



**Универзитета у Крагујевцу
Факултет медицинских наука**

Ксенија В. Вучићевић

„Експресија гена *ABCВ1* и гена регулатора апоптозе као фактора
резистенције на хемиотерапију код оболелих од хроничне
лимфоцитне леукемије“

Докторска дисертација

Ментор: др Соња Павловић, научни саветник

Крагујевац, 2017

Експресија гена *ABCB1* и гена регулатора апоптозе као фактора резистенције на хемиотерапију код оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије“

РЕЗИМЕ

Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) је малигно обољење хематопоетског ткива, које се манифестује као клонска експанзија Б лимфоцита. ХЛЛ се карактерише изузетно хетерогеним клиничким током и одговором на терапију, у чему генетички профил пацијента има улогу.

Главну препреку успеху терапији која се користи у лечењу канцера је резистенција на лекове (енг. Multi Drug Resistance, MDR). Резистенција на лекове се различито манифестује код пацијената и генетички је детерминисана. Два главна механизма учествују у резистенцији на лекове који се примењују у лечењу канцера: повишена експресија протеина који су ефлуксне пумпе и не дозвољавају улазак лека у ћелију (транспортна, пумпна резистенција), и повишена активност антиапоптотског система (апоптотска резистенција).

Ово је прва студија генетичких маркера транспортне и апоптотске резистенције на лекове у пацијената са ХЛЛ у Србији.

Анализирана је експресија *ABCB1* гена чији је продукт протеин ћелијске мембране који учествује у ефлуксу лекова из ћелија, као и утицај две варијанте у *ABCB1* гену (rs1045642, с.3435С > Т и rs20132582, с. 2677G > Т/А), на његову експресију. Поред тога изучавана је и експресија *Bcl2* и *Bax* гена, која може да укаже на статус апоптотског система у ћелијама пацијената оболелих од ХЛЛ. Експресија гена је изучавана у мононуклеарним ћелијама периферне крви 46 ХЛЛ болесника и 53 здраве контроле методом реверзне транскрипције и ланчане реакције полимеразе у реалном времену (qRT-PCR), док је детекција варијанти у *ABCB1* гену урађена методом ланчане реакције полимеразе и дигестијом рестрикционим ензимом (PCR-RFLP).

У нашој студији није детектована статистички значајна разлика у учесталости варијантних алела у *ABCB1* гену, с.3435С > Т и с.2677G > Т/А, између здравих контрола и пацијената са ХЛЛ. Овај податак указује на то да ове генетичке варијанте нису фактори ризика за обољевање од ХЛЛ.

У нашој групи ХЛЛ пацијената, 40% пацијената је имало високу експресију *ABCB1* гена, која се значајно разликује од експресије овог гена која је слична новоу експресије код здравих контрола. Може се рећи да је у 40% ХЛЛ пацијената експресија *ABCB1* гена позитиван маркер за потенцијалну појаву резистенције на лекове (MDR). Наши резултати нису показали асоцијацију варијанти *ABCB1* гена, с.3435С > Т и с.2677G > Т/А, нити варијантних генотипова, са експресијом *ABCB1* гена, слично многим студијама.

Резултати молекуларно-генетичких анализа су били корелисани са одговором на терапију у ХЛЛ пацијената. Маркер терапијског одговора је био постизање комплетне или парцијалне ремисије.

Праћењем генетичких маркере транспортне резистенције на лекове у пацијената са ХЛЛ, уочено је да је повишен нивоа експресије *ABCB1* гена статистички значајно повезан са парцијалном, а не комплетном ремисијом. Наш резултат говори у прилог да је експресија

ABCB1 гена потенцијални маркер транспортне резистенције код ХЛЛ пацијената лечених ФС протоколом.

Праћењем генетичких маркера апоптотске резистенције на лекове у пацијената са ХЛЛ, уочено је да је повишен *Bcl2/Bax* однос статистички значајно повезан са парцијалном, а не комплетном ремисијом. Наш резултат говори у прилог да је *Bcl2/Bax* однос потенцијални маркер апоптотске резистенције код ХЛЛ пацијената лечених ФС протоколом.

Ова студија доприноси знању о значају изабраних генетичких маркера за одговор на хемиотерапију код пацијената оболелих од ХЛЛ и за индивидуализацију терапије код ових болесника.

Кључне речи: хронична лимфоцитна леукемија, експресија гена, *ABCB1*, *Bcl2*, *Bax*, резистенција на хемиотерапију

Expression of *ABCB1* gene and apoptotic regulatory genes as markers of multidrug resistance developed to chemotherapy used for the treatment of chronic lymphocytic leukemia

ABSTRACT

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a hematologic malignancy which manifests as monoclonal expansion of B lymphocytes. CLL is characterized by extremely variable clinical presentation, with different therapy requirements and overall survival. Genetic profile of a patient can be used as a predictor of the course of the diseases and therapeutic response. A major impediment to the success of human cancer therapy is the development of cancer variants exhibiting multidrug resistance (MDR). MDR is characterized with various manifestations and it is associated with individual genetic profile of a patient. Two most important mechanisms contribute to MDR, including the overexpression of drug efflux pumps (transport, pump resistance) and the upregulation of cellular antiapoptotic defense systems (apoptotic resistance).

This is the first study of genetic markers of transport and apoptotic MDR in CLL patients in Serbia.

Expression of *ABCB1* gene, coding for a cell membrane protein which mediates the efflux of drugs, as well as the effect of two *ABCB1* gene variants (rs1045642, c.3435C > T and rs20132582, c. 2677G > T/A) on its expression were analyzed. Furthermore, expression of *Bcl2* and *Bax* genes, regulators of apoptosis in CLL cells, was studied. Gene expression was analyzed in peripheral blood mononuclear cells of 46 CLL patients and 53 controls, using qRT-PCR (Real-time PCR), while detection of *ABCB1* gene variants was performed using PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) methodology. Frequency of *ABCB1* variant alleles, c.3435C > T and c.2677G > T/A, did not show statistically significant difference between CLL patients and healthy controls. This finding suggests that analyzed variants are not risk factors for CLL.

When compared to healthy controls, *ABCB1* gene overexpression was detected in 40% of CLL patients. Consequently, expression of *ABCB1* gene could be considered a positive marker of potential development of MDR in 40% of CLL patients. Similar to many other studies, our findings did not reveal the association of either *ABCB1* gene variants, c.3435C > T и c.2677G > T/A, or variant genotypes, with *ABCB1* gene expression.

The results of molecular genetic analysis were correlated with therapy response of CLL patients. Achieving a complete or a partial remission was chosen to be a therapy response marker.

Analysis of genetic markers of transport MRD in CLL patients revealed that elevated level of *ABCB1* gene expression was associated with partial, but not with complete remission. Our finding suggests that *ABCB1* gene expression could be considered as a potential marker of transport MDR in CLL patients treated with FC protocol.

Analysis of genetic markers of apoptotic MRD in CLL patients revealed that elevated level of *Bcl2/Bax* ratio was associated with partial, but not with complete remission. Our finding suggests that *Bcl2/Bax* ratio could be considered as a potential marker of apoptotic MDR in CLL patients treated with FC protocol.

This study contributes to knowledge on importance of analyzed genetic markers for chemotherapy response in CLL patients and for individualization of therapy for these patients.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, gene expression, *ABCB1*, *Bcl2*, *Bax*, multidrug resistance

САДРЖАЈ

1. Захвалница.....	4
2. Резиме.....	5
3. Абстракт.....	7
4. Увод	11
5. Вишеструка резистенција организма на лекове (MDR).....	14
6. Транспортна резистенција на лекове – варјанте у гену ABCB1.....	15
7. Апоптоза у хроничној лимфоцитној леукемији (HLL).....	17
8. Bcl2 у хроничној лимфоцитној леукемији (HLL).....	18
9. Bcl2/Bax однос.....	19
10. Циљ рада	20
11. Специфични циљеви рада.....	20
12. Материјал и методе	21
13. Пацијенти.....	21
14. Узорци.....	21
15. Изолација DNK из периферне крви.....	21
16. Изолација моноклеарних ћелија из периферне крви.....	22
17. Изолација RNK из моноклеарних ћелија.....	22
18. Изолација DNK из моноклеарних ћелија.....	23
19. Реверзна транскрипција (RT).....	23
20. Ланчана реакција полимеризације (PCR).....	23
21. PCR-RFLP.....	24
22. Услови PCR реакције за детекцијуварјанте ABCB1 с.2677 G>T.....	25
23. Дигестија PCR продукта рестрикционим ензимом.....	25
24. Услови PCR реакције за детекцијуварјанте ABCB1 с.3435 C>T.....	25
25. Дигестија PCR продукта рестрикционим ензимом.....	26
26. Анализа DNK на агарозном гелу.....	26
27. Анализа експресије гена помоћу REAL-TIME PCR (qPCR) методе.....	26
28. Компаративна ddCT метода.....	31
29. Мерење експресије апоптотског гена qRT – PCR методом.....	31
30. Мерење експресије ABCB1 гена qRT – PCR методом.....	32
31. Статистичка обрада података	33
32. Резултати	33
33. Демографске и клиничке карактеристике анализираних HLL пацијената.....	35
34. Учесталост варјанте у ABCB1 гену T 3435(C) и T2677(A) код оболелх од HLL код здравих контрола.....	35
35. Експресија ABCB1 гена оболелих од HLL и здравих контрола.....	37
36. Испитивање различитих варијанти алела ABCB1 гена T3435C и T2677 G(A) на висину експресије ABCB1 гена код оболелих од HLL.....	39
37. Утицај висине експресије ABCB1 гена на одговор на терапију оболелих од HLL.....	40
38. Утицај висине релативног односа Bcl2/Bax геномске експресије на одговор на терапију.....	41

39. Повезаност експресије ABCB1 гена, Bcl2/Bax релативног односа и одговора на терапију код оболелих од HLL.....	42
40. Дискусија	44
41. Учесталост варијанти у ABCB1 геноу, 3435 C>T и 2677 G>T/A у здравој популацији.....	44
42. Учесталост варијанти у ABCB1 геноу, 3435 C>T и 2677 G>T/A код оболелих од HLL.....	44
43. Експресија ABCB1 гена код пацијената са HLL.....	45
44. Утицај варијанте алела ABCB1 гена (3435 C>T и 2677 G>T/A) на експресију ABCB1 гена код оболелих од HLL.....	45
45. Транспортна вишеструка резистенција на лекове у HLL (транспортна MDR).....	45
46. Апототска вишеструка резистенција на лекове у HLL (апоптотска MDR).....	46
47. Закључци	47
48. Литература	48

1. УВОД

ХРОНИЧНА ЛИМФОЦИТНА ЛЕУКЕМИЈА (ХЛЛ)

Хронична лимфоцитна леукемија (ХЛЛ) је малигно обољење хематопоеетског ткива, које се манифестује као клонска експанзија зрелих CD5, CD19, CD23, sIgM В лимфоцита, што доводи до њихове акумулације у крви, костној сржи и периферним лимфним органима.

ХЛЛ је најређе присутна у Азијским земљама, свега 3% свих дијагностикованих леукемија, а најзаступљенија је у земљама Европе и Северне Америке, где представља 20-30% свих дијагностикованих леукемија адултне доби (<http://seer.cancer.gov>; Tamura *et al.* 2001).

ХЛЛ је болест која је чешћа код мушкараца него код жена, а медијана старосне доби при постављању дијагнозе је између 65-70 године старости. Једна трећина пацијената млађа је од 60 година (Rozman and Montserrat 1995).

Етиологија ХЛЛ још увек није позната. Гени одговорни за наследну предиспозицију ХЛЛ нису идентификовани, али је уочено присуство болести код више чланова једне породице, што указује на могућу улогу генетичких фактора у настанку болести (Yuille *et al.* 2000; Crowther-Swaneapoel and Houlston 2009).

ХЛЛ се карактерише изузетно хетерогеним клиничким током и прогнозом. Код једне групе пацијената болест се карактерише индолентним током, присутни су минимални симптоми болести или их уопште нема, лечење обично није потребно, а преживљавање ових пацијената је налик здравим контролама. Код друге групе пацијената, болест се карактерише агресивним током болести, уз брзо присуство њене прогресије, лечење је неопходно често одмах по постављању дијагнозе, а преживљавање ових пацијената је знатно краће. Код 50% пацијената болест напредује између ове две крајности.

Прогноза болести се поставља на основу стадијума који су дефинисани на основу клиничких карактеристика. Постоје два основна стадијума која су у употреби, према Raiју (Rai *et al.* 1975) и према Vineu (Binet *et al.* 1981).

Ови системи пацијенте класификују у стадијуме ниског (Rai 0, Vine A), средњег (Rai I/II, Vine B) и високог ризика (Rai III/IV, Vine C).

За сваки стадијум ризика поменутих класификација, дате су клиничке карактеристике болести (Mihaljevic i dr. 2011).

Vinet класификација:

- А стадијум, постојање мање од три подручја увећаних лимфних жлезди, без анемије и тромбоцитопеније
- В стадијум, постојање три и више подручја увећаних лимфних жлезди, без анемије и тромбоцитопеније
- С стадијум, постојање анемије $Hg < 100 \text{ g/L}$ или тромбоцитопенија $Tr < 100 \times 10^9/L$, без обзира на лимоденопатију

Rai класификација:

- 0 стадијум, постојање лимфоцитоза у периферној крви $> 15 \times 10^9/L$
- I стадијум (0 стадијум + лимфоденопатија)
- II стадијум (0 стадијум, постојање увећане јетре и/или слезине, са присутном или не лимфоденопатијом)
- III стадијум (0 стадијум, присутна анемија $Hg < 100 \text{ g/L}$, са присутном или не органомегалијом и лимфоденопатијом)
- IV стадијум (0 стадијум, присутна тромбоцитопенија $Tr < 100 \times 10^9/L$, са присутном или не органомегалијом и лимфоденопатијом) (Mihaljevic i dr. 2011).

