0,05$).

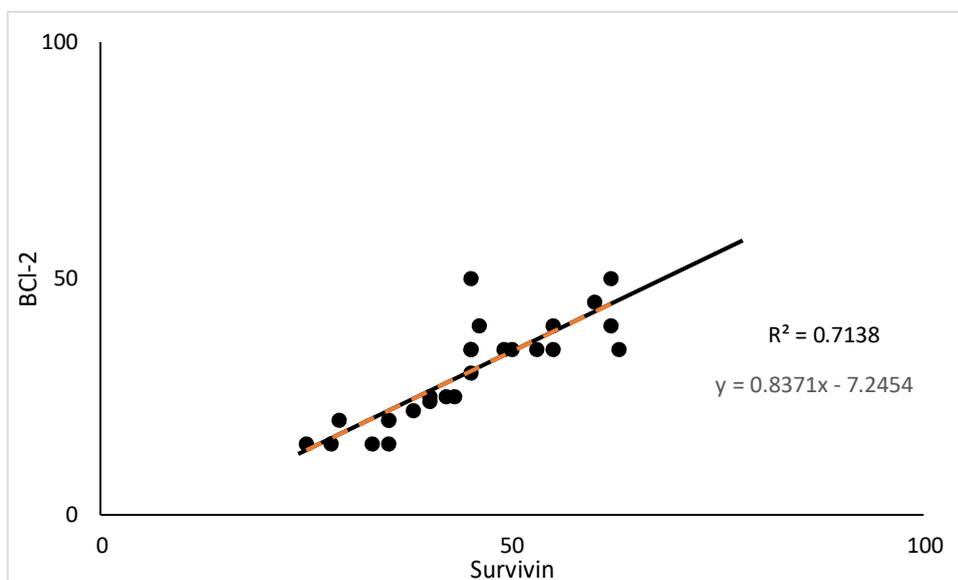
U ostalim posmatranim grupama postojala je statistički značajna ($p<0,05$) pozitivna korelacija. U grupi Relaps B1 postojala je statistički značajna ($p<0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između Bcl-2 i Pgp/ABCB1 ($r=0,461$, $p=0,018$), i u grupi Refraktorni DLBCL postojala je statistički značajna ($p<0,05$) srednje jaka pozitivna korelacije između između Bcl-2 i Pgp/ABCB1 ($r=0,463$, $p=0,015$).

Istraživanjem je utvrđeno da je u grupi Remisija postojala statistički značajna ($p<0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između survivina i Bcl-2 ($r= 793$; $p=0,000$), (slika 51).



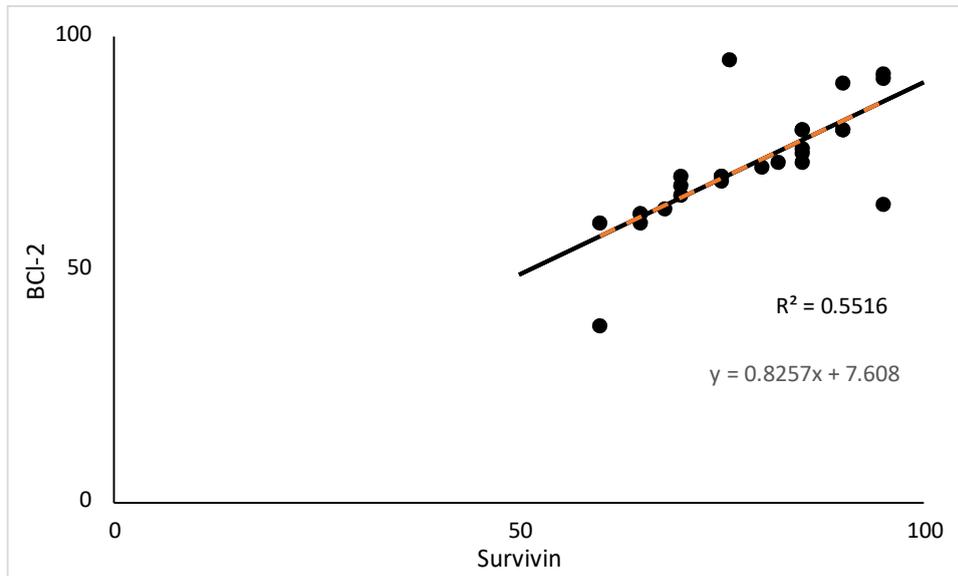
Slika 51. Pearson-ova korelacija Bcl-2 i survivina u grupi Remisija

Na osnovu rezultata *Pearson*-ove korelacije zaključeno je da je u grupi Relaps B1 postojala statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između survivina i Bcl-2 ($r = 0,845$; $p = 0,000$), (slika 52).



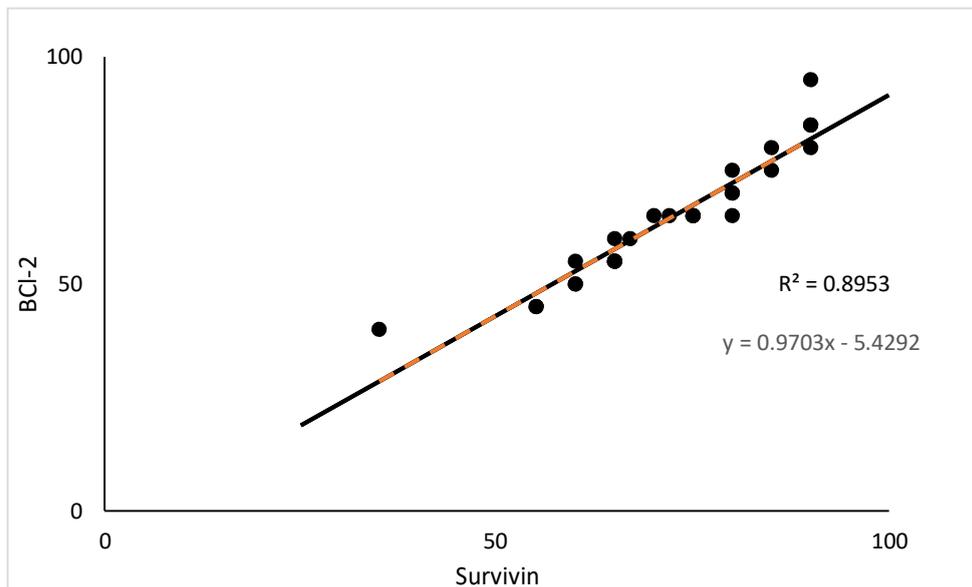
Slika 52. Pearson-ova korelacija Bcl-2 i survivina u grupi Relaps B1

Utvrđeno je da je grupi Relaps B2 postojala statistički značajna ($p < 0,05$) veoma jaka pozitivna korelacija između Bcl-2 i survivina ($r = 0,743$; $p = 0,000$), (slika 53).



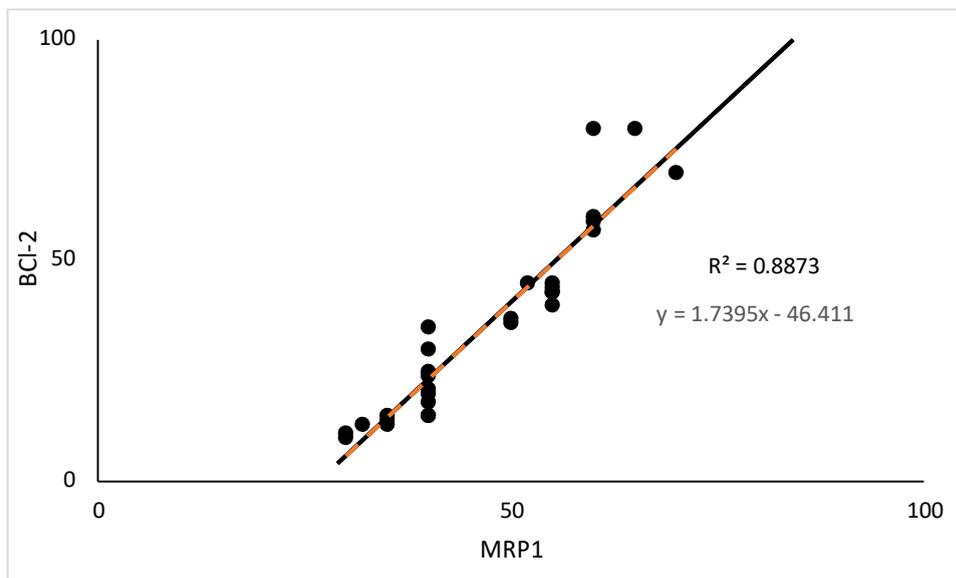
Slika 53. Pearson-ova korelacija Bcl-2 i survivina u grupi Relaps B2

Analizom je utvrđeno u grupi Refraktorni postojanje statistički značajne ($p < 0,05$) vrlo jake pozitivne korelacije između Bcl-2 i survivina ($r = 0,946$; $p = 0,000$), (slika 54).



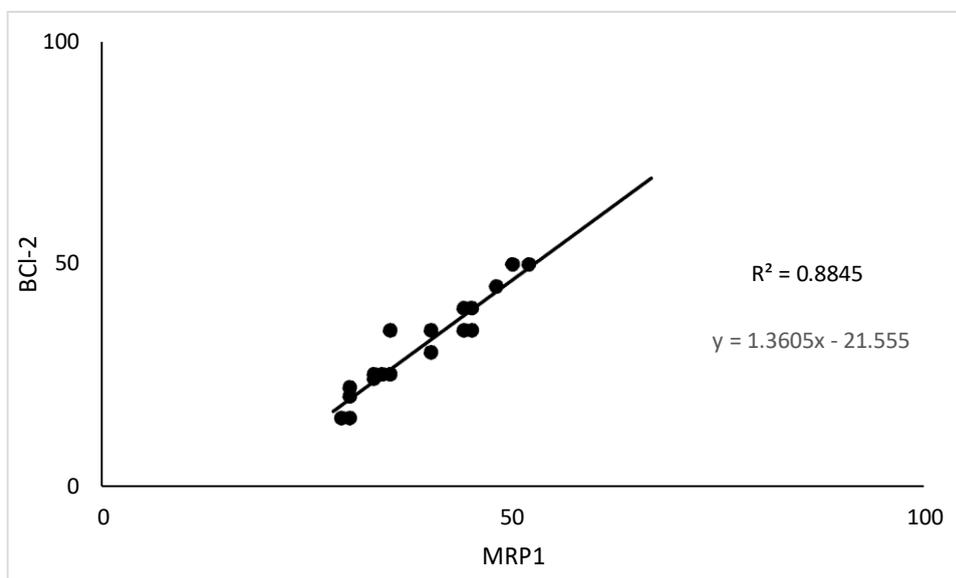
Slika 54. Pearson-ova korelacija Bcl-2 i survivina u grupi Refraktorni DLBCL

Na osnovu rezultata Pearson-ove korelacije i analize Bcl-2 u grupi Remisija došlo se do zaključka da su Bcl-2 i MRP1/ABCC1 statistički značajnu ($p < 0,05$) veoma jaku pozitivnu korelaciju ($r = 0,942$; $p = 0,000$), (slika 55).



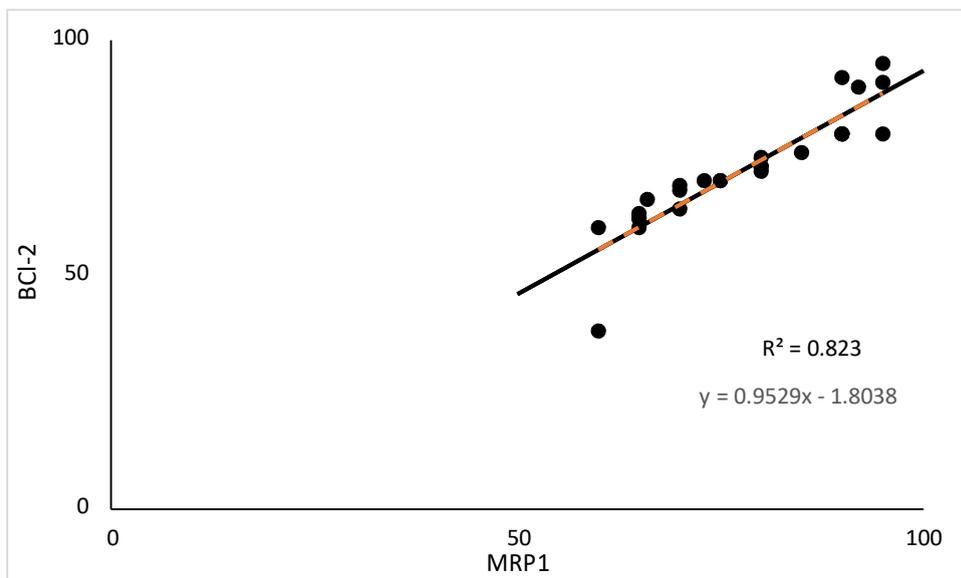
Slika 55. Pearson-ova korelacija Bcl-2 i MRP1/ABCC1 u grupi Remisija

U grupi Relaps B1 postojala je vrlo jaka pozitivna korelacija između Bcl-2 i MRP1/ABCC1 ($r = 0,940$, $p = 0,000$), koja je takođe bila statistički značajna ($p < 0,05$), (slika 56).

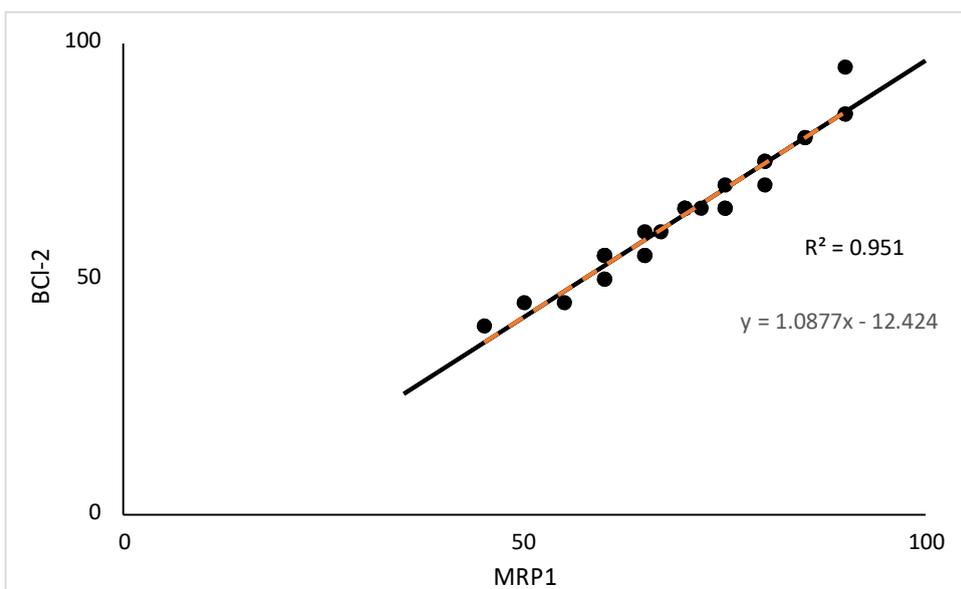


Slika 56. Pearson-ova korelacija Bcl-2 i MRP1/ABCC1 u grupi Relaps B1

I u ostalim posmatranim grupama postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) pozitivna korelacija. U grupi Relaps B2 postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između Bcl-2 i MRP1/ABCC1 ($r = 0,907$, $p = 0,000$), (slika 57). Takođe, i u grupi Refraktorni DLBCL postojala je statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između Bcl-2 i MRP1/ABCC1 ($r = 0,975$, $p = 0,000$), (slika 58).



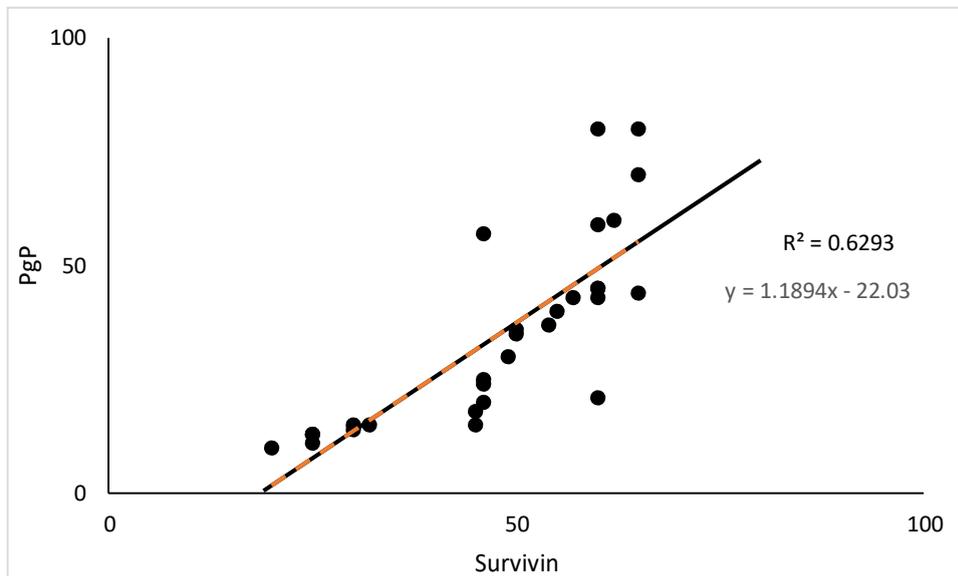
Slika 57. Pearson-ova korelacija Bcl-2 i MRP1/ABCC1 u grupi Relaps B2



Slika 58. Pearson-ova korelacija Bcl-2 i MRP1/ABCC1 u grupi Refraktorni

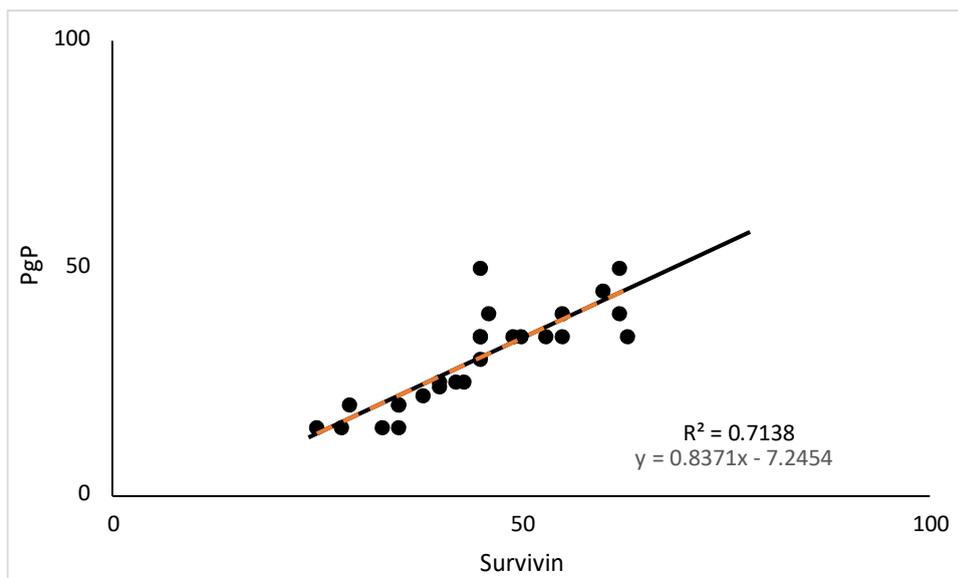
Na osnovu rezultata analize Bcl-2 u grupi Remisija došlo se do zaključka da su Bcl-2 i BCRP/ABCG2 imali veoma jaku pozitivnu korelaciju ($r=0,608$, $p=0,000$) koja je bila statistički značajna ($p<0,05$). Takođe, i u grupi Relaps B1 je postojala statistički značajna ($p<0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između Bcl-2 i BCRP/ABCG2 ($r=0,604$; $p=0,001$), dok je u grupi Relaps B2 postojala statistički značajna ($p<0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između ova dva posmatrana markera ($r=0,494$; $p=0,010$). Slično i u grupi Refraktorni DLBCL postojala je statistički značajna ($p<0,05$) srednje jaka korelacija između Bcl-2 i BCRP/ABCG2 ($r=0,494$; $p=0,010$).

