

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandra M. Sretenović

**MOLEKULARNO-GENETIČKI
MEHANIZMI REZISTENCIJE U PROGNOZI
BOLESNIKA SA MULTIPLIM MIJELOMOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Aleksandra M. Sretenović

**MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS OF
RESISTANCE IN THE PROGNOSIS OF
PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentor: Prof. dr Jelena Bila, specijalista interne medicine- hematolog, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi Komisije:

1. Prof. dr Biljana Mihaljević, specijalista interne medicine- hematolog, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

2. Prof. dr Milena Todorović, specijalista interne medicine- hematolog, profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

3. Naučni savetnik, Sonja Pavlović, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu

SAŽETAK

Uvod: Multipli mijelom (MM) je bolest za koju se vezuje visok stepen genomske nestabilnosti. Karakteriše se numeričkim i strukturnim hromozomskim aberacijama, koje zauzimaju centralno mesto u prognoznom profilu bolesnika sa MM.

Cilj: Utvrditi uticaj postojanja molekularno-genetičkih aberacija: del1p, +1q21, translokacije t(4;14), t(14;16) i del 17p na terapijski odgovor i preživljavanje bolesnika sa multiplim mijelomom. Utvrditi uticaj ekspresije cereblona (CRBN), MDR (multidrug resistance protein) i LRP (lung resistance protein) na terapijski odgovor i preživljavanje bolesnika sa multiplim mijelomom.

Metod: Ispitivana su 92 novootkrivena bolesnika sa multiplim mijelomom, koji su dijagnostikovani i lečeni u Klinici za hematologiju KCS u periodu od decembra 2011. do januara 2014. godine. Molekularno-genetička ispitivanja koja su predmet ovog istraživanja su sprovedena u Laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Klinike za hematologiju Kliničkog centra Srbije i u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGG) u Beogradu. Prisustvo viskorizičkih citogenetskih abnormalnosti utvrđivano je metodom interfazne in situ hibridizacije (iFISH), a nivo ekspresije CRBN, MDR i LRP kod naših ispitanika utvrđivan je metodom „real-time“ PCR.

Rezultati: Metodom iFISH prisustvo viskorizičnih citogenetskih abnormalnosti: t (4;14), t(14;16), del 17p utvrđeno je kod 14 (15,2%) bolesnika. Kod 27 (29,3%) bolesnika utvrđeno je prisustvo abnormalnosti hromozoma 1. Kod 8 (8,7%) bolesnika delecija 1p, a kod 19 (20,6%) dodatne kopije hromozoma 1q. Kod 4 (4,34%) bolesnika bila je prisutna hiperdiploidija +1q. Bolesnici sa abnormalnostima hromozoma 1 su se karakterisali kraćim trajanjem remisije na granici statističke značajnosti i jasno kraćim preživljavanjem u odnosu na bolesnike bez ovih abnormalnosti. Medijana ekspresije CRBN kod bolesnika sa MM je bila značajno viša u odnosu na zdravu kontrolu. Korelacija između visoke ekspresije CRBN i povoljnog terapijskog odgovora bila je prisutna u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, što je u skladu sa podacima iz literature, te visoka ekspresija CRBN može da posluži kao surogat marker za bolest niskog rizika. Analiza nivoa ekspresije RQ_MDR1 pokazala je da je njena vrednost bila niža kod bolesnika koji su reagovali na lečenje 252.1 ± 46.2 u odnosu na one koji su umrli 493.8 ± 168 , ali T testom nije postignuta statistička značajnost ($p=0,233$). Slični rezultati su dobijeni i kod RQ_LRP 181.9 ± 31.5 prema 242.5 ± 33.8 , takođe bez postizanja statističke značajnosti ($p=0,213$). Koristeći Kaplan-Meier analizu preživljavanja potvrdili smo prognostički značaj

ISS skora i povišene vrednosti LDH na PFS i OS. Bolesnici sa visokorizičnim CA su imali lošiji PFS i OS u poređenju sa onima kod kojih nije dokazano prisustvo visokorizičnih CA.

Zaključak: Identifikacija bolesnika sa nepovoljnim prognostičkim profilom, uključujući i kliničke i molekularne činioce, omogućila bi u budućnosti individualni terapijski pristup i potencijalno izlečenje.

Ključne reči: multipli mijelom, molekularno-genetički profil, prognoza

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Hematologija

ABSTRACT

Introduction: Multiple myeloma (MM) is a disease that is associated with a high degree of genomic instability. It is characterized by numerical and structural chromosomal aberrations, which occupy a central place in the prognosis profile of patients with MM.

Aim: To determine the influence of the existence of molecular-genetic aberrations: del1p, +1q21, translocation t (4; 14), t (14; 16) and del 17p on the therapeutic response and survival of patients with multiple myeloma. Determine the effect of cereblone expression (CRBN), MDR (multidrug resistance protein) and LRP (lung resistance protein) on the therapeutic response and survival of patients with multiple myeloma.

Method: 92 newly discovered patients with multiple myeloma, who were diagnosed and treated in the Clinic of Hematology of the Clinical Centre of Serbia in the period from December 2011 to January 2014, were examined. Molecular-genetic studies that are the subject of this research were conducted at the Laboratory for Cytogenetics and Molecular Genetics of the Clinic of Hematology of the Clinical Center of Serbia and the Institute for Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGG) in Belgrade. The presence of high-risk cytogenetic abnormalities was determined by interphase in situ hybridization (iFISH), and the level of expression of CRBN, MDR and LRP in our subjects was determined by the method of "real-time" PCR.

Results: The iFISH method of presence of high-risk cytogenetic abnormalities: t (4; 14), t (14; 16), del 17p was found in 14 (15.2%) patients. In 27 (29.3%) patients, the presence of abnormalities of chromosome 1 was determined. In 8 (8.7%) patients deletion 1p, and in 19 (20.6%) additional copies of chromosomes 1q. In 4 (4.34%) patients, hyperdiploidy + 1q was present. Patients with abnormalities of chromosome 1 were characterized by shorter duration of remission at the boundary of statistical significance and clearly shorter survival compared to patients without these abnormalities. Median expression of CRBN in patients with MM was significantly higher in relation to healthy control. Correlation between high expression of CRBN and favorable therapeutic response was present in the group of patients treated with thalidomide, which is in accordance with literature data, and high expression of CRBN can serve as a surrogate marker for low-risk disease. Analysis of the expression level RQ_MDR1 showed that its value was lower in patients who responded to treatment 252.1 ± 46.2 compared to those who died 493.8 ± 168 , but did not achieve statistical significance with the T test ($p = 0.233$). Similar results were obtained in RQ_LRP 181.9 ± 31.5 versus 242.5 ± 33.8 , also without statistical significance ($p = 0.213$).

Using the Kaplan-Meier survival test, we confirmed the prognostic significance of ISS scores and elevated LDH values on PFS and OS. Patients with high risk CAs had poorer PFS and OS compared to those who did not have the presence of high risk CAs.

Conclusion: Identification of patients with an unfavorable prognostic profile, including clinical and molecular factors, would allow in the future an individual therapeutic approach and potential cure.

Key words: multiple myeloma, molecular-genetic profile, prognosis

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Hematology

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1 Definicija i etiologija multiplog mijeloma.....	1
1.2 Klinička slika.....	2
1.3 Prognostički faktori.....	5
1.4 Lečenje multiplog mijeloma.....	6
1.5 Predmet istraživanja.....	9
2. Ciljevi rada.....	19
3. Materijal i metode.....	21
3.1 Ispitanici.....	22
3.2 Metode.....	22
3.2.1 Statističke metode.....	22
3.2.2 Fluorescentna in situ hibridizacija	22
3.2.3 Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR).....	26
3.2.4 Praćenje ekspresije gena pomoću „real-time“ PCR metode.....	28
3.2.5 Određivanje ekspresije MDR1 i LRP gena.....	32
3.2.6 Određivanje ekspresije CRBN gena.....	33
4. Rezultati.....	34
4.1. Struktura ispitanika prema polu, starosti, tipu paraproteina, kliničkom stadijumu.....	35
4.2 Struktura ispitanika prema stepenu rizika.....	37
4.3 Utvrđivanje prisustva visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti iFISH metodom.....	37
4.4 Struktura ispitanika prema tipu hemioterapije i medijana ekspresije CRBN gena.....	41
4.5 Analiza nivoa ekspresije MDR1 i LRP gena.....	41
4.6 Analiza preživljavanja.....	42
5. Diskusija.....	44
6. Zaključak.....	52
7. Literatura.....	55

UVOD

1. Uvod

1.1 Definicija i etiologija multiplog mijeloma

Multipli mijelom (MM) je maligno oboljenje koštane srži iz grupe imunoproliferativnih bolesti, koje se karakteriše klonskom proliferacijom i nagomilavanjem patoloških plazmocita koji nekontrolisano sekretuju monoklonski (M) protein, tzv. paraprotein, koji po strukturi može biti teški lanac imunoglobulina (IgG, IgA, IgD, IgE ili IgM klase) ili laki kappa/lambda lanac, uz brojne citokine (1).

Multipli mijelom čini 1% svih maligniteta i oko 10% svih hematoloških malignih bolesti (2). Incidenca MM u Evropi iznosi 4,5-6/100.000 stanovnika godišnje sa prosečnom starošću obolelih u momentu postavljanja dijagnoze od 72 godine. Mortalitet iznosi 4,1/100.000 stanovnika godišnje (2).

Etiologija multiplog mijeloma je nedovoljno razjašnjena kao i u drugim malignim bolestima, mada eksperimentalna ispitivanja ukazuju na značaj određenih faktora.

Pojava iste bolesti kod blizanaca ili srodnika ukazuje na značaj genetskog faktora. Umereno povećana učestalost ove bolesti utvrđena je kod radnika sa nuklearnim materijalom ili kod bolesnika sa ankilozirajućim spondilitisom koji su lečeni radioterapijom. Citogenetska ispitivanja pokazala su prisustvo strukturnih i numeričkih hromozomskih anomalija kod 18-36% bolesnika u momentu postavljanja dijagnoze i kod 37-50% lečenik bolesnika (1).

Sa kliničkog aspekta, patogenetske posledice bujanja patoloških plazmocita u koštanoj srži su: potiskivanje normalne hematopoeze, destrukcija kostiju, bubrežna insuficijencija, hiperviskozni sindrom, krioglobulinemija, amiloidoza i/ili hemoragijski sindrom zbog poremećaja faktora koagulacije, deficit imuniteta i povećana sklonost prema infekcijama i sekundarnim malignitetima zbog supresije humoralnog imuniteta (1).

1.2. Klinička slika multiplog mijeloma

Klinička slika ispoljene bolesti je raznolika i zavisi pre svega od promena u koštanoj srži, koštanom i nervnom sistemu i bubrezima (1).

Bolovi u kostima su najčešći simptom bolesti i javljaju se u oko 70% bolesnika. Bolovi se obično javljaju u kičmenom stubu, rebrima i ekstremitetima. Česte su spontane frakture i deformiteti grudnog koša. Oštećenje kostiju u multiplom mijelomu je posledica proliferacije plazma ćelija koje luče osteoklast aktivirajuće faktore, kao što su Il-6, Il-3, TNF. Oni povećavaju osteoklastnu aktivnost. Lezije na kostima su osteolizne i dovode do mobilizacije kalcijuma iz kostiju i do nastanka hiperkalcemije. Lokalizovane lezije na kostima mogu biti tako velike, da se palpiraju u vidu tumora na kostima lobanje, sternumu, klavikulama i drugim kostima. Kolabiranje pršljenjskih tela usled patološke frakture može dovesti do kompresije kičmene moždine i neuroloških poremećaja (1).

U oko 80% bolesnika postoje simptomi i znaci anemije, koja je normocitna i normohromna, nastala kao posledica infiltracije koštane srži i potiskivanja normalnog tkiva hemoatopoeze mijelomskim (1).

Bubrežna insuficijencija je prisutna u oko 25% bolesnika, a oko 50% bolesnika ima određen stepen bubrežnog oštećenja (1). U razvoju bubrežne insuficijencije od značaja je glomerulska filtracija velike količine lakih lanaca imunoglobulina, odnosno Bence Jonesovih proteina, koji se resorbuju u proksimalnim tubulima, vremenom se talože u kanalićima i dovode do degeneracije epitela, nekroze i poremećaja funkcije tubula. Oštećenje bubrega se manifestuje smanjenjem klirensa kreatinina, smanjenom koncentracionom sposobnošću i smanjenom tubularnom reapsorpcijom (1).

Kao posledica nedovoljnog stvaranja normalnih imunoglobulina, a u odmakloj fazi bolesti i granulocitopenije, javlja se sklonost ka infekcijama. Hemoragijski sindrom se javlja usled trombocitopenije i poremećaja hemostaze zbog oblaganja trombocita imunoglobulinima ili vezivanja imunoglobulina sa pojedinim faktorima koagulacije (faktor I, II, V, VII i X) (1).

Za postavljanje dijagnoze MM neophodna je (2):

1. Kompletna krvna slika sa leukocitarnom formulom, rutinske biohemijske analize sa sedimentacijom eritrocita (SE), azotnim materijama i koncentracijom serumskog kalcijuma.

2. Detekcija monoklonskog proteina (paraproteina) u serumu i/ili urinu metodom elektroforeze i imunoelektroforeze, nefelometrijska kvantifikacija imunoglobulina klase IgG, IgA i IgM i određivanje koncentracije slobodnih lakih lanaca u serumu.
3. Evaluacija plazmocitne infiltracije u aspiratu i bioptatu koštane srži.
4. Detekcija koštanih lezija (standardna radiografija lobanje, kičmenog stuba i kostiju skeleta, niskodozni CT pregled celog tela (WBLD-CT), NMR kičmenog stuba i male karlice, PET CT) (2).

Ove analize su od značaja za određivanje kliničkog stadijuma bolesti. Najčešće se primenjuju Durie-Salmon kriterijumi, koji su bazirani na stepenu opsežnosti tumorske mase. Na osnovu ove klasifikacije razlikujemo tri klinička stadijuma (I, II, III) bazirano na vrednostima koncentracije hemoglobina, serumskog kalcijuma, koncentracije M komponente i prisustva koštanih lezija. Svaki od tri navedena stadijuma, u zavisnosti od prisustva bubrežne slabosti, može biti I A ili B, II A ili B, III A ili B, pri čemu B označava bubrežnu slabost (1,2).

Durie&Salmon kriterijumi	I stadijum	II stadijum	III stadijum
	Sve od navedenog	≥1 kriterijuma	≥1 kriterijuma
Hemoglobin	>100 g/l	85-100 g/l	<85 g/l
Kalcijum	<3 mmol/l	<3 mmol/l	>3 mmol/l
M komponenta			
IgA	<30 g/l	30-50 g/l	>50 g/l
IgG	<50 g/l	50-70 g/l	>70 g/l
Laki lanci u urinu	<4g/24h	4-12g/24h	>12g/24h
Rtg skeleta	normalan		≥3 osteolizne promene
Podklasifikacija	A Cr<177μmol/l B Cr >177μmol/l	A Cr<177μmol/l B Cr >177μmol/l	A Cr<177μmol/l B Cr >177μmol/l

Tabela 1. Durie&Salmon kriterijumi

Takođe, ove analize omogućavaju da se postavi diferencijalna dijagnoza između monoklonske gamopatije neutvrđene značajnosti (MGUS), indolentnog ili „smouldering“ MM i multiplog mijeloma (2).

Od strane Internacionalne radne grupe za multipli mijelom (IMWG) 2014. godine su revidirani kriterijumi za postavljanje dijagnoze **MM**:

1. $\geq 10\%$ infiltracije koštane srži monoklonskim plazmocitima u aspiratu i bioptatu koštane srži ili plazmocitom dokazan biopsijom tumorskog tkiva,
2. organska disfunkcija uzrokovana aktivnošću mijeloma, tzv. CRAB kriterijumi (hiperkalcemija, renalna insuficijencija, anemija, koštane lezije)
3. ≥ 1 biomarkera plazmocitne neoplazme ($\geq 60\%$ infiltracije koštane srži monoklonskim plazmocitima; odnos kappa/lambda ≥ 100 utvrđen metodom kvantitativnog određivanja slobodnih lakih lanaca u serum; ≥ 1 fokalne lezije na skeletu veličine 5 mm i više dokazane NMR pregledom) (3, 4).

Smoulderig ili indolentni mijelom (moraju biti ispunjena oba kriterijuma):

1. M protein u serumu $\geq 30\text{g/l}$ ili 500 mg/l u 24h urinu, i/ili infiltracija srži monoklonskim plazmocitima 10-60%
2. Odsustvo drugih kriterijuma za postojanje MM (3, 4).

MGUS:

1. M protein u serumu $< 30\text{ g/l}$ i/ili prisutni monoklonski slobodni laki lanci u serumu (kappa/lambda odnos $> 1,65$ ili $< 0,26$)
2. Infiltracija srži manja od 10%
3. Odsustvo CRAB kriterijuma i odsustvo kliničkih i laboratorijskih znakova amiloidoze/bolest taloženja lakih lanaca i drugih B ćelijskih limfoproliferativnih bolesti (3, 4).

Kao što se klinička slika multiplog mijeloma odlikuje heterogenošću, tako je i tok ove bolesti raznolik.

I pored svih napredaka u lečenju, multipli mijelom je i dalje neizlečiva bolest uz ograničeno prosečno preživljavanje obolelih. Multipli mijelom se karakteriše kaskadnim tokom zamaha i remisija, uz sve kraće trajanje svake sledeće remisije i neminovnom terminalnom fazom refraktarnosti na lečenje (2).

1.3. Prognostički faktori u multiplom mijelomu

Brojne analize različitih prognostičkih faktora u multiplom mijelomu rezultirale su 2005. godine formiranjem **internacionalnog prognostičkog indeksa- International Staging System (ISS)** kao parametra aktivnosti bolesti (5). Naime, na osnovu koncentracije beta2-mikroglobulina (β 2M) i serumskih albumina definisane su tri grupe bolesnika različitog prognostičkog profila.