Код готово 80% ХЛЛ пацијената, болест се дијагностикује управо у раним стадијумима болести. Међутим, основни проблем ових система јесте тај, што се на основу њих не може предвидети прогресивни ток болести у стадијумима ниског ризика, па су бројна истраживања усмерена у проналажењу иновативних прогностичких и биолошких фактора, који би омогућили бољу класификацију пацијената (Byrd *et al.* 2004).

Дијагноза ХЛЛ се поставља на основу низа параметара. У крвној слици доминира број В лимфоцита већи од $5 \times 10^9/l$ у периферној крви у периоду од најмање 3 месеца. Постоје високоспецијализоване методе којима се одређује тип повишених лимфоцита. На основу маркера, поставља се дијагноза лимфопрлиферативног обољења чији скор указује на дијагностиковање ХЛЛ (у прилог болести иде скор 4 односно 5). Од дијагностичког значаја јесте РТГ плућа, ултразвук стомака, компјутеризована томографија, пункција и биопсија косне сржи. Присутни цитогенетички поремећаји иду у прилог болести, посебно

dell17p, dell11q. Обавезно је одређивање Vinet или Rai стадијума болести, од кога зависи даље праћење, контрола и лечење болести.

Поред стадијума болести, за даље лечење важно је опште стање болесника и присуство коморбидитета.

Редовне контроле захтева Vinet стадијум А и В, односно Rai стадијум 0, I, II без симптома. Лечење захтева унапредовала болест, што подразумева Vinet стадијум А и В, Rai стадијум 0, I, II са симптомима, Vinet C, Rai III-IV.

Лечење ХЛЛ врши се по одговарајућим протоколима терапија, прихваћеним од стране СЗО, датим у водичу за дијагностиковање и лечење лимфопролиферативних болести (Mihaljevic i dr. 2011).

Протоколи су:

- **FC протокол**

Fludarabin 25 mg/m² и.в у периоду 1-3 дана

Ciklofosamid 250 mg/m² и.в у периоду 1-3 дана

Циклус се понавља на 4-6 недеља, до укупно 6 циклуса хемиотерапије.

- **Kladribin монотерапија**

Kladribin 0,1 mg/kg/tt с.к у периоду 1-5 дана

Циклус се понавља на 4 недеље, до укупно 3-6 циклуса хемиотерапије.

- **Alemtuzumab монотерапија**

Alemtuzumab 30 mg и.в у периоду од 3 недеље

Дужина примене је 12 недеља.

- **Нlorambucil монотерапија**

Примењују се високе дозе, интермитентно сваког месеца, 10 mg/m² x 6 дана мале дозе, континуирано 4-6 mg дневно.

У зависности од стадијума болести, постоји примена прве и друге линије терапије.

Прва линија:

- код болесника у добром општем стању и без коморбидитета: FC (Fludarabin, Ciklofosamid)
- код болесника са коморбидитетом: Нlorambucil, FC у редукованим дозама

- код болесника са del17p, размотрити високодозну терапију

Друга линија:

- уколико је релапс 12 месеци после хемиотерапије, размотрити понављање терапије прве линије
- уколико је релапс наступио раније или нема одговора на терапију прве линије, примењује се следеће:
 - протокол са Alemtuzumabom
 - FC протокол код болесника са неадекватним одговором на алкилишуће агенсе
 - високе дозе кортикостероида
 - високодозна хемиотерапија

Током лечења ХЛЛ, може се постићи комплетна ремисија, парцијална ремисија, прогресија болести и стабилно стање (Mihaljevic i dr. 2011).

Комплетна ремисија	Парцијална ремисија	Прогресија болести	Стабилно стање
-нормалан физикални налаз -одсуство симптома болести -лимфоцити $< 4,0 \times 10^9/L$ -неутрофили $> 1,5 \times 10^9/L$ -тромбоцити $> 100 \times 10^9/L$ -хемоглобин $> 11 g/L$	->50% смањења броја лимфоцита ->50% броја лимфоденопатије ->50% регресије хепато/спленомегалије -присуство > 1 критеријума: -неутрофили $> 1,5 \times 10^9/L$ или повећање $> 50\%$ -тромбоцити $> 100 \times 10^9/L$ или повећање преко 50% -хемоглобин $> 11 g/L$ или повећање преко 50%	->50% повећања најмање 2 лимфне жлезде на 2 узастопна прегледа -нова увећања лимфних жлезда ->50% повећања хепато/спленомегалије ->50% пораста лимфоцита -трансформација у Richter-ов синдром или ПЛЛ	све друго

Табела 1.0. Симптоми класификације пацијената у стадијуме прогресивног или стабилног тока болести.

ВИШЕСТРУКА РЕЗИСТЕНЦИЈА ОРГАНИЗМА НА ЛЕКОВЕ

(MDR-Multidrug resistance)

Највећа препрека успеху лечења малигних болести је постојање варијанти болести које испољавају резистенцију на хемиотерапију (енг. multidrug resistance, MDR) [Laage, H.,

2008]. *MDR* има важну улогу у иницијацији тумора и његовој прогресији кроз повећану пролиферацију и инхибицију апоптозе.

Ћелијски механизми за које знамо да имају важну улогу у *MDR* су:

1. транспортна (пумпна) резистенција – промене у уласку лека или ефлуксу лека кроз мембрану туморске ћелије (P-гликопротеин, енг. multidrug resistance (*MDR*)1 P-glycoprotein transporter), или промене у транспорту лрка између цитоплазме и нуклеуса (протеини LRP/VAULT)
2. метаболичка резистенција – промене у активацијин или инактивацији лекова унутра туморске ћелије (глутатион – С трансферазе)
3. резистенција узрокована измењеним таргетом лека – промене у протеинима преко којих лек делује. Промене могу бити у количини протеина унутар туморске ћелије преко којих лек остварује своје дејство, или у њиховом афинитету за лек (топоизомеразе)
4. резистенција узрокована ДНК репарацијом – промене у процесима ДНК репарације (гени одговорни за „mismatch“ репарацију, као што је *Msh2*)
5. апоптотска резистенција – промене у способности туморске ћелије да оствари образац програмиране ћелијске смрти или промене у апоптотским сигналним путевима (*bcl2*, *p53*).

Туморске ћелије на овај начин постају способне да развију селективну предност у преживљавању, мењајући ћелијске путеве и превазилазећи цитотоксични ефекат лекова на једном или више наведених нивоа. Разумевање тих механизма буди наду да се терапијске стратегије могу развијати у правцу превазилажења резистенције на хемиотерапију код пацијената (D.M. Bradshaw et al. 1998).

Транспортна резистенција на лекове – варијанте у гену *ABCB1*

Различити механизми дају допринос *MDR*, укључујући повишену експресију протеина који су ефлуксне пумпе и не дозвољавају улазак лека у ћелију (транспортна, пумпна резистенција) и повишена активност антиапоптотског система (апоптотска резистенција) [Wang, X., et al. 2007]. P-гликопротеин (енг. P-gp; кодиран геном

MDR1/ABCB1), и други протеини асоцирани са резистенцијом на терапију, припадају суперфамилији протеина који везују *ATP* (енг. *ATP-binding cassette, ABC*). П – гликопротеин се сматра мултирезистентном пумпом за велики број структурно различитих лекова. Његова експресија је изражена у епикалним мембранама црева, јетре и бубрега, где долази до елиминације или апсорпције лека (Thiebaut, F., et al. 1987; Cordon-Cardo, Cet al. 1989). Овај протеин транспортер (одговоран за пумпну резистенцију) учествују у ефлуксу лекова, као што су антрациклини, доксорубицин и флударабин, који се користе у лечењу канцера дојке, оваријума и леукемија (Saher, K., et al. 2012). Флударабин представља један од најважнијих лекова који се користи у лечењу ХЛЛ [Bosch, F., et al 2008].

Претходна истраживања су показала повишену експресију *ABCB1* гена у пацијената са акутном леукемијом и хроничним мијелопролиферативним болестима [Sviranovski, A., et al. 2009]. Показано је да варијанте (енг. *single nucleotide polymorphisms, SNP*) у *ABCB1* гену могу да доведу до промене у експресији овог гена, што утиче на модулацију у одговору на лекове и клинички ток хематолошких малигнитета [Maroofi, F.,2015]. SNPs у *ABCB1* гену може да утиче на фармакокинетику супстрата П-гликопротеина. Најбоље изучене варијанте у *ABCB1* гену као фармакогенетички маркери укључени у резистенцију на хемотерапију су: rs1045642 - 3435C>T, Ile1145Ile и rs20132582 - 2677G>T/A, Ala893Ser/Thr).

Hoffmeyer et al. доказали су постојање варијанте, полиморфизма у нуклеотиду 3455, у егзону 26 *ABCB1* гена, који корелира са *ABCB1* експресијом у хуманом дуоденуму и плазма концентрацији након примене дигоксина, типичног супстрата П-гликопротеина [Hoffmeyer, S., 2000]. Хомозиготни носиоци варијанте *ABCB1* с. 3455C>T, имају значајно смањену експресију П-гликопротеина у дуоденуму као и изразито висок ниво дигоксина у плазми. Неколико студија говори је у прилог повећане плазма концентрације супстрата П-гликопротеина, код субјеката са 3455C алелском варијантом, у односу на 3455T алелском варијантом, али друге студије су имале контрадикторне резултате [Hoffmeyer, S., 2000]. Међутим, молекуларни механизам којим варијанта с. 3455C>T, мења експресију *ABCB1* гена још увек су непознати.

Друга значајна варијанта у хуманом *ABCB1* гену је с. 2677 G>T/A (Tanabe, M., et al. 2001).

Kioka et al. су показали да 2677G>T супституција резултира смањеном интрацелуларном акумулацијом неколико супстрата П-гликопротеина у ХЛЛ ћелијама (Kioka, N., et al. 1989).

Показано је да су варијанте на позицијама 2677 и 3435 у *ABCB1* гену удружене код више од 90% испитаника у Кавказу и Јапану (Kim, B., et al. 2001; Tanabe, M., et al. 2001).

АПОПТОЗА У ХРОНИЧНОЈ ЛИМФОЦИТНОЈ ЛЕУКЕМИЈИ

Хронична лимфоцитна леукемија се сматра типичним примером малигнитета узрокованим поремећајима у процесу апоптозе. Циркулишући ХЛЛ Б лимфоцити се налазе у G0/G1 фази ћелијског циклуса и њихова постепена акумулација у крви, костној сржи и секундарним лимфоидним органима, која се дешава током болести, приписана је примарно њиховој способности да избегну апоптозу (Messmer *et al.* 2005; Defoiche *et al.* 2008).

Механизам којим би се објаснила ова резистенција још увек је непознат. Контрола апоптозе у ХЛЛ ћелијама је комплексан процес који је резултат комбинованог дејства две компоненте: сигнала који ћелије примају из микросредине и генетичких и/или епигенетичких промена апоптотске машинерије у самим леукемичним Б лимфоцитима. Обе компоненте су врло хетерогене међу пацијентима (Collins *et al.* 1989; Ghia and Caligaris-Cappio 2000).

Код ХЛЛ пацијената су детектоване бројне генетичке промене и аберантне експресије бројних протеина регулатора апоптозе, који су укључени у спољашњи и унутрашњи пут ове активације. Због централне улоге у процесима регулације апоптозе, генетичких промена и аберантних експресија бројних чланова Bcl2 фамилије протеина, Bcl2 фамилија протеина привукла је највећи пажњу у изучавању апоптозе у ХЛЛ.

Bcl2 У ХРОНИЧНОЈ ЛИМФОЦИТНОЈ ЛЕУКЕМИЈИ

Bcl2 ("B-cell CLL/lymphoma 2") протеин је типичан анти-апоптотски члан Bcl2 фамилије. Експримира се у многим типовима ћелија, укључујући Б и Т лимфоците. Bcl2 је кодиран геном који је лоциран на хромозому 18q21.3 и састоји се од 3 егзона; алтернативним сплајсингом настају два транскрипта Bcl2 α и Bcl2 β (Tsujimoto and Croce 1986).

Леукемични Б лимфоцити већине ХЛЛ пацијената (преко 80%) експримирају висок ниво Bcl2. Експресија је обично већа у нормалним Б ћелијама, па чак и у ћелијама које садрже t(14;18) транслокацију. Сматра се да је за прекомерну експресију Bcl2 одговорна хиперметилација његовог промоторског региона, детектована код већине пацијената [Hanada *et al.* 1993].

Повећан ниво Bcl2, је у неким студијама дао јасну асоцијацију са неповољним прогностичким клиничким факторима, каснијим стадијумима болести, резистенцијом на хемиотерапију и краћим преживљавањем ХЛЛ пацијената (Robertson *et al.* 1996; Faderl *et al.* 2002).

У другим студијама, Bcl2 експресија није показала прогностички значај (Pepper *et al.* 1996; Aguilar-Santelises *et al.* 1996; Pepper *et al.* 1997; Molica *et al.* 1998). Ипак, заједничко свим овим студијама јесте повећана експресија Bcl2, хетерогеност нивоа експресије Bcl2 међу пацијентима и преклапање са здравим контролама.

Bax У ХРОНИЧНОЈ ЛИМФОЦИТНОЈ ЛЕУКЕМИЈИ

Bax протеин ("Bcl2-associated X protein") је типичан про-апоптотски члан Bcl2 фамилије. Експримира се у многим типовима ћелија, укључујући Т и Б лимфоците. Кодирајући је геном који је лоциран на хромозому 19q13.3-q13.4 и састоји се од 6 егзона који су диференцијално експримирани у различитим ткивима (Oltvai *et al.* 1993; Arpe *et al.* 1995; Zhou *et al.* 1998; Shi *et al.* 1999; Schmitt *et al.* 2004; Cartron *et al.* 2002).