Na osnovu rezultata Pearson-ove korelacije za marker Pgp/ABCB1 je utvrđeno da je u grupi Remisija postojala statistički značajna ($p<0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između Pgp/ABCB1 i survivina ($r=0,484$; $p=0,008$), (slika 59).

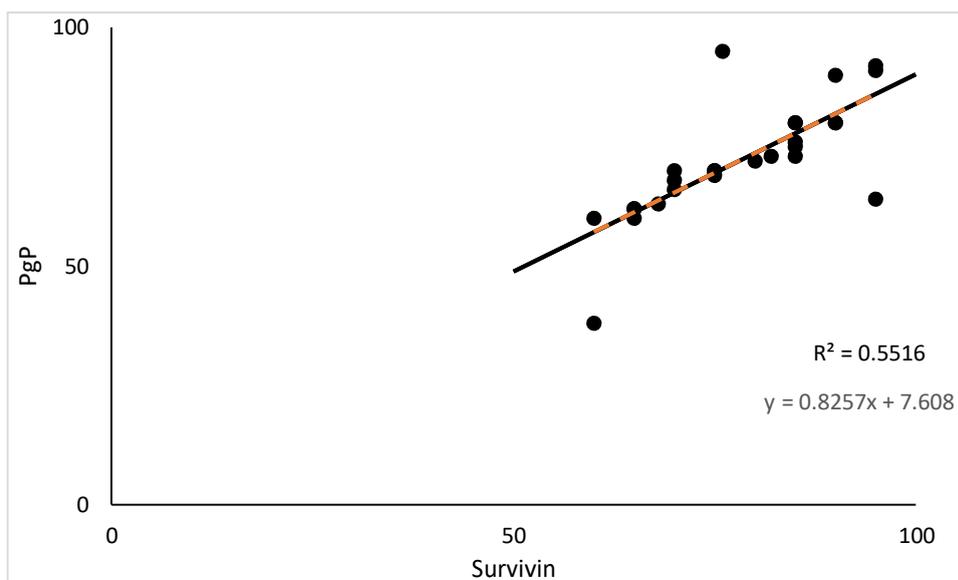


Slika 59. Pearson-ova korelacija Pgp/ABCB1 i survivina u grupi Remisija

Utvrđeno je da je u grupi Relaps B1 postojala statistički značajna ($p<0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između Pgp/ABCB1 i survivina ($r=0,468$; $p=0,016$), (slika 60). Takođe i u grupi Relaps B2 je postojala srednje jaka pozitivna korelacija između survivina i Pgp/ABCB1 ($r=0,415$; $p=0,035$), koja je bila statistički značajna ($p<0,05$), (slika 61)

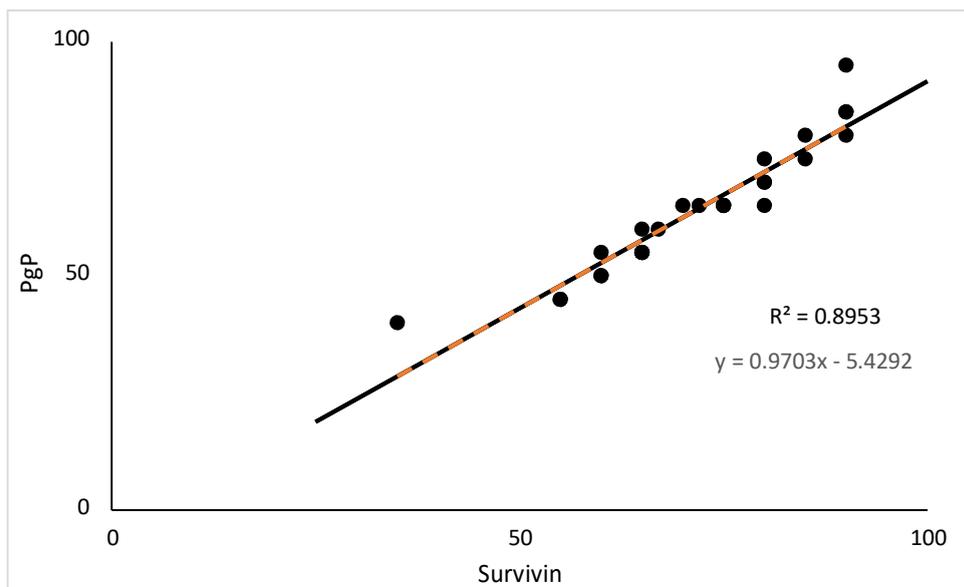


Slika 60. Pearson-ova korelacija Pgp/ABCB1 i survivina u grupi Relaps B1



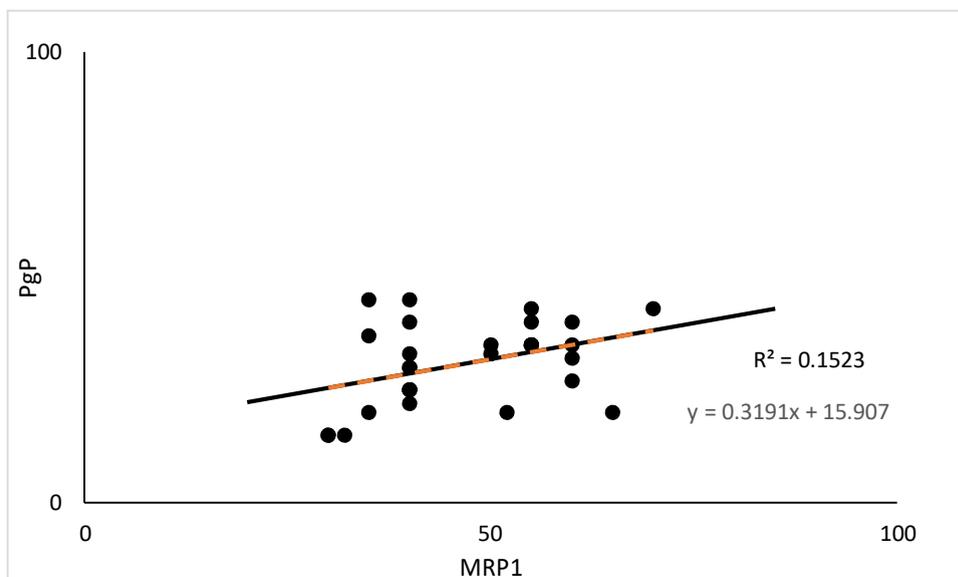
Slika 61. Pearson-ova korelacija Pgp/ABCB1 i survivina u grupi Relaps B2

Analizom je utvrđeno da je i u grupi pacijenata Refraktorni DLBCL postojala statistički značajna ($p < 0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između Pgp/ABCB1 i survivina ($r = 0,424$; $p = 0,028$), (slika 62).



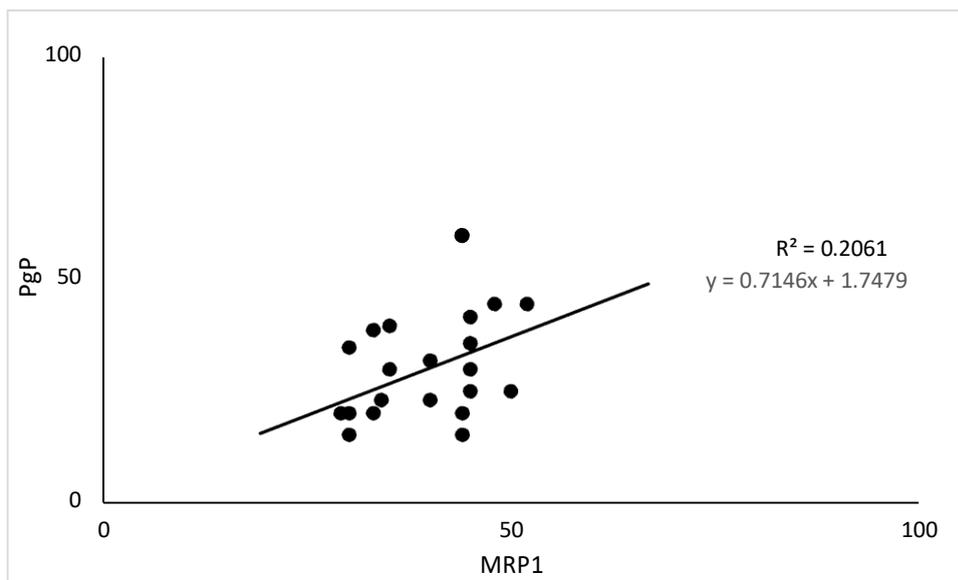
Slika 62. Pearson-ova korelacija Pgp/ABCB1 i survivina u grupi Refraktorni

U posmatranoj grupi Remisija, utvrđena je statistički značajna ($p < 0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između Pgp/ABCB1 i MRP1/ABCC1 ($r = 0,390$; $p = 0,036$), (slika 63).

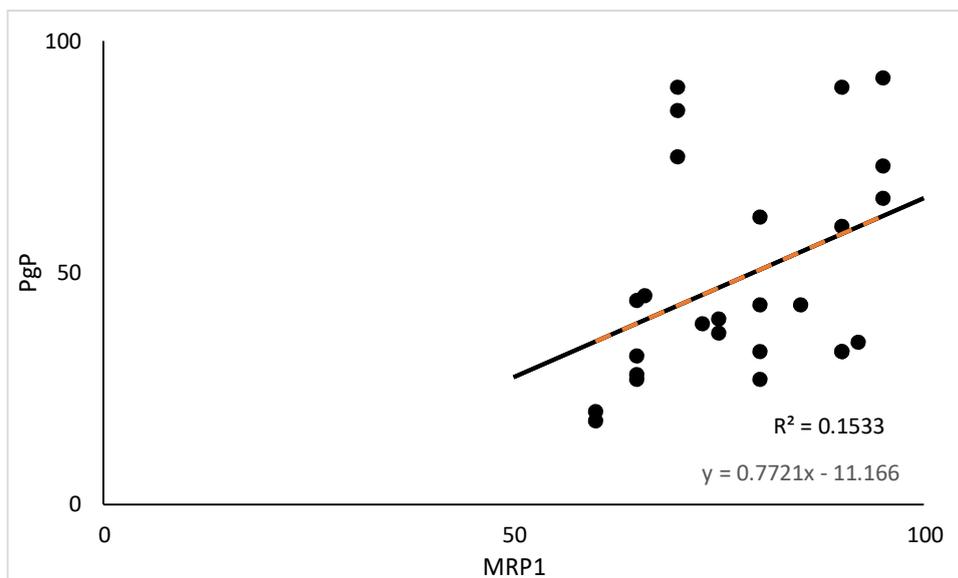


Slika 63. Pearson-ova korelacija Pgp/ABCB1 i MRP1/ABCC1 u grupi Remisija

Srednje jaka pozitivna korelacija između Pgp/ABCB1 i MRP1/ABCC1 ($r = 0,454$; $p = 0,020$) koja je bila statistički značajna ($p < 0,05$) je utvrđena i u grupi Relaps B1, (slika 64). Takođe i u grupi Relaps B2 je utvrđena statistički značajna ($p < 0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između posmatranih markera ($r = 0,392$; $p = 0,048$), (slika 65).

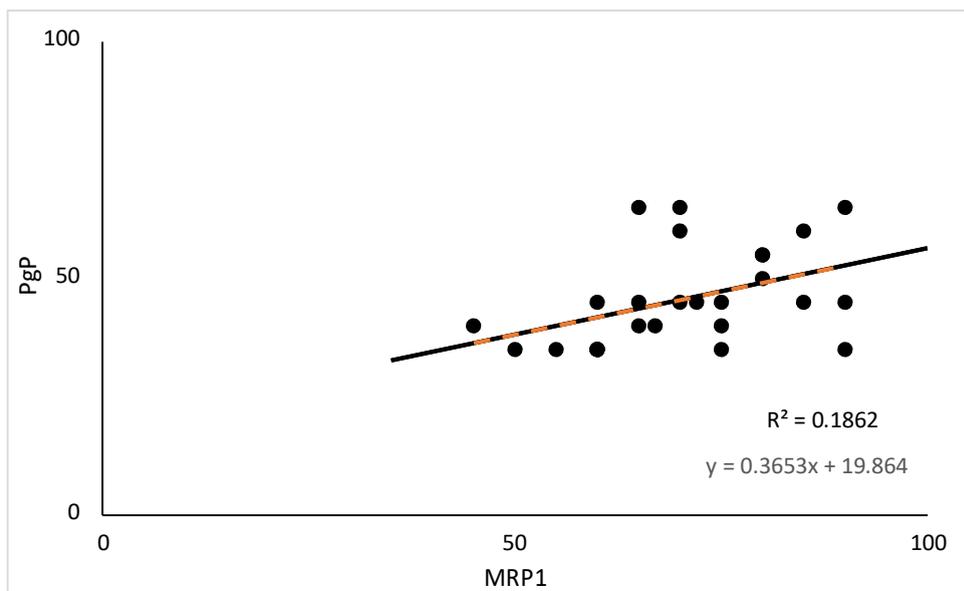


Slika 64. Pearson-ova korelacija Pgp/ABCB1 i MRP1/ABCC1 u grupi Relaps B1



Slika 65. Pearson-ova korelacija Pgp/ABCB1 i MRP1/ABCC1 u grupi Relaps B2

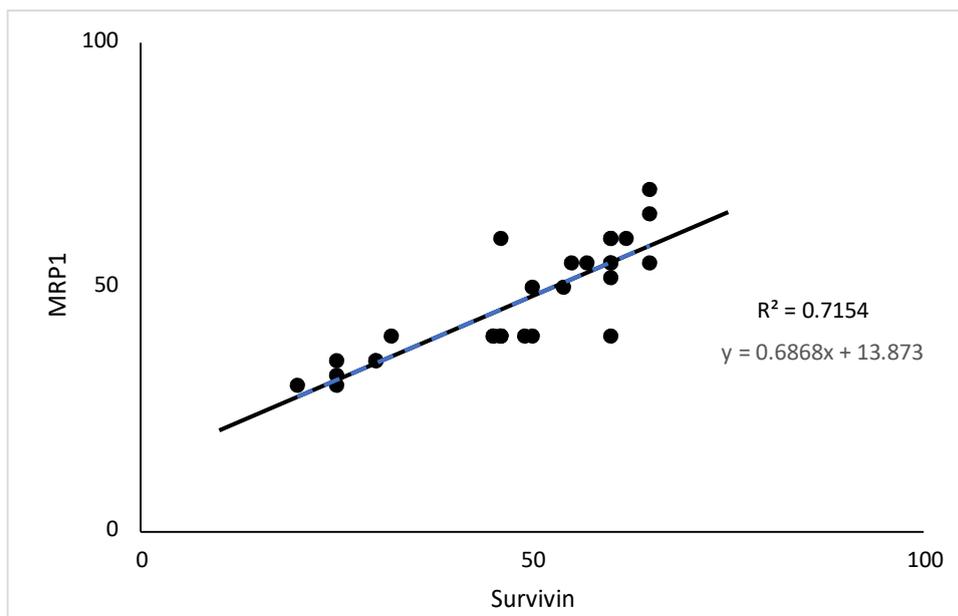
U grupi Refraktorni DLBCL je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između Pgp/ABCB1 i MRP1/ABCC1 ($r = 0,431$; $p = 0,025$), (slika 66).



Slika 66. Pearson-ova korelacija Pgp/ABCB1 i MRP1/ABCC1 u grupi Refraktorni

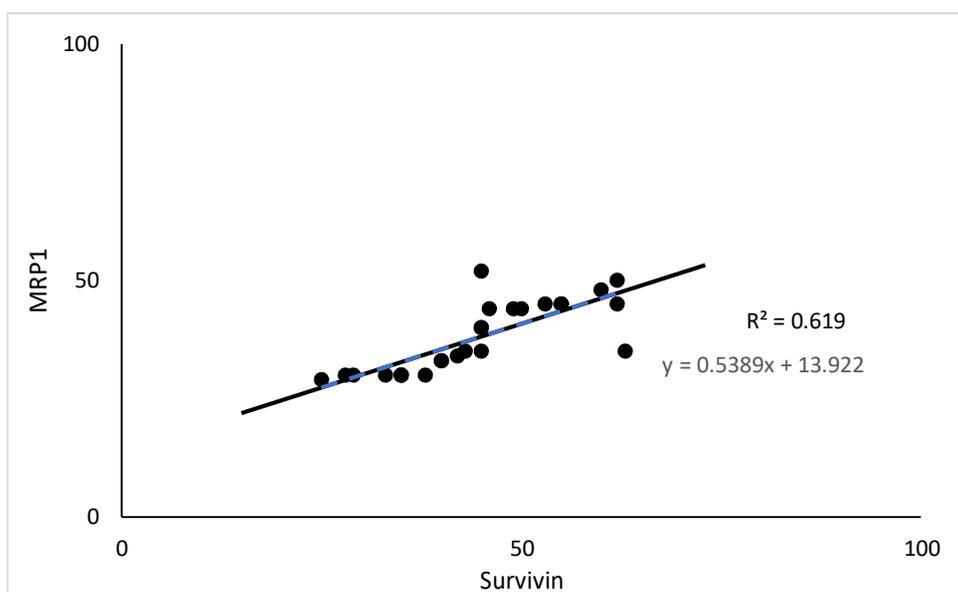
U odnosu na analizu markera Pgp/ABCB1 i BCRP/ABCG2 je utvrđeno da je u grupi Remisija postojala niska negativna korelacija ($r=-0,024$; $p=0,903$), koja nije bila statistički značajna ($p>0,05$). U grupi Relaps B1 je utvrđeno da je između ova dva posmatrana markera postojala umjereno jaka pozitivna korelacija ($r=0,313$; $p=0,119$), koja nije bila statistički značajna ($p>0,05$), dok u grupi Relaps B2 nije postojala statistički značajna ($p>0,05$) korelacija između Pgp/ABCB1 i BCRP/ABCG2 ($r=0,076$; $p=0,713$). Utvrđeno je da je u grupi Refraktorni postojala umjereno jaka pozitivna korelacija koja nije bila statistički značajna ($p>0,05$), ($r=0,327$; $p=0,096$).