Beta2-mikroglobulin je vrlo značajan prognostički faktor koji utiče na dužinu preživljavanja bolesnika, nezavisno od kliničkog stadijuma bolesti. Nivo beta2-mikroglobulina je proporcionalan veličini tumorske mase i zavisi i od bubrežne funkcije. Visok nivo beta2-mikroglobulina može da ukaže na ranu smrt obolelih. Prilikom postavljanja dijagnoze od značaja je koncentracija od 6 mg/l i veća. U studijama koje ispituju efikasnost visokodozne hemioterapije, jedan od najznačajnijih prognostičkih faktora je i nivo beta2-mikroglobulina (6).

ISS	1	2	3
	nizak rizik	umeren rizik	visok rizik
β 2M	<3,5 mg/l	<3,5 mg/l	>5,5 mg/l
Albumin	>35 g/l	<35 g/l ili β 2M 3,5 do 5,5 mg/l	

Tabela 2. „International Staging System“

Medijana preživljavanja bolesnika u ISS 1 stadijumu iznosi 62 meseca, u ISS 2 stadijumu 44 meseca, a u ISS 3 stadijumu 29 meseci (5).

Citogenetske abnormalnosti (CA) detektovane metodom intrefazne fluorescentne in situ hibridizacije (iFISH) su glavni prognostički faktor u MM (7).

Kod novodijagnostikovanog bolesnika sa MM, bolest standardnog rizika se definiše kao odsustvo del 17p, translokacije t (4;14) ili translokacije t (14;16). Kombinovanjem ovih citogenetskih abnormalnosti koje su detektovane metodom iFISH, sa klasičnim ISS skorom i vrednostima laktat-dehidrogenaze (LDH) koja je značajan biomarker u MM i ukazuje na stepen

agresivnosti bolesti, kreiran je 2015. godine od strane IMWG tzv. **revidirani internacionalni stejdžing sistem za multipli mijelom- R-ISS** (8).

Povišen nivo laktat-dehidrogenaze vezuje se za visokorizičnu grupu bolesnika sa agresivnom formom mijeloma, koji može imati limfomu slične karakteristike sa velikom tumorskom masom i kraćim preživljavanjem. Prisutan je kod oko 11% novootkrivenih bolesnika sa multiplim mijelomom (9).

R-ISS 1 ima sve karakteristike klasičnog ISS 1 uz odsustvo visokorizičnih CA detekovanih iFISH metodom i normalnu vrednost LDH, R-ISS 3 ima sve karakteristike klasičnog ISS 3 uz prisustvo ili visokorizičnih CA detekovanih iFISH metodom ili povišenu vrednost LDH, a R-ISS 2 nema karakteristike niti R-ISS1 niti R-ISS2 (8). Petogodišnje preživljavanje bolesnika sa MM u R-ISS 1 iznosi 82%, u R-ISS 2 62%, a u R-ISS 3 40%. Ovakav način kombinovanja prognostičkih faktora omogućio je bolju stratifikaciju bolesnika u odgovarajuće grupe rizika, sa posebnom naznakom na grupu visoko rizičnih bolesnika, u cilju odabira adekvatnog lečenja i poboljšanja ukupnog preživljavanje obolelih (8).

1.3. Lečenje multiplog mijeloma

Savremeno lečenje multiplog mijeloma zasnovano je na prognostičkom profilu bolesnika i odabiru optimalnog terapijskog modaliteta sa ciljem da se postigne stabilna i dugotrajna kompletna remisija (2). U zavisnosti od godina života bolesnika, opšteg stanja, i pridruženih bolesti kreira se terapijski pristup.

Bolesnici sa indolentnim multiplim mijelomom („smouldering“ MM) standardnog rizika ne zahtevaju hitno započinjanje lečenja, već redovno praćenje hematološkog statusa u tromesečnim intervalima (2).

Bolesnik sa indolentnim mijelomom, kod koga se iFISH metodom ustanovi prisustvo visokorizičnih CA, tretira se kao i novodijagnostikovani bolesnik sa simptomatskom bolešću (2).

Lečenje novodijagnostikovanih bolesnika koji su mlađi od 65 godina ili mlađih od 70 godina koji spadaju u grupu „fit“ bolesnika ima za cilj postizanje dugotrajne remisije i potencijalno izlečenje (2). Ono podrazumeva indukcionu, najbolje trojnu hemioterapiju praćenu visokodoznom hemioterapijom (melfalan) i autologom transplantacijom matične ćelije hematopoeze (ASCT). Tandem autologa transplantacija se može sprovesti u slučaju da je kao

maksimalan terapijski odgovor postignuta parcijalna remisija posle prve autologe transplantacije i to 100. dana od prve (optimalno se sprovodi u prvih 3-12 meseci od prve ASCT) (2).

Efekat tandem ASCT je evaluiran pre ere novih lekova. Sada su toku studije koje porede singl ASCT sa tandem ASCT kao prvom terapijskom linijom, sa dužim periodom praćenja (10). U okviru studija se savetuje kod visokorizičnih bolesnika (11). Konsolidaciona hemioterapija posle autologe transplantacije matične ćelije hematopoze se još uvek razmatra u cilju produbljenja pozitivnog terapijskog efekta prethodno primenjenog lečenja (12).

Alogena transplantacija matične ćelije hematopoze nije sastavni deo preporuka za lečenje multiplog mijeloma u eri savremnih lekova. Njeno izvođenje treba razmatrati u okviru kliničkih trajala (2).

Lečenje bolesnika starijih od 65 godina i onih koji nisu podobni za lečenje visokodoznom hemioterapijom i autologom transplantacijom matične ćelije hematopoze ima za cilj produženje ukupnog preživljavanja uz korekciju i održavanje dobrog opšteg stanja (2). U lečenju se primenjuju hemioterapijske kombinacije sa imunomodulatornim lekovima (talidomid, lenalidomid) ili sa bortezomibom (kao predstavnikom inhibitora proteazoma). Kod bolesnika sa polineuropatijom može se primeniti i bendamustin.

Kod starijih bolesnika, posle indukcione hemioterapije, primena **terapije održavanja** imunomodulatornim lekovima ili bortezomibom ispitivana je u nekoliko randomizovanih studija. One nisu pokazale jasan benefit u ukupnom preživljavanju, te se sistemska terapija održavanja kod starijih ne može preporučiti (13,14).

Kod mlađih bolesnika posle autologe transplantacije matične ćelije hematopoze, faze III randomizovanih trajala su pokazale jasan benefit i u vremenu do progresije bolesti i u ukupnom preživljavanju, kada se primenju terapija održavanja imunomodulatornim lekovima (ili talidomid ili lenalidomid) (15). U februaru 2017. godine, EMA (evropska medicinska agencija) je odobrila lenalidomid kao terapiju održavanja za bolesnike sa novodijagnostikovanim MM posle sprovedene ASCT (2).

Lečenje bolesnika sa relapsom MM zavisi od dužine trajanja prve remisije i prethodnog načina lečenja (2).

Ako je remisija trajala kraće od jedne godine govorimo o ranom recidivu koji zahteva intezifikaciju lečenja, ako je remisija trajala između jedne i tri godine govorimo o

intermedijarnom relapsu i ako je trajala duže od 3 godine radi se o kasnom relapsu MM (2). Kod kasnog relapsa može se ponoviti indukciono lečenje ili se mogu primeniti hemioterapijske kombinacije sa lekovima iz druge grupe koji nisu ranije korišćeni.

Kod pacijenata sa rezistentnom i progresivnom formom bolesti treba razmatrati lečenje novim modalitetima (panobinostat- pan HDAC inhibitor, karfilzomib- nova generacija inhibitora proteazoma, iksazomib- prvi peroralni inhibitor proteazoma, pomalidomid- nova generacija imunomodulatornih lekova, monoklonska antitela- elotuzumab, daratumumab) (2).

Kod bolesnika sa prisutnom koštanom bolešću u okviru MM primenjuju se palijativna zračna terapija, ortopedske intervencije i bisfosfonati (2).

Skorašnje kliničke studije sa novim lekovima i autologom transplantacijom matične ćelije hematopoeze identifikovale su postizanje kompletne remisije kao značajan prediktor dugotrajnog preživljavanja bolesnika, sa oko 15% bolesnika koji se mogu smatrati izlečenim (16). Očekuje se povećanje ovog procenta uvođenjem monoklonskih antitela u indukcionu terapijsku modalitete.

1.4. Predmet istraživanja

Pored jasno definisanih kliničkih i laboratorijski parametara koji su sastavni deo prognostičkih modela, savremene studije su usmerene na ispitivanje molekularno-genetičkih entiteta u okviru multiplog mijeloma.

Multipli mijelom je oboljenje za koje se vezuju visok stepen genomske nestabilnosti i česte numeričke i strukturne hromozomske aberacije koje uključuju translokaciju lokusa za teške lance imunoglobulina (IgH) tzv. primarne translokacije kao što su t(4;14), t(14;16), t(6,14) i t(11;14) (16,17,18).

Numeričke hromozomske aberacije u multiplom mijelomu

Najčešće numeričke hromozomske aberacije u multiplom mijelomu su dodatne kopije hromozoma 1q21 i delecija 17p13.

Dodatne kopije hromozoma 1q21 su među najčešćim genetičkim abnormalnostima kod pacijenata sa multiplim mijelomom. Kod 39% novodijagnostikovanih bolesnika sa multiplim mijelomom i 70% onih koji imaju skrivene translokacije t(4;14) i t(14;16) prisutne su dodatne kopije hromozoma 1q21, koje se vezuju za loš terapijski ishod, čak i kod intenzivno lečenih bolesnika. Prognostički značaj ove anomalije je još uvek kontroverzan, ali su neke studije pokazale da je +1q21 nezavistan i značajan faktor loše prognoze, posebno kod pacijenata koji se leče primenom režima koji sadrže bortezomib (20,21). Dodatne kopije hromozoma 1q21 ne utiču na preživljavanje pacijenata koji su lečeni hemioterapijskim kombinacijama koje su bazirane na primeni talidomida.

Dodatne kopije hromozoma 1q21 nisu svrstane u visokorizične citogenetske abnormalnosti u multiplom mijelomu od strane IMWG (internacionalna radna grupa za MM), između ostalog zbog značajne heterogenosti pacijenta sa ovom numeričkom hromozomskom aberacijom, kako u pogledu broja kopija, tako i u pogledu veličine klona koji je nosilac 1q21. Obično, kao preporučena cut-off vrednost od strane EMN (European Myeloma Network) za iFISH za delecije i numeričke aberacije se uzima 20% (22).

Delecija 17p13 je jedan od najznačajnijih prognostičkih markera u multiplom mijelomu. Javlja se kod oko 10% novodijagnostikovanih pacijenata, a njena učestalost raste u kasnijim fazama bolesti. Ova hromozomska anomalija limitira ključnu ulogu p53 u kontroli

ćelijskog ciklusa i apoptozi. Vezuje se za agresivnu formu bolesti i loš ishod lečenja čak i u eri savremene terapije, koja podrazumeva primenu bortezomiba i nove generacije imunomodulatornih lekova (23,24).

Prisustvo del 17p13 u momentu postavljanja dijagnoze ili njeno sticanje u kasnijim fazama bolesti povezano je sa lošijim ukupnim preživljavanjem. Pacijenti sa visoko-rizičnim profilom na prezentaciji i visoko-proliferativnom bolešću imaju veći rizik od razvoja del 17p13 u kasnijim fazama bolesti, što može delom objasniti lošu prognozu ove grupe bolesnika (22,23). Procenat plazmocita sa del 17p13 ima uticaj na prognostički značaj ove abnormalnosti. Pacijenti sa više od 80% ćelija sa del 17p13 imaju lošije preživljavanje u odnosu na ostale. Od strane EMN preporučena cut-off vrednost je >60%. (22).

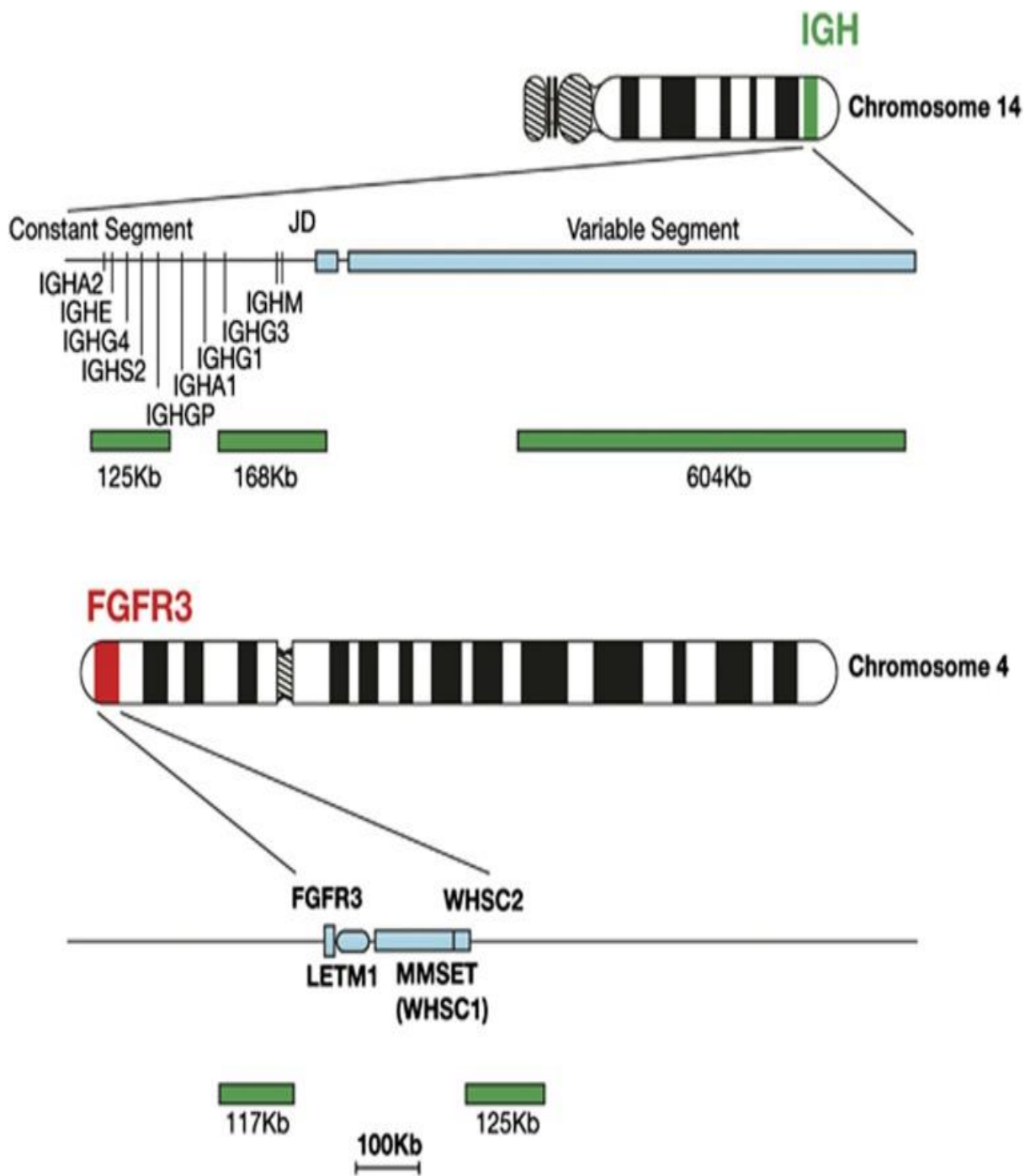
Strukturne hromozomske abercaije u multiplom mijelomu

Od strukturnih hromozomskih aberacija izdvajaju se tzv primarne translokacije, odnosno one koje podrazumevaju translokaciju lokusa za teške lance imunoglobulina (IgH).