Као и у случају Bcl2, експресија Bax није показала конзистентну асоцијацију са клиничким карактеристикама ХЛЛ. У неким студијама је детектована асоцијација

повишеног нивоа Вах са индолентним током болести или одговором на терапију (Aguilar-Santelises *et al.* 1996; Molica *et al.* 1998; Pepper *et al.* 1996). У другим студијама то није потврђено, а није показана ни асоцијација са клиничким параметрима.

Bcl2/Вах ОДНОС

Релативни однос експресије и/или активности различитих анти- и про-апоптотских чланова Bcl2 фамилије је кључна детерминанта способности ћелија да уђе у процес апоптозе. У складу са тим схватањем и имајући у виду функционални антагонизам Bcl2 и Вах, претпоставља се да је њихов релативни однос, пре него индивидуална експресија, значајна за избегавање апоптозе од стране ХЛЛ Б лимфоцита (Pepper *et al.* 1997; Saxena *et al.* 2004).

Повишен Bcl2/Вах однос код ХЛЛ пацијената је детектован у многим студијама, иако је показао знатну хетерогеност међу пацијентима и преклапање са здравим контролама. Повишен Bcl2/Вах однос је показао асоцијацију са прогресивним током болести и резистенцијом на хемиотерапију (Aguilar-Santelises *et al.* 1996; Molica *et al.* 1998). Међутим, у неким студијама Bcl2/Вах однос, није корелирао са неповољним прогностичким параметрима, изузев хемиотерапије (Kitada *et al.* 1998).

Детектована је корелација повећаног нивоа Bcl2 са повећаном експресијом Вах (Faderl *et al.* 2002).

Истраживања су показала да симултано снижење експресије Bcl2 и Вах је рационална стратегија за имплементацију анти-канцер терапије. Поред тога, досадашња истраживања су сугерисала да постоји повезаност између аберантне експресије *ABC1* гена и регулације апоптозе преко Bcl2 и Вах протеина (Wang, D., *et al.* 1997).

Међутим, механизам који лежи у основи ових повезаности није познат.

2. ЦИЉЕВИ РАДА

ЦИЉЕВИ

Циљ ове студије је да анализира утицај фармакогенетичких маркера укључених у резистенцију на хемиотерапију (експресија *ABCB1* гена и полиморфизам две варијанте у *ABCB1* гену (rs1045642 - 3435C>T, Ile1145Ile и rs20132582 - 2677G>T/A, Ala893Ser/Thr), као и експресија *Bcl2* и *Bax* гена) на терапијски одговор код пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије .

Специфични циљеви

1. Утврдити учесталост варијанти у *ABCB1* гену (rs1045642 и rs20132582) код пацијената оболелих од ХЛЛ и здравих контрола
2. Утврдити ниво експресије *ABCB1* гена код пацијената оболелих од ХЛЛ и здравих контрола
3. Испитати да ли постоји утицај варијанти у *ABCB1* гену (rs1045642 и rs20132582) на експресију *ABCB1* гена код пацијената оболелих од ХЛЛ и здравих контрола
4. Утврдити да ли постоји корелација између нивоа експресије *ABCB1* гена и нивоа експресије *Bcl2* и *Bax* гена код пацијената оболелих од ХЛЛ
5. Утврдити да ли постоји корелација између нивоа експресије *ABCB1* гена и одговора на терапију (постизање комплетне или парцијалне ремисије) код пацијената оболелих од ХЛЛ .
6. Утврдити да ли постоји корелација између нивоа експресије *Bcl2* и *Bax* гена и одговора на терапију (постизање комплетне или парцијалне ремисије) код пацијената оболелих од ХЛЛ .
7. Утврдити да ли постоји повезаност између аберантне експресије *ABCB1* гена, регулације апоптозе преко *Bcl2* и *Bax* гена и одговора на терапију (постизање комплетне или парцијалне ремисије) код пацијената оболелих од ХЛЛ .

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

ПАЦИЈЕНТИ

У студију анализе DNK и RNK маркера као фактора резистенције на хемиотерапију код пацијената са HLL укључено је 46 пацијената лечених на Клиници за хематологију Клиничког центра Србије у Београду. Дијагноза болести је постављена, лечење спроведено и клинички подаци учињени доступним од стране Проф. Др Милице Чоловић. Како ће се у студији пратити генетички маркерирезистенције на лекове, терапијакод болесника који се прате је била униформна: у студију су укључени само болесници лечени FC протоколом (fludarabin+ciklofosamid). Процена одговора на терапију се вршила после 6 циклуса хемиотерапије (6-7 месеци лечења) и пацијенти су подељени у групе према одговору на терапију на оне који су постигли комплетну или парцијалну ремисију. Поред тога у студију су били укључени и узорци здравих контрола (53) из биобанке Лабораторије за молекуларну биомедицину Института за молекуларну генетику и генетичко инжињерство Универзитета у Београду, које су биле усклађене по полу и старости са пацијентима са HLL.

Ова студија је одобрена од стране Етичког Комитета Клиничког центра Србије, Београд.

УЗОРЦИ

Крв је узимана са 3,8% Na-citratom као антикоагулансом, у односу 9:1 и транспортована до института за молекуларну генетику и генетичко инжињерство, где је вршена изолација DNK и RNK. Аликвот се чува на -20°C и из њега се изолује DNK, при чему се користи QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany). Из остатка узорка периферне крви се изолују моноклеарне ћелије на градијенту Ficoll-Plaque PLUS (GE Healthcare), ресуспендују у TRIzol®-у (Invitrogen), и чувају на -80°C . RNK се изолује из моноклеарних ћелија ресуспендованих у TRIzol® (Invitrogen). TRIzol® представља монофазни раствор фенола и гуанидин-изоцијаната, а сам процес изолације представља унапређен класичан метод изолације RNK дефинисан од стране Chomczynski P & Sacchi N (Chomczynski P & Sacchi N, 1987).

ИЗОЛАЦИЈА DNK ИЗ ПЕРИФЕРНЕ КРВИ

За изолацију DNK из крви коришћен је QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany).
Протокол;

- на дно тубе сипати 20 μl proteinase K (20 mg/ml), додати 200 μl узорка, 200 μl пуфера AL и помешати вортексовањем
- инкубирати у воденом купатилу 10 min/ 56°C
- додати 200 μl 96-100% етанола и помешати вортексовањем
- овако припремљен узорак нанети на QIAamp Mini spin колоницу и центрифугирати

8 000 rpm/1 min

- колоницу сипати са 500 μ l пуфера AW1, центрифугирати на 8 000 rpm/1 min
- колоницу сипати са 500 μ l пуфера AW2, центрифугирати на 13 000 rpm/3 min
- на крају преbacити колоницу на чисту тубу, додати 200 μ l пуфера АЕ и центрифугирати на 8 000 rpm/1 min

ИЗОЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ ПЕРИФЕРНЕ КРВИ

Протокол;

- на дно стерилне епрувете запремине 10 ml сипати 3 ml Ficoll-Plaque PLUS (GE Healthcare), а затим на овај градијент нанети 4 ml разблаженог узорка (1:1, узорак:физиолошки раствор)
- центрифугирати на 1 500 g/25 min на собној температури, у клиничкој центрифуги, без кочења
- након центрифугирања, пипетом преbacити „buffy coat“ интерфазу која је састављена од мононуклеарних ћелија у нову стерилну епрувету
- испрати два пута у PBS-у. Након сваког испирања следи центрифугирање на 1 500 g/15 min
- талог ресуспендовати у TRIzol®-у (Invitrogen)

ИЗОЛАЦИЈА RNK ИЗ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА

За изолацију RNK из мононуклеарних ћелија је коришћен TRIzol® (Invitrogen). TRIzol® представља монофазан раствор фенола и гуанидин-изотиоцијаната, а сам процес изолације представља унапређен класичан метод изолације RNK дефинисан од старане strane Chomczynski P & Sacchi N (Chomczynski P & Sacchi N, 1987).

Протокол;

- у 1 ml TRIzol®-а ресуспендовано је максимално 1×10^7 ћелија и лизирано провлачењем кроз иглу промера 0,7 mm
- лизирани узорак се остави да стоји на собној температури 5-10 min
- додаје се 200 μ l хлороформа, снажно промућка, а затим узорак остави да стоји 5-15 min на собној температури
- након центрифугирања на 12 000rcf/15 min/+4°C појављују се јасно одвојене фазе; горња водена фаза у којој се налази RNK, интерфаза и доња, црвена, органска фаза у којој се налази DNK и протеини
- горња водена фаза се преbacује у нову тубу и додаје се 0,5 ml изопропанола. Промешати инвертовањем тубе и оставити да стоји 10-15 min на собној температури (преципитација RNK)
- центрифугирати на 12 000rcf/15 min/+4°C, а затим уклонити супернатант декантовањем и опрати талог са 1 ml хладног 70% етанола
- центрифугирања на 12 000rcf/10 min/+4°C, уклонити пажљиво етанол и талог, осушити на собној температури
- талог RNK растворити у „RNAse-free“ води, а концентрацију и чистоћу RNK одредити мерењем A260/A280 на спектрофотометру

ИЗОЛАЦИЈА DNK ИЗ МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА

Из мононуклеарних ћелија које су ресуспендоване у TRIzol®-у (Invitrogen), поред изолације RNK може се паралелно вршити и изолација DNK.

Протокол;

- након лизе ћелија, додавања 200 μ l хлороформан и центрифугирања на 12 000 rcf/15 min/+4°C Појављују се јасно одвојене фазе; DNK се налази у доњој, обојеној, органској фази
- пажљиво отклонити остатке водене фазе
- преципитирати DNK из интерфазе и органске фазе додавањем 300 μ l 100% етанола. Помешати ивертовањем туба и оставити да стоји на собној температури 3-5 min
- након центрифугирања на 2 000rcf/5 min/+4°C, уклонити супернатант (који садржи протеине) и опрати талог два пута додавањем 1 ml раствора који садржи 0,1 M Na-citrat и 10% етанол (wash-solution). У току сваког испирања омогућити да DNK стоји најмање 30 min на собној температури, након чега следи центрифугирање на 2 000rcf/5 min/+4°C
- ресуспендовати талог у 1,5-2 ml 75% етанола и оставити да стоји 10-20 min на собној температури
- након поновног центрифугирања 2 000rcf/5 min/+4°C, одбацити супернатант и осушити талог на собној температури
- талог растворити у 8 mM NaOH

РЕВЕРЗНА ТРАНСКРИПЦИЈА (РТ)

Синтеза cDNK је извршена реакцијом реверзне транскрипције.

Протокол;

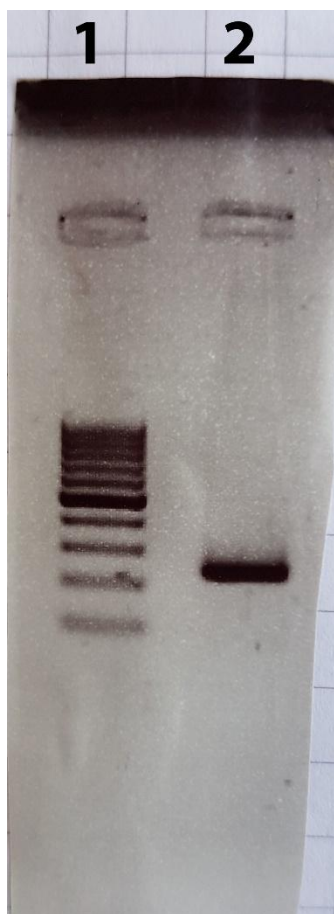
- смешу финалног волумена 11, 5 μ l која садржи 2 μ g RNK и 100 pmol „random-hexamer“ прајмера инкубирати 5 min на 70°C, а затим охладити на леду
- додати смешу финалног волумена 8,5 μ l која садржи 4 μ l 5x RT-puffera, 20U RNase-inhobitora, 2 μ l dNTP (10 mM) и 40 U M-MuLV реверзне транскриптазе (Fermentas)
- инкубирати 10 min на 25°C, а затим 1h на 42°C
- реакција се зауставља инкубацијом од 10 min на 70°C

ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА ПОЛИМЕРИЗАЦИЈЕ (PCR)

Ланчана реакција полимеризације (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) је in vitro амплификације дефинисане DNK секвенце и представља имитацију процеса DNK репликације. Репликација користи два олигонуклеотида, комплементарна крајевима секвенце од интереса (прајмери), а који су међусобно супротно орјентисани и дугачки 15-20 нуклеотида. Синтеза DNK катализована је термостабилном DNK полимеразом. Понављање циклуса, од којих се сваки састоји од денатурације DNK, хибридизације

прајмера и екстензије хибризованих прајмера од стране термостабилне ДНК полимеразе, за резултат има експоненцијалну амплификацију специфичног ДНК фрагмента. Крајеви амплификованог фрагмента су дефинисани 5' крајевима прајмера, а њихова величина одређена је растојањем између секвенци који прајмери препознају. PCR реакциона смеша мора садржати све компоненте потребне за *in vitro* синтезу ДНК: матрица (ДНК која се копира), прајмери (олигонуклеотиди комплементарни крајевима секвенце од интереса), нуклеотиди (градивни елементи ДНК), Таq полимераза (термостабилна ДНКполимераза која катализује уградњу нуклеотида по принципу комплементарности са матрицом), јони магнезијума и пуфер (неопходни за оптимални рад Таq полимераза).

PCR-RFLP (eng. Polimerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism) је метода којом се користи за директну мутацију која мења, креира ново или укида постојеће место препознавања неког рестрикционог ензима.