Rezultati su pokazali da je analizom markera survivin u grupi Remisija utvrđeno da postoji statistički značajna ($p<0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 ($r=0,846$; $p=0,000$), (slika 67).



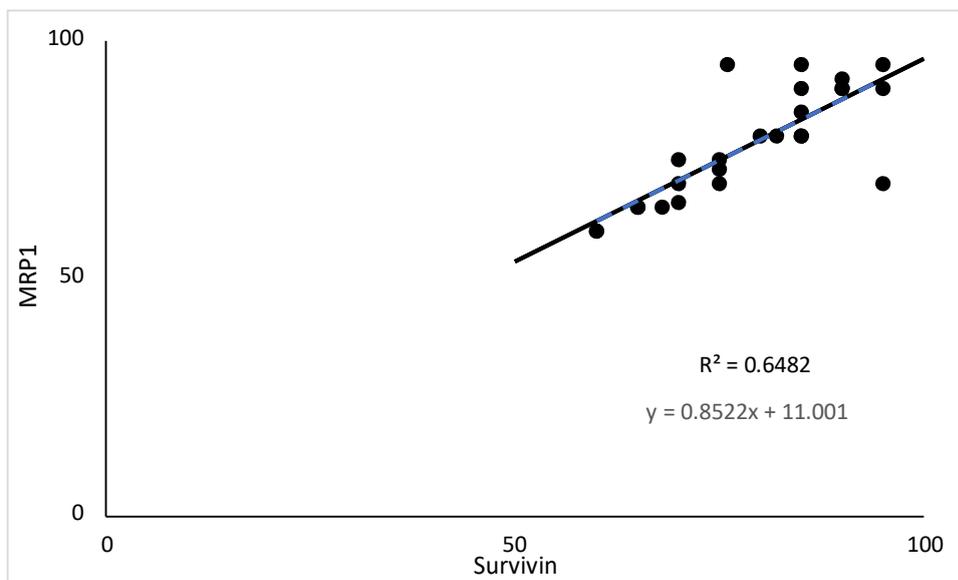
Slika 67. Pearson-ova korelacija survivina i MRP1/ABCC1 u grupi Remisija

Takođe i u grupi Relaps B1 je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 ($r = 0,787$; $p = 0,000$), (slika 68).

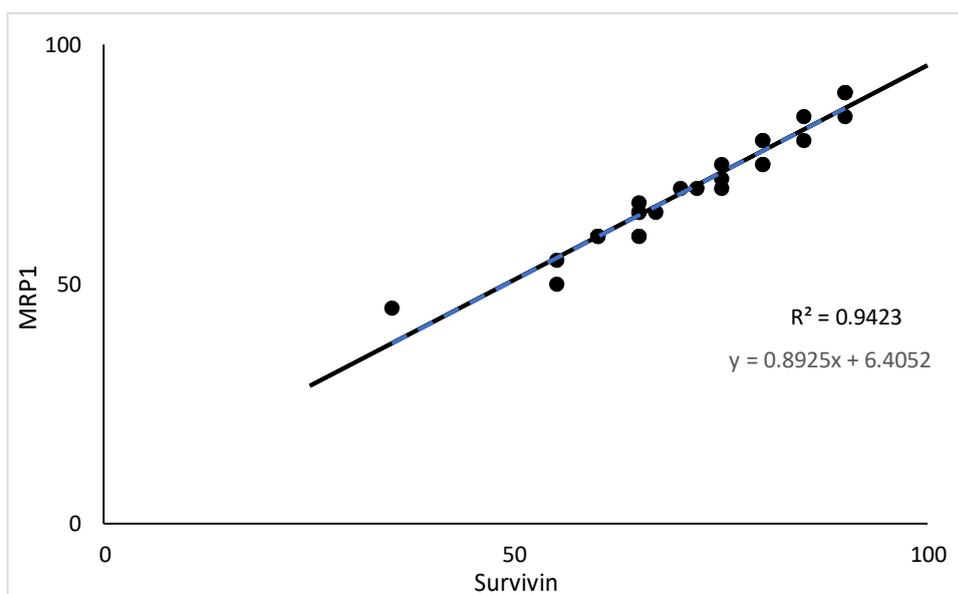


Slika 68. Pearson-ova korelacija survivina i MRP1/ABCC1 u grupi Relaps B1

Statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija utvrđena je i u grupi Relaps B2 između survivina i MRP1/ABCC1 ($r = 0,805$; $p = 0,000$), (slika 69). Takođe, i u grupi Refraktorni DLBCL je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između survivina i MRP1/ABCC1 ($r = 0,971$; $p = 0,000$), (slika 70).

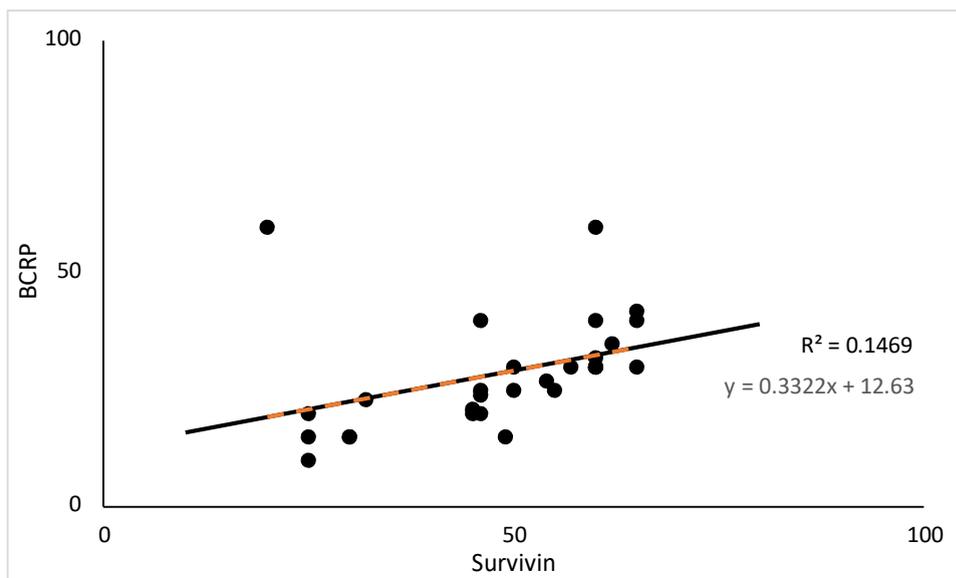


Slika 69. Pearson-ova korelacija survivina i MRP1/ABCC1 u grupi Relaps B2

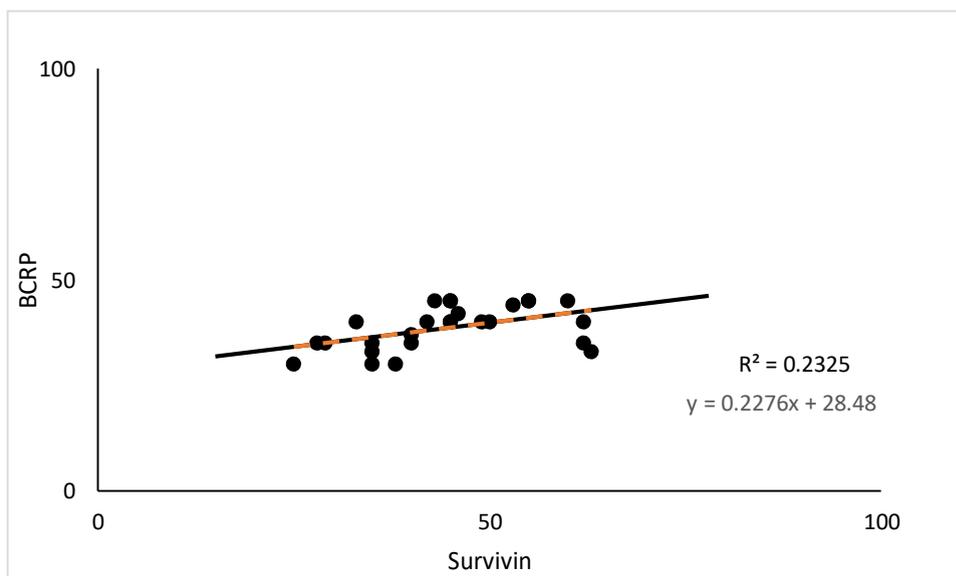


Slika 70. Pearson-ova korelacija survivina i MRP1/ABCC1 u grupi Refraktorni

Rezultati su pokazali da je između survivina i BCRP/ABCG2 u grupi Remisija postojala statistički značajna ($p < 0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija ($r = 0,383$; $p = 0,040$), (slika 71). Takođe, u grupi Relaps B1 je utvrđena statistički značajna ($p < 0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između ova dva posmatrana markera ($r = 0,482$; $p = 0,013$), (slika 72).

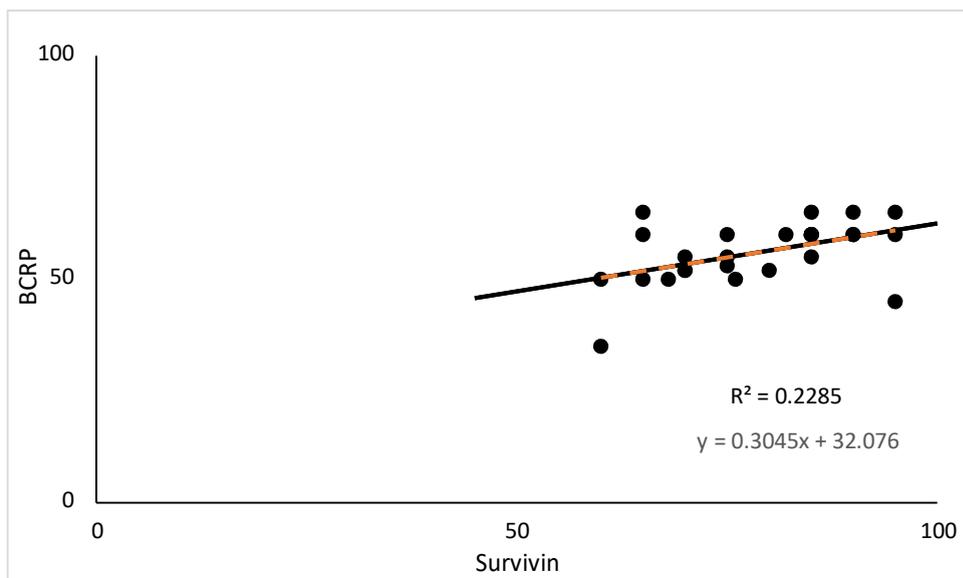


Slika 71. Pearson-ova korelacija survivina i BCRP/ABCG2 u grupi Remisija

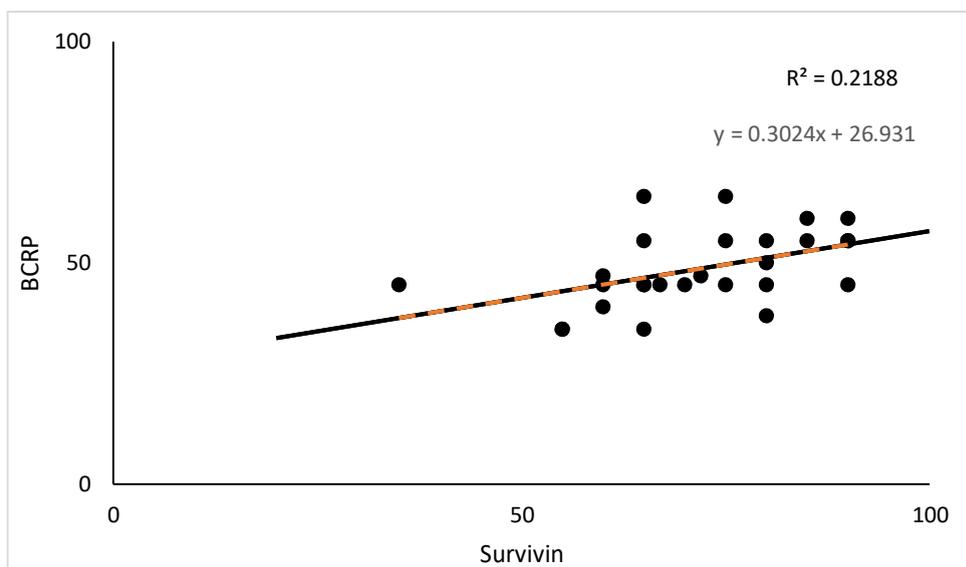


Slika 72. Pearson-ova korelacija survivina i BCRP/ABCG2 u grupi Relaps B1

I u grupi Relaps B2 je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između survivina i BCRP/ABCG2 ($r = 0,478$; $p = 0,014$), (slika 73). Takođe i u grupi Refraktorni je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) srednje jaka pozitivna korelacija između survivina i BCRP/ABCG2 ($r = 0,468$; $p = 0,014$), (slika 74).

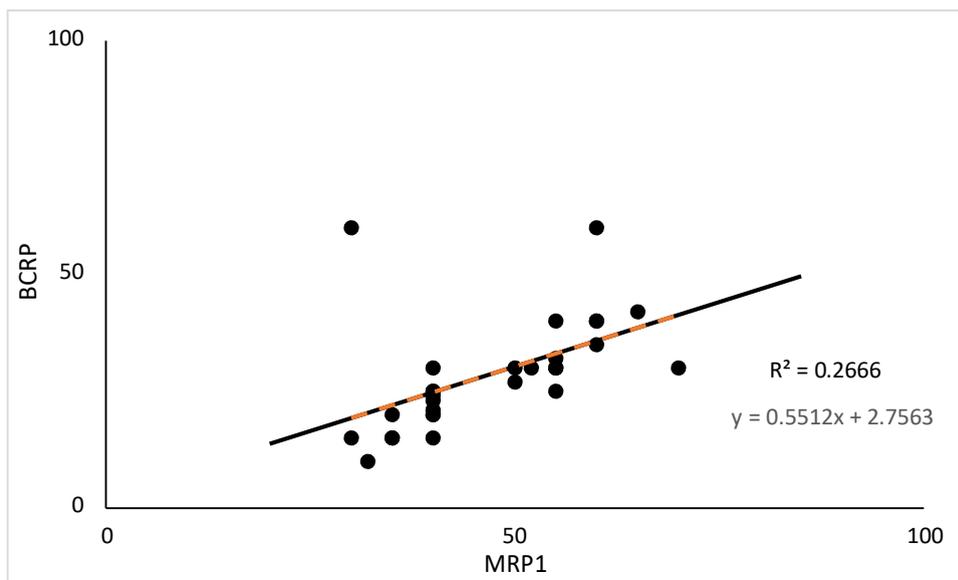


Slika 73. Pearson-ova korelacija survivina i BCRP/ABCG2 u grupi Relaps B2



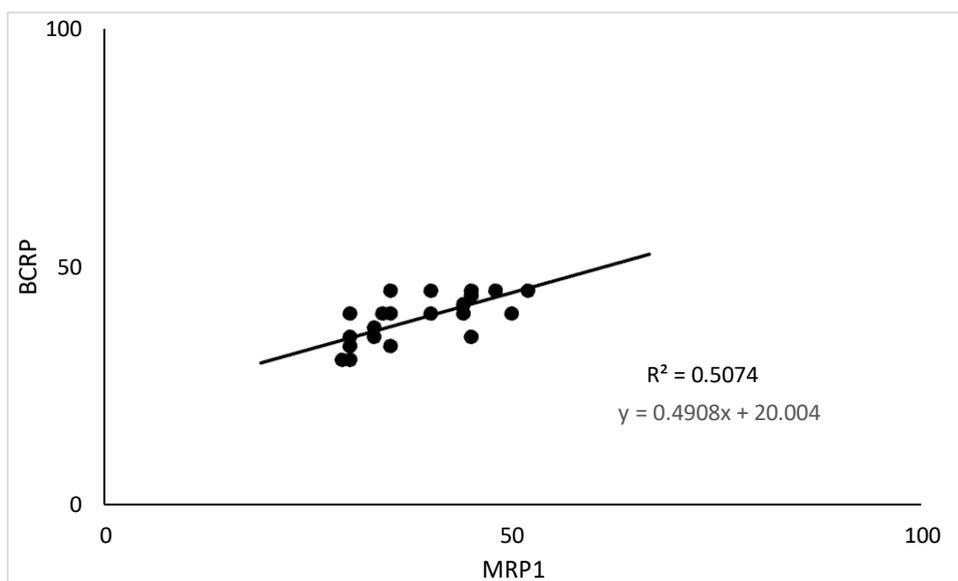
Slika 74. Pearson-ova korelacija survivina i BCRP/ABCG2 u grupi Refraktorni

U svim posmatranim grupama je urađena i analiza markera MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 primjenom *Pearson*-ove korelacije sa sljedećim rezultatima. U grupi Remisija je utvrđeno da je postojala statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 ($r = 0,516$; $p = 0,004$), (slika 75).



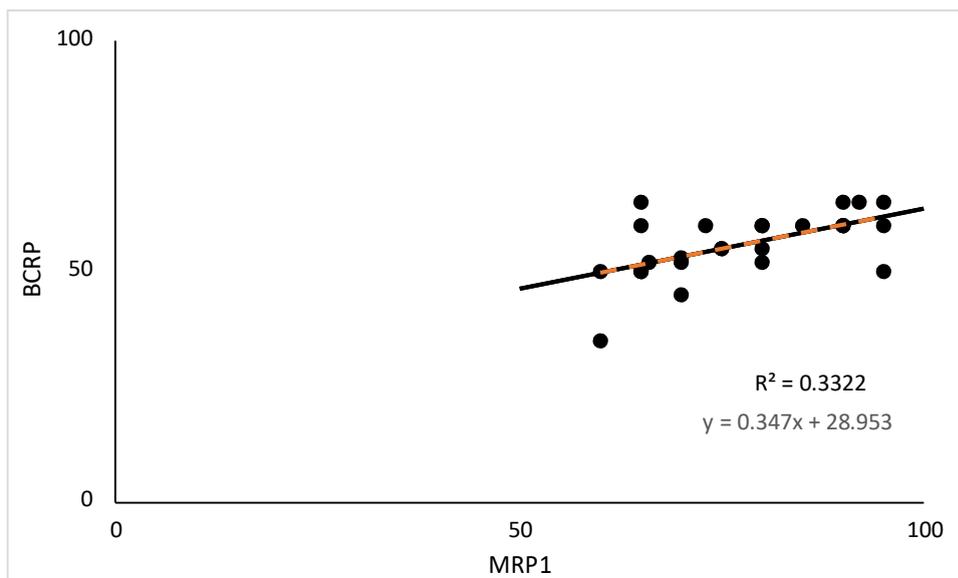
Slika 75. Pearson-ova korelacija MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 u grupi Remisija

Takođe, postojala je i statistički značajna ($p < 0,05$) vrlo jaka pozitivna korelacija između MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 u grupi Relaps B1 ($r = 0,712$; $p = 0,004$), (slika 76).



