



Примљено: 24.8.2022.		
Орг. јед.	Број	Прилог

fudof

ИЗВЈЕШТАЈ

о оцјени урађене докторске дисертације

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

На основу члана 141 Закона о Високом образовању („Службени гласник републике Српске, број 67/20) члана 54. Статута Универзитета у Бањој Луци, и члана 18 Статута Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, Научно-наставно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци на редовној X сједници одржаној 22.06.2022 донијело је Одлуку под бројем 18/3.561/2022 о именовању Комисије за одбрану докторске дисертације кандидата мр.сц Данијела Мандић, доктор медицине, под називом „Значај експресије ABC протеина, сурвивина и Vcl-2 код дифузног В крупноћелијског не-Хочкин лимфома у настанку резистенције на хемиотерапију“ у сљедећем саставу:

1. Др Лана Нежић, ванредни професор, ужа научна област Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија, Медицински факултет Универзитет у Бањој Луци, председник
2. Др Милена Годоровић-Балинт, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет универзитет у Београду, члан,
3. Др Радослав Гајанин, редовни професор, ужа научна област Патологија, члан, Медицински факултет Универзитет у Бањој Луци
4. Др Ранко Шкрбић, редовни професор, ужа научна област Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија, Медицински факултет Универзитет у Бањој Луци, члан
5. Др Љиљана Амићић, ванредни професор, ужа научна област Хумана генетика, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан
6. Др Бојана Царић, доцент, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, резервни члан.

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Данијела (Милан) Мандић, рођена 04.фебруара 1973.године у Дервенти, Босна и Херцеговина. Завршила је постдипломски студиј на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци, студијски програм „Биомедицинска истраживања“. Магистарски рад под називом „Процјена безбједности прописаних лијекова код старих лица у геријатријским центрима“ из научне области Фармакологија и интерна медицина одбранила је 14.марта 2016.године на Мединском факултету Универзитета

у Бањој Луци и стекла научно звање магистар медицинских наука.

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације мр сц. Данијеле Мандић гласи „Значај експресије ABC протеина, сурвивина и Vcl-2 код дифузног В крупноћелијског не-Хочкин лимфома у настанку резистенције на хемиотерапију“ .

Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци Одлуком број 18/3.410/2018 од 11.06.201. године, а Сената Универзитета у Бањој Луци је Одлуком број 02/04-3.1780-78/18 од 28.06.2018.године дао сагласност на Извјештај о оцјени подобности теме, кандидата и ментора за израду докторске дисертације на Медицинском факултету кандидата мр сц. Данијела Мандић под називом „Значај експресије ABC протеина, сурвивина и Vcl-2 код дифузног В крупноћелијског не-Хочкин лимфома у настанку резистенције на хемиотерапију“.

Докторска дисертација кандидата мр сц. Данијела Мандић је написана на српском језику, латиничним писмом (фонт *Times New Roman*, величина слова у тексту 12, проред 1,5, формат А4) на 124 странице. На почетку дисертације се налази 12 страница које нису означене, а чине их: насловна страна на српском језику, насловна страна на енглеском језику, резиме на српском језику, резиме на енглеском језику, захвалница и садржај. Иза дисертације је 5 нумерисаних страница које садрже списак скраћених назива у тексту, биографију кандидата, потписану Изјаву о ауторству, потписану Изјаву којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију учини јавно доступном и потписану Изјаву о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације.

Дисертација садржи 85 слика и 8 табела, а цитирана су 160 литературна извода.

Подјелења је у 8 поглавља и то:

1. Увод, написан на 30 страница
2. Хипотеза, написана на 1 страници
3. Циљеви рада написани на 1 страници
4. Материјали и методе, написани на 8 страница
5. Резултати, написани на 56 страница
6. Дискусија, написана на 15 страница
7. Закључци, написани на 1 страници
8. Литература, написана 12 страница

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

У уводном дијелу дисертације описан је дифузни В крупно ћелијски не-Хочкин лимфом (DLBCL), његова епидемиологија, етиологија, хистолошке карактеристике, клиничке манифестације, дијагностичка обрада и лијечење и стандардни критеријуми за процјену одговора након лијечења. Наглашено је да савремена подкласификација DLBCL, и примјена ревидираног Интернационалног прогностичког индекса (R-IPi),