Слика 1.0. Електрофореграм PCR амплификације ДНК фрагмента који садржи варијанту *ABCB1* с. 2677 G>T. 1. ДНК маркер од 100bp; 2. PCR продукт

Услови PCR реакције за детекцију варјанте *ABCB1* с. 2677 G>Т (Ghallab et al. 2015)

Финална PCR смеша од 20 μ l садржи следеће компоненте: 100-300 ng геномске DNK, 1x PCR пуфер (КАРА Biosystems, МА, USA), 1.5 mM MgCl₂, 1x Q пуфер (Qiagen, Немачка), 200 μ M dNTP, прајмери (F (forward): 5'-TGC AGG CTA TAG GTT CCA GG i R (reverse): 5'-TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC G i 1U КАРА Таq DNA Полимеразе (КАРА Biosystems, МА, USA).

Температурни профил PCR реакције:

- 5 min/ 95⁰C – активација Таq полимеразе
- 35 циклуса:
- 30 sec/94⁰C – денатурација
- 30 sec/58⁰C – анилинг
- 30 sec/72⁰C – елонгација
- 10 min/72⁰C – финална елонгација

Анализа PCR продуката се врши на 4% агарозном гелу визуелизацијом под UV-светлом.

Дигестија PCR продукта рестрикционим езимом

Детекција варјанте *ABCB1* с. 2677 G>Т вршена је сечењем *Ban I* (Thermo Scientific) рестрикционим ензимом фрагмента DNK добијених у реакцији ланчаног умножавања. PCR фрагмент дужине 224 bp, уколико садржи алелску варјанту G, бива сечен на фрагменте дужине 200bp и 24 bp. Сечење рестрикционим ензимом вршено је у рестрикционој смеси од 20 μ l која је садржала: 10 μ l умноженог фрагмента, 1,5 μ l 10X пуфера (Thermo Scientific), 0.3 μ l *Ban I* ензима и до 20 μ l dH₂O. Реакциона смеша инкубирана је преко ноћи на 37⁰C. Анализа DNK фрагмента после дигестије се врши на 4% агарозном гелу визуелизацијом под UV-светлом.

Услови PCR реакције за детекцију варјанте *ABCB1* с. 3435 C>Т (Ghallab et al. 2015)

Финална PCR смеша од 20 μ l садржи следеће компоненте: 100-300 ng геномске DNK, 1x PCR пуфер (КАРА Biosystems, МА, USA), 1.5 mM MgCl₂, 1x Q пуфер (Qiagen, Немачка), 200 μ M dNTP, прајмери (F (forward): 5'-TGT TTT CAG CTG CTT GAT i R (reverse): 5'-AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC i 1U КАРА Таq DNA Полимеразе (КАРА Biosystems, МА, USA).

Температурни профил PCR реакције:

- 5 min/ 95⁰C – активација Таq полимеразе
- 35 циклуса:
- 30 sec/94⁰C – денатурација

- 30 sec/54⁰C – анилинг
- 30 sec/72⁰C – елонгација
- 10 min/72⁰C – финална елонгација

Анализа PCR продукта се врши на 2% агарозном гелу визуелизацијом под UV-светлом.

Дигестија PCR продукта рестрикционим ензимом

Детекција варјанте *ABCBI* с. 3435 G>T вршена је сечењем *Dpn I* (BioLabs, New England) рестрикционим ензимом фрагмената DNK добијених у реакцији ланчаног умножавања. PCR фрагмент дужине 208 bp, уколико садржи алелску варјанту С, бива сечен на фрагменте дужине 152bp и 56 bp. Сечење рестрикционим ензимом вршено је у рестрикционој смеши од 20 µl која је садржала: 10 µl умноженог фрагмента, 1,5 µl 10X пуфера (NEB3, BioLabs, New England), 0.3 µl *Dpn I* ензима и до 20 µl dH₂O. Реакциона смеша инкубирана је преко ноћи на 37°C. Анализа DNK фрагмента после дигестије је вршена на 4% агарозном гелу визуелизацијом под UV-светлом.

АНАЛИЗА DNK НА АГАРОЗНОМ ГЕЛУ (Maniatis i sar., 1982)

За верификацију успешности ланчане реакције умножавања *CYP21A2* гена коришћена је хоризонтална електрофореза на 1% -ном агарозном гелу.

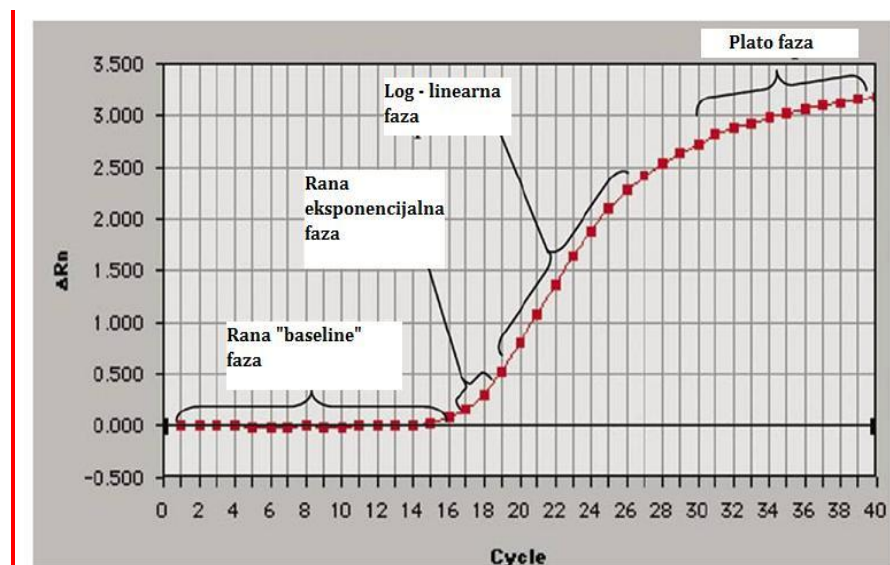
Као пуфер за припремање гела коришћен је 1X концентрован ТАЕ пуфер (0.04M Tris-acetat; 0.002M EDTA pH8.0). Исти пуфер јекоришћен и за електрофорезу. У гел је додат и етидијум бромид у финалној концентрацији 0.5µg/ml. Етидијум бромид је флуоресцентна боја која се интеркалира у DNK и представља најпогодније средство за визуелизацију DNK на агарозном гелу. Електрофореза је текла при јачини струје од 100 mA и констатном напону од 100 V. Након завршене електрофорезе гел је анализиран под UV светлом таласне дужине 312 nm. За одређивање величине фрагмената DNK коришћен је комерцијални DNK маркер од 1kb (Fermentas).

АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА ПОМОЋУ "REAL-TIME" PCR (qPCR) МЕТОДЕ

"Real-time" PCR или квантитативна PCR (qPCR) је метода која омогућава квантификацију PCR продукта у току сваког PCR циклуса, тј. у реалном времену ("real-time"). qRT-PCR ("quantitative RT-PCR") је варјанта qPCR методе у којој се, као матрица за амплификацију специфичне секвенце, користи cDNK.

У qPCR се мери флуоресцентни сигнал који се емитује у току PCR реакције и чији је интензитет директно пропорционалан количини PCR продукта у датом циклусу. За разлику од "класичног" PCR, где се количина продукта може мерити сам на крају PCR реакције, овде се квантификација одвија у току експоненцијалне фазе реакције, у току које долази до удвостручавања PCR продукта приликом сваког циклуса (Слика 1.0)

У почетним циклусима интензитета флуоросценције не прелази базални ниво ("baseline"). Циклус у коме је флуоресцентни сигнал узорка значајно виши од базалног сигнала, назива се "threshold cycle" – Ct. Вредност Ct је директно пропорционална количини таргет секвенце у узорку. Што је већи почетни број копија таргет секвенце, Ct је нижи и обрнуто, Ct је виши у узорцима са мањом почетном количином таргет секвенце.

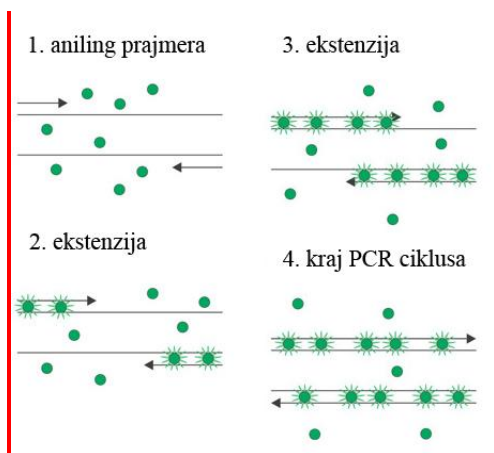


Слика 1.1. Фазе амплификације. R_n представља вредност флуоресценције репортерске боје, а ΔR_n представља разлику R_n вредности између узорка и бланка ("no template control") [<http://www.appliedbiosystems.com>]

Тренутно се користе 2 основне qPCR технике:

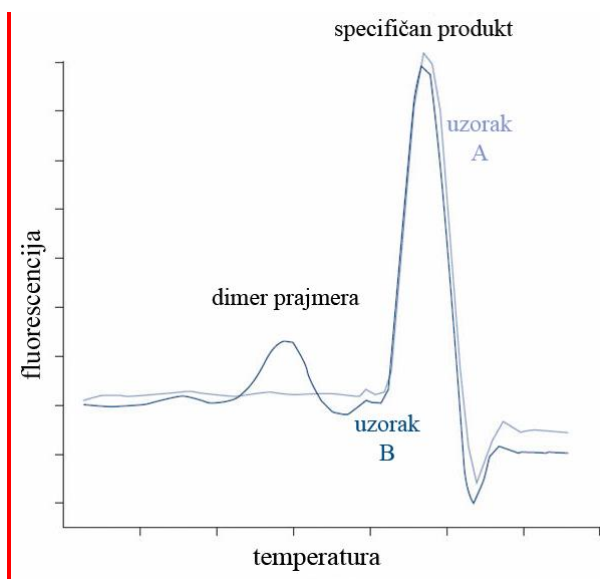
1. SYBR Green
2. TaqMan

SYBR Green је најједноставнија техника, заснована на примени интеркалирајуће SYBR Green I боје која се везује за мањи жљеб дволанчане ДНК. Са повећањем броја циклуса PCR реакције долази до повећања количине дволанчане реакције ДНК, па самим тим и до повећаног интензитета флуоресцентног сигнала који емитује SYBR Green I боја (Слика 1.1).



Слика 1.2. Принцип рада SYBR Green I технике [van der Velden *et al.* 2003]

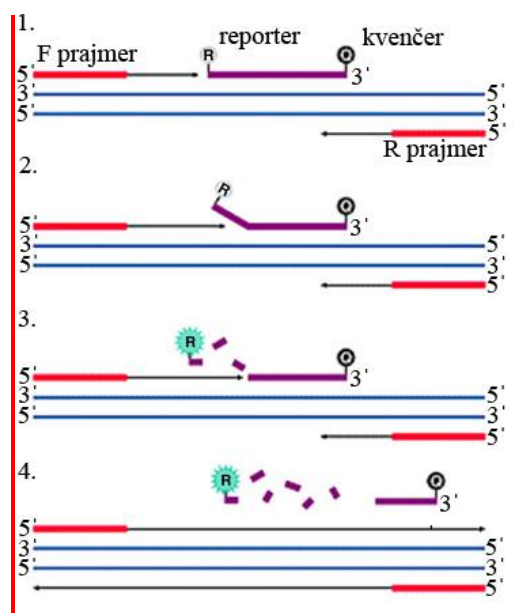
SYBR Green техника за последицу може имати детекцију неспецифично амплификованих PCR продуката, као и детекцију димера пражмера. Због тога се за процену специфичности реакције примењује анализа криве топљења ("melting curve analysis"). У овој анализи, током qPCR реакције температура постепено расте од 65°C до 95°C, при чему се константно прати ниво флуоресценције. У присуству дволанчане ДНК, интензитет флуоресцентног сигнала ће бити висок при ниским температурама, али ће флуоресценција драстично пасти при температурама око тачке топљења PCR продукта. PCR продукти различите дужине и састава ће имати различите тачке топљења, па ће давати различите пик-ове флуоресценције. У присуству само једног, специфичног PCR продукта детектоваће се само један пик (Slika 1.2).



Слика 1.3. Анализа криве топљења [http://www.appliedbiosystems.com]

TaqMan техника користи 5'→3' егзонуклеарну активност Таq полимеразе за детекцију PCR

Продукта. За разлику од SYBR Green технике, и TaqMan техници, се поред специфичних прајмера, користи и TaqMan проба. TaqMan проба је олиго-нуклеотидна проба комплементарна секвенци у оквиру таргет секвенце; на 5' је обележена флуоросцентном, репортерском бојом (најчешће FAM, VIC или JOE), а на 3' крају "квенчером" (најчешће TAMRA). Све док се репортер и квенчер налазе близу један другом, тј. док је TaqMan проба интактна, нема емитовања флуоросценције јер флуоросценција коју емитује репортер бива апсорбована од стране квенчера. Међутим, у току PCR амплификације 5'→3' егзонуклеазна активност Taq полимеразе измешта пробу и уклања је са DNK ланца, што резултира емитовањем детектабилне флуоросценције од стране репортерске боје (Слика 1.3.)