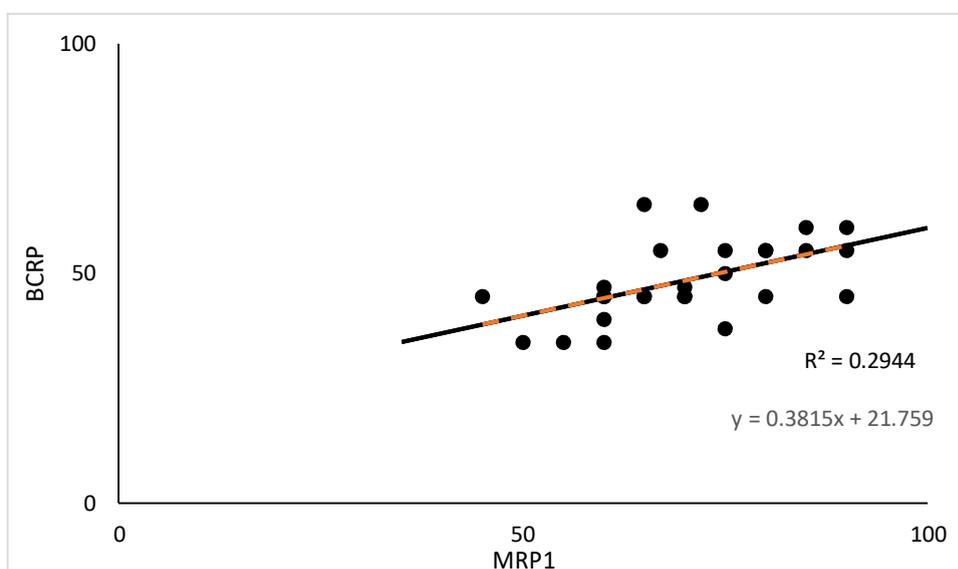
Slika 76. Pearson-ova korelacija MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 u grupi Relaps B1

U grupi Relaps B2 je utvrđeno postojanje statistički značajne ($p < 0,05$) vrlo jake pozitivne korelacije između MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 ($r = 0,576$; $p = 0,002$), (slika 77).



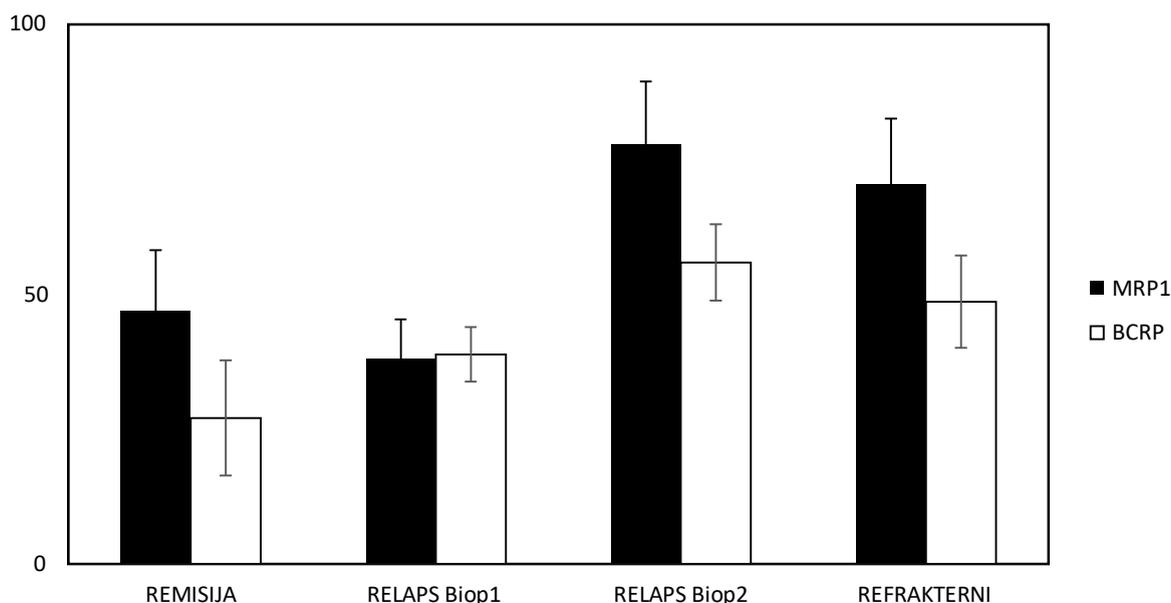
Slika 77. Pearson-ova korelacija MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 u grupi Relaps B2

Analiza posmatranih markera u grupi Refraktorni je utvrdila postojanje statistički značajne ($p < 0,05$) vrlo jake pozitivne korelacije između MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 ($r = 0,543$; $p = 0,003$), (slika 78).



Slika 78. Pearson-ova korelacija MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 u grupi Refraktorni

U svim posmatranim grupama istraživanja (Remisija, Relaps B1, Relaps B2, Refraktorni) maksimalnu ekspresiju MRP1/ABCC1 je pratio BCRP/ABCG2, (slika 79).



Slika 79. Ekspresija MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 kroz grupe

5.3. Prediktabilna vrijednost kliničkih, laboratorijskih i imunohistohemijskih parametara na pojavu određenog tipa DLBCL

Linearnom regresijom je ispitivana prediktabilna vrijednost kliničkih i molekularnih parametara u predviđanju nastanka jednog od oblika DLBCL (Remisija, Relaps, Refraktorni) odnosno rezistencije na prvu liniju imunohemioterapije. U analizu su uvršteni svi klinički parametri (starost, pol, ECOG, R-IPI, LDH, β 2-mikroglobulin, ektranodalna lokalizacija, broj ektranodalnih lokalizacija) i molekularni markeri pored Bcl-2 (Pgp/ABCB1, survivin, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2).

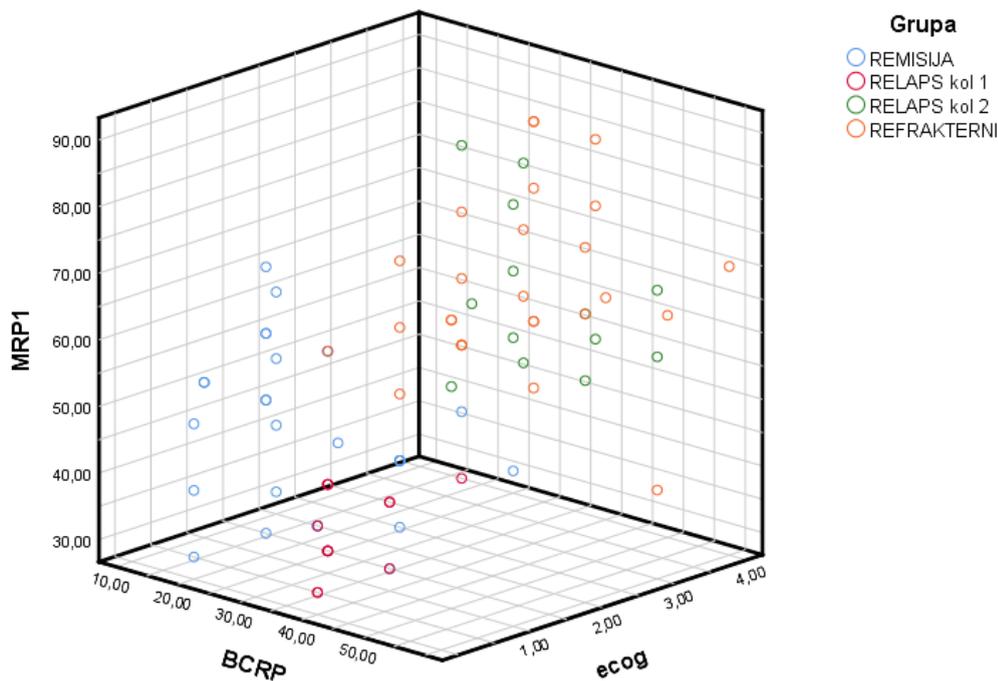
Na osnovu rezultata ANOVA testa ($F=44,315$; $p=0,000$) došlo se do zaključka da je regresioni model statički značajan ($p<0,05$) u predikciji grupe (stanja pacijenta).

Tabela 12. Prediktabilna vrijednost ECOG, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 u nastanku rezistencije na imunohemioterapiju kod DLBCL

Model	Nestandardni koeficijenti		Standardni koeficijenti		
	B	Standardna greška	β	t	Sig.
Konstanta	-0,774	0,309		-2,505	0,014
ECOG	0,412	0,102	0,316	4,062	0,000
MRP1/ABCC1	0,024	0,006	0,327	3,907	0,000
BCRP/ABCG2	0,033	0,007	0,374	4,740	0,000

$$grupa = 0,412 * ecog + 0,024 * MRP1 + 0,033 * BCRP - 0,774$$

Dobijeni model je pokazao da parametri ECOG, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 sa tačnošću od $R^2=63\%$ imaju najveću prediktabilnu vrijednost u pojavi određenog tipa DLBCL i rezistencije na prvu liniju imunochemoterapije, (tabela 12, slika 80).



Slika 80. Model prediktabilne vrijednosti ECOG, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 u nastanku rezistencije na imunochemoterapiju

Na osnovu dobijenih rezultata u tabeli iznad može se zaključiti:

- Da je statistički značajan uticaj ECOG ($p < 0,05$) na predikciju oblika bolesti,
- Da je statistički značajan uticaj MRP1/ABCC1 ($p < 0,05$) na predikciju oblika bolesti,
- Da je statistički značajan uticaj BCRP/ABCG2 ($p < 0,05$) na predikciju oblika bolesti.

Umjesto MRP1/ABCC1 se može koristiti i vrijednost survivina, jer su survivin i MRP1/ABCC1 u veoma jakoj pozitivnoj korelaciji ($r=0,846$; $p=0,000$).

6. DISKUSIJA

6.1 Značaj kliničkih i metaboličkih parametara u predviđanju rezistencije DLBCL na prvu liniju imunohemioterapije

Rezistencija na hemioterapijske lijekove predstavlja veliki problem u liječenju malignih bolesti. Postoji nekoliko mehanizama kojim se nastoji objasniti pojava rezistencije na lijekove, a to su: promjene u farmakokinetici i farmakodinamici, zajedno sa karakteristikama tumorskih ćelija i mikrookolinom. Rezistencija na lijekove može biti urođena (intrinsic), uslovljena karakteristikama samih tumorskih ćelija, koja kao takva postoji prije primjene bilo kakvog antitumorskog lijeka, ili stečena, koja nastaje u toku primjene antitumorskih lijekova [41,42].

Početak sedamdesetih godina prošlog vijeka prvi put je u liječenju pacijenata sa DLBCL primjenjena kombinovna hemioterapija na bazi antraciklina, a nakon toga je CHOP protokol postao standard za liječenje DLBCL zbog dobrog terapijskog odgovora, stope preživljavanja i niske toksičnosti [40,134,137]. Primjenom monoklonskog antitijela rituksimaba uz hemioterapijske protokole je postignut značajan napredak u liječenju pacijenata sa DLBCL, u vidu veće stope CR i stope preživljenja bez događaja [41,48, 44,134]. Međutim i dalje veliki procenat pacijenata sa DLBCL ostaje rezistentan na prvu liniju terapije. Pacijenti s relaps/rezistentnim DLBCL, kao i utvrđivanje mehanizma rezistencije na konvencionalnu hemioterapiju, predstavljaju veliki terapijski izazov. Stoga, rana identifikacija rezistencije na lijekove i terapijskih neuspjeha su od ključnog značaja za identifikaciju visokorizičnih pacijenata. [20, 70] Sve veći broj studija istražuje molekularne mehanizme koji leže u osnovi rezistencije na R-CHOP protokol kod pacijenata sa DLBCL, što je ključno za poboljšanje odgovora na liječenje [41]. Treba napomenuti da je oko 15-20% pacijenata, koji su refraktorni na R-CHOP terapijski protokol, imalo unakrsnu rezistenciju na druge hemoterapeutske režime sa lošim ishodom, i medijanom preživljavanja od 6 mjeseci.

DLBCL non-Hodgkin limfom se može javiti u bilo kom životnom dobu, mada se najčešće javlja u srednjoj i starijoj dobi, i medijan životne dobi je sedma decenija života. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je prosječna životna dob pacijenata bila 61 godinu, a to je u skladu sa opštim epidemiološkim podacima za DLBCL non-Hodgkin limfoma. Epidemiološki podaci u svijetu ukazuju da se ova bolest češće javlja kod osoba muškog pola u odnosu na žene (1,3:1),

a epidemiološkim podacima ovog istraživanja je utvrđeno da je u ukupnoj grupi pacijenata (S i R/R) gotovo dvije trećine pacijenata bilo muškog pola (67,9%).

S obzirom na karakteristike same bolesti (DLBCL) i životnog doba u kome se pojavljuje, i da sa godinama starosti dolazi do porasta hroničnih oboljenja, komorbiditeti od značaja su utvrđeni kod 62,3% svih pacijenata sa DLBCL u ovom istraživanju. Najčešća dijagnoza je bila arterijska hipertenzija, dijabetes, i tromboembolijske komplikacije. Učestalost tromboembolijskih komplikacija proizilazi iz činjenice da maligne bolesti u odmaklom kliničkom stadijumu imaju visok rizik za iste, te su u današnjim preporukama za liječenje malignih oboljenja nalaze i preporuke za prevenciju tromboembolijskih komplikacija.

Za DLBCL je karakteristično da se oko 60% pacijenata u svijetu dijagnostikuje kao diseminovani oblik bolesti (odnosno III i IV klinički stadijum), dok 40% pacijenata ima lokalizovanu bolest, odnosno bolest u I i II kliničkom stadijumu. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je 90% pacijenata bilo u III i IV kliničkom stadijumu, a samo 10% je imalo lokalizovanu bolest. U grupi pacijenata bez relapsa bolesti u momentu postavljanja dijagnoze bolesti, najveći broj pacijenata je bio u četvrtom kliničkom stadijumu (73,1%). Ovakvi podaci su u diskrepanci sa podacima u svijetu, a mogu biti povezani sa opštom prosvjedošću stanovništva, prepoznavanju i usmjeravanju ciljnih pacijenata sa primarnog nivoa zdravstvene zaštite prema sekundarnom i tercijarnom nivou, i dostupnost dijagnostičkih procedura. Veoma je bitno, kada je riječ o svim malignitetima pa tako i DLBCL, podizanje svijesti opšte populacije o limfomu. Shodno značaju bolesti, epidemiološkog i kliničkog značaja limfoma danas je u svjetu određeni Dan limfoma 15.septembra.

Uvođenje novih terapijskih modaliteta može da mjenja značaj ranije utvrđenih prognostičkih faktore. Uvođenjem rituksimaba uz CHOP terapiju, ranije korišteni model IPI je zadržao svoju vrijednost, ali je uvođenje novog prognostičkog skora R-IPI obezbjedilo tačniju informaciju o ishodu liječenja. Novi, revidirani, prognostički skor razlikuje tri grupe sa četverogodišnjim preživljavanjem koje varira od 55% do 94%. Od svih pacijenata uključenih u studiju, u momentu postavljanja dijagnoze bolesti, najveći broj pacijenata je imao R-IPI prognostički skor 3 (67,9%) što predstavlja parametar loše prognoze. Analizom revidiranog prognostičkog skora u grup pacijenata bez relapsa bolesti je utvrđeno da je najveći broj pacijenata imao R-IPI prognostički skor 2 i 3 (po 30,8%). R-IPI skor 2 se smatra parametrom dobre prognoze, dok R-IPI prognostički skor 3 predstavlja parametar loše prognoze sa uticajem na skraćeno ukupno preživljavanje za bolesnike koji su u ovoj grupi rizika.

DLBCL je najčešće lokalizovan u limforetikuloendotelnom tkivu. Međutim, primarno ili sekundarno mogu biti zahvaćena brojna ekstranodalna mjesta. Dosadašnja istraživanja su pokazala da se ekstranodalna bolest kod pacijenta sa DLBCL non-Hodgkin limfomom javlja u 40% pacijenata. U ovom istraživanju je utvrđeno da je gotovo $\frac{3}{4}$ pacijenata imalo ekstranodalnu lokalizaciju bolesti, od kojih najveći broj imao samo jednu ekstranodalnu lokalizaciju).

Povišenu vrijednost LDH je utvrđena kod 2/3 pacijenata, a vrijednost β 2-mikoglobulina kod 40%. U ovom istraživanju nije utvrđena prediktibilna vrijednost povišene vrijednost LDH i β 2-mikoglobulina na pojavu relapsa ili refrakternosti. Otokom ovog istraživanja je utvrđeno da ova dva metabolička parametra nisu pouzdani pokazatelji rezistencije na DLBCL na primjenjenu imunohemioterapiju.

Razlika među pacijentima sa različitim ECOG performans statusom na početku bolesti je uočena jedino po pitanju pojave refrakternog oblika bolesti. Ovaj status je bitan i radi određivanja intenziteta inicijalnog liječenja. Tako da se pacijente lošijeg inicijalnog opšteg stanja na početku liječe manje intenzivnom hemioterapijom uz redukciju doze pojedinih citostatika i povećanje vremenskog perioda između dvije primjene lijeka.

Ovo istraživanje je potvrdilo da klinički parametri poput ECOG i R-IPI nisu pouzdani pokazatelji rezistencije DLBCL na primjenjenu imunohemioterapiju.

Iako je u dosadašnjoj kliničkoj praksi IPI skor predstavljao standard u stratifikaciji rizika pacijenata sa DLBCL, ipak postoji heterogenost u preživljavanju unutar iste IPI grupe. Istraživanja u polju biološke heterogenosti i profila genske ekspresije su pokazala da IPI skor nije u potpunosti prediktivan za ishod liječenja pacijenata sa DLBCL [138, 139, 140]. Identifikacija novih, preciznih molekularnih prediktora preživljavanja je neophodna kako bi se identifikovali molekularni biomarkeri kojim će se pacijenti sa DLBCL stratifikovati u grupe rizika i individualizirati terapijske strategije uz poboljšanje preživljavanja [138]. Klasifikacijom Hansa i saradnika su pacijenti sa DLBCL podjeljeni na dvije grupe: GCB i ABC. Utvrđeno je da pacijenti sa genskom ekspresijom profila ABC imaju lošije preživljavanje u odnosu na GCB grupu. Prediktivna vrijednost Hansove klasifikacije pokazala se korisnom u nekim istraživanjima, dok druga istraživanja to nisu potvrdila [141-148]. Istraživanje *Rosenwald* i saradnika je utvrdilo postojanje specifičnih ćelijskih i nećelijskih genetskih potpisa koji su se razlikovali u zavisnosti od odgovora na standardnu terapiju. Bez obzira na molekularne prognostičke faktore i subklasifikaciju, molekularna istraživanja u polju

biohemijskih puteva će sigurno obezbjediti bolju identifikaciju preciznih terapijskih ciljeva [19].