стратификују пацијенте у групе ризика на основу којих се може процјент исход лијечења пацијената са DLBCL. Међутим, хетерогеност у преживљавању унутар исте групе ризика захтјева идентификацију нових предиктивних фактора. Наглашено је да велики проблем успешне имунохемиотерапије предстваља резистенција на више муђособно различитих компоненти терапијских протоколоа код малигну обопења, тзв. вишеструка резистенција на лијекове (MRD). У наставку су описани ABC протеини и њихов значај у настанку MRD. Описани су: Pg/ABCB1, MRP1/ABCC1 и BCRP/ABCG2, и њихов утицај на развој резистенције на лијекове. На крају су наведени сурвивина и Bcl-2, и њихов значај у процесима апоптозе и MRD код малигну обопења.

У другом поглављу су постаљена хипотезе истраживања:

1. Нулта хипотеза:

Повећана експресија Pg-гликопротеина (ABCB1), ABCC1 и ABCG2-АТР-касетних протеина, сурвивина и Bcl-2 нема прогностички значај у утврђивању вишеструке резистенције на примјену хемиотерапије (циклофосфамид, доксорубин, винкрестин и преднисон +/- ритуксимаб) код пацијената са DLBCL.

2. Радна хипотеза:

Повећана експресија мембранских Pg-гликопротеина (ABCB1), ABCC1 и ABCG2-АТР-касетних протеина, сурвивина и Bcl-2, и њихове корелације су потенцијални биомаркери туморске резистенције на примјењену хемотерапију и могу објаснити молекуларни механизам настанка хеморезистенције.

Циљеве истраживања су јасно и прецизно формулисани.

3. Испитати интензитет експресије мембранских протеина-(АТР-касетних протеина, *efflux* пумпе) потенцијално одговорних за резистенцију према хемиотерапији и то: Р-гликопротеина (Pg или ABCB1), ABCC1 и ABCG2- у дифузном В крупноћелијском не-Хочкин лимфому (*diffuse large B cell lymphoma*-DLBCL) код релапс/резистентне болести у односу на иницијални ниво експресије и болести без релапса.
4. Испитати корелацију експресије Pg, ABCC1 и ABCG2 протеина и интрацелуларних антиапоптотских протеина сурвивина и Bcl-2 и објаснити молекуларни механизам резистенције на хемиотерапију код релапс/резистентног DLBCL у односу на иницијални ниво експресије и болести без релапса.
5. Утврдити значај експресије потенцијалних маркера резистентности на хемиотерапију (Pg, ABCC1 и ABCG2 протеина, сурвивина, Bcl-2) код релапс/резистентне болести у односу на имнохистохемијску подјелу DLBCL: лимфом порјекла герминативног центра (*germinal center B cell*-GCB) и лимфом активираних В ћелија (*activated B-cell*- ABC).
6. Испитати корелацију експресије потенцијалних маркера резистентности на

хемиотерапију (Pg, ABCС1 и ABCG2 протеина, сурвивина и Bcl-2) са нодалним и екстранодалним поријеклом лимфома, стадијумом болести, полом, животном доби и прогностичком оцјеном.

Кратак преглед претходних истраживања и литературе.

Резистенција на хемиотерапијске лијекове представља велики проблем у лијечењу малигнух болести. Постоји неколико механизма којим се настоји објаснити појава резистенције на лијекове, а то су: промјене у фармакокинетици и фармакодинамици, заједно са карактеристикама туморских ћелија и микроколином. Резистенција на лијекове може бити урођена (*intrinsic*), условљена карактеристикама самих туморских ћелија, која као таква постоји прије примјене било каквог антитуморског лијека, или стечена, која настаје у току примјене антитуморских лијекова [1,2].