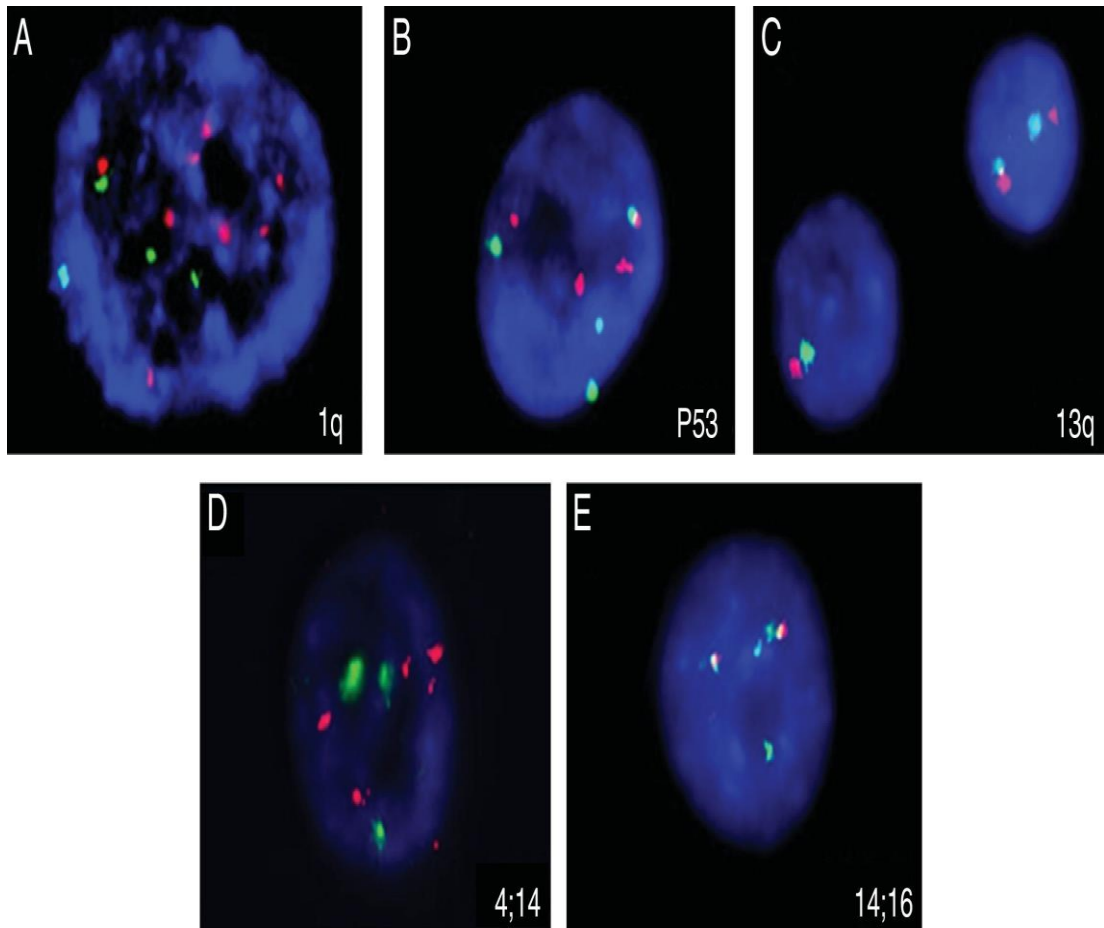
Translokacija t(4;14) prisutna je kod 15% bolesnika sa multiplim mijelomom i povezuje se sa lošim ishodom i mogućom rezistencijom na alkilirajuće agense, što je od značaja za pacijenate koji primaju visokodoznu hemioterapiju i koji se uključuju u program autologe transplantacije matične ćelije hematopoeze. Kod translokacije t(4;14) tačka prekida na hromozomu 4p16 nalazi se u okviru petog ezgonskog gena MMSET, što je 50-100 kilobaza centromerično u odnosu na disregulisani FGFR-3 (fibroblast growth factor 3) gen. FGFR-3 gen je jedan iz familije 5 receptora tirozin kinaze i njegova uloga je onkogen. Disregulacija ova dva gena (FGFR3 i MMSET) doprinosi neoplastičnoj transformaciji u multiplom mijelomu. Translokacija t(4;14) je bila prvi primer IgH translokacije koja simultano disreguliše dva gena sa onkogenetskim potencijalom: FGFR3 na der(14) i MMSET na der(4) (25).

Translokacija t(4;14) je često udružena sa abnormalnostima hromozoma 13, IgA tipom mijeloma i lošm prognozom (26).

Više studija je pokazalo da se uvođenjem bortezomiba u lečenje pacijenata sa translokacijom t(4;14) postiže prevazilaženje negativnog prognostičkog značaja ove translokacije na terapijski odgovor, tok i ishod bolesti (27,28).



Slika 1. Shematski prikaz regiona hromozoma 4 i hromozoma 14 koji učestvuju u translokaciji t(4;14)



Slika 2. Citogenetske abnormalnosti utvrđene iFISH tehnikom u multiplom mijelomu

Ređe zastupljena **translokacija t(14;16)**, u manje od 5% pacijenata sa multiplim mijelomom, uzrokuje ushodnu regulaciju ekspresije onkogenog c-MAF, što se takođe vezuje sa lošim kliničkim tokom (29).

Translokacija t(11;14) prisutna je u oko 17% bolesnika sa multiplim mijelomom i uzrokuje ushodnu regulaciju ciklina D gena koji imaju ključnu ulogu u ćelijskom ciklusu. Ne vezuje se loš klinički tok (29).

Translokacija t(6;14) ne utiču na dužinu preživljavanja ako je prisutna kao izolovana anomalija (29).

Patogeneza multiplog mijeloma i mehanizmi molekularne rezistencije u multipлом mijelomu

U želji za boljom detekcijom visoko rizičnih bolesnika sve je više istraživanja koja su usmerena na molekularne mehanizme rezistencije, posebno u eri savremene terapije MM, koja obuhvata primenu novih lekova poput imunomodulatornih lekova (talidomid, lenalidomid, pomalidomid), inhibitora proteazoma (bortezomib, karfilzomib, iksazomib) uz autologu transplantaciju matične ćelije hematopoeze kod bolesnika koji su podobni za ovaj vid lečenja (30).

U poslednje dve decenije ishod lečenja bolesnika sa multiplim mijelomom se značajno unapredio. Razvoj imunomodulatornih lekova kao što su talidomid, lenalidomid i pomalidomid je tome doprineo u velikoj meri. Iako se talidomid, prvi lek iz ove klase, danas sve ređe primenjuje, lenalidomid ima široku primenu kako u lečenju novodijagnostikovanih bolesnika koji su kandidati za visokodoznu hemioterapiju i autologu transplantaciju matične ćelije hematopoeze, tako i u lečenju novodijagnostikovanih bolesnika koji nisu kandidati za intenzivno lečenje. Koristi se i u terapiji održavanja posle sprovedene autologe transplantacije i ima značajno mesto u lečenju relapsa ili refraktarne bolesti. Pomalidomid se danas prvenstveno koristi u lečenju relapsa odnosno refraktarne forme bolesti (2).

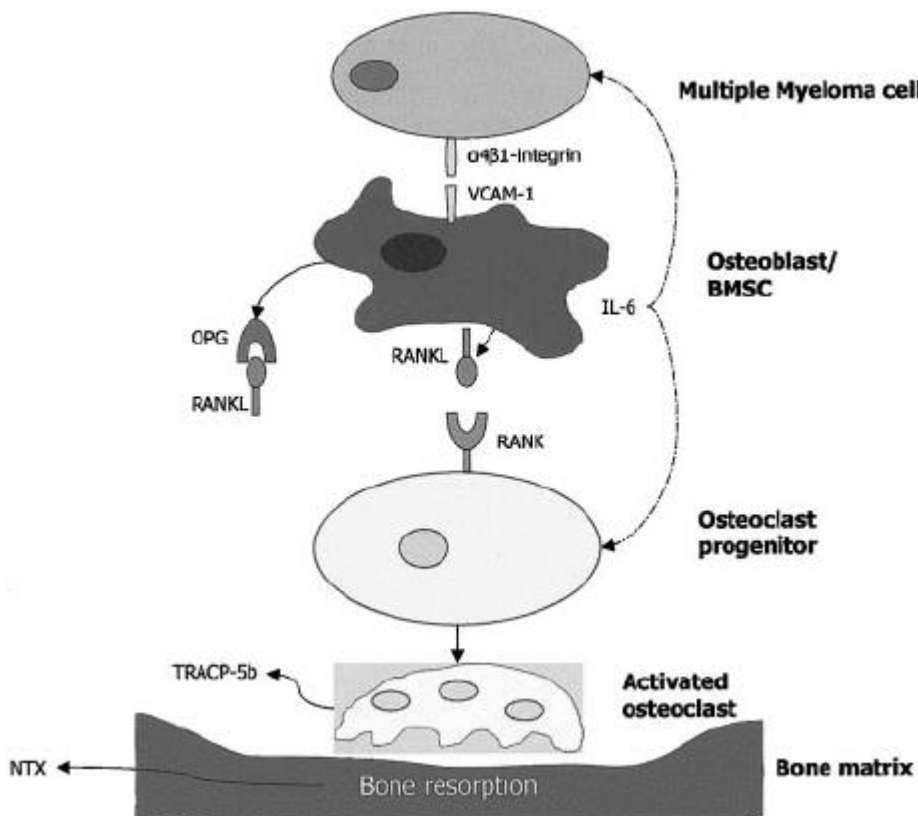
Svoje povoljno dejstvo ostvaruju antiangiogenetskim, citotoksičnim i imunomodulatornim dejstvom. Za to je neophodno rasvetljavanje biologije multiplog mijeloma.

Smatra se da se početna transformacija javlja u postgerminalnom centru B-ćelijske linije, koji nosi somatski hipermutirani IGH gen. Ovaj plazmablastni prekursor ćelija kolonizuje

koštanu srž, propagira se klonalno i diferentuje se u sporo proliferišuću populaciju mijelomskih ćelija (31).

Kada prelaze u cirkulaciju, mijelomske ćelije stiču adhezione molekule na plazma ćelijskoj membrani kakav je hemokin receptor 4 (CXCR 4). Ligand za CXCR 4 u koštanoj srži je stromalni faktor 1 (SDF 1). U koštanoj srži mijelomske ćelije primaju signale za rast i preživljavanje. Glavni faktor rasta mijelomskih ćelija je interleukin 6 (Il-6) koga proizvode stromalne ćelije. Tumor nekroza faktor alfa (TNF-alfa) sekretuju i stromalne i mijelomske ćelije, a on povećava sekreciju Il-6 od strane stromalnih ćelija, povećava ekspresiju adhezionih molekula (VCAM-1, ICAM-1) na mijelomskim ćelijama i njihovih receptora na stromalnim ćelijama. To dovodi do intenzivnog vezivanja mijelomskih ćelija za ćelije strome koštane srži (32, 33).

Mijelomske ćelije produkuju osteoklast-aktivirajuće faktore: Il-6, Il-1, TNF-alfa, TGF-beta. Osteoklast-aktivirajući faktori (OAF) povećavaju ekspresiju liganda za RANK (RANK-L) na membrani stromalnih ćelija. RANK-L se vezuje za RANK receptor na membrani prekursora osteoklasta i tako indukuje njihov rast i diferencijaciju. Aktivnost RANK-L može biti blokirana aktivacijom osteoprotegerina (OPG) koji pripada porodici TNF (tumor necrosis faktor) receptora. Pojačana ekspresija osteoprotegerina (OPG) dovodi do osteopetroze, a njegovo odsustvo dovodi do osteopenije. Ekspresija OPG je snižena u multiplom mijelomu. Naime, mijelomske ćelije vezuju i razgrađuju OPG. Ovaj proces je posredovan interreakcijom sa heparan sulfatom na membrani mijelomskih ćelija. Jedna od osobina i normalnih i malignih plazmocita je ekspresija CD138 transmembranskog proteoglikana koji u svojoj strukturi sadrži lance heparan sulfata. Usled izražene aktivnosti RANK-L i snižene aktivnosti OPG, dolazi do koštane destrukcije u multiplom mijelomu (32,34).



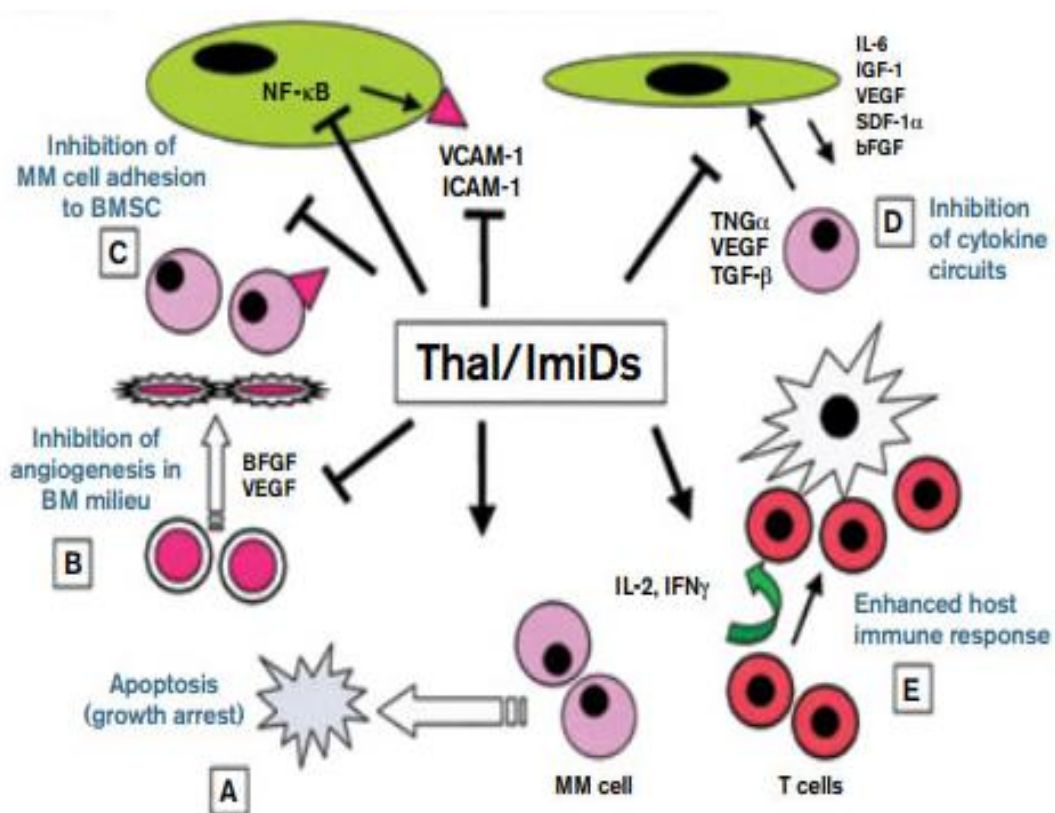
Slika 3. Uloga mikrosredine koštane srži u osteoklastnoj aktivaciji

Jedna od karakteristika malignog procesa u mijelomu je angiogeneza odnosno formiranje novih krvnih sudova koji učestvuju u ishrani neoplastičnog tkiva. Intenzivna angiogeneza, izražena kroz gustinu mikrovaskularizacije i stepen tumorske proliferacije u koštanoj srži, vezuje se za progresivnu formu bolesti i kraće preživljavanje obolelih (35).

1994. godine je otkriveno da talidomid ima antiangiogenetsko dejstvo koje je vezano za inhibiciju FGF (fibroblast growth factor) (30). Lenalidomid i pomalidomid ispoljavaju citotoksično dejstvo, odnosno imaju sposobnost da indukuju smrt mijelomske ćelije. To se ostvaruje različitim mehanizmina, uključujući inhibiciju NF κ B signalnog puta, smanjenjem produkcije IRF-4 (interferon regulatorni faktor 4), kao posledica nishodne regulacije C/EBP β , aktivacije kaspaza, povećane ekspresije proapoptotskih faktora i smanjene ekspresije antiapoptotskih faktora (36,37,38,39).

Imunomodulatorni lekovi imaju sposobnost da prekinu međusobno dejstvo između mijelomskih ćelija i ćelija strome koštane srži, tako što smanjuju ekspresiju adhezionih molekula na površini ćelija i smanjuju produkciju IL-6 (39).

Između mijelomskih ćelija, osteoklasta, osteoblasta, stromalnih ćelija i drugih članova mikrosredine koštane srži postoji složena povezanost. Pokazano je da lenalidomid smanjuje osteoklastnu hiperaktivnost i inhibira sekreciju osteoklastnih faktora kao što su MIP-1a, BAFF, APRIL, and RANK-L (40,41).

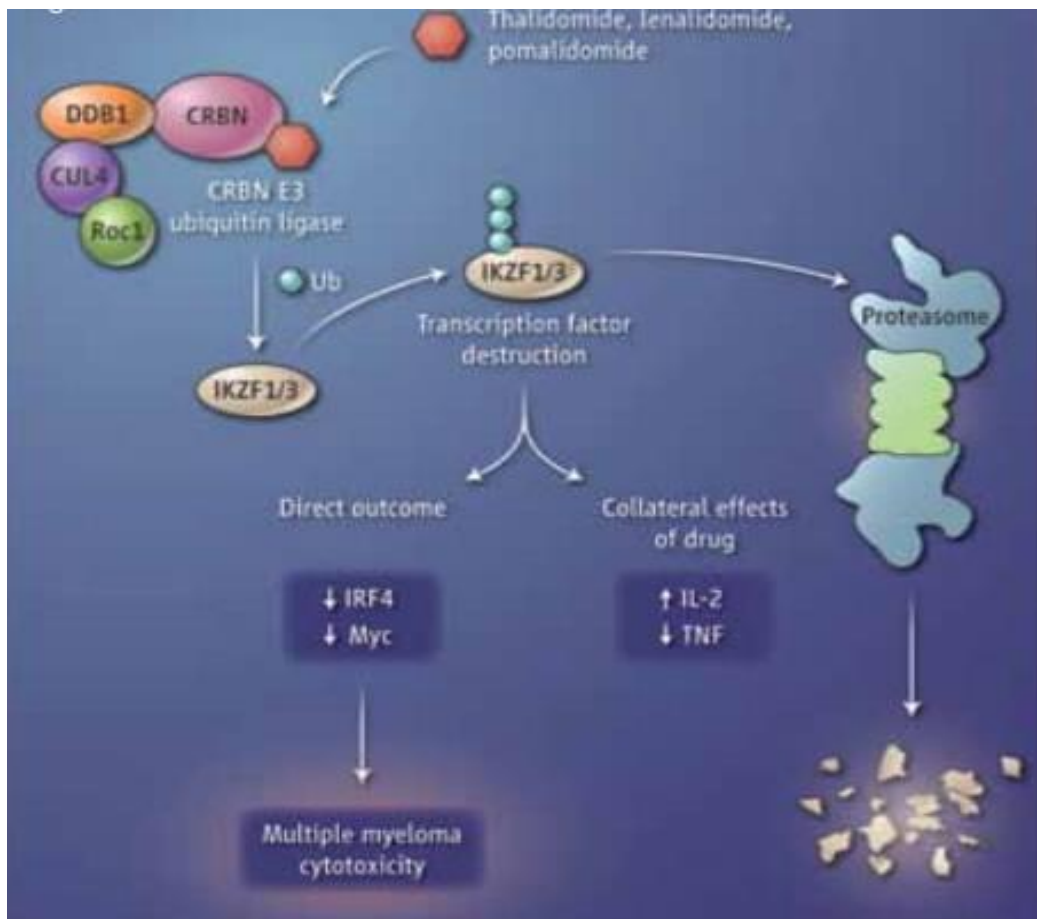


Slika 4. Shematski prikaz dejstva imunomodulatornih lekova

Prvi lek iz grupe imunomodulatornih lekova, talidomid, vezuje **cereblon (CRBN)** čime inhibira funkciju E3 ubikvitin ligaza kompleksa, koji se sastoji od CRBN, DDB1 i Cul4. Ovaj kompleks reguliše mehanizme reparacije DNK, replikacije i transkripcije. Lekom indukovana

inhibicija cereblona uzrokuje između ostalog i nishodnu regulaciju interferon regulatornog faktora 4 (IRF4), koji je faktor preživljavanja mijelomskih ćelija koji cilja kritične gene kao što su MYC, CDK6 i CASP3 (42,43,44).