Da bi preživjeo u različitim uslovima okruženja DLBCL intenzivno oslanja na snabdjevanje energijom [149]. Promjenljivo tumorsko mikrookruženje i veliki broj genomskih tumorskih mutacija može dovesti do metaboličkog reprogramiranja u malignim ćelijama [150]. Naime, aberantna ekspresija glikolitičkih enzima heksokinaze (HK2) i pojačana regulacija transportera glukoze (GLUT) ili monokarboksilnog transportera (MCT) povećavaju unos unutarćelijske glukoze i glikolitičku aktivnost. S druge strane, aerobna glikoliza, koja predstavlja glavni način proizvodnje energije kod malignih ćelija, je usko vezana sa aktivacijom protoonkogeno MYC i inaktivacijom tumor supresorskog gena p53, i stabilizacijom centralnog transkripcionog faktora poput *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF-1 α) [150, 151]. Brza proliferacija i preživljavanje DLBCL zahtjeva dostupnost hranjivih tvari i prekursora za biosintezu lipida, aminokiselina i nukleotida.

HK2 je prvi ključni enzim koji ograničava brzinu glikolize. Prekomjerna ekspresija HK2 dovodi do aerobne glikolize u malignim ćelijama čime se zadovoljavaju energetske zahtjevi brzorastuće ćelije u uslovima niskog nivoa kiseonika [150,152]. Uočeno je da je kod DLBCL povećana ekspresija HK2, i da pacijenti sa visokim nivom HK2 imaju lošiju prognozu [153].

GLUT1 ima ključnu ulogu u transportu glukoze kroz plazmatsku membranu, i njegova prekomjerna ekspresija dovodi do povećanog unosa glukoze u ćeliju sa posljedičnim rastom i proliferacijom tumorskih ćelija [150]. Jedan od mehanizama aktivacije GLUT1 je transkripcija ovisna o NF- κ B, koja dovodi do većeg glikolitičnog protoka kod ćelija DLBCL [150].

MCT4 ima prekomjernu ekspresiju u stromi povezanoj sa tumorom i značajan je kao eksporter laktata. Maligno transformisani limfociti koji se nalaze u okolini mogu koristiti laktat za stvaranje ATP procesom oksidativne fosforilacije (OXPHOS). Osim MCT4, MCT1 je odgovoran za unos laktata i može predstavljati terapijski cilj kod DLBCL. Tumorsko mikrookruženje izloženo laktatu ima visoku glikolitičku aktivnost i pridonose nakupljanju laktata i niskog nivoa piruvata [150].

Ekspresija laktat dehidrogenaze A (LDHA) u malignim tkivima je pozitivno regulisana transkripcionim faktorima MYC i HIF-1 α .. LDHA indirektno utiče na preživljavanje tumora štiteći ga od oštećenja reaktivnim oblicima kisika (ROS). Takođe, LDHA može direktno

inhibirati apoptozu kroz stimulaciju ekspresije antiapoptotskih proteina Mcl-1 i Bcl-XL. Nakupljanje laktata se dovodi u vezu sa izbjegavanjem imunološkog odgovora od strane tumorskih ćelija i povećanjem proliferacije [150].

Onkogen MYC utiče na metabolizam glukoze i ima značajnu ulogu u procesu rasta, diferencijacije, proliferacije i preživljavanja ćelija DLBCL. Stimulisan velikim brojem gena, onkogen MYC dovodi do prekomjerne ekspresije laktat dehidrogenaze, MCT1 i GLUT1 čime se povećava glikoliza [150].

Kod DLBCL je utvrđena povezanost između metabolizma glukoze i p53 [154]. Mutacija p53 pojačavaju ekspresiju HK2 i GLUT, aktivaciju onkogena Myc, Ras i Akt dovodeći do povećanja aerobne glikolize [155].

Reprogramiranje metabolizma aminokiselina igra ključnu ulogu u zadovoljavanju povećanih nutritivnih potreba za energijom i ćelijske biosinteze. Kod ćelija limfoma jedan od bitnijih metabolizama aminokiselina je metabolizam glutamina. Maligne ćelije kako bi održale nivo povećane ćelijske proliferacije uzimaju izvanćelijski glutamin preko transportera glutamina SLC1A5 i SLC7A5. Glutaminoliza je karakteristika karcinoma, i ovim procesom uz pomoć glutaminaze (GLS) se glutamin pretvara u glutamat i amonijak. Krajnji produkt glutaminolize je laktat i ATP. Istraživanja su pokazala da kombinovana primjena MCT1 i GLS inhibitora dovodi do povećane ćelijske smrti kod DLBCL. Manjak glutamin može pokrenuti apoptozu kod ćelija limfoma. MYC i HIF-1 α smanjuju mitohondrijsko disanje u uslovima manjka kisika, a prekomjerna ekspresija MYC stimuliše pretvaranje glukoze u laktat, i stvarajući glutamin kao izvor energije u ćelijama tumora [150].

p53 doprinosi preživljavanju ćelije nakon metaboličkog stresa. Izvor energije u nedostatku glutamina može biti arginin. Protein p53 dovodi do povećane regulacije ekspresije transportera arginina SLC7A3 i povećanja unutarćelijskog nivoa arginina čime se pokreće rast ćelije [150].

Moduliranje metabolizma lipida u vidu *de novo* sinteze masnih kiselina je jedan od načina na koji ubrzano proliferišuća tumorska ćelija obezbjeđuje povećanu potrebu za energijom, formira ćelijske i membrane organela, i kasnije vrši onkogenu signalizaciju [156]. U posljednje vrijeme je sve više dokaza o povezanosti između sinteze masnih kiselina (FASN) i limfoma. Uddin i saradnici su predložili da farmakološka inhibicija FASN ili blokiranje FASN sa iRNK može indukovati apoptozu i potisnuti c-Met onkogen u DLBCL ćelijama [157]. FASN

je ključni enzim potreban za metabolizam prehranbenih ugljenihidrata u masne kiseline, i njegova ekspresija je veoma niska kod normalnih tkiva. Prekomjerna ekspresija FASN je nezavisan prognostički faktor kod DLBCL liječenih R-CHOP protokolom i povezan je sa lošim kliničkim ishodom [150]. SREBP-1c je glavni transkripcioni regulator biosinteze masnih kiselina, koji se veže na FASN promotor i aktivira ekspresiju FASN gena. U uslovima hipoksije dolazi do povećane ekspresije SREBP-1c uz izostanak SREBP aktivnosti i povećane sinteze zasićenih masnih kiselina. SREBP ima ulogu da zaštiti tumorske ćelije od lipotoksičnosti [150]. Oštećenje homeostaze masnih kiselina ukazuje na značajnu ulogu SREBP signalizacije u metabolizmu tumorskih ćelija i dodatno ističe potencijalnu primjenu ciljanih molekula za desaturaciju masnih kiselina koje će ograničiti rast tumorskih ćelija.

Lipidne nakupine su specifični regioni obogaćeni holesterolom, sfingolipidima i gangliozidima. Kod tumorskih ćelija lipidne nakupine su uključene u prijenos signala, interakciju protein-protein i imunološko preživljavanje. Holesterol koji potiče iz mevalonatnog puta je važan sastavni dio ćelijskih membrana, sa značajnim uticajem na regulisanje fluidnosti ćelijske membrane i stvaranja lipidnih nakupina [158]. Statini imaju uticaj na smanjenje nivoa prekursora holesterola, mevalonata, što za posljedicu ima poremećaj signalnih puteva. Osim statina, za snižavanje nivoa holesterola kod pacijenata sa DLBCL primjenjivani su BCR inhibitori i SYK inhibitor R406 u kombinaciji sa nanočesticama sličnim lipoproteinima visoke gustoće (HDL NP) [159]. Smanjeno preuzimanje ili stvaranje holesterola može poremetiti funkcije lipidnih nakupina i moglo bi biti potencijalno ciljno mjesto za lijekove koji će djelovati na metabolizam malignih ćelija.

Unos egzogenih masnih kiselina je još jedan način na koji maligna ćelija dobija masne kiseline. Transmembranski protein CD36 (FAT) se može preko intracelularnih i ekstracelularnih vezikula transportovati do organela ili ćelijskih membrana čime se olakšava translokacija masnih kiselina, održava homeostaza energetskog metabolizma i potiče rast i progresija malignih ćelija [150]. Inhibicijom CD36 se remeti metabolizam slobodnih masnih kiselina i reguliše imunološka funkcija tumora, kao što je upalni odgovor [159]. Prekomjerna ekspresija CD36 i FASN se mogu naći kod DLBCL i bitni su prediktori preživljenja kod liječenih rituksimabom. Unos lipida posredovan sa CD36 je povezan sa hemosenzitivnošću kod DLBCL pacijenata i prognozom.

6.2. Prognošički značaj esencijalnih molekula apoptoze i ABC-efluks pumpi u nastanku rezistencije kod DLBCL

Mehanizmi na kojima se temelji rezistencija na hemioterapiju kod limfoma uključuje različite mehanizme, poput epigenetskih promjena, prekomjerne ekspresije efluksnih ABC proteina, mutacije ciljanih gena i promjene metaboličkih puteva, uz povećanje otpornosti limfoma na hemioterapiju, ciljanu molekularnu terapiju, imunoterapiju, antitijela PD-1/PD-L1 i CAR-T [150].

Važnu ulogu u razumjevanju rezistencije DLBCL na imunohemioterapiju ima metaboličko reprogramiranje, energetski metabolizam i metabolizam signalnih puteva u limfopoezi.

Putevi prijenosa signala uključujući BCR, NF- κ B i PI3K/AKT/mTOR, igraju bitnu ulogu u regulaciji metabolizma i preživljavanju tumorskih ćelija u promjenjivom mikrookruženju [150].

Postoji jasna genetska i biološka razlika između ABC-DLBCL i GCB- DLBCL. GCB-DLBCL je porijekla centroblasta germinalnog centra, dok je ABC-DLBCL nastaje konstitutivnom aktivacijom NF- κ B signalnog puta uz nastanak ekspresije NF- κ B ciljanih gena koji utiču na aktivnost NF- κ B i na proliferaciju i preživljenje. Aktivacija NF- κ B signalnog puta ima značajnu ulogu za ishode liječenja pacijenata sa DLBCL. Tako aktivacija ovog puta sa p50 i p65 ima isti mehanizam rezistencije na R-CHOP protokol kod ABC-DLBCL [81]. Aberacije poput MYD88, BCL-10, CARD11, CD79A, cyclin D2, CCR7, IRF4, FLIP, NFKBIA, TRAF2 i TNFAIP3 na ćelijama ABC-DLBCL omogućavaju osnovnu aktivaciju NF- κ B signalnog puta. Ćelije sa MYD mutacijom je izložena konstitutivnoj aktivaciji NF- κ B signalnog puta. Zbog toga, pojedine komponente NF- κ B signalizacije su značajna, ciljna, terapijska mjesta. Lenalidomid i talidomid koji imaju antiangiogenetsku i pleotropnu imunomodulatornu funkciju, imaju direktno toksično dejstvo na tumorsku ćeliju vršeći inhibiciju „nizvodne“ NF- κ B signalizacije [81]. U dva istraživanja faze II kod 112 novodijagnostikovanih pacijenata sa DLBCL primjena lenalidomida sa R-CHOP protokolom je smanjila loš odgovor u preživljavanju kod ABC-DLBCL [81]. Pacijenti sa GCB-DLBCL podtipom i odsustvom ekspresije NF- κ B imaju bolju prognozu, što se može objasniti povećanom osjetljivošću ćelija na hemioterapiju zbog nedostatka aktivacije NF- κ B i redukovanja antiapoptotičkih signala u maligno transformisanim limfocitima [143]. Međutim, i kod pacijenata sa GCB-DLBCL može postojati ekspresija NF- κ B i posljedično smanjeno preživljavanje, što ukazuje da ćelije

limfoma mogu postati otporne na hemioterapiju iako imaju dobar prognostički fenotip ukoliko je NF- κ B put aktiviran [143].

Rituksimab inhibira konstitutivnu aktivaciju NF- κ B dovodeći na taj način do osjetljivosti tumorskih ćelija na hemioterapiju i Fas indukovanu apoptozu. Ovakav efekat nastaje kao posljedica smanjene fosforilacije I κ B pod uticajem rituksimaba, smanjenja I κ K aktivnosti i NF- κ B DNA vezane aktivnosti [160].

U istraživanju *Chapuy* i saradnika identifikovano je 5 grupa pacijenta sa DLBCL, i utvrđeno je da su pacijenti grupe C3 ili C5 liječeni sa R-CHOP protokolom imali značajno lošije preživljavanje u odnosu na pacijente grupe C1, C2 ili C4. Primjena inhibitora BTK je značajno poboljšala ishode liječenja pacijenta grupe C5, dok epigenetski modifikujući agensi mogu biti efikasni u grupi C3 [81].

Prema istraživanju *Schmitz* i saradnika podjela DLBCL na podgrupe: MCD, BN2 i N1, imala je i različite ishode liječenja R-CHOP terapijom. Pacijenti N1 i MCD podgrupe su imali značajno lošiji ishod u odnosu na EZB i BN2 podgrupu DLBCL nakon primjene R-CHOP. Petogodišnje ukupno preživljenje za MCD, N1, BN2 i EZB podgrupe je bilo 26%, 36%, 65% i 68%. Lijekovi koji imaju za cilj aktivaciju NF- κ B poput inhibitora Brutonove tirozin kinaze (BTK) mogli bi se istraživati u BN2 i MCD podgrupi [81].

Spektar antitumorskih lijekova koje Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 efluksom izbacuju iz unutarćelijske tečnosti obuhvata strukturno različite molekule, što je neuobičajno za efluksne pumpe, budući da transporteri pokazuju određeni stepen supstratne specifičnosti. Tako supstrate za P-glikoprotein predstavljaju sljedeći hemoterapeutici: vinca alkaloidi (vinblastin i vinkristin), antraciklini (doksorubicin i daunorubicin), taksani (paklitaksel i docetaksel), podofilotoksini (etopozid i tenipozid), kampotecini (topotekan), kao i inhibitori tirozin-kinaze (imatinib i gefitinib), sa kojim ABC-proteini stupaju u kompleksnu interakciju, budući da inhibitori tirozin-kinaze zauzvrat mogu modulirati efluksnu aktivnost ABC-proteina.

Spektar supstrata MRP1/ABCC1 obuhvata vinca-alkaloide (vinblastin i vinkristin), antracikline (doksorubicin i daunorubicin), podofilotoksini (etopozid i tenipozid), kampotecini (topotekan), kao i inhibitori tirozin-kinaze (imatinib i gefitinib ali u manjoj mjeri od R-glikoproteina). Takođe predstavlja efluks pumpu za metotreksat.

BCRP/ABCG2 ima spektar sličan kao i prethodna dva. Transportuje podofilotoksine (etopozid i tenipozid), kaptopotecine (tapotekan i irinotekan), mitoksantron a mutirani oblik R482G transportuje i antracikline (daunorubicin i doksorubicin).

U ovom istraživanju je testirana ekspresija 3 ABC transportera koji su vezana za pojavu višestruke rezistencije na lijekove, a oni se koriste kao supstrat za mnoge antitumorske lijekove, koji se koriste kao sastavni dio imunohemioterapijskih protokola prve linije DLBCL.

Osim ABC proteina testirani su i Bcl-2 i survivin, koji imaju značajnu ulogu u apoptozi, odnosno u njenom odlaganju. Analiza ekspresije Bcl-2, survivina, Pg/ABCB1, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2 je ukazala da su molekularni mehanizmi relevantniji za dijagnozu i predikciju rezistencije na prvu liniju liječenja kod DLBCL.

U ovom istraživanju je utvrđen visok nivo ekspresije Bcl-2 kod jedne trećine pacijenata. Marker Bcl-2 je pokazao sličan nivo ekspresije u grupi koja je imala terapijski odgovor na primjenjenu imunohemioterapiju i kod *de novo* dijagnostikovanih sa kasnijim relapsom bolesti. Značajno veća ekspresija Bcl-2, tokom ovog istraživanja, je uočena u grupi koja je bila primarno refraktorna ili u relapsu DLBCL. Bcl-2 biomarker je bitan za konstitutivnu aktivaciju NFκB koji može povećati ekspresiju više anti-apoptotičkih proteina, uključujući Bcl-2. Utvrđeno je da je prekomjerna ekspresija Bcl-2 povezana s t(14;18) translokacijom pronađenom u podtipu GCB DLBCL, koji ima povoljniju prognozu. Takođe, utvrđeno je da je visoka ekspresija Bcl-2 povezana s NFκB u podtipu ABC DLBCL, koji ima lošu prognozu [89,92].

Nekoliko studija sugeriraju da loši prognostički efekti visoke ekspresije Bcl-2 mogu biti prevaziđeni primjenom rituksimaba [106,107]. Efikasnost primjene rituksimaba kod pacijenta sa visokom ekspresijom Bcl-2 je prvi put uočen u maloj studiji DA-EPOCH sa i bez rituksimaba. Veća studija od 292 pacijenta iz ključne randomizovane studije koja je ispitivala primjenu CHOP naspram R-CHOP protokola kod starijih pacijenata, verifikovala je prisutnu visoku ekspresiju Bcl-2 kod 66% pacijenata. Ekspresija Bcl-2 je bila u korelaciji sa ishodom [107] U prosječnom praćenju od dvije godine, primjena R-CHOP protokola je bila povezana sa značajno boljim ukupnim preživljavanjem u poređenju sa primjenom CHOP protokola kod Bcl-2-pozitivnih pacijenata (67% prema 48%), ali ne i kod Bcl-2-negativnih pacijenata.

Primjena rituksimaba dovodi do povoljnih odgovora kod pacijenata sa DLBCL koji ekspresiraju NFκB. Primarni medijastinalnih velikih B-ćelijskih limfoma koji prekomjerno

ekspimiraju NF κ B ukoliko se liječi rituksimabom u kombinaciji značajno poboljšava ishod pacijenata [108, 109]. In vitro studije takođe sugerišu da rituksimab može inhibirati NF κ B put u B-ćelijama limfoma i senzibilišu ih na apoptozu izazvanu hemioterapijom [110].

Survivin je imao sličan nivo ekspresije, koji nije bio statistički značajan ($p > 0,05$) između grupe koja je imala terapijski odgovor na primjenjenu imunohemioterapiju i *de novo* dijagnostikovanih sa kasnijim relapsom bolesti, kao ni između grupa primarno refraktorna bolest i grupe sa relapsom DLBCL. Ekspresija survivina je bila značajno veća kod relaps/refraktorni nasuprot remisija relaps sa inicijalnom biopsijom. Slična situacija je utvrđena i za marker MRP1/ABCC1 koji je imao gotovo identičnu ekspresiju po grupama kao i survivin.