Један од највећих препрека успјешне хемиотерапије тумора лежи у настанку спонтаних мутација у ћелијама, које доводе до резистенције мутираних ћелија на терапију лијековима. Резистенција на више међусобно различитих компоненти терапијског протокола се назива вишеструка резистенција на лијекове (*engl. multidrug resistance, MDR*) [3]. Дејство ефлуксних АТФ-везујућих касетних протеина (*ATP binding cassette transporter-ABC*) само је један од бројних механизма предложених како би се објаснила вишеструка резистенција на лијекове. За развој резистенције на хемиотерапију најбитнија су три протеина: ABCB1 (Р-гликопротеин, Pg), ABCС1 (*multidrug resistance-associated protein 1*) и ABCG2 (*breast cancer resistance protein-BCRP*). Поред инфлуксног облика, ABC протеини имају и ефлукс-облике, који имају способност да „испумпају“ широк спектар супстанци из ћелија, узрокујући смањену ефикасност међусобно хемијски различитих компоненти који чине хемиотерапијске протоколе. До сада су спроведена бројна истраживања којим се настојало утврдити постојање могућности блокирања њихове ефлуксне способности, или постојања инхибитора ових протеина.

Р-гликопротеин (Pg/ABCB1) учествује у развоју вишеструке резистенције на хемиотерапију код туморских ћелија. Бројна ткива показују висок ниво експресије Pg/ABCB1, као што су апикалне мембране епителних ћелија проксималних тубула, танког цријева и плућа, а такође се налазе на лимфоцитима и хематопетским ћелијама [4]. Ткива која природно имају високе нивое Pg/ABCB1 након малигне трансформације често ће одмах испољити вишеструку резистенцију на широк спектар хемиотерапеутика, док ће ткива која у свом природном облику немају високе нивое Pg/ABCB1, попут ћелија хематопоезе, показати повећање количине Р-гликопротеина након хемиотерапије. [5].

MRP (*multidrug resistance-associated proteins*)/ABCС1 и његова прекомјерна експресија може да доведе до вишеструке резистенције ћелија тумора на доксорубицин, даунорубицин, винкрестин и колхицин.

BCRP (*breast cancer resistance protein*)/ ABCG2 чини туморске ћелије резистентним на митоксантрон, али и на терапију антрациклинима. Налази се на мембранама одређених субпопулација хематопоезских ћелија. Највећа експресију ABCG2 показују ткива богата макрофагима, попут слезене, плућа, тимуса и мозга [6,7].

Спектар антитуморских хемотерапеутика које ABCB1, ABCC1 и ABCG2 ефлуксом избацују из унутарћелијске течности обухвата структурно различите молекуле. Супстрате за Pg/ABCB1 представљају слједећи хемиотерапеутици: *vinca*-алкалоиди (винбластин и винкристин), антрациклини (доксорубицин и даунорубицин) као и инхибитори тирозин киназе (иматиниб и гефитиниб) [5,8].

Спектар супстрата MRP1/ABCC1 обухвата *vinca*-алкалоиде, антрациклине, и инхибиторе тирозин киназе, док за метотрексат представљају ефлукс пумпу. [5].

BSCR/ABCG2 има сличан спектар као ABCB1 и ABCC1. Транспортује подофилотоксине (етопозид и тенипозид), митоксантрон, инхибиторе тирозин киназе (иматиниб, гефитиниб, нилотиниб, ерлотиниб и канертиниб) [5], а мутирани облик R482G транспортује и антрациклине (даунорубицин и доксорубицин)[9]. Нека ткива показују већу експресију ABCB1, ABCC1 или ABCG2, те уколико дође до малигне трансформације ћелије, она ће бити примарно резистентна на примјену антитуморских лијекова. Друга ткива могу имати нижи степен резистенције, међутим, уколико се хемиотерапијом униште сензитивне ћелије тумора, а опстану резистентне диференциране ћелије тумора или туморске матичне ћелије, може доћи реколонизације тумора резистентним ћелијама. *Greaves* и сарадници су истраживали значај експресије 5 ABC протеина код класичног Хочкин лимфома, и утврдили значајан ниво експресије ABCC1 и ABCG2 код класичног Хочкин лимфома [10]. Детекција ABCC1 експресије је у овом истраживању била значајно повезана са повећаним ризиком за прогресију болести, резистенцију на примјењену терапију или смрт код класичног Хочкин лимфома. Сличне резултате су током истраживања добили и *Steidl* и сарадници [11], због чега је као закључак овог истраживања наведено да се експресија ABCC1 може успјешно користити као индикатор лошег одговора на терапију код класичног Хочкин лимфома, који су лијечени стандардним хемиотерапијским протоколима [12]. Значај експресије ABC мембранских протеина код DLBCL, у прогнози болести и терапијском исходу су недостатне.