Cereblon je od značaja i za antimijelomsko dejstvo derivata talidomida, lenalidomida i pomalidomida (41). Ekspresija cereblona se smanjuje kod pacijenta koji su razvili rezistenciju na lenalidomid. S druge strane, niska ekspresija cereblona ne utiče da terapijski efekat lekova kao što su bortezomib, deksametazon ili melfalan (46,47).



Slika 5. Imunomodulatorno dejstvo talidomida, lenalidomida i pomalidomida

Većina pacijenata sa multiplim mijelomom inicijalno odgovara na primenjenu hemioterapiju, ali vremenom, sa svakim novim relapsom razvija se rezistencija na lekove (47). Jedan od razloga za rezistenciju na lekove kod pacijenata sa multiplim mijelomom su efluks

transporteri. P-glikoprotein (MDR1) je najviše proučavan **multidrug resistance protein**. P-glikoprotein smanjuje intracelularnu akumulaciju lekova i na taj način ograničava njihovo terapeutsko dejstvo. P-glikoprotein je značajan faktor u rezistenciji na različite grupe lekova koje se koriste u lečenju multiplog mijeloma (inhibitori proteazoma, antraciklini, alkilirajući agensi i imunomodulatorni lekovi). Skorašnje studije su pokazale da bortezomib funkcioniše kao supstrat za P-gp i to može biti u osnovi rezistencije na bortezomib (48,49).

Ekspresija **LRP (lung resistance protein)**, koji posreduje u intracelularnom i nukleocitoplazmatskom transportu, je povezana sa rezistencijom na hemioterapiju i kraće preživljavanje bolesnika sa multiplim mijelomom (50).

Razvoj refraktarne bolesti u okviru multiplog mijeloma je često povezan sa ekspresijom jednog ili više multidrug resistance (MDR) gena. Kod pacijenata sa MM koji nemaju adekvatan odgovor na indukcionu hemioterapiju, česta je ekspresija MDR1 gena koji služi kao efluks pumpa i na taj način štiti neoplastične ćelije. Pojačana ekspresija P glikoproteina (P-gp), koji je produkt MDR1 gena je česta u MM i povezuje se relapsom i rezistencijom na lekove (49,50,51).

Mnogi necitotoksični lekovi, kao što su blokatori kalcijumskih kanala, inhibitori kalmodulina, imunosupresivni lekovi, hinoloni, steroidi, antiestrogeni, mogu da obnove intracelularnu akumulaciju citotoksičnih lekova blokirajući P-glikoprotein efluks funkcionalna mesta (49).

CILJEVI

2. Ciljevi

1. Utvrditi uticaj postojanja molekularno-genetičkih aberacija: del1p, +1q21, translokacije t(4;14), t(14;16) i del 17p na terapijski odgovor i preživljavanje bolesnika sa multiplim mijelomom.
2. Utvrditi uticaj ekspresije CRBN, MDR i LRP na terapijski odgovor i preživljavanje bolesnika sa multiplim mijelomom.

MATERIJAL I METODE

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanici

U ovo ispitivanje su uključena 92 novootkrivena bolesnika sa multiplim mijelomom, koji su dijagnostikovani i lečeni u Klinici za hematologiju KCS u periodu od decembra 2011. do januara 2014. godine.

Dijagnoza multiplog mijeloma kod ispitanika je postavljena u skladu sa kriterijumima Svetske zdravstvene organizacije (52).

Molekularno-genetička ispitivanja koja su predmet ovog istraživanja su sprovedena u Laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Klinike za hematologiju Kliničkog centra Srbije i u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGG) u Beogradu.

3.2. Metode

3.2.1 Statističke metode

Metodama deskriptivne statistike sagledana su klinička obeležja od značaja za bolesnike sa dijagnozom multiplog mijeloma: pol, starost u momentu postavljanja dijagnoze, klinički stadijum, tip paraproteina, prisustvo bubrežne slabosti. Fišerov test je korišćen za analizu kategorijalnih varijabli. Man-Whitney test je korišćen za poređenje ekspresije CRBN normalnih uzoraka koštane srži i koštane srži bolesnika. T-test je korišćen za procenu statističke značajnosti u ekspresiji MDR1 i LRP kod bolesnika koji su reagovali na terapiju i onih koji nisu. Kaplan-Meier metod i log-rank statistika su primenjivani u utvrđivanju razlika u OS (ukupnom preživljavanju) i PFS (progression-free survival). Određivanje optimalne cut-off vrednosti za ekspresiju CRBN u predikciji PFS kod bolesnika lečenih terapijom sa Talidomidom je vršeno korišćenjem R paketa „survAccuracyMeasures“. Cox regresioni model je primenjivan u utvrđivanju koji su faktori imali najjači efekat na PFS u grupi bolesnika koji su lečeni Talidomidom. Sve kalkulacije su su izvedene primenom SPSS, verzija 21.0 (IBM, Armonk, NY) i R verzija 3.2.2.

3.2.2 Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

U laboratoriji za citogenetiku i molekularnu genetiku Klinike za hematologiju KCS urađena je interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija (iFISH) u cilju utvrđivanja prisustva

specifičnih citogenetskih abnormalnosti: abnormalnosti hromozoma 1 (amplifikacija 1q21), translokacija IGH gena (t(4;14) i t(14;16)) i delecija 13q14 i 17p13.

Materijal

Analiza je rađena na uzorcima koštane srži fiksiranim u formalinu i ukalupljenim u parafin, kao i na uzorcima aspirata koštane srži.

Uzorak aspirata koštane srži dobijen je aspiracijom iz grudne kosti ili zadnjeg grebena karlične kosti. Uzorak bioptata koštane srži dobijen je biopsijom iz prednjeg ili zadnjeg grebena karlične kosti Jamashidi iglom.

iFISH metoda

Protokol za pripremu tkiva obuhvata odabir tkivnih preseka debljine 2 μ m iz odgovarajućih kalupa tkiva koji se postavljaju na mikroskopska stakla sa pozitivnim naelektrisanjem. Na navedenim preparatima sprovedena je metoda iFISH, prema opisanom protokolu (53).

Protokol za pripremu aspirata koštane srži podrazumeva upotrebu monoklonskog CD138 antitela, obeleženog magnetnim partikulama (Miltenyi plasma cell isolation kit II, Miltenyi Biotec Inc. CA.USA). Metoda selekcije i obogaćivanja uzorka plazma ćelijama, urađena je prema zadatom protokolu (54).

Hibridizacija je izvedena pomoću komercijalnih, direkno obeleženih proba (1q21 CKS1B/1p32 CDKN2C, LSI RB1, LSI TP53, IGH/MAF DF, IGH/FGFR3 DF), Abbott-Vysis (Vysis, Downers Grove, IL). Denaturacija i hibridizacija DNK izvedeni su na temperaturama prilagođenim vrsti uzorka i detaljno opisani u uputstvu za upotrebu FISH probe. Po završetku hibridizacije, pločice su isprane u 2xSSC/0,3% NP-40 na 73°C, 2 minuta i 2xSSC/0,3% NP-40 na sobnoj temperaturi, 1 minut.

Analiza fluorescentnih signala

Kod svakog bolesnika analiza je urađena na 100 ili više jedara, za svaki od navedenih genskih regiona. Interfazna jedra su analizirana pomoću mikroskopa Olympus BX51 opremljenog fluorescentnom lampom i pojedinačnim (*single band pass*) filterima – SpectrumGreen, SpectrumOrange i DAPI. Slikanje fluorescentnih signala je omogućeno Olympus U-CMAD3 fluorescentnom kamerom (Olympus, Germany).

U Laboratoriji za molekularnu biomedicinu pri IMGG, molekularno-genetička ispitivanja su sprovedena na izolovanim mononuklearnim ćelijama iz aspirata koštane srži. Za izolaciju mononuklearnih ćelije korišćena je metoda izolacije na gradijentu Ficoll-a. Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija korišćen je TRIzol® (Invitrogen). TRIzol® predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a sam proces izolacije predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski P & Sacchi N (Chomczynski P & Sacchi N, 1987). Po izolaciji, RNK se čuva na -80° C do sprovođenja molekularno-genetičkog ispitivanja. Iz RNK metodom reverzne transkripcije izvršena je sinteza komplementarne DNK (c-DNK). Detekcija t(4;14) fuzionih transkripata vršena je primenom RT-PCR metode (55). Utvrđivanje ekspresije MDR1, LRP i CRBN gena sprovedeno je pomoću „real-time“ PCR (q-PCR) metode (56). Relativna ekspresija gena kod pacijenata određena je poređenjem sa ekspresijom kod zdravih kontrola. U slučaju ispitivanja ekspresije MRD1 i LRP gena primenjena je SYBR Green hemija, dok je prilikom određivanja ekspresije CRBN gena korišćena TaqMan hemija.

Izolacija mononuklearnih ćelija iz aspirata koštane srži

Protokol:

- na dno sterilne epruvete zapremine 10 ml sipati 3 ml Ficoll-Plaque PLUS (GE Healthcare), a zatim na ovaj gradijent naneti 4 ml razblaženog uzorka (1:1, uzorak:fiziološki rastvor)
- centrifugirati na 1 500 g/25 min na sobnoj temperaturi, u kliničkoj centrifugi, bez kočenja
- posle centrifugiranja, pipetom prebaciti „buffy coat“ interfazu koja je sastavljena od mononuklearnih ćelija u novu sterilnu epruvetu
- isprati dva puta u PBS-u; posle svakog ispiranja sledi centrifugiranje na 1 500 g/15 min
- talog resuspendovati u TRIzol®-u (Invitrogen)

Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju RNK iz mononuklearnih ćelija je korišćen TRIzol® (Invitrogen). TRIzol® predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, a sam proces izolacije predstavlja

unapređen klasični metod izolacije RNK definisan od strane Chomczynski P & Sacchi N (Chomczynski P & Sacchi N, 1987).

Protokol:

- u 1 ml TRIzol[®]-a resuspendovano je maksimalno 1×10^7 ćelija i lizirano provlačenjem kroz iglu promera 0,7 mm
- liziran uzorak se ostavi da stoji na sobnoj temperaturi 5-10 min
- dodaje se 200 μ l hloroforma, snažno promućka, a zatim uzorak ostavi da stoji 5-15 min na sobnoj temperaturi
- posle centrifugiranja na 12 000rcf/15 min/+4°C pojavljuju se jasno odvojene faze; gornja vodena faza u kojoj se nalazi RNK, interfaza i donja, crevena, organska faza u kojoj se nalazi DNK i proteini
- gornja vodena faza se prebacije u novu tubu i dodaje se 0,5 ml izopropanola. Promešati invertovanjem tube i ostaviti da stoji 10-15 min na sobnoj temperaturi (precipitacija RNK)
- centrifugirati na 12 000rcf/15 min/+4°C, a zatim ukloniti supernatant dekantovanjem i oprati talog sa 1 ml hladnog 70% etanola
- centrifugirati na 12 000rcf/10 min/+4°C, ukloniti pažljivo etanol i talog osušiti na sobnoj temperaturi
- talog RNK rastvoriti u „RNAse-free“ vodi, a koncentraciju i čistoću RNK odrediti merenjem A_{260}/A_{280} na spektrofotometru

Reverzna transkripcija (RT)

Sinteza cDNK je izvršena reakcijom reverzne transkripcije.

Protokol:

- smešu finalnog volumena 11 μ l koja sadrži 1 μ g RNK i 100 pmol „random-hexamer“ prajmera inkubirati 5 min na 70°C, a zatim ohladiti na ledu
- dodati smešu finalnog volumena 9 μ l koja sadrži 4 μ l 5x RT-pufera, 2 μ l dNTP (10 mM) i 40 U M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas)
- inkubirati 15 min na 25°C, a zatim 1h na 42°C
- reakcija se zaustavlja inkubacijom od 10 min na 70°C

3.2.3 Reakcija lančanog umnožavanja DNK (PCR)

PCR („polymerase chain reaction“) je *in vitro* amplifikacija definisane DNK sekvence i predstavlja imitaciju procesa DNK replikacije. Reakcija koristi dva oligonukleotida komplementarna krajevima sekvence koja se umnožava (prajmeri), koji su međusobno suprotno orijentisani i dugački 15-20 nukleotida. Sinteza DNK katalizovana je termostabilnom DNK polimerazom. Ponavljanje ciklusa, od kojih se svaki sastoji od denaturacije DNK, hibridizacije prajmera (aniling) i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze, za rezultat ima eksponencijalnu amplifikaciju specifičnog DNK fragmenta. Krajevi amplifikovanog fragmenta su definisani 5' krajevima prajmera, a njihova veličina određena je rastojanjem između sekvenci koje prajmeri prepoznaju. PCR reakciona smeša mora sadržati u sebi komponente potrebne za *in vitro* sintezu DNK: matrica (DNK koja se kopira), prajmeri (oligonukleotidi komplementarni krajevima sekvence koja se kopira), nukleotidi (gradivni elementi DNK), *Taq* polimeraza (termostabilna DNK polimeraza koja katalizuje ugradnju nukleotida po principu komplementarnosti sa matricom), joni magnezijuma i pufer (neophodni za optimalni rad *Taq* polimeraze).

Analiza DNK na agaroznom gelu

Analiza DNK je vršena na horizontalnom agaroznom gelu odgovarajuće koncentracije (2%), u zavisnosti od veličine molekula DNK koje treba razdvojiti. U gelove je pre polimerizacije dodavan etidijum bromid (5µg/ml). Elektroforeza je tekla u 1XTAE puferu (40mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1mM Na₂EDTA), pri voltaži od 4-7 V/cm. DNK je vizuelizovana osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 266 nm. Trajni zapis rezultata dobija se fotografisanjem gela CCD kamerom integrisanom u sistem za automatsku digitalnu akviziciju slike, BioDocAnalyze sistemom. Veličina fragmenata DNK određuje se pomoću adekvatnih komercijalnih markera (Fermentas).

RT-PCR protokol za detekciju *IGH/MMSET* fuzionog transkripata koji nastaje kao posledica hromozomske translokacije t(4;14)(p16,3;q32)

Za molekularnu detekciju *IGH/MMSET*, odnosno *FGFR3/MMSET* fuzionog transkripta kod obolelih, primenil smo protokol RT-PCR (reverse transcriptase - PCR) analize, na totalnoj

RNK izolovanj iz mononuklearnih ćelija pacijenta. Primenjen je tzv. „nested“ RT-PCR koji se sastoji iz dve runde.

U prvoj rundi korišćeni su I μ 1 i ms6r kao “forward” i “reverse” prajmeri, dok su u drugoj rundi kombinovani I μ 2 i ms5r. Sekvence prajmera su date u tabeli 1.

Tabela 1. Sekvence korišćenih prajmera

prajmer	sekvenca (5'-3')
I μ 1	AGCCCTTGTTAATGGACTTG
I μ 2	CTTTGCAAGGCTCGCAGTGAC
ms6r	CCTCAATTTCCCTGAAATTGGTT
ms5r	AAGAACTGTACGTGATACTG

Protokol:

<u>Prva runda PCR (finalni volumen 25 μl)</u>	<u>Druga runda PCR (finalni volumen 50 μl)</u>
<ul style="list-style-type: none"> • 50-100 ng cDNK (5-10% RT smeše) • 1x reakcioni pufer A • prajmeri finalne koncentracije 800 nM • dNTP finalne koncentracije 400 μM • MgCl₂ finalne koncentracije 1,5 mM • 2,5 U HotStart Taq polimeraza (Kapa, Kapa Biosystems) 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 μl smeše prve runde PCR reakcije • 1x reakcioni pufer A • prajmeri finalne koncentracije 400 nM • dNTP finalne koncentracije 200 μM • MgCl₂ finalne koncentracije 1,5 mM • 2,5 U HotStartTaq polimeraza (Kapa, Kapa Biosystems)

Temperaturni profil PCR reakcije

1. 5 min/95°C – aktivacija Taq polimeraze
2. 35 ciklusa;

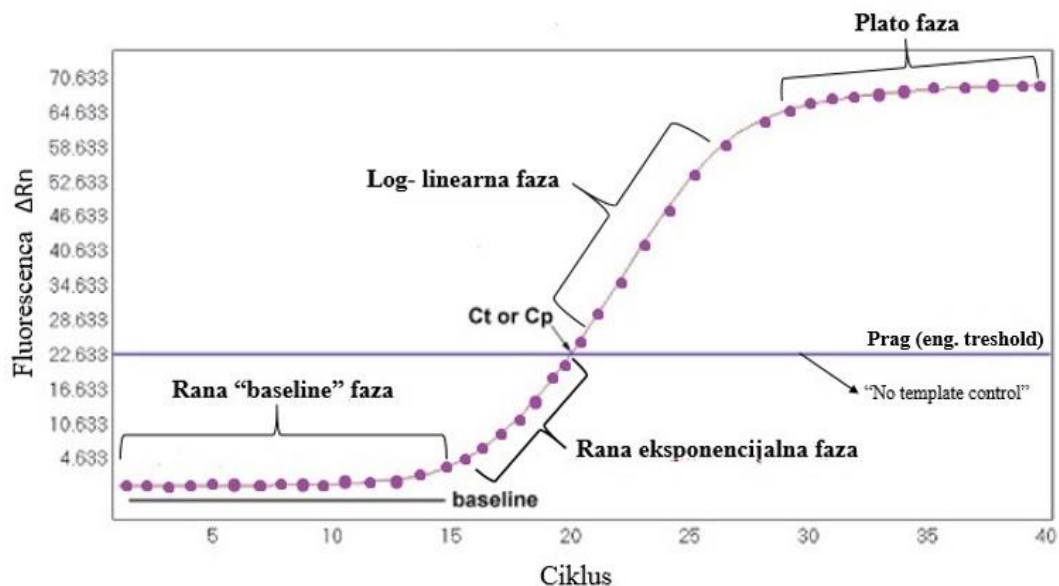
- 30 sec/95°C – denaturacija
 - 1 min/60°C – aniling
 - 1 min/72°C – elongacija
3. 10 min/72°C – finalna elongacija

Razlika u temperaturnom profilu između dve reakcije je bila ta da je u prvoj rundi bilo 35 ciklusa, dok je u drugoj rundi bilo 30 ciklusa.