Слика 1.4. Принцип рада TaqMan технике. 1) TaqMan проба и прајмери се везују за таргет секвенцу и започињу екстензију; 2) када Taq полимеразе стигне до пробе, њена 5'→3' егзонуклеазна активност уклања пробу; 3) започиње "сецање" пробе и емитовање флуоросценције; 4) завршетак полимеризације [Wang *et al.* 2010]

У току експоненцијалне фазе PCR реакције, квантитативни однос између почетне количине таргет секвенце и количине PCR продукта у било ком циклусу је:

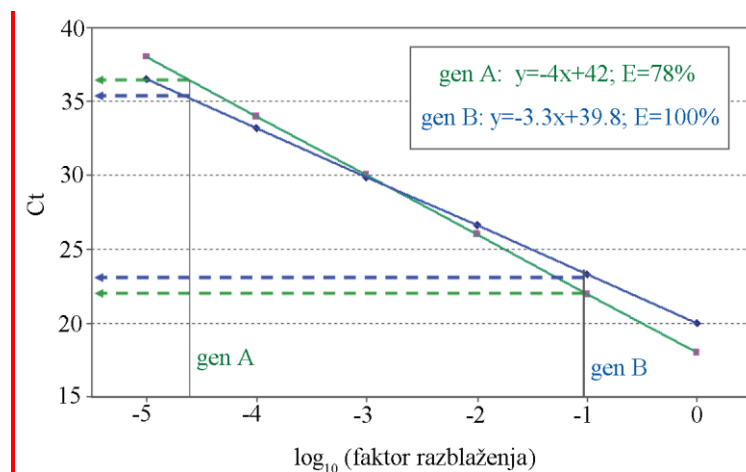
$$X_n = X_0 (1+E)^n$$

Где је X_n количина таргет секвенце у циклусу n , X_0 почетна количина секвенце, док је E ефикасност амплификације и може имати вредност од 0 (нема амплификације) до 1 (у сваком циклусу долази до дуплирања количине таргет секвенце).

Ефикасност реакције је веома важна за одабир методе квантификације qPCR података и она се израчунава из нагиба (S) стандардне криве:

$$E = 10^{-1/S} - 1$$

Стандардна крива се прави анализирањем амплификације десетоструких разблажења почетне количине DNK ili cDNK (Слика 1.4).



Слика 1.5. Одређивање ефикасности qPCR реакције методом стандардне криве [Http://www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)

Квантификација qPCR продуката може бити:

- 1) Апсолутна квантификација, где је резултат изражен као апсолутан број копија таргет секвенце; квантификација таргет секвенце се добија поређењем са стандардном кривом израђеном од узорак познате концентрације
- 2) Релативна квантификација, где је резултат изражен као релативни однос количине референтног узорка (калибратор) и мереног узорка; у овом раду квантификација експресије гена од интереса вршена је методом релативне квантификације

У оба приступа квантификацији, веома је важно извршити нормализацију добијених података. Како је количина добијених PCR продуката директно зависна од почетне количине матрице, да би се избегле грешке настале приликом експеримента, упоредо са умножавањем таргет секвенце врши се и умножавање т.к. Ендогене контроле. Ендогена контрола је обично "housekeeping" ген чија је експресија стабилна у свим узорцима, односно чија се експресија не мења приликом експерименталних третмана.

У случају релативне квантификације, квантификација експресије таргет гена може се извршавати методом релативне стандардне криве или компаративном ddCt методом, која је коришћена у овом раду.

КОМПАРАТИВНА *ddCt* МЕТОДА

Компаративна *ddCt* метода је најчешће коришћена метода квантификације експресије таргет гена применом qRT-PCR технологије [Livak *et al.* 2001].

Количина таргет гена, нормализована у односу на ендогену контролу и релативно у односу на калибратор је:

$$Q = 2^{-ddCt}, \text{ где је}$$

$$ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{KALIBRATOR} = \\ (Ct_{target} - Ct_{endogena\ kont.}) - (Ct_{target, KALIBRATOR} - Ct_{endogena\ kont., KALIBRATOR})$$

Да би калкулација применом ове методе била тачна, ефикасност амплификације таргет гена и ендогене контроле мора бити приближно једнака и $> 96\%$.

Мерење експресије апоптотског гена qRT-PCR методом

Експресија апоптотских гена *Bcl2* и *Bax* је праћена qRT-PCR методом на 7500 Real-time PCR апарату (Applied Biosystems), употребом SYBR Green технике. Као ендогена контрола је коришћен *Abl* ген. <називи и секвенце прајмера наведени су у табели.

Реакциона смеша финалног волумена 10 μ l је садржала следеће компоненте:

- 50 ng cDNK
- 1 x *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems)
- 2 pmol (*Abl*) / 0.5 pmol (*Bcl2*, *Bax*) "forward" прајмера
- 2 pmol (*Abl*) / 0.5 pmol (*Bcl2*, *Bax*) "reverse" прајмера

Температурни профил реакције:

1. 2 min/50°C
2. 10 min/95°C
3. 40 циклуса:

- 15 sek/95°C
- 1 min/60°C

Обрада резултата је извршена применом компаративног ddCt метода, а као калибратор је коришћена HL60 ћелиска линија.

Мерење експресије *ABCB1* гена qRT-PCR методом

Експресија *ABCB1* гена је праћена qRT-PCR методом на 7500 Real-time PCR апарату (Applied Biosystems), употребом SYBR Green технике. Као ендогена контрола је коришћен *GAPDH* ген. Називи и секвенце прајмера наведене су у табели. Реакциона смеша финалног волумена 10 µl је садржала је следеће компоненте:

- 50 ng cDNK
- 1 x *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems)
- 4 pmol "forward" прајмера (*ABCB1*, *GAPDH*)
- 4 pmol "reverse" прајмера (*ABCB1*, *GAPDH*)

Температурни профил реакције:

4. 2 min/50°C
5. 10 min/95°C
6. 40 циклуса:
 - 15 sek/95°C
 - 1 min/60°C

Обрада резултата је извршена применом компаративног ddCt метода, а као калибратор је коришћена K562 ћелиска линија.

Табела 1.1. Прајмери коришћени у qRT-PCR експериментима

Назив прајмера	Секвенце прајмера
Bcl2-F	5' - TCG CCC TGT GGA TGA CTG A - 3'
Bcl2-R	5' - CAG AGA CAG CCA GGA GAA ATC - 3'
Bax-F	5' - TGG CAG CTG ACA TGT TTT CTG AC - 3'
Bax-R	5' - TCA CCC AAC CAC CCT GGT CTT - 3'
Abl-F	5' - TGG AGA TAA CAC TCT AAG CAT AAC TAA AGG T - 3'
Abl-R	5' - GAC GTA GTT GCT TGG GAC CCA - 3'
ABCB1-F	5' - GTC TAC AGT TCG TAA TGC TGA CTG - 3'
ABCB1-R	5' - TGT GAT CCA CGG ACA CTC CTA C - 3'
GAPDH-F	5' - GAA GGT GAA GGT CGG AGT- 3'
GAPDH-R	5' - GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC- 3'

СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Добијени подаци су обрађени и приказани у табели и на сликама уз пропратну дискусију у поглављу резултата..

Од општих статистичких података коришћени су; средња вредности стандардно одступање, распон вредности променљивих (минимум, максимум) и медијана редности.

За истраживање јачине везе између две непрекидне променљиве употребљен је метод Спирманове нелинеарне корелације (Спирманов коефицијент корелације).

За испитивање везе између категоријских променљивих коришћен је непараметарски тест за поређење између две и више категоријских променљивих, Фишеров „тачан показатељ вероватноће“(Fisher’s Exact Probability Test).

Од статистичких тестова за поређење група коришћен је непараметарски тест, Ман-Витнијев U-тест за испитивање разлика између две групе непрекидно променљивих.

За проналажење најповољније граничне вредности, коришћен је -line програм „Cut-off finder“ <http://molpath.charite.de/cutoff/> и „Receiver Operator Characteristic“ ROC анализом, као и ROC-кривом са описом специфичности и сензитивности.

Сви статистички тестови су посматрани на нивоу значајности нуле хипотезе од $p < 0,05$. Статистићка анализа је урађена на РС рачунару применом лиценцираног статистичког пакета IBM SPSS 21.0.

4. РЕЗУЛТАТИ

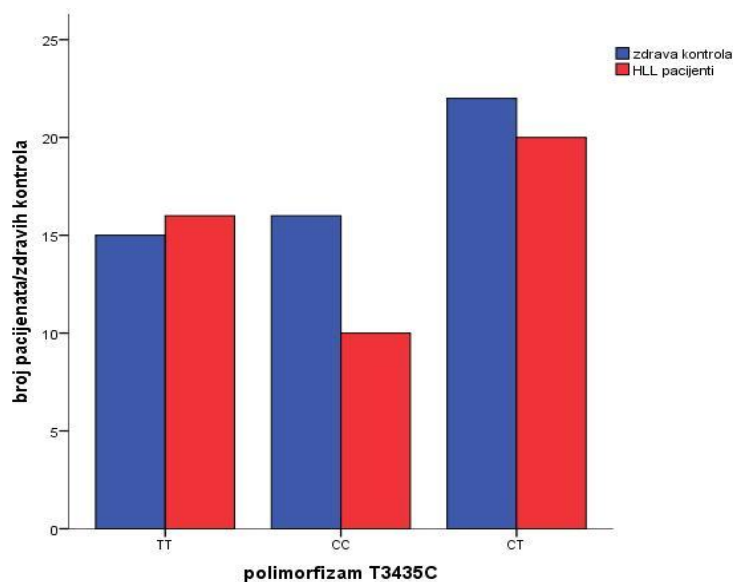
1. Демографске и клиничке карактеристике анализираних HLL пацијената

Укупно је анализирано 46 HLL пацијената. У нашој кохорти пацијената преовлађивао је мушки (83%) у односу на женски пол (17%). Медијана старости је износила 64 године (38 – 86 godina). Што се тиче клиничких карактеристика, на основу Binet-ове класификацијенајвећи проценат пацијената је имао С стадијум (43%), затим следи А стадијум (41%), а најмање пацијената је имало В стадијум болести (16%). Од 46 пацијената њих само 27% је имало стабилни, индолентни, облик болести, док су сви остали показали карактеристике прогресивног облика HLL (73%).

2. Учесталост варијанти у *ABCB1* гену, , T3435C и T2677G(A), код оболелих од HLL и код здравих контрола

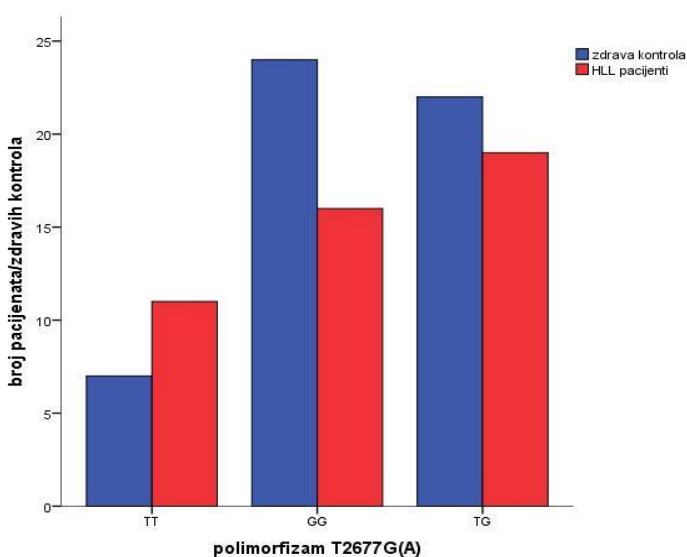
На варјанте T3435C у 26 егзону (rs1045642) и T2677G(A) у 21 егзону (rs2032582) *ABCB1* гена анализирано је 46 HLL пацијената и 53 здравих контроли.

Анализом пацијената и здравих контроли на присуство варјанте rs1045642 на позицији с.3435T>C, односно на позицији p.I1145 у P-glikoproteinu (P-gp), добијени су следећи резултати: и код пацијената и код здравих контроли најзаступљенији су били хетерозиготи СТ (43% пацијента и 42% здравих контроли), а затим ТТ хомозиготи (35% пацијената и 28% здравих контроли). Најмање је било детектовано хомозигота за СС (kod 22% пацијената и код 30% здравих контроли). Није детектована статистички значајна разлика у дистрибуцији појединих генотипова код оболелих и здравих контрола ($p=0,644$, Fisherov egzaktni test) (Слика 1.6.).



Слика 1.6. Заступљеност различитих алела варјанте rs1045642 код оболелих од HLL и код здравих контрола. Код HLL пацијената расподела је била следећа; TT 16/46, CC 10/46 и CT 20/46 пацијената. Код здравих контрола присуство TT варјанте нађено је код 15/53, CC код 16/53, а CT код 22/53.

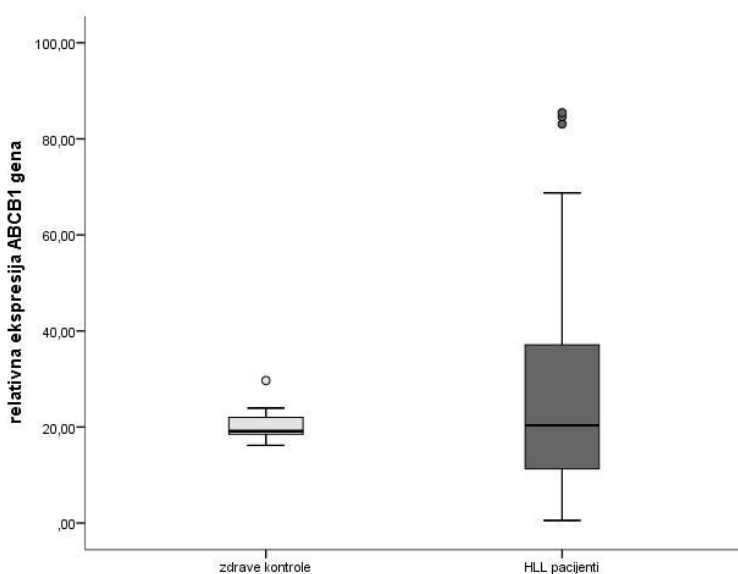
Анализом пацијената и здравих контрола на присуство варјанте rs2032582 на позицији c.2677T>G(A), односно на позицији .S893A(T) у P-glikoproteinu (P-gp), добијени су следећи резултати: и код пацијената и код здравих контрола најзаступљенији су били хетерозиготи TG и GG хомозиготи (заступљености 41% код пацијената и 42% код здравих контрола, односно 35% код пацијената и 45% код здравих контрола). Није детектована статистички значајна разлика у детекцији појединих генотипова код оболелих и здравих контрола ($p=0,335$, Фишеров egzaktni test) (Слика 1.7.).