Bcl-2 протеин је антиапоптоски протеин и његова повећана експресија штити ћелије од процеса програмиране ћелијске смрти. Повећана експресија Bcl 2 се сматра врло поузданим маркером хемотерапијске резистенције [13-16].

Сурвивин, као интрацелуларни молекул који припада фамилији инхибитора апоптозе, инхибише каспазу и блокирају ћелијску смрт, показује значају експресију код многобројних тумора и повезан са лошијим исходом. Сурвивин је препозант као четврти највише експримирани протеин у хуманом малигном ткиву и представља предиктор лоше прогнозе код великог броја солидних тумора и малигних хематолошких обољења[17]. Код неких малигних обољења висока експресија сурвивина је фактор ризика за резистенцију на хемиотерапију и посљедично лошу прогнозу [18]. Разлика у експресији сурвивина у ћелијама тумора у поређењу са нормалним ткивима, данас га чини веома битним „target“ или циљаним мјестом дјеловања за различите антитуморске лијекове [19]. Повећана експресија сурвивна се доводи у корелацију и дјелимично објашњава механизам резистенције према хемотерапији и то различитим механизмима као што су дисрегулација апоптозе, стечена измјена осјетљивости на антитуморске лијекове и стимулација

преживљавања туморских ћелија. Посљедњи резултати су показали да је управо интензивна експресија сурвивина у корелацији са лошим одговором на примјењену терапију код лимфома [20]. Резистенција на апоптозу је један од важних механизма којим туморске ћелије избјегавају идентификацију од стране имунолошких ћелија, што додатно омогућава преживљавање малигне ћелије избјегавањем имунолошке контроле. Прекомјерна експресија сурвивина је у корелацији са смањеном стопом ремисије и преживљавањем код пацијената са акутном лимфобластном леукемијом дјечијег узраста, одраслих пацијената са акутном мијелоидном леукемијом и Т-ћелијска леукемија код адултних пацијената [18]. Међутим, код DLBCL прогностичка вриједност експресије сурвивина је неодређена и противријечна. Неколико студија је потврдило да је преживљавање неовисан прогностички показатељ код DLBCL са повећаном експресијом сурвивина [17]. С друге стране истраживања Митровић и сарадника, као и *Liu* и сарадника су показала да је експресија сурвивина на преживљавање прогностички не тако значајна [17].

Идентификација нових, прецизних молекуларних предиктора преживљавања је неопходна како ни се идентификовали молекуларни биомаркери којим ће се пацијенти са DLBCL стратификовати у групе ризика и индивидуализовати терапијске стратегије уз побољшање преживљавања.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG: Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013;13:714-26.
2. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N et al. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel)* 2014;6:1769–92.
3. Testoni M, Zucca E, Young KH, Bertoni F. Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol* 2015;26:1069-80.
4. 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.
5. Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 2008; 9:105-27.
6. Boumendjel A, Boutonnat J, Robert J. ABC transporters and multidrug resistance. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009.
7. 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.
8. Shukla S, Chen ZS, Ambudukar SV. Tyrosin kinasa inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resist Updates* 2012;15:70-80.

9. Stacy AE, Jansson PJ, Richardson DR. Molecular Pharmacology of ABCG2 and Its Role in chemoristance. *Mol Pharmacol* 2013;84:655-69.
10. 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.
11. 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.
12. Bachy E, Salles G. Treatment approach to newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol* 2015;52:107-18.
13. Wei MC. Bcl-2 related genes in lymphoid neoplasia. *Int J Hematolo* 2004;80:205-9.
14. 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.
15. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; 81:151-7.
16. Ranger AM, Zha J, Harad H. Bad deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9324-9.
17. 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: A Meta-Analysis. *Medicine* 2015;94:e1432.
18. Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic-Martinovic V, Martinovic T, Filipovic B, Stanisavljevic D, et al. Survivin expression in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *Med Oncol.* 2012;29:3515-21.
19. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Ind J Med Res.* 2015;141(4):389-397.
20. Hua Chuan Zheng. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* 2017;8: 59950-64.

V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Материјал, односно испитаници, и методе рада кориштени у овом испитивању су усклађени са постављеним циљевима и описани на 8 страница. Примјењене методе су адекватне, тачне и савремене, имајући у виду достигнућа у овој области истраживања. Није било промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе. Испитивани параметри дају довољно елемената за поуздано истраживање.