Posle prve runde PCR ukoliko postoji prisustvo *IGH/MMSET* rearanžmana, nakon elektroforeze na 2% agaroznom gelu uočiće se prisustvo trake, dužine koja odgovara jednoj od 3 moguće tačke prekida: MB4-1, MB4-2 i MB4-3. Posle prve runde amplifikacije, radi se druga runda sa produktom PCR reakcije iz prve runde kako bi se povećala senzitivnost sa 10^{-2} - 10^{-3} , sa 10^{-4} - 10^{-6} . Na taj način, ova metoda „nested“ RT-PCR postaje pogodna za detekciju minimalne rezidualne bolesti.

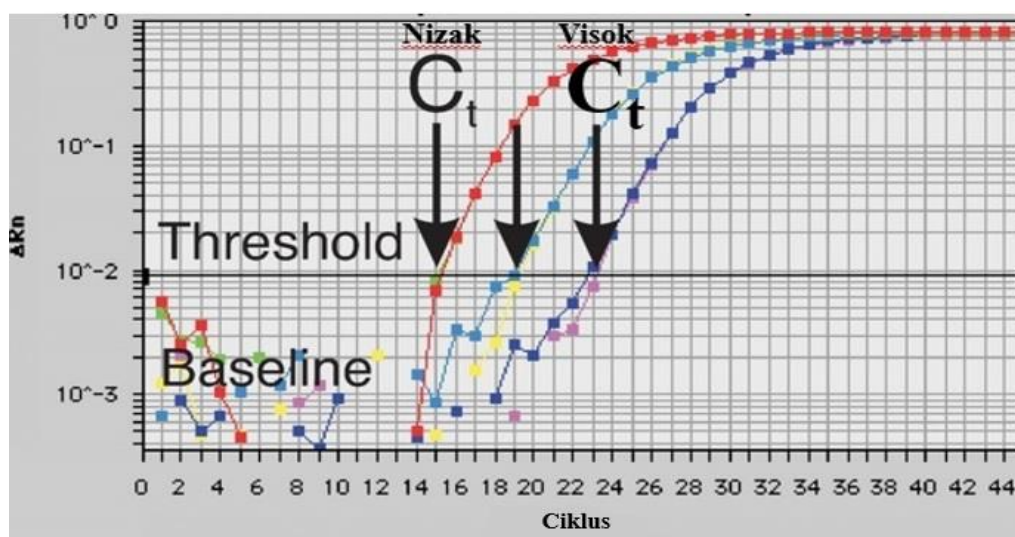
3.2.4 Praćenje ekspresije gena pomoću „real-time“ PCR (q-PCR) metode

„Real-time“-PCR ili kvantitativni PCR (q-PCR) jeste metod koji omogućava tačnu kvantifikaciju količine PCR produkta u toku svakog PCR ciklusa, tj. u realnom vremenu („real-time“). U qPCR meri se fluorescentni signal koji se emituje u toku PCR reakcije koji je direktno proporcionalan količini PCR produkta u datom ciklusu. Za razliku od „klasičnog“ PCR gde se količina produkta može meriti samo na kraju PCR reakcije, ovde se kvantifikacija odvija u toku eksponencijalne faze reakcije, u toku koje dolazi do udvostručavanja PCR produkta prilikom svakog PCR ciklusa (Slika 1.).



Slika 1. Faze PCR amplifikacije. Rn predstavlja vrednost fluorescencije reporterske boje, a ΔRn predstavlja razliku Rn vrednosti između uzorka i kontrole („no template control“).

U početnim ciklusima intenzitet fluorescencije ne prelazi bazalni nivo („baseline“). Ciklus u kome je fluorescentni signal uzorka značajno viši od bazalnog signala, naziva se „threshold cycle“ – Ct. Vrednost Ct je direktno proporcionalna količini target sekvence u uzorku. Što je veći početni broj kopija target sekvence, Ct je niži i obratno, Ct je viši u uzorcima sa manjom početnom količinom target sekvence (Slika 2.).



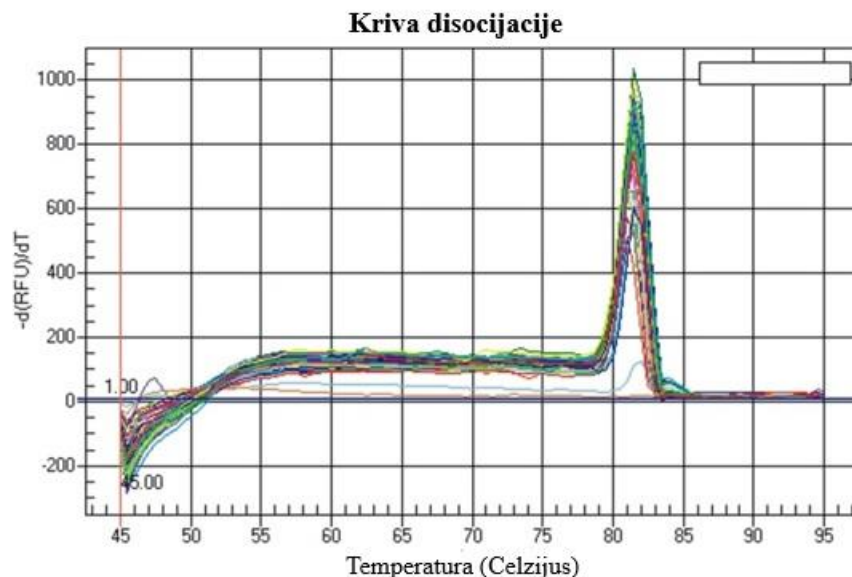
Slika 2. Amplifikacioni plotovi sa različitim početnom količinom target molekula. Niska Ct vrednost znači da je broj početnih molekula bio veliki, a visoka Ct vrednost da je broj početnih molekula bio mali.

Trenutno se koriste 2 osnovne „real-time“ PCR tehnike;

1. SYBR Green
2. TaqMan

SYBR Green je najjednostavnija tehnika, zasnovana na primeni DNK-interkalirajuće SYBR Green I boje. Ova boja se vezuje za manji žleb dvolančane DNK i sa povećanjem broja PCR reakcije dolazi do povećanja količine dvolančane DNK, pa samim tim dolazi i do povećanja fluorescentnog signala koga emituje SYBR Green I boja (na 520nm).

SYBR Green tehnika nije specifična i za posledicu može imati detekciju nespecifično amplifikovanih PCR produkata, kao i detekciju dimera prajmera. Za procenu specifičnosti primenjuje se analiza krive topljenja („melting curve analysis“). U ovoj analizi, temperatura polako raste od 40 do 95°C, pri čemu se konstantno prati nivo fluorescencije. Fluorescentni signal će biti visok pri niskim temperaturama u slučaju postojanja dvolančane DNK, ali će fluorescencija drastično pasti pri temperaturama oko tačke topljenja PCR produkata. PCR produkti različite dužine i sastava će imati različite tačke topljenja pa će davati različite pik-ove fluorescencije. Specifični PCR produkt ima samo jedan pik (Slika 3.).



Slika 3. Kriva topljenja (disocijacije) specifičnog PCR produkta.

TaqMan tehnika koristi 5'→3'egzonukleaznu aktivnost Taq polimeraze za specifičnu detekciju PCR produkata. TaqMan proba je dvostuko obeležena oligo-nukleotidna proba; na 5'kraju je fluorescentna, reporter boja-R (najčešće FAM, VIC ili JOE), a na 3'kraju se nalazi kvenčer-Q. Sve dok se reporter i kvenčer boja nalaze „blizu“ jedna drugoj, tj. dok je TaqMan proba intaktna, nema emitovanja fluorescencije jer fluorescencija koju emituje repoter biva „apsorbovana“ od strane kvenčera. Međutim, u toku PCR amplifikacije 5'→3'egzonukleazna aktivnost Taq polimeraze izmešta probu i uklanja je sa DNK lanca, što rezultira u emitovanju detektabilne fluorescencije od strane reporter boje. U toku svakog novog ciklusa PCR reakcije, fluorescencija će rasti kao posledica akumulacije „slobodnih“ reportera.

Kvantifikacija qPCR podataka može biti:

1. Apsolutna kvantifikacija, gde je rezultat izražen kao apsolutni broj kopija target sekvence. Tačna kvantifikacija target sekvence se dobija poređenjem sa standardnom krivom izrađenom od uzoraka poznate koncentracije.
2. Relativna kvantifikacija, gde je rezultat predstavljen kao relativni odnos reference (kalibrator) i merenog uzorka.

U oba pristupa kvantifikaciji, veoma je važno izvršiti normalizaciju dobijenih podataka. Kako je količina dobijenih PCR produkata direktno zavisna od početne količine matrice da bi se izbegle greške nastale prilikom postavke eksperimenta, uporedo sa umnožavanjem target sekvence vrši se i umnožavanje takozvane endogene kontrole. Endogena kontrola je obično „housekeeping“ gen čija je ekspresija stabilna u svim uzorcima koji se kvantifikuju, odnosno čija se ekspresija ne menja prilikom esperimentalnih tretmana.

Relativna kvantifikacija - Komparativni ddCt metod

Komparativni ddCt metod je najčešće korišćen metod kvantifikacije ekspresije target gena primenom qPCR tehnologije, definisan od strane Livak KJ & Schmittgen TD (Livak KJ & Schmittgen TD, 2001). Količina target gena, normalizovanog u odnosu na endogenu kontrolu i relativno u odnosu na kalibrator je;

$Q = 2^{-ddCt}$, gde je

$$ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{KALIBRATOR} =$$

$$(Ct_{target} - Ct_{endogena kont.}) - (Ct_{target, KALIBRATOR} - Ct_{endogena kont., KALIBRATOR})$$

Da bi kalkulacija primenom ove metode bila tačna, efikasnost amplifikacije target gena i endogene kontrole mora biti približno ista i mora biti iznad 96%.

3.2.5 Određivanje ekspresije *MDR1* i *LRP* gena komparativnim ddCt metodom

Ekspresija *MDR1* i *LRP* gena je praćena primenom „real-time“ PCR metode na 7500 Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom SYBR Green tehnike. Kao endogena kontrola je korišćen *GAPDH* gen. Nazivi i sekvence prajmera navedeni su u Tabeli 2.

Tabela 2 . Prajmeri korišćeni prilikom određivanja visine ekspresije *MDR1* i *LRP* gena

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera
LRP-F	5' - CGC TGT GAT TGG AAG AAG CAC CTA - 3'
LRP-R	5' - TGT GAT CCA CGG ACA CTC CTA C - 3'
MDR1-F	5' - GTC TAC AGT TCG TAA TGC TGA CTG - 3'
MDR1-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'

Reakciona smeša finalnog volumena 10 µl je sadržala sledeće komponente:

- 50 ng cDNK
- 1 x *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems)
- 4 pmol "forward" prajmera (*MDR1*, *GAPDH*)
- 4 pmol "reverse" prajmera (*MDR1*, *GAPDH*)

Temperaturni profil reakcije:

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

- 15 sek/95°C
- 1 min/60°C

Obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena medijana dCt vrednosti nađena kod analiziranih zdravih kontrola;

$Q = 2^{-ddCt}$; gde je $ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{KALIBRATOR} = dCt_{uzorak} - dCt_{zdrave\ kontrole(medijana)}$

3.2.6 Određivanje ekspresije *CRBN* gena komparativnim ddCt metodom

Ekspresija *CRBN* gena je praćena primenom „real-time“ PCR metode na 7900HT Real-time PCR aparatu (Applied Biosystems), upotrebom TaqMan hemije. Kao endogena kontrola korišćen je *GAPDH* gen. Za ekspresiju *CRBN* i *GAPDH* gena je korišćen TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems). Kvantifikacija *CRBN* ekspresije izvršena je u PCR reakciji finalnog volumena 20 µl koristeći 50ng cDNK sa TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems), TaqMan® Gene Expression Assay za *CRBN* (Hs00372271_m1, Applied Biosystems) i za *GAPDH* (Hs02758991_g1, Applied Biosystems).

Temperaturni profil reakcije:

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

Relativna ekspresija *CRBN* gena kod pacijenata je određena poredjenjem sa ekspresijom kod zdravih kontrola. Tačnije, obrada rezultata je izvršena primenom komparativnog ddCt metoda, a kao kalibrator je korišćena medijana dCt vrednosti nađena kod analiziranih zdravih kontrola;

$Q = 2^{-ddCt}$; gde je $ddCt = dCt_{uzorak} - dCt_{KALIBRATOR} = dCt_{uzorak} - dCt_{zdrave\ kontrole(medijana)}$

REZULTATI

4. Rezultati

Ispitivanjem su bila obuhvaćena 92 prethodno nelečena bolesnika sa MM, koji su dijagnostikovani u periodu od decembra 2011. do decembra 2014. godine u Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije.

4.1. Struktura ispitanika prema polu, starosti, tipu paraproteina i kliničkom stadijumu

Prosečna starost obolelih iznosila je 67 godina i kretala se u rasponu od 35 do 80 godina, uz blagu predominaciju osoba ženskog pola (48 žena i 44 muškaraca) (tabela 1 i tabela 2).

Tabela 1. Struktura ispitivanih bolesnika prema polu

Pol	Broj	Procenat
Muški	44	47,8
Ženski	48	52,2
Ukupno	92	100,0

Tabela 2. Starosna struktura ispitivanih bolesnika

	Broj	MIN	MAX	Prosečna starost
Starost u momentu Dg	92	35	80	67
Ukupno	92			

Prema tipu paraproteina IgG mijelom je imalo 55 (59,8%) ispitanika, IgA 18 (19,6%), mijelom lakih lanaca 16 (17,4 %) i IgD mijelom 2 (2,2%) ispitanika (tabela 3).

Tabela 3. Struktura ispitanika prema tipu paraproteina

Tip paraproteina	Broj	Procenat
IgG	55	59,8
IgA	18	19,6
Laki lanci	16	17,4
IgD	2	2,2
Ukupno	92	100,0

Koristeći Durie-Salmon klasifikaciju, 68 (73,9%) bolesnika je imalo bolest u uznapređovalom III kliničkom stadijumu, 18 (19,6%) u II kliničkom stadijumu, a 6 (6,5%) u I kliničkom stadijumu (tabela 4).

Tabela 4. Struktura bolesnika prema Durie-Salmon klasifikaciji (klinički stadijum bolesti)

Klinički stadijum	Broj	Procenat
CS I	6	6,5
CS II	18	19,6
CS III	68	73,9
Ukupno	92	100,0

4.2. Struktura ispitanika prema stepenu rizika

Primenom Internacionalnog Stejdžing Sistema (ISS) u MM, 24 (26,1%) bolesnika je imalo ISS skor 1, 28 (30,4%) ISS 2, a 40 (40,3%) ISS 3 (tabela 5).

Tabela 5. Struktura bolesnika prema stepenu rizika (ISS)

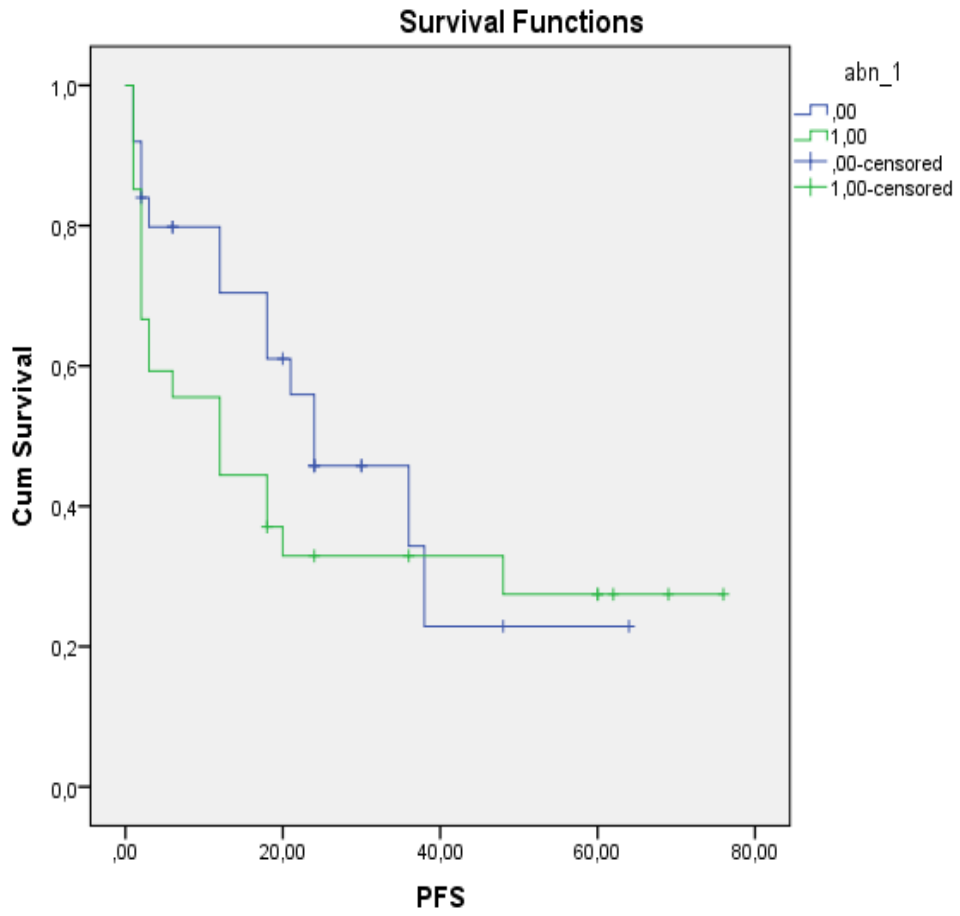
Stepen rizika	Broj	Procenat
Nizak rizik ISS 1	24	26,1
Srednji rizik ISS 2	28	30,4
Visok rizik ISS 3	40	40,3
Ukupno	92	100,0

Povišenu vrednost laktat-dehidrogenaze (LDH) je imalo 18 (19,6%) bolesnika, a bubrežnu slabost 16 (17,4%) bolesnika.