Postoji veliki broj dokaza koji su potvrdili dvostruku funkciju survivina u inhibiciji apoptoze i regulaciji mitoze. Survivin inhibira apoptozu specifičnim vezanjem na terminalne efektorske proteaze ćelijske kaspazu-3 i -7 [138]. Takođe njegova ekspresija dodatno reguliše G2/M fazu ćelijskog ciklusa [138]. Survivin je jedva detektabilan u terminalno diferenciranim normalnim tkivima, ali je značajno prisutan u embrionalnim tkivima. Na temelju podataka iz velike analize humanih transkripata survivin je prepoznat kao četvrti najviše ekspimirani protein u humanom malignom tkivu i predstavlja prediktor loše prognoze kod velikog broja solidnih tumora i malignih hematoloških oboljenja [138]. Kod nekih malignih oboljenja visoka ekspresija survivina je faktor rizika za rezistenciju na hemioterapiju i posljedičnu lošu prognozu [160]. Prekomjerna ekspresija survivina je u korelaciji sa smanjenom stopom remisije i preživljavanjem kod pacijenata s akutnom limfoblastnom leukemijom u dječijem uzrastu, odraslih pacijenata s akutnom mijeloidnom leukemijom i T-ćelijskom leukemijom kod odraslih pacijenata [160].

Međutim, kod DLBCL prognostička vrijednost ekspresije survivina je neodređena i protivrječna. Nekoliko studija je potvrdilo da je preživljavanje neovisni prognostički pokazatelj kod DLBCL sa povećanom ekspresijom survivina [138]. S druge strane istraživanja Mitrović i saradnika, kao i Liu i saradnika su pokazala da je ekspresija survivina na preživljavanja prognostički ne tako značajna [138]. Do sada objavljene studije su pokazale da je survivin ekspimiran kod hematoloških tumora, a ekspresija survivina je identifikovana kao moguć prognostički faktor kod pacijenata sa DLBCL liječenih CHOP protokolom, jer je bila povezana sa lošijim ukupnim preživljavanjem [134]. Značajno povećano preživljavanje pacijenata sa DLBCL nakon dodavanja rituksimaba CHOP protokolu zahtjevalo je ponovnu procjenu

značaja survivina kao prognostičkog faktora [134]. Međutim do sada objavljeni rezultati istraživanja o prognostičkom značaju survivina kod DLBCL liječenih R-CHOP pokazali su svojevrsnu protivriječnost [134].

U multicentričnom istraživanju Liu i saradnika na velikoj kohorti pacijenata ispitivana je ekspresija survivina i njegov prognostički značaj kod 463 pacijenata sa novodijagnostikovanim DLBCL liječenih R-CHOP protokolom u periodu od 2000 do 2010.godine. Na osnovu profiliranja ekspresije gena i/ili imunohistokemijskim Visco-Youngovim algoritmom, pacijenti su bili podjeljeni u dva podtipa GCB i ABC. Granične vrijednosti za povećanu ekspresiju svakog markera je utvrđena preko krivulje osjetljivosti (*engl. receiver operating characteristic, ROC curves*) i/ili X-Tile analizom, a u cilju efektivnijeg načina prikazivanja odnosa senzitivnosti i specifičnosti. Vrijednost praga za Ki-67 je bila 70%, a granična vrijednost za visoku ekspresiju survivina definisana je kao pozitivnost 25% tumorskih ćelija [134]. U ovom istraživanju prosječna životna dob je bila 64 godine sa rasponom od 16 do 92 godine. Većina pacijenata, ukupno 59%, je bilo starije od 60 godina, a 58% su bili muškarci. Ukupno 227 pacijenata (49%) je bilo subklasifikovano kao GCB podtip, a 233 pacijenata (51%) je pripadalo podtipu ABC. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji survivina između pacijenata sa GCB i ABC DLBCL, dok je ekspresija survivina bila povezana sa višim IPI skorom, većim brojem ekстранodalnih lokalizacija i višim Ki-67 indeksom. Ukupno preživljavanje je bilo kraće kod pacijenata sa ABC DLBCL kod kojih je bio eksprimiran survivin. Ovo istraživanje je utvrdilo da je survivin, kao nezavisan prognostički faktor imao uticaj na preživljavanje i loš ishod kod pacijenata sa ABC DLBCL utičući na mitozu i proliferaciju tumorskih ćelija [134].

U istraživanju Marković i saradnici, na uzorku 56 novodijagnostikovanih pacijenata sa DLBCL non-Hodgkin limfomom je utvrđeno da je 39,28 % pacijenata imalo povišenu ekspresiju survivina, i da je visoka ekspresije survivina bila u korelaciji sa smanjenom stopom remisija i kraćim preživljavanjem pacijenata s DLBCL koji su liječeni hemioterapijom. U ovom istraživanju su bili dostupni ograničeni podaci o pacijentima liječenim imunochemioterapijom. Takođe, rezultati su pokazali da je prekomjerna ekspresija survivina bila u značajnoj korelaciji s odgovorom na terapiju i preživljavanjem pacijenata sa nodalnom lokalizacijom DLBCL liječenih imunochemioterapijom, što ukazuje da rituksimab ne može nadvladati negativan prognostički učinak prekomjerne ekspresije survivina kod ovih pacijenata. Dokazano je da postoji povećan rizik za pojavu relapsa bolesti kod pacijenata koji su bili survivin pozitivni [161]. Kod većine survivin-pozitivnih je uočeno citoplazmatsko

bojenje, dok je mješano (citoplazma i jedro) bojenje bilo prisutno kod manjeg broja pacijenata. Bez obzira na subcelularnu lokalizaciju, nije pronađena statistički značajna razlika u stopama remisije i OS između citoplazmatskog i nuklearnog bojenja. Raniji literaturni podaci o prognostičkom značaju lokalizacije survivina (citoplazma ili jedro) su bili kontradiktorni. Naknadno je pokazano da samo citoplazmatska lokalizacija korelira sa antiapoptotičkom funkcijom survivina i da je osjetljivost ćelija na hemioterapijske lijekova veća ukoliko je survivin lokalizovan u jedru[161]. Takođe, uočena je i značajna razlika u ekspresiji survivina između GCB- i ABC-DLBCL tipa što je pridonijelo lošijoj prognozi kod ABC-DLBCL pacijenata. U ovom istraživanju nije utvrđena značajna korelacija između prekomjerne ekspresije survivina i dobro poznatih kliničko-patoloških prognostičkih parametara kod DLBCL: klinički stadijum bolesti, IPI skor, velika tumorska masa, proliferativne aktivnosti. Ali je uočena značajna korelacija između ekстранodalne lokalizacije i broja ekстранodalnih lokalizacija i survivina.

Nasuprot tome Mitrovic i saradnici u svom istraživanju su dokazali da survivin nije imao prognostički značaj kod 57 pacijenata sa DLBCL liječenih R-CHOP protokolom [134].

Ovakvi rezultati mogu proizilaziti iz odabira populacije, relativno male veličine uzorka, različitih graničnih nivoa ekspresije i perioda praćenja. Da bi se procjenio prognostički i kliničko-patološki značaj survivina kod DLBCL *Zhang* i saradnicu su uradili meta analizu kojom su obuhvaćene studije fokusirane na korelaciju ekspresije survivina s preživljavanjem, kliničko-patološkim karakteristikama i stopom CR kod pacijenata sa DLBCL non-Hodgkin limfomom. Kliničko-patološki parametri su uključivali: dob, pol, klinički stadijum bolesti, prisustvo/odsustvo B simptoma, ECOG status, nivo LDH, ekстранodalnu lokalizaciju bolesti i imunološke podtipove (GCB- i ABC-DLBCL). Model ekspresije survivina procijenjen je imunohistohemijskom metodom. Ova meta-analiza je pružila čvrste dokaze o prognostičkoj i kliničko-patološkoj vrijednosti survivina kod pacijenata sa DLBCL. Dokazana je značajna korelaciju između ekspresije survivina s lošom prognozom, uključujući i lošije ukupno preživljavanje (OS), uznapredovali klinički stadijum, visok IPI skor, povišen nivo LDH, infiltracija koštane srži, kao i smanjena stopa kompletnih remisija (CR) kod pacijenata s DLBCL [138]. Međutim, za provjeru ovih rezultata su potrebne dodatne multicentrične prospektivne studije sa standardizovanim metodama i uz dugoročno praćenje pacijenata.

Istraživanje autora *Watanuki-Miyauchi* i saradnika je pokazalo da pacijenti sa pozitivnom ekspresijom survivina i u GCB i ABC-DLBCL podtipu imaju lošiju prognozu [161].

Pg/ABCC1 je imao sličan nivo ekspresije u svim posmatranim grupama, i u grupi koja je imala terapijski odgovor na primjenjenu imunohemioterapiju i kod novodijagnostikovanih sa kasnijim relapsom bolesti, kao i u grupi sa relapsom i primarno refraktornih. Iako je ekspresija ove poznate *effluks* pumpe bila povećana u ovom istraživanju nije dokazana njena dijagnostička i prognostička vrijednost za nastanak relapsa.

Ekspresija ovog markera se nije razlikovala po grupama. I za marker BCRP/ABCG2 je utvrđeno da nije postojala razlika ekspresije u svim grupama. Vrijednost za rezistenciju na imunohemioterapiju u rezistentnoj i relapsnoj bolesti.

Istraživanjem je utvrđeno da istovremeno ispitivanje Bcl-2, survivina i MRP1/ABCC1 daje najbolju prediktabilnu vrijednost za rezistenciju na imunohemioterapiju u relapsnoj i refrakturnoj bolesti.

6.3. Status rezistencije prema imunohemioterapiji i ciljanoj molekularnoj terapiji

Iako DLBCL ima visok stepen izlječenja, neuspjeh liječenja ostaje glavni terapijski izazov. Trenutno postoje dobri genetski, imunohistohemijski i serumski pokazatelji kojim se može prognozirati ishod pacijenata sa DLBCL. Međutim, ključna je pravilna klasifikacija pacijenata sa DLBCL i identifikacija grupe pacijenata koji neće imati povoljan terapijski odgovor na primjenu R-CHOP protokola. Usavršene savremene dijagnostičke procedure poput citogenetike, imunohistohemije i fluorescentne *in-situ* hibridizacije (FISH) omogućavaju dodatnu podtipizaciju DLBCL, ali vrlo heterogena priroda bolesti i dalje izbjegava pokušaj precizne i potpune podtipizacije. Tako npr. *Schmitz* i saradnici sugeriše da je subklasifikacija DLBCL nepotpuna i zbog postojanje TET2 genetske mutacije, koji ovaj tip DLBCL ubrajaju u neklasifikovani DLBCL.

I dalje postoje situacije da su pacijenti sa DLBCL skloni recidivu izvan standardnih, pa čak i preciznih terapijskih modaliteta, te su potrebni stalni naporu u razumjevanju osnovne patofiziologije bolesti.

Postoji nekoliko terapijskih modaliteta koji su postigli dobar terapijski efekat kod R/R DLBCL a koji podrazumjevaju primjenu imunoterapije i inhibitore molekularnog puta. Osim

monoklonskih anti-CD20 antitijela, imunoterapiju čine i inhibitori kontrolne tačke (ICI) poput PD-1/PD-L1 antitijela i CAR-T [150]. Novi inhibitori molekularnog puta koji se koriste za liječenje DLBCL uključuju BTK inhibitore, Bcl-2 inhibitore i PI3K/Akt/mTOR inhibitori. Međutim, pojava rezistencije na lijekove tokom ili nakon terapije je neizbježna. Nakon liječenja rituksimabom smanjena ekspresija CD20 jedan je od mehanizama rezistencije na rituksimab. Takođe, prekomjerna ekspresija efluksnog ABC proteina Pgp/ABCB1 kod DLBCL često dovodi do MDR i loše prognoze kod pacijenata sa DLBCL. Primjena rituksimaba dovodi do povećanog izlučivanja IL-17A, koji blokira ekspresiju p53 i sprečava apoptozu izazvanu rituksimabom. Prekomjerna ekspresija PDK4 može smanjiti ekspresiju CD20 i dovesti do rezistenciju na rituksimab kod DLBCL. Korištenje inhibitora PDK4 dikloroacetata može povećati efikasnost rituksimaba [150]. Ekspresija CD47 je prisutna kod oko 53,7% DLBCL pacijenata i njegova prekomjerna ekspresija je povezana sa lošijim ishodom [81]. Primjena humaniziranog anti-CD47 monoklonskog antitijela Hu5F9-G4 (Magrolimab) za inhibiciju ekspresije CD47 i njegovim dodavanje R-CHOP protokolu može prevazići rezistenciju na R-CHOP u DLBCL [81]. Magrolimab se nakon liječenja selektivno veže na CD47 ekspresiran na malignim ćelijama, usljed čega dolazi do aktivacije makrofaga, aktivacije antitumorskog imunološkog odgovora T limfocita i maligne ćelije posredovane T-limfocitima.

CAR-T terapija je djelotvorna kod polovine R/R DLBCL pacijenata [150]. Rezistencija na terapiju CAR-T ćelijama je je povezana sa interakcijom između CD4+ T limfocita i tumorskog mikrookruženja. Naime, hipoksični uslovi u tumorskom mikrookruženju mogu dovesti do imunosupresivnog okruženja u kome je inhibirana aktivnost antitumorskih ćelija poput CD8+T limfocita, NK ćelija i M1 polarizovanih makrofaga povezanih sa tumorom (TAM) [151]. Na ovaj način tumorska mikrookolina sprečava regrutovanje T limfocita, blokira aktivnost CAR-T ćelija i omogućava preživljavanje ćelija limfoma. Istraživanja su pokazala da se ovakvi mehanizmi mogu prevazići dodavanjem lijekova kao ICI, TKI i imunomodulatornih lijekova [150].

BCR signalni put utiče na stvaranje, diferencijaciju i razvoj B ćelijskih limfoma. Mutacije komponenti BCR puta MYD88 sa *wilde* tipom CD79 α/β kod ABC podtipa je povezana sa primarnom rezistencijom na ibrutinib. Prekomjerna ekspresija CD79 β također može izazvati rezistenciju na ibrutinib. Rezistencija na inhibitore BTK može biti stečena i često dovodi do parcijalnih remisija kod liječenih pacijenata sa limfomom. Aberantna aktivacija NF- κ B puta ili pojačana aktivnost PI3K/AKT puta dovode do stečene rezistencije na ibrutinib.

Eksperimentalna istraživanja su pokazala da maligne ćelije kod DLBCL koje su otporne na ibrutinib eksprimiraju visok nivo antiapoptotskog Bcl-2, zbog čega bi primjena terapijskih opcija koje imaju za cilj Bcl-2 bila od značaja u prevazilaženju rezistencije. Tumorska mikrookolina ima važnu ulogu kod ibrutinib-rezistenog DLBCL. Strategije poput kombinacije inhibitora BTK sa PI3K inhibitorima, SYC ili Bcl-2 inhibitorima, se mogu koristiti u cilju prevazilaženja ove rezistencije [150].

Familija Bcl-2 proteina ima centralnu ulogu u regulaciji apoptoze kod hematoloških maligniteta i promjena ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2 predstavlja jedan od ciljnih mjesta koje može poboljšati ishod liječenja malignih oboljenja. Venetoklaks je najrašireniji inhibitor BCL2, koji je odobren za liječenje hronične limfocitne leukemije, ali je i bitna terapijska opcija u pojedinim podtipovima non-Hodgkin limfoma kao što su DLBCL; mantl *cell* limfom (MCL) i folikularni limfom (FL). Istraživanja su pokazala da je ukupna stopa odgovora na liječenje sa venetoklaksom kod non-Hodgkin limfoma 44%. Mehanizam rezistencije na venetoklaks kod DLBCL je povezana s prekomjernom ekspresijom drugih antiapoptotskih Bcl-2 proteina (BCL-XL i MCL-1). Indukcija snažne aktivacije NF- κ B puta sa IL-10 iz mikrookruženja dovodi do povećane ekspresije antiapoptotskih proteina MCL-1 i Bcl-XL, i rezistencije na Bcl-2 inhibitore. Strategije koje dovode do prevazilaženja otpornosti na venetoklaks podrazumjevaju primjenu kombinacija koje smanjuju ekspresiju MCL-1, dodavanje inhibitora PI3K/ AKT/mTOR puta ili liječenjem s rituksimabom. Kombinacija venetoklaksa s dasatinibom može dovesti do poremećaja aktivnosti CD40 i time prevazići rezistenciju na venetoklaks .[150].

PI3K δ je visoko eksprimiran u B ćelijama zbog čega je PI3K potencijalno ciljno terapijsko mjesto kod limfoma. Inhibitori PI3K (Idelalisib, Duvelisib, Copanlisib, Copanlisib i SAF-248) su dostupni za liječenje DLBCL. Istraživanja su pokazala da je određena grupa pacijenata razvila rezistenciju na PI3K inhibitore nakon dužeg liječenja. Mehanizmi rezistencije na inhibitore PI3K su različiti i temelje se na intrinzične (primarne) kao i na stečene modalitete rezistencije na lijekove. C-X-C hemokinski receptor 4 (CXCR4) se dovodi u vezu sa migracijom tumorskih ćelija i invazivnošću malignih B ćelija. CXCR4 ima centralnu ulogu za primarnu rezistenciju na idelalisib kod ABC podtipa.

Dugotrajno liječenje dovodi do mogućnosti da maligne ćelije aktiviraju alternativne signalne puteve zbog čega je teško blokirati tumorski rast sa jednom malom molekulom. Strategije prevazilaženja rezistencije na PI3K inhibitore podrazumjevaju kombinacije

inhibitora PI3K sa drugim lijekovima, poput CXCR4 antagonista i idelalisiba kod DLBCL. Da bi se prevazišla stečena rezistencija mogu se kombinovati rituksimab, BTK inhibitora ili BCL2 inhibitora.

Racionalna kombinacija lijekova može dovesti do prevazilaženja rezistencije na lijekove i poboljšati ishod pacijenata sa DLBCL, ali i drugih malignih oboljenja.

Svaki podtip DLBCL ima nezavisan, različit terapijski odgovor na primjenu standardnog terapijskog modaliteta imunohemioterapije po protokolu R-CHOP. Molekularni signalni putevi poput BCR, PI3K-Akt, NF- κ B i JAK-STAT3 čine osnovu rezistencije na R-CHOP terapiju, dok su COO, klonalna evolucija, tumorsko mikrookruženje, MDR i epigenetika važni za biološko razmatranje. Identifikacija novih molekularnih ciljeva mogla bi biti mjesta podložna djelovanju preciznih lijekova poput BTK inhibitori kod BN2, MCD, A53; lenalidomid kod MCD, BN2; BET (*bromodomeain and extra-terminal*) inhibitori kod MCD, BN2; JAK1 (Janus kinaza 1) inhibitori kod MCD, IRAK4 (*interleukin-1 receptor-associated kinasa 4*) kod MCD podtipa, EZH2 inhibitori kod EZB sa EZH2 mutacijom, venetoklaks ili navitoklaks kod MCD [19]. Nove ciljane terapije koje su temeljene na ovim mehanizmima trenutno se koriste u prekliničkim i kliničkim ispitivanjima DLBCL-a. Iako postoje samo skromni dokazi koji podupiru njihovu ulogu kao alternative prve linije za R-CHOP, ne smiju se podcijeniti u liječenju rezistentnog DLBCL-a.