Истраживање појаве резистенције на хемиотерапијске протоколе код болесника са дифузним В крупноћелијским лимфомом је проведено у Универзитетском клиничком центру Републике Српске, уз сагласност Етичког одбора Универзитетског клиничког центра Републике Српске. Истраживањем су били обухваћени болесници који су лијечени на Клиници за унутрашње болести, Одјељења за хематологију, Универзитетског клиничког центра Републике Српске, у временски период од 6 година (2014 до 2020). Циљну групу су чинили болесници са релапс/резистентном болести и болесници који су током истраживања и даље били у комплетној ремисији.

Истраживање је било дизајнирано као кохортно ретроспективно и проспективно, и једну кохорту су чинили испитаници са дијагностикованим DCBLC стадијума I -IV без релапса болести након примјене стандардног хемиотерапијског протокола СНОР са или без ритуксимаба, СНОР-like са или без ритуксимаба, CVP са или без ритуксимаба (n 27), другу кохорту су чинили пацијенти (n 27) који су имали рефрактерну болести, а трећу групу су чинили пацијенти који су доживјели релапс болести (n 13) након примјене минимално једног хемиотерапијског протокола.

Анализом су били обухваћени клинички подаци и генералије болесника добијени из медицинске документације (медицинска историја болести, одлуке хематолошког конзилијума, температурне листе са терапијским протоколима, налази патохистолошке анализе лимфног чвора и другог лимфомског ткива). За све пацијенте су били одређени: метаболички параметри (LDH и beta2MG), клинички стадијум болести по *Ann Arbor*, ECOG (*The Eastern Cooperative Oncology Group*), присутност екстранодалне локализације болести, R-IPi скор (Интернационални прогностички скор), протокол лијечења у првој линији, и одговор на крају лијечења. Анализа је обухватала и патохистолошки налаз са имунохистохемијском анализом биопсије лимфног чвора при дијагностиковању не-Хочкин лимфома или након ребиопсије.

Критеријуми укључења за све пацијенте су били: потврђена дијагноза болести, DLBCL *de novo*, старији од 18 година, доступан парафински узорак биопсије туморског ткива, доступна медицинска документација, потписан информисани пристанак.

Критеријуми неукључења/искључења су били: недотатак парафинског узорка

биоптата, пацијенти са другим типовима лимфома и хематолошких малигнитета, некомплетна медицинска документација, прогерсија болести у централни нервни систем, пацијенти са релапсом болести у терминалној фази који не могу поднијети ребиопсију, пацијенти који нису потписали информисани пристанак.

Пацијенти су били селектовани на основу адекватне морфологије лимфног чвора и доступност хистолошког материјала за имунохистохемијску анализу. За анализу су се користили парафински калупи лимфних чворова и другог туморског ткива који су се налазили у архиви Завода за патологију УКЦ РС. На свим узорцима ткива била је анализирана експресија 3 ABC транспортера: Pg/ABCB1, MRP1/ABCC1 и BCRP/ABCG2, и сурвивина и BCL2, примјеном биохемијског приступа (имунохистохемијско бојење) и морфолошки приступ (електронска микроскопија). Хистолошке дијагнозе су потврђене према критеријумима SZO класификације лимфоидних неоплазми из 2016. године на хистолошким резевима обојеним хематоксилин еозин (H&E), *Giemsa* и *PAS* методом. За анализу су кориштени ткивни узорци обрађени на стандардан начин бојени рутинском методом бојења хематоксилин-еозин (HE) и анализирани свјетлосним микроскопом. Након претретмана и припреме ткива, имунохистохемијско бојење је спроведено ручно, примјеном одговарајућих моноклоналних антитјела у оптималној концентрацији. Након монтирања обојена ткива су анализирана на свјетлосном микроскопу и фотографисана. За процјену експресије анализираних протеина кориштен је семиквантитативни систем бодовања базиран на оцјени интензитета мембранског и/или цитоплазматског и/или нуклеарног бојења туморских ћелија и процента обојених ћелија. Интензитет мембранског/цитоплазматског и/или нуклеарног бојења био је оцјењен као: 1 (негативно или слабо бојење), 2 (умјерено бојење) и 3 (јако бојење), док је проценат обојених ћелија био оцјењен са 1, 2 или 3, овисно да ли се радило о <50%, 50-75% или >75% обојених ћелија.