Слика 1.7. Заступљеност различити алела варјанте rs2030582 код оболелих од HLL и здравих контрола. Код HLL пацијената расподела је била следећа; TT 11/46, GG 16/46 и TG 19/46 пацијената. Код здравих контрола присуство TT варјанте нађено је код 7/53, GG код 24/53, а TG код 22/53.

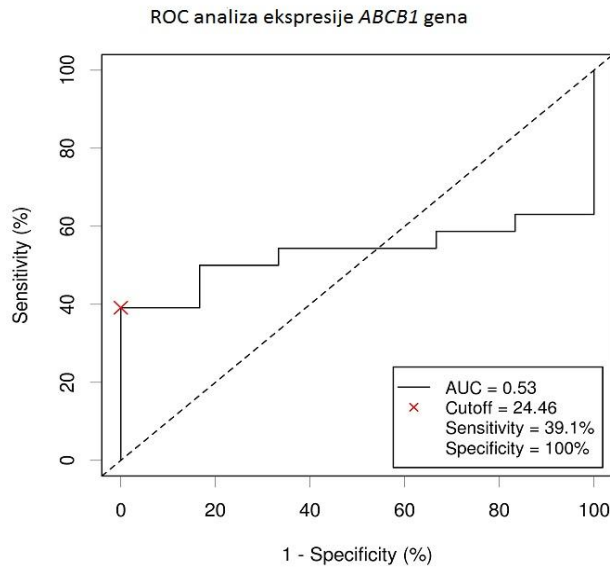
3. Експресија *ABCB1* гена код оболелих од HLL и код здравих контрола

Анализирано је укупно 46 HLL пацијената. Медијана вредности експресије *ABCB1* гена код оболелих је износила 20,37 (0,56-85,44) (средња вредност $27,09 \pm 3,34$). Није уочена статистички значајна разлика у нивоу експресије овог гена у односу на *ABCB1* експресију код здравих контрола (медијана 19,14 (16,18-29,67); средња вредност $20,86 \pm 1,72$) ($p=0.812$, U-test) (Слика 1.8.).

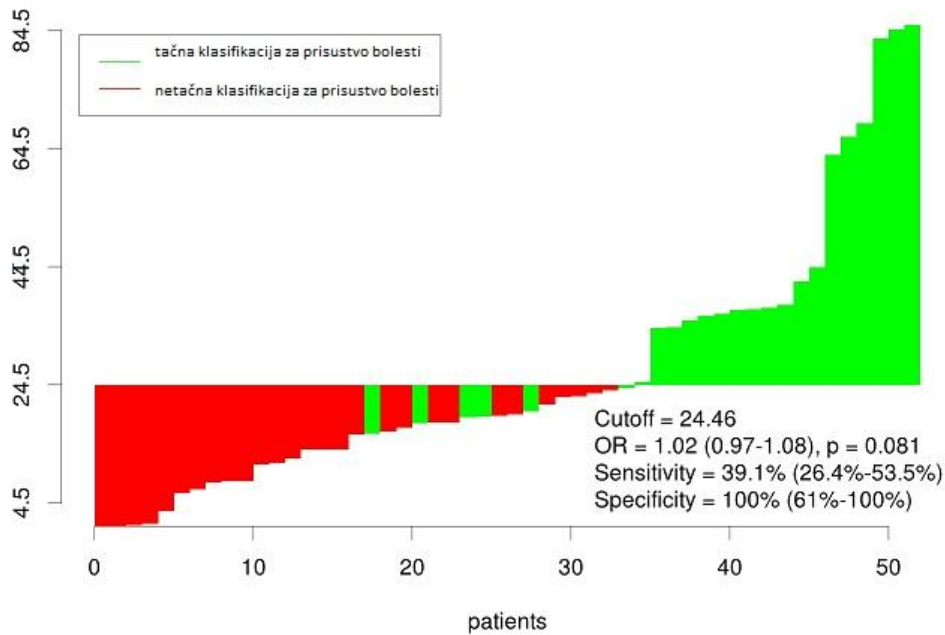


Слика 1.8. Box-plot графички приказ експресије *ABCB1* гена код HLL пацијената и здравих контрола. Хоризонталне линије представљају медијане вредности експресије у одговарајућим групама.

Применом „cut-off finder“ on-line програма и ROC анализом, дефинисали смо „cut-off“ вредност експресије *ABCB1* гена на основу које се најпрецизније може предвидети који од пацијената има високу експресију *ABCB1* гена (*ABCB1*⁺), а код којих се експресија овог гена не разликује од нивоа детектованог међу здравим контролама (*ABCB1*⁻). Ова вредност *ABCB1* експресије је износила 24,46. Након увођења дате вредности, наша контрола HLL пацијената је била сачињена од 18 пацијената (39%) са *ABCB1*⁺ сатаусом и од 28 пацијената (61%) са *ABCB1*⁻ статусом (Слика 4.и Слика 5).



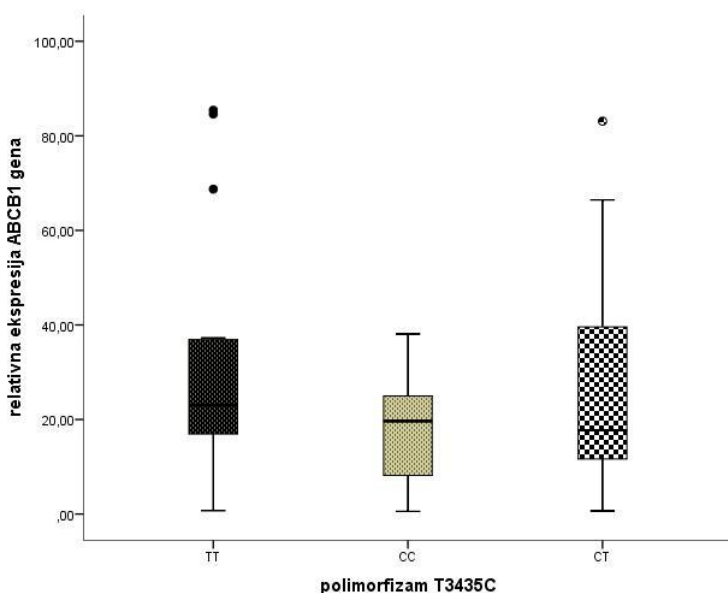
Слика 1.9. ROC анализа експресије *ABCB1* гена и проналажење cut-off вредности за коју је експресија датог гена позитиван маркер за присуство болести



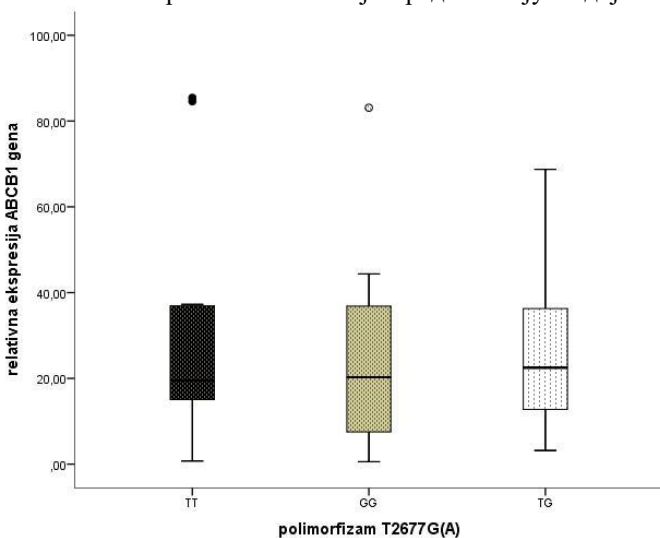
Слика 2.0. „Waterfall“ график расподеле висине експресије *ABCB1* гена у односу на „cut-off“ вредност

4. Испитивање утицаја различитих варјанти алела *ABCB1* гена (T3435C и T2677G(A)) на висину експресије *ABCB1* гена код оболелих од HLL

Испитивање утицаја различитих генотипова и варјанти varijanti T3435C и T2677G(A) на експресију *ABCB1* гена нису уочене статистички значајне разлике ($p=0,494$ и $p=0,780$, U-test) (Слика 6. и слика 7.).



Слика 2.1. Вох-plot графички приказ експресије *ABCB1* гена код HLL пацијената у зависности од T3435C генотипова. Хоризонталне линије представљају медијане вредности експресије у одговарајућим групама..



Слика 2.2. Вох-plot графички приказ експресије *ABCB1* гена код HLL пацијената у зависности од (T2677G(A)) генотипа. Хоризонталне линије представљају медијане вредности експресије у одговарајућим групама.

Слични резултати су добијени и када је експресија *ABCB1* гена посматрана као категоријска променљива, односно када је целокупна група HLL пацијената подељена на *ABCB1*⁺ и на *ABCB1*⁻ ($p=0,859$ и $p=1,00$, Fisherov egzaktni test)(Табела 1. и табела 2.)

		експресија		Укупно
		<i>ABCB1</i> <i>ABCB1</i> ⁻	<i>ABCB1</i> ⁺	
Варјанта Т3435С	ТТ	9	7	16
	СС	7	3	10
	СТ	12	8	20
Укупно		28	18	46

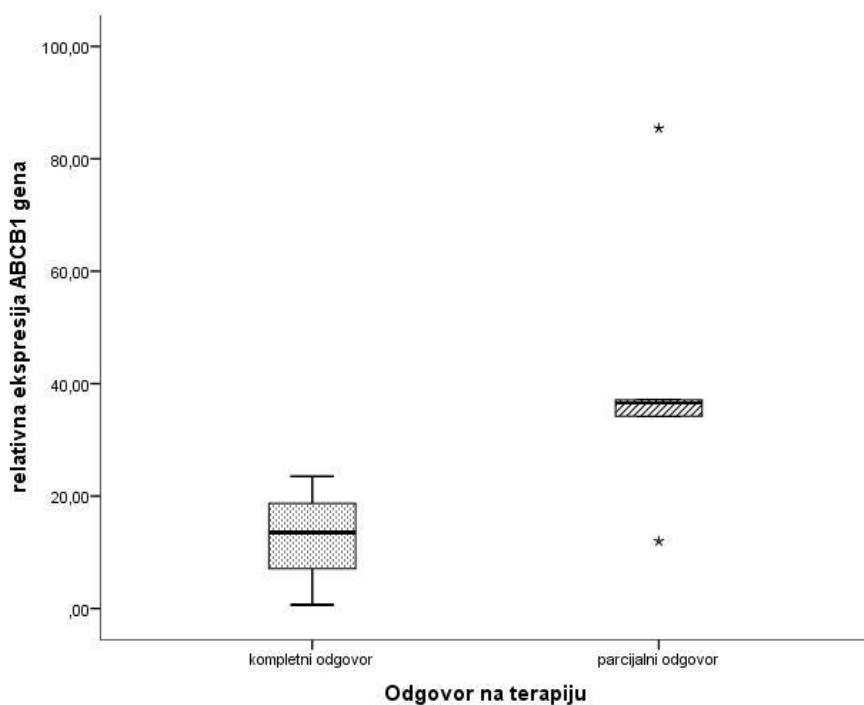
Табела 1.2. Учесталост појединих Т3435С генотипова у *ABCB1*⁻ и *ABCB1*⁺ групи пацијената.

		експресија		Укупно
		<i>ABCB1</i> <i>ABCB1</i> ⁻	<i>ABCB1</i> ⁺	
Варјанта Т2677G(A)	ТТ	7	4	11
	GG	10	6	16
	TG	11	8	19
Укупно		28	18	46

Табела 1.3. Учесталост појединих Т2677G(a) генотипова у *ABCB1*⁻ и *ABCB1*⁺ групи пацијената.

5. Утицај висине експресије *ABCB1* гена на одговор на терапију оболелих од HLL

Од 46 изучаваних HLL пацијената, подаци о одговору на примењену терапију био је доступан за њих 12. Код 7/12 пацијената примећен је комплетан одговор на терапију, док је код њих 5/12 забележен парцијални одговор. Експресија *ABCB1* гена код пацијената са парцијалним одговором била је значајно виша од нивоа детектованог код пацијената са комплетним одговором на терапију ($p=0,030$, U/test)(Слика 8.).



Слика 2.3. Вох-plot графички приказ висине експресије *ABCB1* gena код пацијената са комплетним и са парцијалним одговором на терапију. Медијана *ABCB1* експресије код пацијената са комплетним одговором износила је 13,51 (0,65-23,52), што је било значајно ниже од нивоа детектованог код пацијената са парцијалним одговором 36,58 (11,99-85,44).

Сличан налаз је добијен и када је експресија *ABCB1* gena посматрана као категоријска променљива, односно када су пацијенти подељени на $ABCB1^+$ и на $ABCB1^-$ ($p=0,010$, Фишеров egzaktni test)(Табела 3.).

		експресија		Укупно
		<i>ABCB1</i> <i>ABCB1</i> ⁻	<i>ABCB1</i> ⁺	
Одговор на терапију	комплетан одговор	7	0	7
	парцијални одговор	1	4	5
Укупно		8	4	12

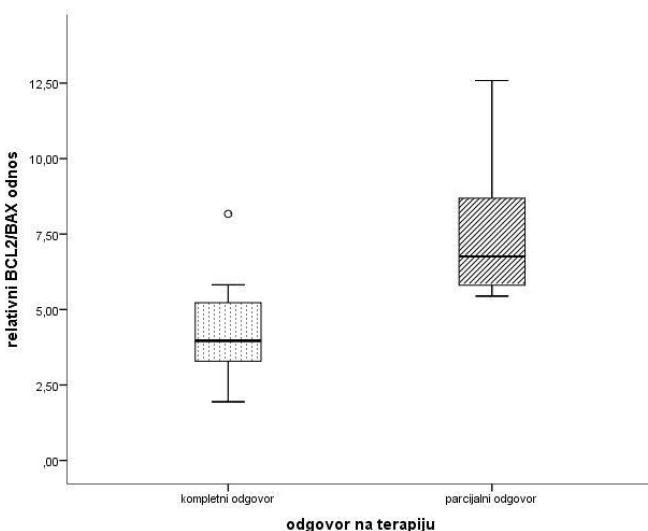
Табела 1.4. Заступљеност пацијената са парцијалним и комплетним одговором на терапију у односу на $ABCB1^+$ и на $ABCB1^-$ статус.