Istorijski gledano, različite strategije usmjerene na prevazilaženje specifičnih mehanizama rezistencije na lijekove su pokušavane, ali s ograničenim uspjehom. Postojanje koncepta rezistencije na lijekove poput razvoja mehanizama specifičnih za lijek, kao što su prekomjerna ekspresija membranskih pumpi, povećani hvatači slobodnih radikala, mutacije intracelularnih target molekula i/ili povećana aktivnost reparativnih mehanizama DNK aktivnost, nastoji da objasni ograničavanje citotoksičnog oštećenja. Smatra se da su važne determinante osjetljivosti na hemioterapiju nalaze unutar puteva apoptoze. Apoptoza ili programirana ćelijska smrt i njena modulacija je krajnji put ćelijske smrti za većinu klasa lijekova.

Disregulacija ćelijske proliferacije i apoptoze regulisane genetskim izmjenam dovode do stvaranja maligne ćelije, a u velikoj mjeri kontrolisane su kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa i indukcijom i supresijom apoptoze. Abnormalnost ovih puteva može odrediti osjetljivost tumorskih malignih ćelija na citotoksične efekte radioterapije i hemioterapije. Ove abnormalnosti koje se javljaju u regulaciji ćelijskog ciklusa i apoptoze su iskorisšene u

dizajniranju novih terapijskih pristupa. Ipak, osnovu za većinu novih strategija liječenja DLBCL i dalje čine principi hemioterapije, uključujući farmakologiju, klasičnu rezistenciju na lijekove i kinetiku tumorskih malignih ćelija.

Disregulacija survivina kod DLBCL važan je korak u patogenezi DLBCL, zbog čega survivin predstavlja vrlo atraktivnu metu za nove terapije koje bi mogle dovesti do daljnjeg poboljšanja u liječenju pacijenata sa DLBCL. Obzirom da je do sada opisano najmanje pet spojenih varijanti survivina s različitim funkcijama, potrebna su daljnja veća istraživanja kako bi se ispitala ekspresija svih izoformi survivina i njihov prognostički značaj kod DLBCL pacijenata. Direktna odnos ekspresije survivina sa bolesnikovim lošijim ishodom klinički je koristan u smislu eventualne primjene inhibitora survivina kod pacijenata sa R/R DLBCL, što može otvoriti nove terapijske mogućnosti u liječenju pacijenata sa DLBCL. Najbolje proučeni inhibitor survivina je mala molekula YM155, koja je pokazala značajan inhibitoran efekat na rast i snažno antitumorsko djelovanje u ćelijskoj liniji [134]. U kliničkom ispitivanju faze II primjena YM155 kao monoterapije imala je dokazanu sigurnost i podnošljivost, ali ograničenu efikasnost kod pacijenata sa refrakternim DLBCL [134]. Predkliničke studije su pokazale da YM155 plus rituksimab, bendamustin ili inhibitor STAT3 ima jasne inhibitorne efekte na DLBCL. Potencijalnu kliničku korist kombinacije supresora survivina i rituksimaba je neophodno procijeniti u podgrupi pacijenata ABC DLBCL sa prekomjenom ekspresijom survivina [134]. Osim terapijskih sredstava kojim je cilj survivin, postoje i druga sredstva poput peptidnih vakcina protiv tumorskih ćelija. Peptidne vakcine su obećavajuće molekule, koje su izvedene iz survivina i mogu dovesti do imunološki odgovor povećanjem CD8+ citotoksičnih T limfocita specifičnih za survivin. Survivin-2B80-88 i Survivin-2B77 su se pokazali kao bezbjedni uz određeni terapijski potencijal karcinoma dojke i želudca, i kolorektalnog karcinoma. SVN53-67/M57 (SurVaxM) sadrži više HLA epitopa zbog čega se može primjeniti kod velike populacije pacijenata, i ima značajan klinički potencijal kod pacijenata sa gliomom. DPX-Survivac vakcina ima dobar sigurnosni profil i kliničku efikasnost kod karcinoma jajnika u kliničkim ispitivanjima faze I, a sprovode se i ispitivanja faze II kod pacijenata sa DLBCL. Nepotpuni Freundov adjuvans i interferon tipa I (IFN α) dva su adjuvansa koji mogu povećati antitumorski imunitet specifičan za survivin [134].

U idealnom slučaju, uz bolje razumijevanje biološkog i molekularnog mikrokruženja DLBCL, detaljniji sistem klasifikacije i prilagođeni tretmani će biti dostupni u bliskoj budućnosti.

7. ZAKLJUČCI

- Rezistencija DLBCL prema prvoj liniji (imuno)hemoterapije i dalje predstavlja značajan problem u liječenju, prognozi i ishodu pacijenata. Uobičajeni klinički parametri i standardna dijagnostika DLBCL, vredovani pojedinačno ili zajedno, nemaju značajnu prediktabilnu vrijednost u nastanku rezistencije prema imunohemioterapiji.
- DLBCL koji je primarno rezistentan, odnosno, refraktoran, uključujući relapsni oblik karakteriše povećana ekspresija ABC protein (Pgp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2) odgovornih za terapijsku rezistenciju malignih bolesti, kao i antiapoptotskih protein kao što je survivin.
- Značajan je molekularni zapis koji je utvrđen kod pacijenata s refraktornim i/ili relapsnim DLBCL, koji se ogleda u povećanoj ekspresiji survivina, MRP1/ABCC1 i BCRP/ABCG2, markera koji su u snažnoj pozitivnoj korelaciji sa povećanom ekspresijom sa standardnim Bcl-2 i slaboj sa Pgp/ABCB1.
- Povećana i istovremena ekspresija survivina i MRP1/ABCC1 kod pacijenata sa refraktornim i/ili relapsnim DLBCL, ukazuje da oni predstavljaju potencijalne dijagnostičke molekularne markere u dijagnostici i predviđanju rezistencije prema (imuno)hemioterapiji.
- Klinički parametar ECOG, BCRP/ABCG2, i survivin ili MRP1/ABCC1, imaju najveću prediktabilnu vrijednost za određeni tip DLBCL. Ostali klinički parametri, uključujući i standardne metaboličke parametre (LDH i β 2 mikroglobulin), kao i Pgp, pojedinačno i u sveukupnoj analizi nemaju značajnu prediktabilnu vrijednost za određeni tip DLBCL u kontekstu rezistencije prema (imuno)hemioterapiji.
- Analiza dodatnih ili novih intracelularnih molekula i metaboličkih parametara je neophodna u dijagnostici DLBCL rezistentnog prema (imuno)hemioterapiji, ali i kao osnova razvoja nove ciljano molekularne terapije koja će biti usmjerena na ključne i višestruke signalne puteve maligne ćelije limfoma.

8. LITERATURA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiel J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid Tissues. IARC: Lyon 2008.
2. Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;523-31.
3. Aurer I, Dominis M, Stern-Padovan R, Huić D, Santek F. Diagnosis and therapy of lymphomas--Croatian consensus. *Lijec Vjesn*. 2007;129(5):111-117.
4. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016. 127:2375-90.
5. Sant M; Allemani C; Tereenu C et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype results of the HAEMACARE project. *Blood* 2010; 116:3724-34.
6. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2015; 26:116-25.
7. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010;116(12):2040-45.
8. Sehn LH and Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* 2015; 125: 22-32.
9. Rovira J, Valera A, Colomo L, Setoain X, Rodriguez S, Martinez-Trillos A, Gine E, Dlouhy I, Magnano L, Gaya A, Martinez D, Martinez A, Campo E and Lopez-Guillermo A. Prognosis of patients with diffuse large B cell lymphoma not reaching complete response or relapsing after frontline chemotherapy or immunochemotherapy. *Ann Hematol* 2015; 94: 803-12.
10. Popp C, Staniceanu F, Micu G, Nichita L, Mateescu RM, Dimitriui L and Sticlaru L. Longstanding ulcerative colitis complicated with mantle-cell lymphoma transformed in diffuse large B cell lymphoma. *Rom J Intern Med* 2014; 52: 176-182.
11. Blonska M, Zhu Y, Chuang HH, You MJ, Kunkalla K, Vega F and Lin X. Jun-regulated genes promote interaction of diffuse large B-cell lymphoma with the microenvironment. *Blood* 2015; 125: 981-991.
12. Swerdlow SH. Diagnosis of 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014; 2014: 90-99.
13. Davis CC, Cohen JB, Shah KS, Hutcherson DA, Surati MJ, Valla K, Panjic EH, Handler CE, Switchenko JM and Flowers CR. Efficacy and tolerability of

- anthracycline-based therapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015; 15: 270-277.
14. Candelaria M, Labardini-Mendez J, Ramirez-Ibarguen AF, Aviles-Salas A, Estrada-Lobato E, Meneses-Garcia A and Mohar A. Impact of a federal program on response rate & survival, in a cohort of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Analysis in a single national reference institution in Mexico. *Rev Invest Clin* 2014; 66: 399-406.
 15. Szekely E, Hagberg O, Arnljots K, Jerkeman M. Improvement in survival of diffuse large B-cell lymphoma in relation to age, gender, International Prognostic Index and extranodal presentation: a population based Swedish Lymphoma Registry study. *Leuk Lymphoma* 2014. 55:1838-1843.
 16. Testoni M, Zucca E, Young KH, Bertoni F. Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2015; 26:1069-80.
 17. Flowers CR, Sinha R, Vose JM. Improving outcomes for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(6):393-408.
 18. Hunt KE, Reichard KK. Diffuse large B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(1):118-124.
 19. Ta R, Yang D, Hirt C, Drago T, Flavin R. Molecular diagnostic review of diffuse large B-cell lymphoma and its microenvironment. *Diagnostics* 2022; 12:1087.
 20. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503–11.
 21. Young RM, Shaffer AL 3rd, Phelan JD, Staudt LM. B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma . *Semin Hematol.* 2015; 52:77-85.
 22. Pasqualucci L. The genetic basis of diffuse B-cell lymphoma. *Cur Open Hematol* 2013; 20:336-44.
 23. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma treatment approaches in the molecular era. *Nar Rev Clin Oncol* 2014;11:12-23.
 24. Shafer AL III, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol.*2012; 30:565-610.
 25. Fu K, Weisenburger DD, Choi WWL, Perry KD, Smith LM, Shi X, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26:4587–94.
 26. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2018;378:1396–407.
 27. Bai M, Skyrilas A, Agnantis NJ, Kamina S, Tsanou E, Grepic C et al. Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell-like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index, high expression of the proapoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the antiapoptotic protein bcl-xl. *Mod Pathol.* 2004;17:847-56.
 28. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* 2018;24:679-90.

29. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103:275-82.
30. Friedberg JW, Fisher RI. Diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008;22(5):941-ix.
31. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. 2022 Apr 8. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. [Table], Table 4. Ann Arbor Staging Classification for Hodgkin Lymphoma. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65726/table/CDR0000062933_557/
32. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, Klasa R, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007;109:1857-61.
33. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group [published correction appears in *J Clin Oncol* 2000;18(11):2351]. *J Clin Oncol.* 1999;17(4):1244.
34. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(5):579-586.
35. De Yong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as prerequisite for broad clinical applications-A study from Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol.* 2007; 25:805-12.
36. Biasoli I, Morais JC, Sheliga A, Milito CB, Romano S, Land M et al. CD10 and Bcl-2 expression combined with the International Prognostic index can identify subgroups of patients with diffuse large-cell lymphoma with very good or very poor prognoses. *Histopathology.* 2005; 46: 328-33.
37. Miller TP, Leblanc M, Spier C et al. CHOP alone compared to CHOP plus radiotherapy for early stage aggressive non-Hodkin's lymphomas: Update of the South-west Oncology Group (SWOG) randomized trial. *Blood* 2001;98:3024-30.
38. Horning SJ, Weller E, Kim K et al. Chemotherapy with or without radiotherapy in limited-stage diffuse aggressive non Hodgkin's lymphoma: Eastern Cooperative Oncology Group study 1484. *J Clin Oncol* 2004; 22:3023-8.
39. Bonnet C, Filler G, Mounier N et al. CHOP alone compared with CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma in elderly patients: A study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2007; 25:356-63.
40. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1993. 328:1002-6.
41. 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.

42. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:3121-7.
43. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lenfelder E et al. Six versus eight cycles of weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 2008; 9:105-16.
44. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pottengell R, Trneny M, Imrie K et al. CHOP like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by The MabThera International Trial (MinT) Group. *Lancet Oncol* 2006; 7: 379-91.
45. Bachy E, Salles G. Treatment approach to newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol* 2015; 52: 107–118.
46. Amin AD, Peters TL, Li L, Rajan SS, Choudhari R, Puvvada SD et al. Diffuse large B-cell lymphoma: can genomics improve treatment options for a curable cancer? *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*. 2017; 3:a001719. doi:10.1101/mcs.a001719.
47. Salles G, Barrett M, Foa R, Maurer J, O'Brien, Valente N, et al. Rituximab in B-cell hematologic malignancies: A review of 20 years of clinical experience. *Adv Ther* 2017; 34:2232-73.
48. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepage G, Plantieri I, Catagne S et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2010; 116:2040-5.
49. George A, Tam CS and Seymour JF. High-risk diffuse large B-cell lymphoma: can we do better than rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone? *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 2575-6.
50. Zhang J, Chen B and Xu X. Impact of rituximab on incidence of and risk factors for central nervous system relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2014; 55: 509-14.
51. Ding H, Jin X, Ding N, Fu Z, Song Y and Zhu J. Single nucleotide polymorphisms of CD20 gene and their relationship with clinical efficacy of R-CHOP in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell Int* 2013; 13: 58.
52. Thieblemont C, Gisselbrecht C: Second-line treatment paradigms for diffuse large B-cell lymphomas. *Current oncology reports* 2009; 11:386-93.
53. Kevalramani T, Zelentz AD, Nimer SD et al. Rituximab and ICE as second-line therapy before autologous stem cell transplantation for relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2004;103:3684-8.
54. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG: Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:714-26.
55. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531–44.
56. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2019;380:45-56.

57. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2545–54.
58. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1-2 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(1):31–42.
59. Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 1979; 63:1727-33.
60. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329:1318-27.
61. Longo DL, DeVita VT Jr, Duffey PL, Wesley MN, Ihde DC, Hubbard S, et al. Superiority of ProMACE-CytaBOM over ProMACE-MOPP in the treatment of advanced diffuse aggressive lymphoma: Results of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 1991; 9:25-38.
62. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: Optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* 2015;125:22–32.
63. Melchardt T, Hufnagl C, Weinstock DM, Kopp N, Neureiter D, Trankenschuh W, et al. Clonal evolution in relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphoma is characterized by high dynamics of subclones. *Oncotarget* 2016;7:51494–502.
64. Zou L, Song G, Gu S, Kong L, Sun S, Yang L, et al. Mechanism and treatment of rituximab resistance in diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Cancer Drug Targets* 2019;19:681–7.
65. Linderoth J, Eden P, Ehinger M, Valcich J, Jerkeman M, Bendahl PO, et al. Genes associated with the tumour microenvironment are differentially expressed in cured versus primary chemotherapyrefractory diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:423–32.
66. Xu-Monette ZY, Li L, Byrd JC, Jabbar KJ, Manyam GC, Maria de Winde C, et al. Assessment of CD37 B-cell antigen and cell of origin significantly improves risk prediction in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2016;128:3083–100.
67. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2015;126:2193–201.
68. Advani R, Flinn I, Popplewell L, Forero A, Bartlett NL, Ghosh N, et al. CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and rituximab in non-Hodgkin’s lymphoma. *N Engl J Med* 2018;379:1711–21.
69. Bouwstra R, He Y, de Boer J, Kooistra H, Cendrowicz E, Fehrmann RSN, et al. CD47 expression defines efficacy of rituximab with CHOP in non-germinal center B-cell (non-GCB) diffuse large B-cell lymphoma patients (DLBCL), but not in GCB DLBCL. *Cancer Immunol Res* 2019;7 10:1663–71.
70. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of STAT3 in the tumour microenvironment: Tumour immunology. *Nat Rev Immunol* 2007;7:41–51.
71. Rui L, Drennan AC, Ceribelli M, Zhu F, Wright GW, Huang DW, et al. Epigenetic gene regulation by Janus kinase 1 in diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:E7260-7.

72. Mraz M, Zent CS, Church AK, Jelinek DF, Wu X, Pospisilova S, et al. Bone marrow stromal cells protect lymphoma B-cells from rituximab-induced apoptosis and targeting integrin $\alpha 4 \beta 1$ (VLA-4) with natalizumab can overcome this resistance. *Br J Haematol* 2011;155:53–64.
73. Yin H, Zhong F, Ouyang Y, Wang Q, Ding L, He S. Upregulation of ADAM12 contributes to accelerated cell proliferation and cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* 2017;22:527–35.
74. Nishikori M. Classical and alternative NF- κ B activation pathways and their roles in lymphoid malignancies. *J Clin Exp Haematopathol* 2005; 45: 15-24
75. Gilmore TD, Kalaitzidis D, Liang MC *in* sur. The c-REL transcription factor and B- cell proliferation: a deal with devil. *Oncogene* 2004; 23: 2275-86.
76. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Guix XM. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005; 446: 475-82
77. Schmid JA, Birbach A. I κ B kinase β (IKK β /IKK2/I κ BK β)- A key molecule in signaling to the transcription factor NF- κ B. *Cytokine & Growth Factor Rev* 2008; 19: 157-65.
78. Juvekar A, Manna S, Ramaswami S *in* 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.
79. 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.
80. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor B activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 2001; 194:1861-74. Doi:10.1084/jem.194.12.1861.
81. Wang L, Li LR. R-CHOP resistance in diffuse large B-cell lymphoma: biological and molecular mechanisms. *Chin Med J* 2020; 134:253-60.
82. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57:727-41.
83. Lynch A, Harvey J, Aylott M, Nicholas E, Burman M, Siddiqui A, et al. Investigations into the concept of a threshold for topoisomerase inhibitor-induced clastogenicity. *Mutagenesis* 2003; 18:345-53.
84. Cole DE, Balis FM, Lowe ES, et al. Pharmacokinetics (pk) and tolerance of doxorubicin (dox) and etoposide (etop) during treatment of aggressive B-cell lymphomas indicate doses need not be routinely reduced for hepatic dysfunction. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; 24 (abstr).