Статистичка обрада добијених података је била адекватна. За приказ квантитативних података кориштени су индикатори дескриптивне статистике (број пацијената, проценат, аритметичка средина, стандардна девијација, стандардна грешка аритметичке средине, екстремне вриједности и медијан). За израчунавање разлика између појединих група пацијената кориштен је *Anova* тест. За *post hoc* тест је одабран *Tamhane* тест којим се одредило између којих група постоји статистичка разлика у односу на одређени маркер. Корелације између двије варијабле су одређене кориштењем Пирсоновог коефицијента корелације. За статистички значајну разлику између различитих група испитаника узета је значајност мања од 0,05. Графички резултати су креирани у рачунарском програму *Microsoft®Excel for Windows*.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

Резултати докторске дисертације су потврдили да клинички параметри: ECOG, R-IP1, метаболички параметри (LDH, beta2MG) нису поуздани показатељи резистенције DLBCL на примјењену имунохемотерапију. Анализа експресије Bcl-2, сурвивин, Pg/ABCB1, MRP1/ABCC1, и BCRP/ABCG2 је указала да су молекуларни механизми релевантнији за дијагнозу и предикцију резистенције на прву линију имунохемотерапије.

Резултати су показали да је постојала статистички значајна разлика свих посматраних биомаркера (Bcl-2, сурвивин, Pg/ABCB1, MRP1/ABCC1, и BCRP/ABCG2) међу групама ремисија, релапс и рефрактерни DLBCL ($p < 0,05$).

Маркер Bcl-2 је показао сличан ниво експресије у групи која је имала терапијски одговор на примјењену имунохемотерапију и *de novo* дијагностикованих са каснијим релапсом болести, док је његова експресија значајно већа ($p < 0,05$) у примарно рефрактерној болести и релапасу DLBCL.

Pg/ABCB1 је имао сличан ниво експресије у свим посматраним групама, и у групи која је имала терапијски одговор на примјењену имунохемотерапију и *de novo* дијагностикованих са каснијим релапсом болести, као и групи пацијента са релапсом и примарно рефрактерних, и није било статистички значајне разлике у експресији међу посматраним групама, ($p > 0,05$).

Сурвивин је имао сличан ниво експресије, који није био статистички значајан ($p > 0,05$) између групе која је имала терапијски одговор на примјењену имунохемотерапију и *de novo* дијагностикованих са каснијим релапсом болести, као ни између група примарно рефрактерна болести и групе са релапасом DLBCL. Експресија сурвивина је била значајно већа ($p < 0,05$) код релапс/рефрактерни насупрот ремисија/релапс са иницијалном биопсијом. Слична ситуација је утврђена и за маркер MRP1/ABCC1, који је имао значајно већу експресију ($p < 0,05$) код релапс/рефрактерни насупрот ремисија/релапс са иницијалном биопсијом.

За маркери BCRP/ABCG2 је утврђена статистички значајна експресија у свим посматраним групама у истраживању ($p < 0,05$).

У групи рефрактерни DLBCL је постојала статистички значајна ($p < 0,05$), врло јака позитивна корелација између сурвивина и MRP1/ABCC1 ($r=0,971$; $p=0,000$), између сурвивина и Bcl-2 ($r=0,946$; $p=0,000$), између MRP1/ABCC1 и Bcl-2 ($r=0,975$; $p=0,000$) и између MRP1/ABCC1 и BCRP/ABCG2 ($r=0,543$; $p=0,003$).

Посматрано према сваком појединачном биомаркеру утврђено је да је у релапсној и рефрактерној болести значајно повећана експресија сурвивина, MRP1/ABCC1, али и BCRP/ABCG2, који су такође у статистички значајној позитивној корелацији са стандардним дијагностичким маркером Bcl-2. То је посебно изражено у примарном рефрактерном DLBCL и код појаве релапсне болести. Значајно је поменути да су ови маркери у јакој корелацији са метаболским маркерима LDH и beta-2MG.