6. Утицај висине релативног односа *Bcl2/Bax* генске експресије на одговор на терапију оболелих од HLL

Једна од главних карактеристика HLL јесте антиапоптотски статус леукемијских ћелија, узрокован превасходно увећаном експресијом анти-апоптотских gena као што је *Bcl2*, и сниженом експресијом про-апоптотских gena као што је *Bax*. Међутим, релативан однос експресије ова два gena тј. *Bcl2/Bax*, је вредност која је најбољи параметар за предикцију анти- или про- апоптотског статуса. Увећан однос *Bcl2/Bax* указује на активност анти-

апоптотских механизма, па самим тим може указати на присуство резистенције на терапију.

Упоредивањем висине *Bcl2/Bax* односа, детектованим код појединих пацијената са парцијалним одговором на терапију ($p=0,048$, U-test) (Слика 9.).



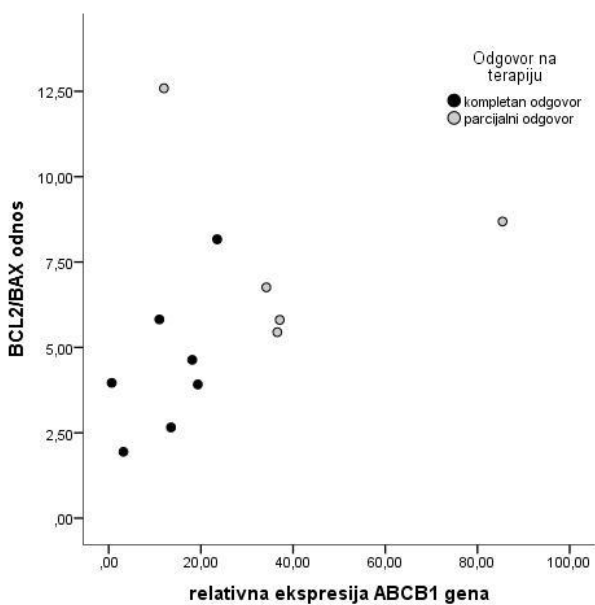
Слика 2.4. Вох-plot графички приказ висине *Bcl2/Bax* релативног односа код пацијената са комплетним и парцијалним одговором на терапију. Код пацијената са комплетним одговором медијана *Bcl2/Bax* релативног односа износила је 3,96 (1,94-8,17), што је било значајно ниже од нивоа детектованог код

пацијената са парцијалним одговором 6,76 (5,45-12,59).

7. Повезаност експресије *ABCB1* гена, *Bcl2/Bax* релативног односа и одговора на терапију код оболелих од HLL

Како смо засебно утврдили постојање статистички значајне повезаности експресије *ABCB1* гена, као и повишеног *Bcl2/Bax* релативног односа и одговора на терапију, испитали смо постојање корелације између ова два параметра.

Није утврђено постојање статистички значајне корелације између вредности *Bcl2/Bax* релативног односа и *ABCB1* експресије код пацијената (Spirmanov koeficijent korelacije 0,222, $p=0,138$).



Слика 2.5. Графички приказ корелације експресије *ABCB1*, *Bcl2/Bax* односа и одго

5. ДИСКУСИЈА

Ћелије канцера развијају многобројне стратегије како би избегле дејство терапије. Међу њима, моћно средство је присуство или стицање вишеструке резистенције на лекове (енг. multi-drug resistance - *MDR*), која умањује ефикасност хемиотерапије. *MDR* је, између осталих механизма, посредована *ABC* транспортерима који имају функцију ефлуксних пумпи које могу да елиминишу различите лекове из туморске ћелије (Aquali et al. 2005). Најзначајнији и најбоље изучен *ABC* транспортер је *P*- гликопротеин, кодиран *ABCВ1* геном. У ХЛЛ је изучавана улога *P*- гликопротеина, али резултате није лако упоредити (Friedenberg et al 2004). Такође је показано да се резистенција на лекове различито манифестује код пацијената оболелих од ХЛЛ и да је генетички детерминисана (Rosenwald 2006).

Други водећи механизам који учествују у резистенцији на лекове који се примењују у лечењу ХЛЛ је повишена активност антиапоптотског система (апоптотска резистенција). Мада има све више показатеља да ХЛЛ ћелије пролиферишу и умиру у значајном степену (Messmer et al. 2005, van Gent et al. 2008), поремећај апоптозе остаје њихова најзначајнија карактеристика. Изражена је разлика у апоптотском потенцијалу ћелија ХЛЛ међу пацијентима (Sieklucka et al. 2008, Kravic-Stevovic et al. 2014). Генетичке промене и измењена експресија регулатора апоптозе детектоване су код пацијената са ХЛЛ. Циљ наше студије је био анализа утицаја фармакогенетичких маркера укључених у резистенцију на хемиотерапију (експресија *ABCВ1* гена и полиморфизам две варијанте у *ABCВ1* гену (rs1045642 и rs20132582), као и експресија *Bcl2* и *Bax* гена) на терапијски одговор код пацијената оболелих од хроничне лимфоцитне леукемије. Ова студија је имала циљ да утврди да ли постоји синергистичко дејство генетичких маркера транспортне и апоптотске резистенције на лекове код стандардних протокола лечења ХЛЛ (FC protokol (fludarabin+ciklofosfamid)).

Учесталост варијанти у *ABCВ1* гену, 3435C > T и 2677G > T/A, у здравој популацији Србије

Учесталост варијантног алела 3435C у светској популацији варира од 34-90% (Deu et al. 2006). У нашој студији, овај варијантни алел је био присутан са учесталошћу од 50% у здравој популацији.

Варијантни алел 2677T је присутан у светској популацији са учесталошћу од 2–65% (International HarMap project (www.harmap.org)). Хомозиготни генотип (2677TT) у нашој популацији је заступљен са учесталошћу од 13%. Хомозиготни генотип (2677GG) је већи од 81% у популацијама Африке, док је у учесталост од 10–32% карактеристична за белу популацију, америчке Индијанце и Азијате. Код нас је овај генотип у здравој популацији био заступљен са 45%. Алел 2677A је relativno redak (0-17%) (Cascorbi et al. 2001).

Учесталост варијанти у *ABCВ1* гену, 3435C > T и 2677G > T/A, код оболелих од ХЛЛ

У нашој студији није детектована статистички значајна разлика у учесталости варијантних алела, нити у дистрибуцији појединих генотипова нити за варијанту 3435C > T, нити за 2677G > T/A између здравих контрола и пацијената са ХЛЛ. Овај податак указује на то да ове генетичке варијанте нису фактори ризика за обољевање од ХЛЛ. Наши резултати су у сагласности са другим студијама, које такође показују да ове варијанте нису повезане са ризиком за појаву малигнитета (Bosch 2008).

Експресија *ABCB1* гена код пацијената са ХЛЛ

Ћелије ХЛЛ обично експримирају више транспортних протеина који су укључени у MDR, од којих су најзначајнији П-гликопротеин (P-gp, познат и као MDR1 и *ABCB1*), МРП1 протеин (енг. multidrug resistance-associated protein-1, MRP1, *ABCC1*) и ЛРП протеин (енг. lung resistance protein, LRP) (Consoli et al. 2002). Релативно висок ниво П-гликопротеина, класични механизам преко кога ћелија остварује MDR, изгледа да је карактеристика туморских ћелија у ХЛЛ. П-гликопротеин је детектован у 48–100% узорака пацијената са ХЛЛ, мада је његов биолошки и клинички значај још увек недовољно јасан (Webb et al. 1998). Важно је истаћи да су супстрати П-гликопротеина лекови који се рутински користе у хемиотерапији за рефракторну и рекурентну ХЛЛ (Tsimberidou et al. 2003). Такође су супстрати П-гликопротеина лекови који се користе као прва линија третмана овог малигнитета (Leporrier et al. 2001).

У нашој групи ХЛЛ пацијената, 40% пацијената је имало високу експресију *ABCB1* гена, која се значајно разликује од експресије овог гена која је слична новоу експресије код здравих контрола. Може се рећи да је у 40% пацијената експресија *ABCB1* гена позитиван маркер за потенцијалну појаву резистенције на лекове, MDR.

Утицај варијантних алела *ABCB1* gena (3435C > T и 2677G > T/A) на експресију *ABCB1* гена код оболелих од ХЛЛ

Студије корелације промена у *ABCB1* гену са нивоом експресије овог гена су контрадикторне (Hodges et al. 2011, Leschziner et al. 2007).

У једној студији 3435ТТ генотип је био повезан са ниском експресијом *ABCB1* гена (Hoffmeyer et al. 2000), али репликационе студије то нису потврдиле (Leschziner et al. 2007). Неке студије су показале корелацију 3435ТТ са сниженим нивоом експресије *ABCB1* гена (Wang et al. 2005), повишеним нивоом експресије *ABCB1* гена (Dey et al. 2006) или одсуством утицаја генотипа на експресију *ABCB1* гена (Owen et al. 2005).

Наша студија није показала утицај варијантног алела 3435C > T, нити варијантних генотипова на експресију *ABCB1* гена.

Мада постоји велики број студија утицаја триалелске варијанте 2677G > T/A на експресију *ABCB1* гена, резултати су опречни. Тако неке студије говоре у прилог асоцијације варијанте и експресије гена (Eichelbaum et al. 2004), а неке негирају ту асоцијацију (Owen et al. 2005). Наши резултати нису показали асоцијацију триалелске варијанте 2677G > T/A са експресијом *ABCB1* гена, слично многим студијама (Estrela et al. 2009).

Транспортна вишеструка резистенција на лекове у ХЛЛ (транспортна MDR)

У многим студијама је изучавана асоцијација *ABCB1* генотипа и активности П-гликопротеина са клиничким исходом ХЛЛ после примене лекова који су супстрат П-гликопротеина, били да се ради о успешном лечењу или нежељеним дејствима лекова (Leschziner et al. 2007). Резултати ових асоцијативних студија су неконзистентни и не могу се валидирати у репликационим студијама.

У нашој студији у којој смо пратили генетичке маркере резистенције на лекове у пацијената са ХЛЛ, и то транспортне MDR, упоређивањем нивоа експресије *ABCB1* гена у пацијената и њиховог одговора на терапију, уочено је да је повишен нивоа експресије *ABCB1* гена статистички значајно повезан са парцијалном, а не комплетном ремисијом.

Наш резултат говори у прилог да је експресија *ABCBI* гена значајни маркер транспортне резистенције код ХЛЛ пацијената лечених ФС протоколом.

Апоптотска вишеструка резистенција на лекове у ХЛЛ (апоптотска MDR)

У ХЛЛ су уочене генетичке промене и аберантна експресија различитих чланова *Bcl2* генске фамилије, који имају кључну улогу у регулацији апоптозе (Vucicevic et al. 2015). Посебно је експресија два члана ове фамилије и њихов однос, *Bcl2/Bax* однос, значајан показатељ како функционише апоптоза у ХЛЛ ћелијама, а самим тим је и потенцијални прогностички маркер, као и потенцијални маркер апоптотске MDR у ХЛЛ (Vucicevic et al. 2016).

У многим студијама је увећан *Bcl2/Bax* однос, и на РНК нивоу (Aguilar-Santelises et al. 1996) и на протеинском нивоу (Molica et al. 1998), асоциран са лошим прогностичким параметрима у ХЛЛ. У другим студијама то није показано (Vucicevic et al. 2016, Kitada et al. 1998).

Повишен *Bcl2/Bax* однос је показао асоцијацију са прогресивним током болести и резистенцијом на хемотерапију (Tzifi et al. 2012).

Истраживања су показала да је симултано снижавање експресије *Bcl2* и *Bax* рационална стратегија за имплементацију анти-канцер терапије (Yamanaka et al. 2006).

У нашој студији, у којој смо пратили генетичке маркере резистенције на лекове у пацијената са ХЛЛ, и то апоптотске MDR, упоређивањем величине *Bcl2/Bax* односа у пацијената и њиховог одговора на терапију, уочено је да је повишен *Bcl2/Bax* однос статистички значајно повезан са парцијалном, а не комплетном ремисијом. Наш резултат говори у прилог да је *Bcl2/Bax* однос значајни маркер апоптотске резистенције код ХЛЛ пацијената лечених ФС протоколом.

Ограничења студија молекуларно-генетичких фармакогенетичких маркера у одговору на хемотерапију су бројне: селекција пацијената, комплексан и неконзистентан фенотип, дефиниција исхода болести, примена различитих протокола лечења (Leschziner et al. 2007).

Предност наше студије је што су у студију укључени само пацијенти чија је терапија била униформна, ФС протокол (fludarabin+ciklofosamid). Међутим, наша група пацијената је изузетно мала и студија са већим бројем ХЛЛ пацијената је неопходна да би се потврдили наши резултати. Такође би избор клиничких параметара процене успешности терапије требало боље дефинисати.

Потребно је истаћи да је ово прва студија на ХЛЛ пацијентима у Србији која се односи на молекуларно-генетичке фармакогенетичке маркере који могу доприносити транспортној и апоптотској резистенцији на лекове.