85. Kwak LW, Halpern J, Olshen RA, Horning SJ. Prognostic significance of actual dose intensity in diffuse large-cell lymphoma: Results of a treestructured survival analysis. *J Clin Oncol* 1990; 8:963-77.
86. Meyer RM, Quirt IC, Skillings JR, Cripps MC, Bramwell VH, Weinerman BH, et al. Escalated as compared with standard doses of doxorubicin in BACOP therapy for patients with non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329:1770-6.
87. Kaiser U, Uebelacker I, Abel U, Birkmen J, Trumper L, Schmalenberg H, et al. Randomized study to evaluate the use of high-dose therapy as part of primary treatment for "aggressive" lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20:4413-9.
88. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, Salles G, Coiffier B, Brice P, et al. Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 protocol—A groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte study. *J Clin Oncol* 2000; 18:3025-30.
89. Wilson WH, Grossbard ML, Pittaluga S, Cole D, Pearson D, Drbohlav N, et al. Dose-adjusted EPOCH chemotherapy for untreated large B-cell lymphomas: A pharmacodynamic approach with high efficacy. *Blood* 2002; 99:2685-93.
90. Skipper HE, Schabel FM Jr, Wilcox WS. Experimental evaluation of potential anticancer agents. XIII. On the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia. *Cancer Chemother Rep* 1964; 35:1-111.
91. Dave SS, Fu K, Wright G, Lam L, Grenier TC, Weisenberger DD, et al. Gene expression distinguishes Burkitt lymphoma from other aggressive lymphomas and identifies patients who are highly curable with intensive chemotherapeutic regimens. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2000; 106:415.
92. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346:1937-47.
93. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Braziel RM, Banks PM, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: A prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 1994; 83:1460-6.
94. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 328:1002-6.
95. Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, et al. 2-weekly vs. 3-weekly CHOP with and without etoposide in for patients 60 years of age with aggressive non-Hodgkin's lymphoma (NHL): Results of the completed NHL-B-2 trial of the DSHNHL. *Blood* 2002; 99, (abstr 3060).
96. Lai GM, Chen YN, Mickley LA, Fojo AT, Bates SE. P-glycoprotein expression and schedule dependence of Adriamycin cytotoxicity in human colon carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 1991; 49:696-703.
97. Wilson WH, Porcu P, Hurd D, et al. Phase II study of dose-adjusted EPOCH-R in untreated de novo CD20 diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)-CALGB 50103. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005; 24 (abstr).

98. Wilson WH, Teruya-Feldstein J, Fest T, Harris C, Steinberg SM, Jaffe ES, et al. Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997; 89:601-9.
99. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1997; 337:529-34.
100. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Chan WC, Aoun P, Cochran G, et al. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2005; 18:1377-84.
101. Filipits M, Jaeger U, Pohl G, Stranzl T, Simonitsch I, Kaider A, et al. Cyclin D3 is a predictive and prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8:729-33.
102. Paik JH, Jeon YK, Park SS, Kim YA, Kim JE, Huh J, et al. Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, p16, p21, p27, p14 and p53 in germinal centre and non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphomas. *Histopathology* 2005; 47:281-91.
103. Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: New implications for therapy. *Blood* 1993; 82:15-21.
104. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334-6.
105. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90:244-51.
106. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, Emile JF, Lederlin P, Sebban C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 2003; 101:4279-84.
107. Wilson W, Pittaluga S, O'Connor P, Hegde U, Drbohlav N, Janik J, et al. Rituximab may overcome BCL-2-associated chemotherapy resistance in untreated diffuse large B-cell lymphomas. *Proc Am Soc Hematol* 2001; 99.
108. Dunleavy K, Pittaluga S, Janik J, Grant N, Steinberg S, Staudt L, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBL) outcome is significantly improved by the addition of rituximab to dose adjusted (DA)-EPOCH and overcomes the need for radiation. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2005; 106:623 (abstr).
109. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, 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; 198:851-62.
110. Jazirehi AR, Huerta-Yepez S, Cheng G, Bonavida B. Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: Role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65:264-76.

111. Cole S. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) a „Multitasking“ ATP-binding cassette (ABC) transporter. *The J Bio Chemistri* 2014; 289:30880-8.
112. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987. 84:7735-8.
113. Boumendjel A, Boutonnat J, Robert J. ABC transporters and multidrug resistance. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009.
114. Szakács G, Homolya L, Sarkadi B, Váradi A. (2008). MDR-ABC Transporters. In: Offermanns, S., Rosenthal, W. (eds) *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
115. Ward AB, Szewczyk P, Grimard V, Lee CW, Martinez L, Doshi R, et al. Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110:13386-91.
116. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; 9:105-27.
117. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:265-9.
118. Wilson WH, Bates SE, Fojo A, Bryant G, Zhan Z, Regis J, et al. Controlled trial of dexverapamil, a modulator of multidrug resistance, in lymphomas refractory to EPOCH chemotherapy. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1995-2004.
119. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: From genomics to mechanism. *Oncogene* 2003;22:7468–85.
120. Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:285–307.
121. Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U. ABC drug transporters: Hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2001;2:51–64.
122. Kim JE, Singh RR, Cho-Vega JH, Drakos E, Davuluri Y, Khokhar FA, et al. Sonic hedgehog signaling proteins and ATP-binding cassette G2 are aberrantly expressed in diffuse large B-Cell lymphoma. *Mod Pathol* 2009;22:1312–20.
123. Ohsawa M, Ikura Y, Fukushima H, Shirai N, Sugama Y, Suekane T, et al. Immunohistochemical expression of multidrug resistance proteins as a predictor of poor response to chemotherapy and prognosis in patients with nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology* 2005;68:422–31.
124. Shukla S, Chen ZS, Ambudkar SV. Tyrosin kinasa inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resistance Updates* 2012; 15:70-80.
125. Gaynor ER, Unger JM, Miller TP, Grogan TM, White LA Jr, Mills GM, et al. Infusional CHOP chemotherapy (CVAD) with or without chemosensitizers offers no advantage over standard CHOP therapy in the treatment of lymphoma: A Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2001; 19:750-5.

126. Boumendjel A, Boutonnat J, Robert J. ABC transporters and multidrug resistance. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009.
127. Kerr ID, Haider AJ, Gelissen IC. The ABCG family of membrana-associated transporters: you don't have to be big to be mighty. *British J Pharmacol*, 2011; 164:1767-79.
128. Stacy AE, Jansson PJ, Richardson DR. Molecular Pharmacology of ABCG2 and Its Role in chemoresistance. *Molec Pharmacol* 2013; 84:655-69.
129. Wei MC. Bcl-2 related genes in lymphoid neoplasia. *Int J Hematol* 2004; 80: 205-9.
130. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334-6.
131. Amidžić LJ. Regulacija apoptoze. U: Amidžić LJ, Nežić L. *Apoptoza*. (2022); Medicinski fakultet Univerzitet u Banjoj Luci.
132. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; 81:151-7.
133. Ranger AM, Zha J, Harad H. Bad deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9324-9.
134. Liu, Z., Xu-Monette, Z., Cao, X. *et al.* Prognostic and biological significance of survivin expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP therapy. *Mod Pathol* 2015; 1297–1314.
135. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *The Indian Journal of Medical Research*. 2015; 141:389-97. doi:10.4103/0971-5916.159250.
136. Hua Chuan Zheng. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 2017; 8: 59950-64.
137. De Vita VT Jr, Canelleos GP, Chabner B, Advanced diffuse histiocytic lymphoma, a potentially curable disease. *Lancet* 1975; 1:248-50.
138. Zhang Y, Wang J, Sui X, Li Y, Lu K, Fang X, et al. Prognostic and clinicopathological Value of survivin in diffuse large B-cell lymphoma. *Med* 2015; 94:1-9.
139. Zelenetz AD, Abramson JS, Advani Rh. NCCN Clinical practice guidelines in Oncology: non-Hodgkin's lymphomas. *J Natl Compr Cancer Netw* 2010; 8:288-334.
140. Bari A, Marcheselli L, Sacchi S. Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: a never ending story. *Ann Oncol* 2010; 21:1486-91.
141. 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.
142. 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.

143. 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
144. 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.
145. Imhoff GW, Boerma EJ, der Holt B, Schuurin 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.
146. 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.
147. 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.
148. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham A, Leppa S. Prognostic impact of ofactivated B-cell focused classification in diffuse large B cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Modern Pathol* 2009; 22: 1094-1101.
149. Yin G, Liang Y, Wang Y, Yang Y, Yang M, Cen XM, et al. mTOR complex 1 signalling regulates the balance between lipid synthesis and oxidation in hypoxia. *Biosci.Rep.*37.
150. Manfei P, Kuang H, Yue Ch, Yang Q, Wu A, Li Y, et al. Targeting metabolism to overcome cancer drug resistance: a promising therapeutic strategy for diffuse large B-cell lymphoma. *Drug Resist Updat* 2022; 61:100822.
151. Kopecka J, Sararoglio LC, Perez-Ruiz E, Sarmiento-Ribeiro AB, Saponara S, De Las Rivas J, et al. Hypoxia as a driver of resistance to immunotherapy. *Drug Resist Updat* 2021; 59:100787.
152. Beielstein Ac, Paliasch CP. Tumor metabolism as a regulator of tumor-host interactions in the B-cell lymphoma microenviromet-fueling progression and novel brakes for therapy. *Int J Mol Sci* 2019; 20.
153. Bhalla K, Jaber S, Reagan K, Hamburg A, Underwood KF, Jhajharia A, et al. SIRT3, a metabolic target linked to ataxia-telangiectasia mutated (ATM) gene deficiency in diffuse large B-cell lymphoma. *Sci Rep* 2020; 10:21159.
154. Lu TX, Young KH, Xu W, Li JY. TP53 disfuncion in diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2016; 97:47-55.
155. Bensad K, Vousden KH. P53 : new roles in metabolism. *Trnds Cell Biol* 2007; 17:286-91.

156. Guo W, Wang X, Li Y, Bai O. Function and regulation of lipid signaling in lymphomagenesis: A novel target in cancer research and therapy. *Crit.Rev Oncol/Hematol* 2020. 154:103071.
157. Uddin S, Hussain AR, Ahmed M, Bu R, Ahmed SO, Ajarim D, et al. Inhibition of fatty acid synthase suppresses c-Met receptor kinase and induces apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Mo Cancer Ther* 2010; 9: 1244-55.
158. Montesdeoca N, Lopez M, Ariaza X, Herrero L, Makowski K. Inhibitors of lipogenic enzymes as a potential therapy against cancer. *FASEB Jr: Of Publ Feder Am Soc Exp Biol* 2020; 34:11355-81.
159. Zhao L, Zhang C, Luo X, Wang P, Zhon W, Zhong S, et al. CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue inflammation in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2018; 69:705-17.
160. 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.
161. Markovic O, Marisavljević D, Cemerikic-Martinovic V, Martinovic T, Filipovic B, Stanisavljević D, et al. Survivin expression in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *Med Oncol* 2012; 29: 3515-21.

LISTA SKRAĆENICA

ABC (aktivirane B-ćelije)

ADAM-12 (ADAM metaloproteinaznog domena 12)

Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)

Bcl-6 (*B-cell lymphoma 6*)

BCRP/ABCG2 (*breast cancer resistance protein*)

BIR (Baculoviral IAP Repeat-containing proteini)

BIRC5 (*Baculo viral Inhibitor Apoptosis Protein Repeat-Containing 5*)

BTK (Brutonova tirozin kinaza)

CAM-DR (celularna adhezija posredovana rezistencijom na lijekove)

CAR (*chimeric antigen receptor*)

CARD11 (*caspase recruitment domain-containing protein 11*)

CD10 (*cluster of differentiation 10*)

CHOP (ciklofosamid, vinkristin, prednisolon, doksorubicin)

COO (*cell of origin*)

COP (ciklofosamid, vinkristin, prednizolon)

CR (kompletan odgovor)

CREBBP (*CREB-binding protein*)

Cru (kompletan odgovor neutvrđen)

CVAD (ciklofosamid, vinkristin, doksorubicin i deksametazon)

CytaBOM (citarabin, bleomicin, vinkristin i metotreksat)

DHAP (deksametazon, citarabin, cisplatina)

DI (identitet doze)

DLBCL (difuzni B krupnoćelijski non-Hodgkin limfom)

DLBCL-NOS (difuzni B krupnoćelijski non-Hodgkin limfom – *not otherwise specified*)

DSHNHL (*High-Grade Non-Hodgkins Lymphoma Deutch Study Group*, njemačka grupa za agresivne limfome)

ECOG (*The Eastern Cooperative Oncology Group*)

ECT (ekstracelularna tečnost)

EZH2 (*recurrent enhancer of zoster 2*)

Fab (*fragment anigen binding*)

Fc (*fragment crystallizable*)

FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*)

GCB (ćelija germinativnog porijekla)

GEP (profiliranje genetske ekspresije)

HE (hemotoksilin-eosin)

HTS (sekvencionisanje visoke propusnosti)

IAP (protein inhibitor apoptoze)

ICE (ifosfamid, karboplatin, etopozid)

ICT (intracelularna tečnost)

IE (ekstralimfatični organi)

I κ B (inhibitor kappa B)

I κ K (I-kappa-kinaza)

IPI (Internacionalni prognostički indeks)

IRF-4 (*interferon regulatory factor 4*)

IRF4 (regulatorni faktor interferona 4)

JAK-STAT3 (transduktor signala Janus kinaze i aktivator transkripcije 3)

KMT2D (*lysine methyltransferasa 2D*)

LMO2 (*LIM domain only 2*)

LMO2 (LIM domen 2)

MACOP-B (metotreksat, doksorubicin, ciklofosfamid, vinkristin, prednizon i bleomicin)

MALT (limfom marginalne zone)

M-BACOD (metotreksat, bleomicin, doksorubicin, ciklofosfamid, vinkristin i deksametazon)

MDR (*multidrug resistance*, višestruka rezistencija na lijekove)

MINE (mesna, ifosfamid, novantron, etopozid)

MRP (*multidrug resistance-associated proteins*, proteini povezani s višestrukom rezistencijom na lijekove)

MRP1/ABCC1 (*multidrug resistance related protein 1*)
MRP1/ABCC1 (*multidrug resistance-associated protein 1*)
MUM-1 (*multiple myeloma 1*)
NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
NFKBIA (*NF κ B inhibitor alpha*)
NFKBIE (*NF κ B inhibitor epsilon*)
NF κ B (aktivacija nuklearnog faktora κ B)
NOTCH2 (*Notch Receptor 2*)
OS (ukupno preživljavanje)
PD-L1 (ligand programirane ćelijske smrti 1)
PET (pozitronska emisiona tomografija)
Pgp/ABCB1 (P-glikoprotein)
PI3K (modulaciju signalizacije fosfatidilinozitol 3-kinaze)
PMBCL (primarni medijastinalni B-krupnoćelijski limfom)
PR (parcijalni odgovor)
ProMACE (prednizon, doksorubicin, ciklofosamid i etopozid)
PTEN (delecije homologa fosfataze i tenzina)
PTEN (*phosphatase and tensin homolog*)
R-CHOP (rituksimab, ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednison)
R-IPI (Revidirani Internacionalni prognostički indeks)
R-IPI (revidirani internacionalni prognostički indeks)
STAT 3 (*signal transducer and activator of transcription*)
STAT 3 (transduktor signala i aktivator transkripcije)
SZO (Svjetska zdravstvena organizacija)
TBS (*Tris buffered saline*)
TGF (transformirajući faktor rasta)
TMČH (transplantacija matičnih ćelija hematopoeze)
TNF (tumor nekroza faktor)

TNFAIP3 (*tumor necrosis factor alpha-induced protein 3*)

TNFR1/2 (tumor nekrozis faktor tip 1/2 receptora)

TP53 (tumorski protein 53)

TRAIL (ligand koji indukuje apoptozu povezanu sa tumor nekrozis faktorom ili Bax-om)

BIOGRAFIJA

Danijela Mandić, rođena 04.02.1973.godine u Derventi. Završila Medicinski fakultet Univerziteta u Banjoj Luci 1999. godine. Radila u Službi medicine rada i Službi hitne pomoći u Domu Zdravlja Gradiška, a od 2001.godine u Gerontološkom centru u Banjoj Luci. Specijalizaciju iz Interne medicine završila 2010. godine, a subspecijalistički ispit iz Hematologije položila 2013.godine na Medicinskom fakultetu Univerzitet u Beogradu. Magistarski rad „Bezbedno propisivanje lijekova kod starih lica u gerijatrijskim centrima“ odbranila 2016. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banjoj Luci. Od 2008.godine je stalno zaposlena u Univerzitetskom kliničkom centru Republike Srpske. Kao glavni istraživač je učestvovala u više kliničkih ispitivanja faze II i III. Viši asistent na Katedri za internu medicinu Medicinskog fakulteta.

Izjava 1

IZJAVA O AUTORSTVU

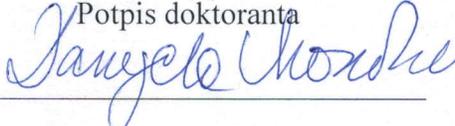
**Izjavljujem
da je doktorska disertacija**

„ZNAČAJ EKSPRESIJE ABC PROTEINA, SURVIVINA i Bcl-2 KOD DIFUZNOG B KRUPNOĆELIJSKOG NE-HOČKIN LIMFOMA U NASTANKU REZISTENCIJE NA HEMIOTERAPIJU“,

" SIGNIFICANCE OF EXPRESSION OF ABC PROTEINS, SURVIVIN, AND BCL-2 IN CHEMOTHERAPY RESISTANCE IN PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE B-CELL NON-HODGKIN LYMPHOMA“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da doktorska disertacija, u cjelini ili u dijelovima, nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

U Banjoj Luci, juni 2022.

Potpis doktoranta


Izjava 2

Izjava kojom se ovlašćuje Univerzitet u Banjoj Luci da doktorsku disertaciju učini javno dostupnom

Ovlašćujem Univerzitet u Banjoj Luci da moju doktorsku disertaciju pod naslovom „Značaj ekspresije ABC proteina, survivina i Bcl-2 kod difuznog B krupnoćelijskog ne-Hoćkin limfoma u nastanku rezistencije na hemioterapiju“,

koja je moje autorsko djelo, učini javno dostupnom.

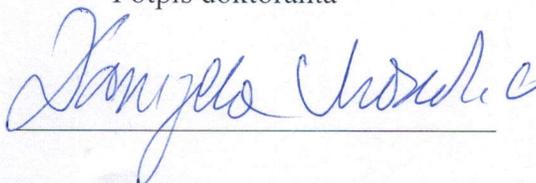
Doktorsku disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
- 4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima**
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima

U Banjoj Luci, jun 2022.

Potpis doktoranta



Sanjela Urošević

Izjava 3

Izjava o identičnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora Danijela Mandić

Naslov rada „Značaj ekspresije ABC proteina, survivina i Bcl-2 kod difuznog B
krupnoćelijskog ne-Hoćkin limfoma u nastanku rezistencije na hemioterapiju”

Mentor Prof. dr Milena Todorović Balint

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije identična elektronskoj verziji koju sam predala za digitalni repozitorijum Univerziteta u Banjoj Luci.

U Banjoj Luci, jun 2022. godine

Potpis doktoranta