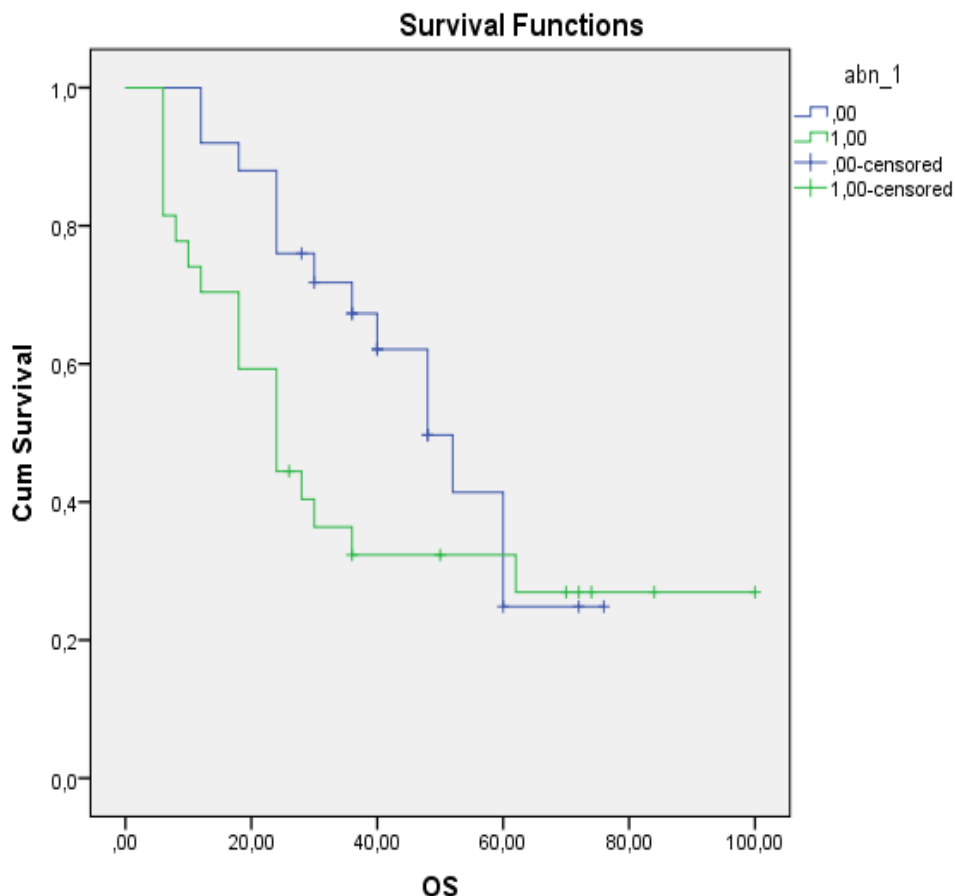
4.3. Prisustvo visokorizičnih CA utvrđenih iFISH metodom

Metodom interfazne in situ hibridizacije (iFISH) kod 14 (15,2%) bolesnika ustanovljeno je prisustvo visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti: translokacija t(4;14), translokacija t(14;16) i del17p. Istom metodom kod 27 (29,3%) bolesnika utvrđeno je prisustvo abnormalnosti hromozoma 1. Kod 8 (8,7%) bolesnika delecija 1p, a kod 19 (20,6%) dodatne kopije hromozoma 1q. Kod 4 (4,34%) bolesnika bila je prisutna hiperdiploidija +1q.

U ovoj grupi bolesnika povoljan terapijski odgovor (\geq PR) postignut je kod 51,9% bolesnika. U eri savremene terapije očekuje se povoljan terapijski odgovor kod oko 90% bolesnika, što ukazuje na negativan prognostički značaj abnormalnosti hromozoma 1 u multiplom mijelomu. Bolesnici sa abnormalnostima hromozoma 1 su se karakterisali kraćim trajanjem remisije na granici statističke značajnosti i jasno kraćim preživljavanjem u odnosu na bolesnike bez ovih abnormalnosti



Breslow 2,449, p 0,114



Breslow 5,834, p 0,016

Analizirajući izolovano bolesnike sa del1p21, ova razlika u dužini remisije i ukupnom preživljavanju nije utvrđena, što se pre svega može objasniti malim brojem bolesnika – cele grupe, ali pre svega dvostruko manjoj zastupljenosti u odnosu na bolesnika sa dodatnim kopijama hromozoma 1q21 koji su se karakterisali kraćim trajanjem remisije i ukupnog preživljavanja, na granici statističke značajnosti. Abnormalnosti hromozoma 1 su od značaja za postizanje terapijskog odgovora, njegovo trajanje i ukupno preživljavanje

Svi pacijenti su lečeni trojnim hemioterapijskim kombinacijama, sa alkilirajućim agensima (melfalan ili ciklofosamid) i kortikosteroidima (deksametazon ili pronison). Hemioterapijski režimi sa talidomidom primenjeni su kod 77 (83,7%) bolesnika, a kod 15 (16,3%) su primenjeni hemioterapijski režimi sa bortezomibom (tabela 6).

Pacijenti nisu bili podobni za primenu visokodozne hemioterapije i autologe transplantacije matične ćelije hematopoeze zbog godina života, visokog komorbiditetnog indeksa, progresivne bolesti ili ličnih razloga.

Tabela 6. Struktura bolesnika prema tipu hemioterapije (HT)

Tip HT protokola	Broj	Procenat
Sa talidomidom	77	83,7
Sa bortezomibom	15	16,3
Ukupno	92	100,0

Povoljan terapijski odgovor, koji podrazumeva kompletnu remisiju (CR), vrlo dobru parcijalnu remisiju (VGPR) i parcijalnu remisiju, postiglo je 77 (83,7%) bolesnika, a minimalan terapijski odgovor (MR) i progresivna bolest (PD) zabeleženi su kod 15 (16,3%) bolesnika.

U grupi od 77 bolesnika koji su lečeni HT sa talidomidom, povoljan terapijski odgovor postiglo je 65 (84,5%) bolesnika, a u grupi od 15 bolesnika koji su lečeni HT sa bortezomibom, povoljan terapijski odgovor postiglo je 12 bolesnika (tabela 7).

4.4. Medijana ekspresije CRBN gena

Medijana ekspresije cereblona (CRBN) kod bolesnika sa MM je iznosila $2,22 \pm 2,52$ (raspon 0,00-14,40), što je značajno više u odnosu na zdravu kontrolu (medijana 1,04, $\pm 0,93$; raspon 0,3-2,90, $P=0,013$).

Medijana ekspresije CRBN za pacijente sa CR, VGPR, PR, MR i PD je iznosila istim redosledom 3,13, 2,60, 2,14, 2,02 i 1,08. Odgovarajuća ekspresija CRBN u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom i koji su postigli povoljan terapijski odgovor (CR, VGPR, PR, MR i PD) je iznosila 3,13, 2,65, 2,08, 1,85 i 0,97, a u grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom 2,63, 3,00, 3,04 i 1,35 (tabela 7).

Tabela 7. Struktura bolesnika prema tipu terapijskog odgovora i medijana ekspresije CRBN u zavisnosti od načina lečenja

Terapijski odgovor	Cela grupa ispitanika	Medijana ekspresije CRBN (raspon)	Talidomidom lečena grupa	Medijana ekspresije CRBN (raspon)	Bortez. lečena grupa	Medijana ekspresije CRBN (raspon)
CR	14 (15,2%)	3,13 (0,36-11,30)	11 (14,3%)	3,13 (0,36-11,30)	3 (20%)	2,63 (1,10-3,20)
VGPR	31 (33,7%)	2,60 (0,20-14,40)	26 (11,7%)	2,65 (0,20-14,40)	5 (33,3%)	3,00 (1,16-3,50)
PR	32 (34,8%)	2,14 (0,14-21,90)	28 (36,4%)	2,08 (0,14-21,90)	4 (26,7%)	3,04 (1,86-6,80)
MR	10 (10,9%)	2,02 (0,20-5,30)	9 (11,7%)	1,85 (0,20-4,60)	1 (6,7%)	
PD	5 (5,4%)	1,08 (0,83-1,40)	3 (3,9%)	0,97 (0,83-1,08)	2 (13,3%)	1,35 (1,30-1,40)

Diskriminativna *cutoff* vrednost za ekspresiju CRBN je bila 1,4. Niska ekspresija CRBN ($\leq 1,4$) bila je prisutna kod 23 (25%) od ukupno 92 bolesnika, odnosno kod 19 (24,7%) od 77 bolesnika koji su lečeni talidomidom i kod 4 (26,7%) od 15 bolesnika koji su lečeni bortezomibom. Korelacija izmedju visoke ekspresije CRBN i povoljnog terapijskog odgovora bila je prisutna u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, dok u grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom nije uočena. Prisutvo visokorizičnih abnormalnosti u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom nije bila povezana sa nižom ekspresijom CRBN.

4.5. Analiza nivoa ekspresije MDR1 i LRP

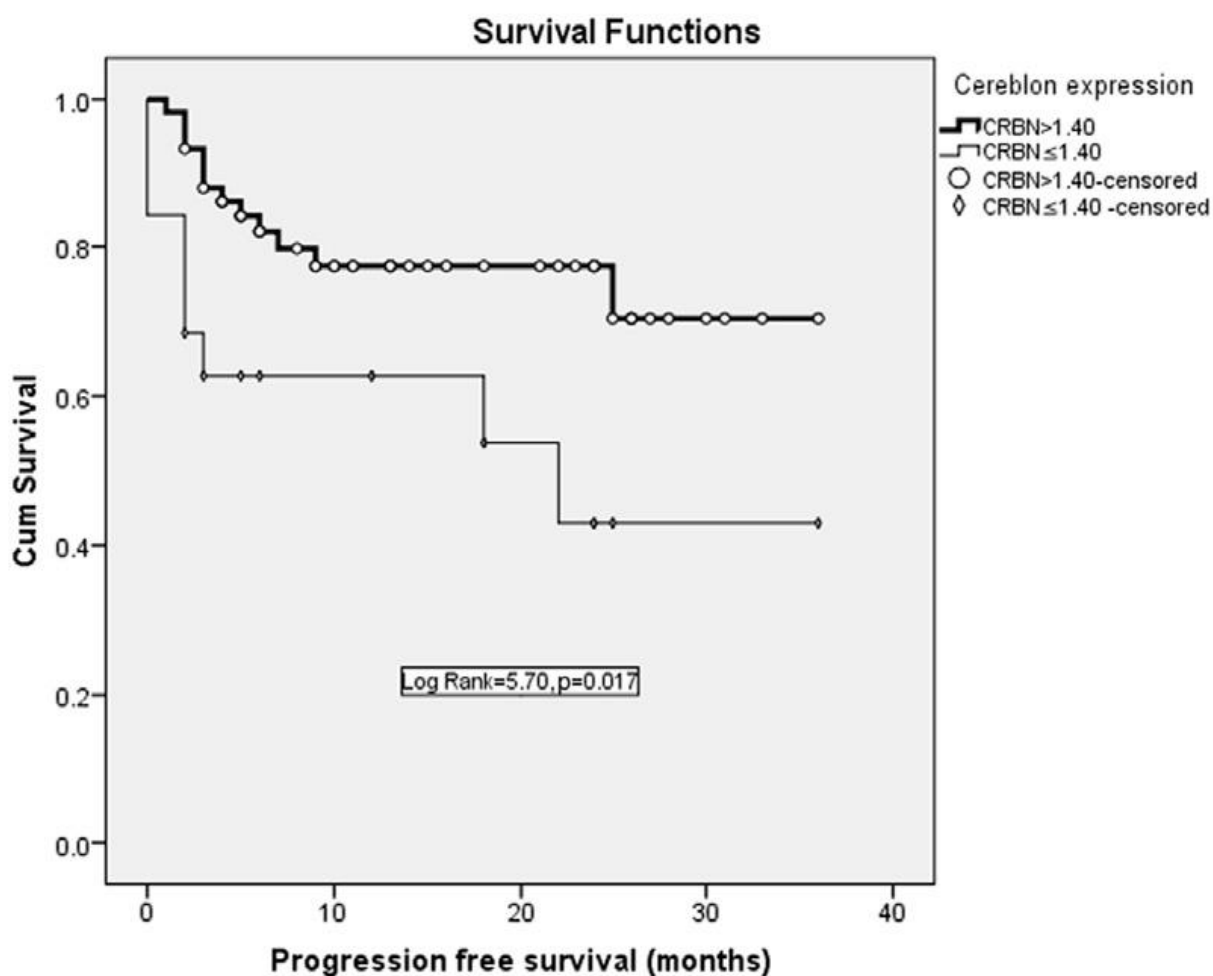
Analiza nivoa ekspresije RQ_MDR1 pokazala je da je njena vrednost bila niža kod bolesnika koji su reagovali na lečenje 252.1 ± 46.2 u odnosu na one koji su umrli $493.8 \pm 168.$, ali T testom nije postignuta statistička značajnost ($p=0,233$). Slični rezultati su dobijeni i kod RQ_LRP 181.9 ± 31.5 prema 242.5 ± 33.8 , takođe bez postizanja statističke značajnosti ($p=0,213$).

4.6. Analiza preživljavanja

Medijana praćenja ispitivane grupe bolesnika iznosila je 27 meseci (kretala se u rasponu od 4 do 42 meseca). Koristeći Kaplan-Meier analizu preživljavanja analizirali smo i potvrdili prognostički značaj ISS skora i povišene vrednosti LDH na PFS (log-rank =4.19, P = .041; i log-rank = 12.23, P = .001) i OS (log-rank = 4.34, P = .04; i log-rank = 13.34, P = .001).

Bolesnici sa visokorizičnim CA su imali lošiji PFS (log-rank = 4.94, P= .026) i OS (log-rank=5.08, P= .024), u poređenju sa onima kod kojih nije dokazano prisustvo visokorizičnih CA.

Razlika u PFS je bila značajna za pacijente sa ekspresijom CRBN $\leq 1,4$ a koji su bili lečeni talidomidom, u odnosu na one koji su imali ekspresiju CRBN $>1,4$ (medijana 22 meseca, vs nije dostignuta; log-rank =5,70, P=0,017). U ovoj grupi niska ekspresija CRBN nije bila povezana sa lošijim OS (medijana 37 meseci vs nije dostignuta; log-rank =2,93, P=0,087).



U grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom, nije utvrđen značaj ekspresije CRBN na PFS i OS.

Sve varijable (ISS, LDH, CRBN, CA) koje su bile značajne u univarijantnoj analizi za PFS u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, uključene su u multivarijantnu analizu. Analiza je pokazala da su nivo ekspresije CRBN i vrednost LDH imale najveći prognostički značaj na PFS.

DISKUSIJA

5. Diskusija

Multipli mijelom je i pored svih napredaka u lečenju za većinu obolelih neizlečiva bolest. Karakteriše se kaskadnim tokom recidiva i remisija bolesti, kao rezultat genske nestabilnosti, odnosno varijabilne predominacije različitih klonova u svakom sledećem zamahu bolesti.

Multipli mijelom je bolest zrelih B limfoplazmocita i kao takva odlikuje se niskim mitotskim indeksom i često lošim prinosom malignih ćelija u aspiratu koštane srži, što otežava citogenetsku analizu (57).

Revolucionarni napredak u prognostičkoj stratifikaciji bolesnika sa multiplim mijelomom napravljen je uvođenjem interfazne fluorescentne in-situ hibridizacije (iFISH) u rutinsku kliničku praksu pri dijagnostikovanju ove grupe obolelih.

Zahvaljujući ovoj metodi ustanovljeno je da se kod najmanje 90% bolesnika sa multiplim mijelomom detektuju određene citogenetske aberacije (58).

FISH analiza hromozomskih abnormalnosti primenom standardnog panela proba predstavlja zlatni standard u određivanju prognostičkog profila bolesnika sa multiplim mijelomom.

Multipli mijelom je genetički kompleksna i heterogena bolest. Savremene metode molekularne biologije- NGS (**next generation sequencing**) pružaju uvid u biologiju bolesti, uključujući i intraklonsku heterogenost. Imunomodulatorni lekovi nove generacije i inhibitori proteazoma su značajno unapredili ishod lečenja. Od 2015. godine nova monoklonska antitela daratumumab i elotuzumab, odobreni su za lečenje relapsirajuće i/ili refraktarne forme multiplog mijeloma. Venetoclax, selektivni bcl-2 inhibitor se ispituje u lečenju relapsirajuće/refraktarne forme multiplog mijeloma sa translokacijom t(11;14) i visokom ekspresijom bcl-2. To ukazuje da će personalizovana medicina i lečenje čiji je krajnji cilj izlečenje, biti realnost u budućnosti (59).

Savremena ispitivanja genoma bolesnika sa multiplim mijelomom su unapredila znanje o patofiziologije ove bolesti, dovela do formiranja molekularne klasifikacije i označila nove terapijske mete delovanja, sa ciljem da se prevaziđe rezistencija na standardnu hemioterapiju i unapredi krajnji ishod u lečenju, a to je što veća redukcija tumorske mase, produženje trajanja remisije i ukupnog preživljavanja obolelih (59).

Kao posledica savremenih ispitivanja kreiraju se novi lekovi, koji deluju kako na malignu ćeliju, tako i na mikrosredinu koštane srži koja omogućava rast i opstanak malignih mijelomskih ćelija.