6. ЗАКЉУЧАК

ЗАКЉУЧЦИ

1. Ово је прва студија генетичких маркера транспортне и апоптотске резистенције на лекове (варијанте у *ABCB1* гену (rs1045642, с.3435С > Т, и rs20132582, с. 2677G > Т/А), експресија *ABCB1* гена, експресија *Bcl2* и *Bax* гена) у пацијената са ХЛЛ у Србији
2. У нашој студији није детектована статистички значајна разлика у учесталости варијантних алела у *ABCB1* гену, с.3435С > Т и с.2677G > Т/А, између здравих контрола и пацијената са ХЛЛ. Овај податак указује на то да ове генетичке варијанте нису фактори ризика за обољевање од ХЛЛ.
3. У нашој групи ХЛЛ пацијената, 40% пацијената је имало високу експресију *ABCB1* гена, која се значајно разликује од експресије овог гена која је слична новоу експресије код здравих контрола. Може се рећи да је у 40% ХЛЛ пацијената експресија *ABCB1* гена позитиван маркер за потенцијалну појаву резистенције на лекове (енг. multi drug resistance, MDR).
4. Наши резултати нису показали асоцијацију варијанти *ABCB1* гена, с.3435С > Т и с.2677G > Т/А, нити варијантних генотипова, са експресијом *ABCB1* гена, слично многим студијама.
5. У нашој студији, у којој смо пратили генетичке маркере транспортне резистенције на лекове у пацијената са ХЛЛ, уочено је да је повишен нивоа експресије *ABCB1* гена статистички значајно повезан са парцијалном, а не комплетном ремисијом. Наш резултат говори у прилог да је експресија *ABCB1* гена потенцијални маркер транспортне резистенције код ХЛЛ пацијената лечених ФС протоколом.
6. У нашој студији, у којој смо пратили генетичке маркере апоптотске резистенције на лекове у пацијената са ХЛЛ, уочено је да је повишен *Bcl2/Bax* однос статистички значајно повезан са парцијалном, а не комплетном ремисијом. Наш резултат говори у прилог да је *Bcl2/Bax* однос потенцијални маркер апоптотске резистенције код ХЛЛ пацијената лечених ФС протоколом.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Aguilar-Santelises, M., Rottenberg, M. E., Lewin, N., Mellstedt, H., and Jondal, M. (1996) Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression, *Int J Cancer* 69, 114-119.
2. Aouali N, Eddabra L, Macadre J, Morjani H. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 61–70
22. Apte, S. S., Mattei, M. G., and Olsen, B. R. (1995) Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta, *Genomics* 26, 592-594.
3. Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguat, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Belabbes, S., and Gremy, F. (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis, *Cancer* 48, 198-206.
4. Bosch F, Ferrer A, Villamor N, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(1):155-61
5. Bosch TM. Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes and drug transporters in chemotherapy. *Methods Mol Biol.* 2008; 448:63–76
6. Brian C. Shaffer, Jean-Pierre Gillet, Chirayu Patel, Maria R. Baer, Susan E. Bates and Michael M. Gottesman. Drug resistance: Still a daunting challenge to the successful treatment of AML. *Drug Resist Updat.* 2012; 15(1-2): 62-69.
7. Byrd, J. C., Stilgenbauer, S., and Flinn, I. W. (2004) Chronic lymphocytic leukemia, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 163-183.
8. Cartron, P. F., Oliver, L., Martin, S., Moreau, C., LeCabellec, M. T., Jezequel, P., Meflah, K., and Vallette, F. M. (2002) The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients, *Human molecular genetics* 11, 675-687.

9. Caligaris-Cappio, F. (2003) Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia, *British journal of haematology* 123, 380-388.
10. Carton-Cardo C, Brein JP, Casalas D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multi-drug resistance gene (p glykoprotein) is expressed by endothelial cells at blood – brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:695-8.
11. Cascorbi I, Gerloff T, John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69:169–174.
12. Consoli U, Santonocito A, Stagno F, Fiumara P, Privitera A, Parisi G, Giustolisi GM et al.: Multidrug resistance mechanisms in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*, 2002, 116, 774–780.
13. Defoiche, J., Debacq, C., Asquith, B., Zhang, Y., Burny, A., Bron, D., Lagneaux, L., Macallan, D., and Willems, L. (2008) Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia, *British journal of haematology* 143, 240-247.
14. D.M. Bradshaw and R.J. Arceci. *J. Clin. Oncol.* 16:2674-2690 (1998).
15. Dey S. Single nucleotide polymorphisms in human P-glycoprotein: its impact on drug delivery and disposition. *Expert Opin Drug Deliv.* 2006; 3:23–35
16. Caligaris-Cappio, F. (2003) Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia, *British journal of the hematology* 123, 380-388.
17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr; 162 (1): 156-9.
18. Cordon-Cardo C, Brein JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (p-glykoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:695-8.
19. Collins, R. J., Verschuer, L. A., Harmon, B. V., Prentice, R. L., Pope, J. H., and Kerr, J. F. (1989) Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro, *British journal of haematology* 71, 343-350.
20. Crowther-Swanepoel, D., and Houlston, R. S. (2009) The molecular basis of familial chronic lymphocytic leukemia, *Haematologica* 94, 606-609.

21. Eichelbaum M, Fromm MF, Schwab M. Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism. *Ther Drug Monit.* 2004; 26:180–185.
22. Estrela Rde C, Ribeiro FS, Barroso PF, Tuyama M, Gregorio SP, Dias-Neto E, et al. ABCB1 polymorphisms and the concentrations of lopinavir and ritonavir in blood, semen and saliva of HIV-infected men under antiretroviral therapy. *Pharmacogenomics.* 2009; 10:311–318.
23. Faderl, S., Keating, M. J., Do, K. A., Liang, S. Y., Kantarjian, H. M., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Manshouri, T., and Albitar, M. (2002) Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 16, 1045-1052.
24. Friedenberг W R, Tallman M S, Brodsky I, Paietta E, Rowe J M, Lee S J, et al. Modified VAD and PSC-833 in the treatment of resistant or relapsing chronic lymphocytic leukemia (E4996): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Leuk Res* 2004; 28: 813–819.
25. Ghallab O, Hamed NAM, El Shafei S, Abo Elwafa R, Sherif S (2015) MDR1 Gene Polymorphism and Outcome in Egyptain Chronic Myeloid Leukemia Patients. *J Cancer Biol Res* 3(2): 1062.
26. Ghia, P., and Caligaris-Cappio, F. (2000) The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B-cell neoplasms, *Advances in cancer research* 79, 157-173.
27. Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E., and Reed, J. C. (1993) bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 82, 1820-1828.
28. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johnе A, Cascrobi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:3473-8.
29. Hodges L, Markovac S, Chinn L, Gow J, Kroetz D, Klein T, Altman R. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, Pglycoprotein). *Pharmacogenet Genomics.* 2011 March ; 21(3): 152–161.

30. Kioka N, Tsubota J, Kkehi Y, Komano T, Gottesman MM, Pastan I, Ueda K. P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal p-glycoprotein carries Gly 185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162:224-31.
31. Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J. M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H. G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C. M., Rai, K., Hines, J., and Reed, J. C. (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses, *Blood* 91, 3379-3389
32. Kravic-Stevovic T, Bogdanovic A, Bumbasirevic V. Higher percentage of in vitro apoptotic cells at time of diagnosis in patients with chronic lymphocytic leukemia indicate earlier treatment requirement: ten years follow up. *Srp Arh Celok Lek* 2014;142(1-2):48-53.
33. Lage H An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3145–3167.
34. Leparrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, Rapp MJ et al.: French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previouslyuntreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood*, 2001, 98, 2319–2325.
35. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J.* 2007; 7:154–179.
36. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor., New York: Cold Spring Harbor Laboratory , 1982.
37. Maroofi F1, Amini S, Roshani D, Ghaderi B, Abdi M. Different frequencies and effects of ABCB1 T3435C polymorphism on clinical and laboratory features of B cell chronic lymphocytic leukemia in Kurdish patients. *Tumour Biol.* 2015; 36(4):2863-8.
38. Messmer, B. T., Messmer, D., Allen, S. L., Kowitz, J. E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E. J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R. N., Wasil, T., Rai, K. R., Hellerstein, M. K., and Chiorazzi, N. (2005) In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells, *The Journal of clinical investigation* 115, 755-764.

39. Mihaljevic, B., Todorovic, M., Bila, J., Antic, D., Andjelic, B., Jankovic, S., Milicevic Rasic, S., Smiljanic, M. (2011) Vodic za dijagnostiku i lecenje limfoproliferativnih bolesti.
40. Molica, S., Dattilo, A., Giulino, C., Levato, D., and Levato, L. (1998) Increased bcl-2/bax ratio in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with a progressive pattern of disease, *Haematologica* 83, 1122-1124.
41. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death, *Cell* 74, 609-619
42. Owen A, Goldring C, Morgan P, Chadwick D, Park BK, Pirmohamed M. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver. *Br J Clin Pharmacol*. 2005; 59:365–370.
43. Pepper, C., Bentley, P., and Hoy, T. (1996) Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia, *British journal of haematology* 95, 513-517.
44. Pepper, C., Hoy, T., and Bentley, D. P. (1997) Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance, *Br J Cancer* 76, 935-938.
45. Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., and Pasternack, B. S. (1975) Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 46, 219-234.
46. Rozman, C., and Montserrat, E. (1995) Chronic lymphocytic leukemia, *The New England journal of medicine* 333, 1052-1057.
47. Rosenwald A. Multi-drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): A feature of B-CLL sub-sets with poor prognosis genetic alterations? *Leukemia & Lymphoma* 2006; Vol. 47 (11): 2263-2264.
48. Robertson, L. E., Plunkett, W., McConnell, K., Keating, M. J., and McDonnell, T. J. (1996) Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome, *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 10, 456-459.

23. Saxena, A., Viswanathan, S., Moshynska, O., Tandon, P., Sankaran, K., and Sheridan, D. P. (2004) Mcl-1 and Bcl-2/Bax ratio are associated with treatment response but not with Rai stage in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Am J Hematol* 75, 22-33.
49. Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2004) Bcl-xES, a BH4- and BH2-containing antiapoptotic protein, delays Bax oligomer formation and binds Apaf-1, blocking procaspase-9 activation, *Oncogene* 23, 3915-3931.
50. Shi, B., Triebe, D., Kajiji, S., Iwata, K. K., Bruskin, A., and Mahajna, J. (1999) Identification and characterization of baxepsilon, a novel bax variant missing the BH2 and the transmembrane domains, *Biochem Biophys Res Commun* 254, 779-785.
51. Sieklucka M, Pozarowski P, Bojarska-Junak A, et al. Apoptosis in B-CLL: the relationship between higher ex vivo spontaneous apoptosis before treatment in III-IV Rai stage patients and poor outcome. *Oncol Rep* 2008;19(6):1611-20.
52. Svirnovski AI, Shman TV, Serhiyenko TF, Savitski VP, Smolnikova VV, Fedasenko UU. ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. *Hematology*. 2009; 14(4):204-12.
53. Tamura, K., Sawada, H., Izumi, Y., Fukuda, T., Utsunomiya, A., Ikeda, S., Uike, N., Tsukada, J., Kawano, F., Shibuya, T., Gondo, H., Okamura, S., and Suzumiya, J. (2001) Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is rare, but the proportion of T-CLL is high in Japan, *European journal of haematology* 67, 152-157.
54. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of p-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug-resistance (MDR1)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297:1137-43.
55. Tsujimoto, Y., and Croce, C. M. (1986) Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5214-5218.
56. Tsimberidou AM, Kantarjian HM, Cortes J, Thomas DA, Faderl S, Garcia-Manero G, Verstovsek S et al.: Fractionated cyclophosphamide, vincristine, liposomal daunorubicin, and dexamethasone plus rituximab and granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) alternating with methotrexate and cytarabine plus rituximab and GM-

- CSF in patients with Richter syndrome or fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 2003, 97, 1711–1720.
57. Thiebaut F, Tsurio T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7735-8.
58. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A, The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias, *Advances in Hematology*, 2012; 2012, 1-15.
59. van Gent R, Kater AP, Otto SA, et al. In vivo dynamics of stable chronic lymphocytic leukemia inversely correlate with somatic hypermutation levels and suggest no major leukemic turnover in bone marrow. *Cancer Res.* 2008;68(24):10137-44.
60. Vucicevic K, Jakovljevic V, Colovic N, Tosic N, Kostic T, Glumac I, Pavlovic S, Karan-Djurasevic T, Colovic M. Association of Bax Expression and Bcl2/Bax Ratio with Clinical and Molecular Prognostic Markers in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Med Biochem.* 2016 Apr;35(2):150-157.
61. Vucicevic K, Jakovljevic V, Sretenovic J, Tosic N, Kostic T, Glumac I, Colovic M, Colovic N, Pavlovic S, Karan-Djurasevic T. EXPRESSION OF BCL2 GENE IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA PATIENTS *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research.* 2015; 16 (3): 187-191
62. Wang, D., Freeman, G. J., Levine, H., Ritz, J., and Robertson, M. J. (1997) Role of the CD40 and CD95 (APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies, *British journal of haematology* 97, 409-417.
63. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15:693–704.
64. Wang X, Wang C, Qin YW, Yan SK, Gao YR Simultaneous suppression of multidrug resistance and antiapoptotic cellular defense induces apoptosis in chemoresistant human acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 2007; 31: 989–994.
65. Webb M, Brun M, McNiven M, Le Couteur D, Craft P: MDR1 and MRP expression in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol*, 1998, 102, 710–717.

66. Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, Fazli L, So A, et al. Induction of apoptosis and enhancement of chemosensitivity in human prostate cancer LNCaP cells using bispecific antisense oligonucleotide targeting Bcl-2 and Bcl-xL genes. *BJU Int* 2006; 97: 1300–1308.
67. Yuille, M. R., Matutes, E., Marossy, A., Hilditch, B., Catovsky, D., and Houlston, R. S. (2000) Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies, *British journal of haematology* 109, 794-799.
68. Zhou, M., Demo, S. D., McClure, T. N., Crea, R., and Bitler, C. M. (1998) A novel splice variant of the cell death-promoting protein BAX, *The Journal of biological chemistry* 273, 11930-11936.