Индијектно у ремисији, односно код пацијената са повољним терапијским одговором на имунохемиотерапију, сурвивин и MRP1/ABCC1 нису имали тако значајну експресију. Анализом логистичке регресије утврђено је да истовремено испитивање Bcl-2, сурвивина и MRP1/ABCC1 даје најбољу предиктабилну вриједност за резистенцију на имунохемиотерапију у релапсној и рефрактерној болести. Експресија Р-гликопротеина, познате ABC ефлукс пумпе је била повећана, али није доказана њена дијагностичка и прогностичка вриједност за настанак релапса и појаву рефрактерног облика DLBCL.

Основни теоретски допринос дисертације

Резултати ове докторске дисертације указују да постојеће знање у патогенези примарне и секундарне резистенције према првој линији имунохемиотерапије, односно према R-CHOP протоколу, не могу се дијагностиковати и предвидјети на основу стандардних клиничких параметара и скорова, хистолошке дијагнозе и стандардних интрацелуларних маркера као што су Bcl-2, и маркера Хансовог алгорита. Резултати указују да специфичан молекуларни запис код R/R DLBCL подразумјева повећану експресију маркера резистенције доказаних и код других малигну болести попут сурвивина, MRP1/ABCC1 и BCRP/ABCG2. Осим тога, у фармакологији је добро испитан значај Pg/ABCB1 у развоју резистенције малигне ћелије према хемиотерапији, ипак, он није поуздан маркер за процјену резистенције лимфома на имунохемиотерапију.

Практични значај дисертације

Резултати докторске дисертације указују да удружена експресија и интеракција интрацелуларних маркера има дијагностички и прогностички значај у превиђању резистенције DLBCL према првој линији имунохемиотерапије, превасходно сурвивина, MRP1/ABCC1 али и BCRP/ABCG2 у корелацији са Bcl-2. Такође, повећана експресија ових маркера указује и на агресивност болести али и на неопходност проширња стандардне имунохистохемијске дијагностике у погледу предвиђања резистенције DLBCL према имунохемиотерапији. Додатни значај повећане експресије сурвивина и MRP1/ABCC1 у R/R DLBCL потврђује њихов значај у даљем клиничком развоју молекуларно циљане терапије, односно антисурвивин и лијекова који антагонизују експресију MRP1/ABCC1 у успјешном лијечењу R/R DLBCL, у комбинацији са постојећом имунохемиотерапијом или са другом циљном терапијом.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

Докторска дисертација мр сц. Данијела Мандић „Значај експресије ABC протеина, сурвивина и Bcl-2 код дифузног В крупноћелијског не-Хочкин лимфома у настанку резистенције на хемиотерапију“ је урађена према правилима и принципима израде научно-истраживачког рада, а резултат је изворног научног рада кандидата. Резултати истраживања јасно намеће закључак да удружена експресија маркера попут сурвивина, MRP1/ABCC1 и BCRP/ABCG2 са Bcl-2 могу предвидјети резистенцију DLBCL према имунохемиотерапији која се примјењује у првој линији, као и да развој и примјена нових циљних молекуларних терапија које антагонизују њихову експресију може бити успјешан модел за превазилажење хемиотерапијске резистенције код DLBCL. Мишљења смо да резултати и закључци ове докторске дисертације представљају оригиналан допринос науци и струци јер доприноси развоју фармакологије и хематологије. Комисија за оцјену докторске дисертације даје позитивну оцјену за докторску дисертацију под називом „Значај експресије ABC протеина, сурвивина и Bcl-2 код дифузног В крупноћелијског не-Хочкин лимфома у настанку резистенције на хемиотерапију“ кандидата мр сц. Данијеле Мандић и предлаже Научно-наставном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци да прихвате извјештај и омогући кандидату да јавно брани своју докторску дисертацију.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Датум:23.08.2022

1. Др Лана Нежић, ванредни професор, ужа научна област Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија, Медицински факултет Универзитет у Бањој Луци, предсједник

2. Др Милена Годоровић-Балинт, редовни професор, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет универзитет у Београду, члан

3. Др Радослав Гајанин, редовни професор, ужа научна област Патологија, члан, Медицински факултет Универзитет у Бањој Луци

4. Др Ранко Шкрбић, редовни професор, ужа научна област Фармакологија, токсикологија и клиничка фармакологија, Медицински факултет Универзитет у Бањој Луци, члан

5. Др Љиљана Амићић, ванредни професор, ужа научна област Хумана генетика, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан

6. Др Бојана Царић, доцент, ужа научна област Интерна медицина, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, резервни члан