Naime, mijelomske ćelije u koštanoj srži se vezuju za adhezione molekule na proteinima ekstracelularnog matriksa i stromalnih ćelija koštane srži. Ovo lokalizuje tumorske ćelije u mikrosredini koštane srži i pruža im otpornost na lekove posredovano ćelijskom adhezijom. Citokini kao što su interleukin-6 (IL-6), insulin-like faktor rasta 1 (IGF1), faktor nekroze tumora- α (TNF- α) i faktor-1 α (SDF-1 α) iz stromalnih ćelija, posreduju u rastu, preživljavanju i migraciji malignih ćelija i posle primenjenog lečenja i time doprinose razvoju otpornosti na lekove.

Novi biološki zasnovani tretmani (imunomodulatorni lekovi, inhibitori proteazoma) ne deluju samo na malignu mijelomsku ćeliju, već i na interakciju između mijelomskih ćelija i mikrosredine koštane srži i na taj način mogu prevladati konvencionalnu otpornost na lekove (59,60,61).

Određivanje faktora rizika u multiplom mijelomu ima za cilj da se što ranije izdvoji visokorizična grupa bolesnika, koja čini oko jedne četvrtine obolelih i karakteriše se izostankom povoljnog terapijskog odgovora na visokodoznu hemioterapiju praćenu autologom transplantacijom matične ćelije hematopoeze.

Visokorizični bolesnici sa multiplim mijelomom imaju nepovoljne citogenetske abnormalnosti (t(4;14)/t(14;16)/t(14;20)/del 17p) udružene sa povišenom vrednošću LDH i/ili beta2mikrogloblina. Kod ove grupe bolesnika treba što ranije u lečenje uvesti nove terapijske modalitete (10, 61,62,63,64).

Međutim, treba napomenuti da se definicija bolesti standardnog rizika nasuprot bolesti visokog rizika menja sa napretkom u razvoju terapijskih modaliteta. Istraživanja su pokazala da bortezomib može da prevaziđe negativan prognostički potencijal translokacije t(4;14) (65). Pomalidomid i monoklonska antitela- elotuzumab i daratumumab mogu da daju dobar terapijski odgovor i kod bolesnika sa del17p (66). U progresiji multiplog mijeloma, većina bolesnika stiče visokorizične citogenetske abnormalnosti kao posledica evolucije i/ili ekspanzije rezistentnih klonova. Ove promene su vezane kako za genomske promene maligne ćelije, tako i za uticaj mikrosredine tumora i prethodnog načina lečenja. Kombinovanjem lekova koji imaju drugačiji mehanizam delovanja, na primer inhibitora proteazoma sa imunomodulatornim lekovima, inhibitora proteazoma sa inhibitorom histon deacetylaze- panobinostat, imunomodulatornih lekova sa monoklonskim antitelima može da se prevaziđe agresivnost u ispoljavanju bolesti i postigne povoljan i dugotrajan terapijski efekat (67,68,69,70,71,72,73,74).

Imunološka terapija u cilju prevazilaženja rezistencije na lekove u multiplom mijelomu podrazumeva primenu imunomodulatornih lekova, monoklonskih antitela, *checkpoint* inhibitora, inhibitora histon deacetilaze, vakcina i ćelijske terapije (75).

Imunomodulatorni lekovi direktno aktiviraju ćelijsku apoptozu, sprečavaju adheziju mijelomskih ćelija za koštanu srž, moduliraju citokine, inhibiraju angiogenezu i pojačavaju funkciju T ćelija, NK ćelija i NK-T ćelija (76).

Mijelomske ćelije kao i plazmocitoidne dendritične ćelije, koje pojačavaju rast mijelomskih ćelija i slabe imunološku funkciju domaćina, ekspimiraju PD-L1. *Checkpoint blokada* može da indukuje specifičnu CD4 i CD8 citolitičku T ćelijsku i NK ćelijsku citotoksičnost i tako spreči rast mijelomskih ćelija u koštanoj srži.

U pretkliničkim studijama HDAC6 inhibitor može da pojačava autologu mijelomsku citotoksičnost (77,78).

Primena vakcina u lečenju MM, koje su usmerene na multiple tumorske antigene na mijelomskim ćelijama ima za cilj da blokira progresiju smoldering multiplog mijeloma u aktivnu bolest. Kombinacija vakcina, *checkpoint* inhibitora i HDAC6 inhibitora može da unapredi efektorsku i memorijsku T ćelijsku funkciju i pojača anti-mijelomski imunitet (79). Himerični antigen receptor (CAR) T ćelija pokazuje značajnu pretkliničku aktivnost i daje pozitivno rano kliničko obećanje (80).

Rezultat savremenih ispitivanja u multiplom mijelomu je doveo do produženja medijane preživljavanja bolesnika sa multiplim mijelomom. Definicija bolesnika koji bi mogli imati benefit od intenzivnog savremenog lečenja je proširena. Indukciono lečenje bolesnika koji su podobni za autologu transplantaciju podrazumeva trojne kombinacije lekova, uključujući novu generaciju imunomodulatornih lekova (Lenalidomid). Trojne kombinacije se savetuje i bolesnicima koji nisu podobni za transplantaciju. Procena terapijskog odgovora danas podrazumeva praćenje minimalne rezidualne bolesti, primenom metode multikolorne protočne citometrije u koštanoj srži, sekvencioniranjem i imidžingom ekstramedularne bolesti. Prolongirana terapija održavanja Lenalidomidom do progresije može da produži PFS i OS bolesnika standardnog rizika, uz dodatak inhibitora proteazoma kod bolesnika visokog rizika. Dostupnost sekundarne generacije inhibitora proteazoma, nove generacije imunomodulatornih lekova, monoklonskih antitela, inhibitora histon deacetilaze omogućava efektivne kombinacije u lečenju relapsa odnosno refraktarne forme bolesti.

U našoj studiji kod 92 novootkrivena bolesnika sa multiplim mijelomom analizirali smo: pol, starost u momentu postavljanja dijagnoze, tip mijeloma prema vrsti paraproteina, klinički stadijum bolesti, stepen rizika prema ISS, vrednost laktat-dehidrogenaze, prisustvo bubrežne slabosti na prezentaciji, tip hemioterapijskog protokola, prisustvo visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti, prisustvo molekularno-genetičkih abnormalnosti hromozoma 1, vrstu terapijskog odgovora i nivo ekspresije cereblona (CRBN), MDR i LRP.

Od ukupno 92 bolesnika, 48 (52,2%) su činile osobe ženskog pola, a 44 (47,8%) osobe muškog pola. Prosečna starost je iznosila 67 godina, a kretala se u rasponu 35 do 80 godina.

Koristeći Durie-Salmon klasifikaciju, najveći broj bolesnika 68 (73,9%) je bio u III kliničkom stadijumu, 18 (19,6%) u II, a 6 (6,5%) u I kliničkom stadijumu, što odgovara i podacima iz literature.

Prema tipu paraproteina, najveći broj bolesnika je imao IgG mijelom (55, odnosno 59,8%), što takođe odgovara literaturi, IgA 18 (19,6%), mijelom lakih lanaca 16 (17,4%) i IgD mijelom 2 (2,2%) bolesnika.

Primenom Internacionalnog Stejdžing Sistema u MM, bolesnici su podeljeni u tri grupe rizika: 24 (26,1%) u grupu niskog rizika ISS1, 28 (30,4%) u grupu srednjeg rizika ISS2, i 40 (40,3%) u grupu visokog rizika ISS3.

Kod 18 (19,6%) bolesnika nađena je povišena vrednost LDH, a bubrežnu slabost je imalo 16 (17,4%) bolesnika.

Kod 14 (15,2%) bolesnika utvrđeno je prisustvo visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti: t (4;14), t (14;16), del 17p.

Kod 27 (29,3%) bolesnika utvrđeno je prisustvo abnormalnosti hromozoma 1. Kod 8 (8,7%) bolesnika delecija 1p, a kod 19 (20,6%) dodatne kopije hromozoma 1q. Kod 4 (4,34%) bolesnika bila je prisutna hiperdiploidija +1q.

U grupi bolesnika sa abnormalnostima hromozoma 1 povoljan terapijski odgovor (\geq PR) postignut je kod 51,9% bolesnika. U eri savremene terapije očekuje se povoljan terapijski odgovor kod oko 90% bolesnika, što ukazuje na negativan prognostički značaj abnormalnosti hromozoma 1 u multiplom mijelomu. Bolesnici sa abnormalnostima hromozoma 1 su se karakterisali kraćim trajanjem remisije na granici statističke značajnosti i jasno kraćim preživljavanjem u odnosu na bolesnike bez ovih abnormalnosti, što je u skladu sa literaturnim podacima.

Analizirajući izolovano bolesnike sa de 11p21, ova razlika u dužini remisije i ukupnom preživljavanju nije utvrđena, što se pre svega može objasniti malim brojem bolesnika – cele

grupe, ali pre svega dvostruko manjoj zastupljenosti u odnosu na bolesnike sa dodatnim kopijama hromozoma 1q21 koji su se karakterisali kraćim trajanjem remisije i ukupnog preživljavanja, na granici statističke značajnosti.

Na osnovu sprovedenog ispitivanja potvrđeno je da su abnormalnosti hromozoma 1 od značaja za postizanje terapijskog odgovora, njegovo trajanje i ukupno preživljavanje. S obzirom da se dodatne kopije +1q21 izdvajaju kao nezavistan i značajan faktor loše prognoze, posebno kod bolesnika koji se leče primenom protokola koji sadrže bortezomib, ne treba zaboraviti potencijalnu udruženost hromozomskih abnormalnosti utvrđenih primenom standardnog panela FISH proba sa drugim abnormalnostima izvan panela. To u aktuelnom trenutku dovodi u pitanje optimalnosti FISH metode.

Prema tipu hemioterapije koju su primili pacijenti su podeljeni u dve grupe: 77 (83,7%) bolesnika je lečeno primenom HT sa talidomidom, a 15 (16,3%) bolesnika primenom HT sa bortezomibom.

Prema tipu terapijskog odgovora na indukciono lečenje, povoljan terapijski odgovor (CR, VGPR, PR) je postignut kod 77 (83,7%) bolesnika, a minimalan terapijski odgovor (MR) i progresivna bolest (PD) zabeleženi su kod 15 (16,3%) bolesnika. U grupi od 77 bolesnika koji su lečeni HT sa talidomidom, povoljan terapijski odgovor postiglo je 65 (84,5%) bolesnika, a u grupi od 15 bolesnika koji su lečeni HT sa bortezomibom, povoljan terapijski odgovor postiglo je 12 bolesnika.

Medijana ekspresije CRBN kod bolesnika sa MM je iznosila $2,22 \pm 2,52$ (raspon 0,00-14,40), što je značajno više u odnosu na zdravu kontrolu (medijana 1,04, $\pm 0,93$; raspon 0,3-2,90, $P=0,013$).

Medijana ekspresije CRBN za pacijente sa CR, VGPR, PR, MR i PD na nivou cele grupe je iznosila istim redosledom 3,13, 2,60, 2,14, 2,02 i 1,08. Odgovarajuća medijana ekspresije CRBN u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom (CR, VGPR, PR, MR i PD) je iznosila 3,13, 2,65, 2,08, 1,85 i 0,97, a u grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom 2,63, 3,00, 3,04 i 1,35.

Niska ekspresija CRBN (cut off vrednost $\leq 1,4$) bile je prisutna kod 23 (25%) od ukupno 92 bolesnika, odnosno kod 19 (24,7%) od 77 bolesnika koji su lečeni talidomidom i kod 4 (26,7%) od 15 bolesnika koji su lečeni bortezomibom. Što se tiče ishoda lečenja i ekspresije CRBN u našoj studiji, pacijenti bez odgovora na lečenje češće su imali nizak nivo ekspresije CRBN i pretežno su bili pacijenti tretirani kombinacijama zasnovanim na talidomidu. U grupi koja je tretirana bortezomibom, kao što se očekivalo, nije bilo korelacije između nivoa

ekspresije CRBN i odgovora na terapiju, PFS i OS. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima iz literature (44, 48).

Korelacija između visoke ekspresije CRBN i povoljnog terapijskog odgovora bila je prisutna u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, što je u skladu sa podacima iz literature, te visoka ekspresija CRBN može da posluži kao surogat marker za bolest niskog rizika, dok u grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom nije uočena, najverovatnije zbog malog broja bolesnika koji je lečen na ovaj način. Niska ekspresija CRBN može da predstavlja prediktivni faktor za rezistenciju na imunomodulatorne lekove.

U eri novih terapijskih modaliteta, postoji potreba da se lečenje individualizuje kako bi se postigao što bolji rezultat. S obzirom na jasnu korelaciju između niske ekspresije CRBN i značajno lošijeg PFS posle terapije bazirane na Talidomidu, inicijalno lečenje te grupe bolesnika trebalo bi da uključi intenzivnije terapijske režime sa inhibitorima proteazoma. U tom svetlu, treba razmotriti određivanje nivoa ekspresije CRBN na prezentaciji kako bi se izdvojila grupa bolesnika sa niskom ekspresijom CRBN koja bi se lečila indukcinom terapijom baziranom na inhibitorima proteazoma.

Analiza nivoa ekspresije RQ_MDR1 pokazala je da je njena vrednost bila niža kod bolesnika koji su reagovali na lečenje 252.1 ± 46.2 u odnosu na one koji su umrli $493.8 \pm 168.$, ali T testom nije postignuta statistička značajnost ($p=0,233$). Slični rezultati su dobijeni i kod RQ_LRP 181.9 ± 31.5 prema 242.5 ± 33.8 , takođe bez postizanja statističke značajnosti ($p=0,213$).

Prisutvo visokorizičnih abnormalnosti u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom nije bila povezana sa nižom ekspresijom CRBN.

Medijana praćenja ispitivane grupe bolesnika iznosila je 27 meseci (kretala se u rasponu od 4 do 42 meseca).

Koristeći Kaplan-Meier analizu preživljavanja potvrdili smo prognostički značaj ISS skora i povišene vrednosti LDH na PFS (log-rank = 4.19, $P = .041$; i log-rank = 12.23, $P = .001$) i OS (log-rank = 4.34, $P = .04$; i log-rank = 13.34, $P = .001$).

Bolesnici sa visokorizičnim CA su imali lošiji PFS (log-rank = 4.94, $P = .026$) i OS (log-rank=5.08, $P = .024$), u poređenju sa onima kod kojih nije dokazano prisustvo visokorizičnih CA.

Razlika u PFS je bila značajna za pacijente sa ekspresijom CRBN $\leq 1,4$ a koji su bili lečeni talidomidom, u odnosu na one koji su imali ekspresiju CRBN $> 1,4$ (medijana 22 meseca, vs nije dostignuta; log-rank = 5,70, $P = 0,017$). U ovoj grupi niska ekspresija CRBN nije bila povezana sa lošijim OS (medijana 37 meseci vs nije dostignuta; log-rank = 2,93, $P = 0,087$).

U grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom, nije utvrđen značaj ekspresije CRBN na PFS i OS.

Varijable koje su bile značajne u univarijantnoj analizi za PFS u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, a to su ISS, LDH, CRBN, CA, uključene su u multivarijantnu analizu. Analiza je pokazala da su nivo ekspresije CRBN i vrednost LDH imale najveći prognostički značaj na PFS. Povišena vrednost laktat-dehidrogenaze u multiplom mijelomu se vezuje za veliku tumorsku masu, recidiv bolesti ili postojanje ekstramedularne bolesti i vezuje se za agresivan klinički tok i kraće preživljavanje (8,64).

ZAKLJUČAK

6. Zaključak

1. Metodama deskriptivne statistike sagledana su obeležja od značaja za ispitanike sa dijagnozom multiplog mijeloma: pol, starost u momentu postavljanja dijagnoze, klinički stadijum bolesti, tip paraproteina, prisustvo bubrežne slabosti. Rezultati su bili u skladu sa literaturnim.
2. U skladu sa postavljanim ciljevima rada metodom interfazne in situ hibridizacije (iFISH) kod bolesnika je utvrđivano prisustvo visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti (CA) del17p, t(4;14), t(14;16), kao i vrednost laktat dehidrogenaze u biohemijским analizama i na osnovu toga bila je vršena distribucija bolesnika u odgovarajuće grupe rizika i praćen je odgovor na primenjenu terapiju i dužina preživljavanja.
3. Kod 14 (15,2%) bolesnika utvrđeno je prisustvo visokorizičnih citogenetskih abnormalnosti: t (4;14), t (14;16), del 17p. Kod 18 (19,6%) bolesnika nađena je povišena vrednost LDH. Bolesnici sa visokorizičnim citogenetskim abnormalnostima su imali lošiji PFS (log-rank = 4.94, P= .026) i ukupno preživljavanje (OS) (log-rank=5.08, P= .024), u poređenju sa onima kod kojih nije dokazano prisustvo visokorizičnih CA.
4. Istom metodom (iFISH) utvrđivano je i prisustvo molekularno-genetičkih abnormalnosti hromozoma 1 kod naših ispitanika i ispitivan je njihov prognostički značaj.
5. Kod 27 (29,3%) bolesnika utvrđeno je prisustvo abnormalnosti hromozoma 1. Kod 8 (8,7%) bolesnika delecija 1p, a kod 19 (20,6%) dodatne kopije hromozoma 1q. Kod 4 (4,34%) bolesnika bila je prisutna hiperdiploidija +1q. U ovoj grupi bolesnika povoljan terapijski odgovor (\geq PR) postignut je kod 51,9% bolesnika. Bolesnici sa abnormalnostima hromozoma 1 su se karakterisali kraćim trajanjem remisije na granici statističke značajnosti i jasno kraćim preživljavanjem u odnosu na bolesnike bez ovih abnormalnosti
6. Analizirajući izolovano bolesnike sa del1p21, ova razlika u dužini remisije i ukupnom preživljavanju nije utvrđena, što se pre svega može objasniti malim brojem bolesnika –

cele grupe. Abnormalnosti hromozoma 1 su od značaja za postizanje terapijskog odgovora, njegovo trajanje i ukupno preživljavanje.

7. „Real-time“ PCR metodom određivana je ekspresija CRBN, MDR i LRP kod naših ispitanika i praćen je njen značaj na tip terapijskog odgovora, dužinu trajanja remisije i ukupno preživljavanje.
8. Medijana ekspresije CRBN kod bolesnika sa MM je iznosila $2,22 \pm 2,52$ (raspon 0,00-14,40), što je značajno više u odnosu na zdravu kontrolu (medijana 1,04, $\pm 0,93$; raspon 0,3-2,90, $P=0,013$). Korelacija između visoke ekspresije CRBN i povoljnog terapijskog odgovora bila je prisutna u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, što je u skladu sa podacima iz literature, te visoka ekspresija CRBN može da posluži kao surogat marker za bolest niskog rizika, dok u grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom nije uočena, najverovatnije zbog malog broja bolesnika koji je lečen na ovaj način. Niska ekspresija CRBN može da predstavlja prediktivni faktor za rezistenciju na imunomodulatorne lekove.
9. Analiza nivoa ekspresije RQ_MDR1 pokazala je da je njena vrednost bila niža kod bolesnika koji su reagovali na lečenje 252.1 ± 46.2 u odnosu na one koji su umrli $493.8 \pm 168.$, ali T testom nije postignuta statistička značajnost ($p=0,233$). Slični rezultati su dobijeni i kod RQ_LRP 181.9 ± 31.5 prema 242.5 ± 33.8 , takodje bez postizanja statističke značajnosti ($p=0,213$).
10. Prisutvo visokorizičnih abnormalnosti u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom nije bila povezana sa nižom ekspresijom CRBN.
11. U grupi bolesnika koji su lečeni bortezomibom, nije utvrđen značaj ekspresije CRBN na PFS i OS.
12. Varijable koje su bile značajne u univarijantnoj analizi za PFS u grupi bolesnika koji su lečeni talidomidom, a to su ISS, LDH, CRBN, CA, uključene su u multivarijantnu analizu. Analiza je pokazala da su nivo ekspresije CRBN i vrednost LDH imale najveći prognostički značaj na PFS.

LITERATURA

7. Literatura

1. Hoffbrand, A. V., Pettit, J. E.: Essential Haematology, third ed., Blackwel Scientific Publications, 272-285, 1993.
2. P. Moreau, J. San Miguel, P. Sonneveld, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 28 (Supplement 4): iv52–iv61, 2017.
3. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; 15: e538–e548.
4. Rajkumar SV. Updated diagnostic criteria and staging system for multiple myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2016; 35: e418–e423.
5. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3412–3420.
6. Durie G.M. et al. Prognostic value of pretreatment serum Beta2 microglobulin in myeloma: A Southwest Oncology Group study. *Blood* 4, 823-830, 1990.
7. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood* 2016; 127: 2955–2962.
8. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015; 33: 2863–2869.
9. Barlogie B. et al. High serum level of lactic dehydrogenase identify a high grade lymphoma-like myeloma. *Ann Intern Med* 110, 521-525, 1989.
10. Moreau P, Attal M, Facon T. Frontline therapy of multiple myeloma. *Blood* 2015; 125: 3076–3084.
11. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C et al. Autologous transplantation for multiple myeloma in the era of new drugs: a phase III study of the Intergroupe Francophone du Myelome (IFM/DFCI 2009 trial). *Blood* 2015; 126: abstr. 391.
12. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B et al. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/GMMGHD4 trial. *J Clin Oncol* 2012; 30: 2946–2955.

13. Palumbo A, Bringhen S, Larocca A et al. Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: updated follow-up and improved survival. *J Clin Oncol* 2014; 32: 634–640.
14. Mateos MV, Oriol A, Martinez-Lopez J et al. Maintenance therapy with bortezomib plus thalidomide or bortezomib plus prednisone in elderly multiple myeloma patients included in the GEM2005MAS65 trial. *Blood* 2012; 120: 2581–2588.
15. Attal M, Palumbo A, Holstein SA et al. Lenalidomide maintenance after high-dose melphalan and autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma: a meta-analysis of overall survival. *J Clin Oncol* 2016;34(Suppl): abstr. 8001.
16. Usmani SZ, Crowley J, Hoering A et al. Improvement in long-term outcomes with successive Total Therapy trials for multiple myeloma: are patients now being cured? *Leukemia* 2013; 27: 226–232.
17. Fonseca R, Blood E, Rue M, et al.: Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 101 (11): 4569-75, 2003.
18. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S *et al.* The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006; 108: 2020–2028.
19. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C *et al.* Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 2007; 109: 3489–3495.
20. Fonseca R, Van Wier SA, Chng WJ, Ketterling R, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia*. 2006;20(11):2034–40.
21. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, Zhan F, Santra M, Sawyer JR, et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*. 2006;108(5):1724–32.
22. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutierrez NC, Liebisch P, O'Connor S, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2012;97(8):1272–7.
23. Neben K, Jauch A, Bertsch U, Heiss C, Hielscher T, Seckinger A, et al. Combining information regarding chromosomal aberrations t(4;14) and del(17p13) with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients

- undergoing autologous stem cell transplantation. *Haematologica*. 2010;95(7):1150–7.
24. Neben K, Lokhorst HM, Jauch A, Bertsch U, Hielscher T, van der Holt B, et al. Administration of bortezomib before and after autologous stem cell transplantation improves outcome in multiple myeloma patients with deletion 17p. *Blood*. 2012;119(4):940–8.
 25. Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*. 1998;92:3025–3034.
 26. Fonseca R. et al. The t(4;14) (p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 98, 4, p.1271, 2001.
 27. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, Moreau P, Guerin-Charbonnel C, Caillot D, et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *J Clin Oncol*. 2010;28(30):4630–4.
 28. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, Taylor BJ, Larratt LM, Mant MJ *et al*. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003; 101: 1520–1529.
 29. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al.: Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 106 (8): 2837-40, 2005.
 30. Abdi J, Chen G, Chang H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget*. 2013 Dec;4(12):2186-207.
 31. Kastrinakis N. G. et al. Molecular aspects of multiple myeloma. *Annals of Oncology* 11: 1217-1228, 2000.
 32. Van Riet I. New concepts in the pathogenesis of multiple myeloma. 6th Meeting of the European Haematology Association- Educational Book, 15-18, 2001.
 33. Woodliff E. J. et al. Myeloma cells homing to the bone marrow is directed by CXCR4/SDF-1 interactions. *Blood (Suppl 1)* 96, 550A, 2000.

34. Giuliani N. et al. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 98, 3527-3533, 2001.
35. Rajkumar S. V. et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 6, 3111-3116, 2000.
36. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 26;91(9):4082-5.
37. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood*. 2000 Nov 1;96(9):2943-50.
38. Li S, Pal R, Monaghan SA, Schafer P, Ouyang H, Mapara M, et al. IMiD immunomodulatory compounds block C/EBP β translation through eIF4E down-regulation resulting in inhibition of MM. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5157-65.
39. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4525-30.
40. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*. 2001 Dec;15(12):1950-61.
41. Breitkreutz I, Raab MS, Vallet S, Hideshima T, Raje N, Mitsiades C, et al. Lenalidomide inhibits osteoclastogenesis, survival factors and bone-remodeling markers in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008 Oct;22(10):1925-32.
42. Bolzoni M, Storti P, Bonomini S, Todoerti K, Guasco D, Toscani D, et al. Immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide inhibit multiple myeloma-induced osteoclast formation and the RANKL/OPG ratio in the myeloma microenvironment targeting the expression of adhesion molecules. *Exp Hematol*. 2013 Apr;41(4):387-97.

43. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Kortuem KM, Bruins LA, Schmidt JE, et al. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):536–45.
44. Heintel D, Rocci A, Ludwig H, Bolomsky A, Caltagirone S, Schreder M, et al. High expression of cereblon (CRBN) is associated with improved clinical response in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. *Br J Haematol*. 2013 Jun;161(5):695–700.
45. Schuster SR, Kortuem KM, Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Bruins LA, Schmidt JE, Ahmann G, Kumar S, Rajkumar SV, Mikhael J, Laplant B, Champion MD, Laumann K, Barlogie B, Fonseca R, Bergsagel PL, Lacy M, Stewart AK. The clinical significance of cereblon expression in multiple myeloma. *Leuk Res*. 2014 Jan;38(1):23-28.
46. Zhu YX, Braggio E, Shi CX, Bruins LA, Schmidt JE, Van Wier S *et al*. Cereblon expression is required for the anti-myeloma activity of lenalidomide and pomalidomide. *Blood* 2011; 118: 4771–4779.
47. Huang SY, Lin CW, Lin HH, Yao M, Tang JL, Wu SJ, Chen YC, Lu HY, Hou HA, Chen CY, Chou WC, Tsay W, Chou SJ, Tien HF. Expression of cereblon protein assessed by immunohistochemical staining in myeloma cells is associated with superior response of thalidomide- and lenalidomide-based treatment, but not bortezomib-based treatment, in patients with multiple myeloma.
48. Broyl A, Kuiper R, van Duin M, van der Holt B, el Jarari L, Bertsch U, Zweegman S, Buijs A, Hose D, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Sonneveld P. High cereblon expression is associated with better survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with thalidomide maintenance. *Blood*. 2013 Jan 24;121(4):624-7.
49. Goldie JH & Coldman AJ. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Treatment Reports* 1983; **67**: 923-30.
50. O'Connor R, Ooi MG, Meiller J, Jakubikova J, Klippel S, Delmore J, Richardson P, Anderson K, Clynes M, Mitsiades CS and O'Gorman P. The interaction of bortezomib with multidrug transporters: implications for therapeutic applications in advanced multiple myeloma and other neoplasias. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013; 71(5):1357-1368.

51. Nakagawa Y, Abe S, Kurata M, Hasegawa M, Yamamoto K, Inoue M, Takemura T, Suzuki K, Kitagawa M. IAP family protein expression correlates with poor outcome of multiple myeloma patients in association with chemotherapy-induced overexpression of multidrug resistance genes. *Am J Hematol.* 2006 Nov;81(11):824-31.
52. Jaffe ES, Haris NL, Stein H, Vardiman JW, editors. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer Press; 2001. p.171-174.
53. Chin S-F et al, *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2003;56:275-279.
54. Shi Yu, Solomides C, Gong G, Wang Zi-X, Uppal G, Ly V. Fluorescence *In Situ* Hybridization on Enriched CD138-Positive cells in Plasma Cell Myeloma. *Acta Medica International.* 2015;2(2):168-174.
55. Malgeri U, Baldini L, Perfetti V, Fabris S, Vignarelli MC, Colombo G, Lotti V, Compasso S, Bogni S, Lombardi L, Maiolo AT, Neri A. Detection of t(4;14)(p16.3;q32) chromosomal translocation in multiple myeloma by reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of IGH-MMSET fusion transcripts. *Cancer Res.* 2000 Aug 1;60(15):4058-61.
56. Heintel D, Rocci A, Ludwig H, Bolomsky A, Caltagirone S, Schreder M, Pfeifer S, Gisslinger H, Zojer N, Jäger U, Palumbo A. High expression of cereblon (CRBN) is associated with improved clinical response in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide and dexamethasone. *Br J Haematol.* 2013 Jun;161(5):695-700.
57. Rajkumar S.V. et al. Cytogenetic abnormalities correlate with plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer genet Cytogenet* 113, 73-77, 1999.
58. Debes-Marun C.S. et al. Chromosome abnormalities clustering and implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 17, 427-436, 2003.
59. Hideshima T, Anderson K. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2, 927-937, 2002.
60. Hideshima T, et al. Thalidomide and its analogues overcome drug resistance of human myeloma cells to conventional therapy. *Blood* 96, 2943-2950, 2000.

61. Munshi C.N. Advances in myeloma biology: basis for new therapy. Hematology Education: The education program for the annual Congress of the European Hematology Association 1, 97-101, 2007.
62. Cavo M, Palumbo A, Zweegman S et al. Upfront autologous stem cell transplantation (ASCT) versus novel agent-based therapy for multiple myeloma (MM): a randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95MMtrial). J Clin Oncol 2016; 34 (Suppl): abstr. 8000.
63. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2014 update on diagnosis, risk stratification, and management. Am J Hematol 2014; 89: 999–1009.
64. Terpos E, Katodritou E, Roussou M, Pouli A, Michalis E, Delimopasi S, Parcharidou A, Kartasis Z, Zomas A, Symeonidis A, Viniou NA, Anagnostopoulos N, Economopoulos T, Zervas K, Dimopoulos MA. High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international myeloma staging system even in the era of novel agents. Eur J Haematol. 2010;85:114–119.
65. Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the international myeloma working group. Blood 2016;127:2955–62.
66. Richardson P, Siegel D, Vij R, Hofmeister CC, Baz R, Jagannath S, et al. Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. Blood 2014;123:1826–32.
67. Richardson PG, Weller E, Lonial S, Jakubowiak AJ, Jagannath S, Raje NS, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. Blood 2010;116:679–86.
68. Richardson P, Weller E, Jagannath S, Avigan DE, Alsina M, Schlossman RL, et al. Multicenter, phase 1, dose escalation trial of lenalidomide plus bortezomib for relapsed and relapsed, refractory multiple myeloma. J Clin Oncol 2009;27:5713–19.
69. Richardson PG, Xie W, Jagannath S, Jakubowiak A, Lonial S, Raje NS, et al. Phase II trial of lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone in patients with relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma. Blood 2014;123:1461–9.
70. SanMiguel JF, Hungria VT, Yoon SS, Beksac M, Dimopoulos MA, Elghandour A, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory

- multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;**15**:1195–206.
71. Dimopoulos M, Jagannath S, Yoon S-Y, Siegel DX, Lonial S, Qi J, et al. Vantage 088: an international, multicenter, randomized double-blind study of vorinostat (MK-0683) or placebo in combination with bortezomib in patients with multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2016;**16**:329–34.
 72. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, et al. Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015;**373**:621–31.
 73. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, Nahi H, Gimsing P, Hansson M, et al. Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015;**373**:1207–19.
 74. Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, Singhal S, Chari A, Bahlis NJ, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label randomised, phase 2 trial. *Lancet* 2016;**387**:1551–60.
 75. Kumar SK, Anderson K. Immune therapies in myeloma. *Clin Cancer Res* 2016;**22**:5453–60.
 76. Davies FE, Raje N, Hideshima T, Lentzsch S, Young G, Tai YT, et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 2001;**98**:210–6.
 77. Gorgun G, Calabrese E, Soydan E, Hideshima T, Perrone G, Bandi M, et al. Immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide on interaction of tumor and bone marrow accessory cells in multiple myeloma. *Blood* 2010;**116**:3227–37.
 78. Gorgun G, Samur MK, Cowens KB, Paula S, Bianchi G, Anderson JE, et al. Lenalidomide enhances immune checkpoint blockade induced immune response in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2015;**21**:4607–18.
 79. Rosenblatt J, Avivi I, Vasir B, Uhl L, Munshi NC, Katz T, et al. Vaccination with dendritic cell/tumor fusions following autologous stem cell transplant induces immunologic and clinical responses in multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res* 2013;**19**:3640–8.

80. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell-maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood* 2016;128:1688–700.

Biografija

Aleksandra Sretenović, rođena 19.02.1977. godine u Kruševcu, pohađala je osnovu školu u Beogradu i Četvrtu beogradsku gimnaziju kao odličan đak.

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1995. godine i diplomirala na istom fakultetu u decembru 2001. godine sa prosečnom ocenom 9,69.

Obavezan lekarski staž obavila je u Kliničkom centru Srbije u periodu od januara 2002. do decembra 2002. godine i položila stručni ispit u januaru 2003. godine.

Od januara 2003. godine do oktobra 2006. radila je volonterski na Klinici za hematologiju KCS, a od oktobra 2006. godine zaposlena je na Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije na neodređeno vreme.

Magistarsku tezu pod nazivom „Značaj utvrđivanja PML/RAR alfa gena u proceni remisije i njegova uloga u predviđanju relapsa akutne promijelocitne leukemije“ odbranila je u julu 2010. godine.

U januaru 2014. godine položila je specijalistički ispit iz oblasti interne medicine, a u januaru 2017. usmeni deo subspecijalističkog ispita iz hematologije.

2016. godine prijavljuje na Medicinskom fakultetu u Beogradu, temu za izradu doktorske disertacije pod nazivom „Molekularno-genetički mehanizmi rezistencije u prognozi bolesnika sa multiplim mijelomom“, čiji je mentor prof. dr Jelena Bila.

Uz obavljanje redovnih poslova odeljenskog lekara u Klinici za hematologiju KCS, imala je prezentacije na nacionalnim hematološkim skupovima, bila je učesnik na EHA sa e-posterom u Beču 2015. godine, učestvovala je na III internacionalnoj konferenciji o multiplom mijelomu 2017. godine u Milanu, gde sam na osnovu prihvaćenog rada i postera dobila grant. Kao autor i koautor objavila je do sada 13 radova na SCI listi.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a dr Aleksandra Sretenović

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Molekularno-genetički mehanizmi rezistencije u prognozi bolesnika sa multiplim mijelomom“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, __17.07.2018.____

gp Aleksandra Sretenović

Dr Aleksandra Sretenović

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora _____Aleksandra Sretenović_____

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada "Molekularno-genetički mehanizmi rezistencije u prognozi bolesnika sa multiplim mijelomom"

Mentor Prof. dr Jelena Bila

Potpisani _____dr Aleksandra Sretenović_____

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____17.07.2018._____

dr Aleksandra Sretenović
dr Aleksandra Sretenović

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

“Molekularno-genetički mehanizmi rezistencije u prognozi bolesnika sa multiplim mijelomom”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, ____ 17.07.2018. _____

Dr Aleksandra Sretenović
Dr Aleksandra Sretenović

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.