Prognostičko značenje izraženosti Fas, FasL i c-FLIP u klasičnom Hodgkinovom limfomu

Prka, Željko

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:648663

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Željko Prka

Prognostičko značenje izraženosti Fas, FasL i c-FLIP u klasičnom Hodgkinovom limfomu

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Željko Prka

Prognostičko značenje izraženosti Fas, FasL i c-FLIP u klasičnom Hodgkinovom limfomu

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Zavodu za hematologiju i u Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu.

Mentor: prof. dr. sc. Vlatko Pejša, dr.med.

Ko-mentor: prim.dr.sc. Čedna Tomasović – Lončarić, dr.med., znanstveni suradnik

ZAHVALE

Posebno se zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Vlatku Pejši, dr. med. na velikoj podršci, motivaciji i pruženom povjerenju, kako u izradi ovog rada tako i tijekom cijele dosadašnje karijere.

Također, veliku zahvalnost dugujem i ko-mentorici prim.dr.sc. Čedni Tomasović-Lončarić, dr.med., na pomoći i savjetima tijekom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se pokojnom prof.dr.sc. Mladenu Petrovečkom, prof.dr.sc. Željku Romiću, prof.dr.sc. Igoru Aureru, prof.dr.sc. Slobodanki Ostojić-Kolonić, prof.dr.sc. Slavku Gašparovu, dr.med. Marku Lucijaniću, dr.med. Tamari Vasilj te osoblju Zavoda za hematologiju, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku i Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju na prijateljskim savjetima, stručnoj i znanstvenoj pomoći prilikom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se i svojim roditeljima, Anti i Ankici, što su mi kroz život uvijek bili bezuvjetna podrška i uzor.

Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji, supruzi Lidiji i djeci Luciji i Dominiku za svu potporu, razumijevanje, strpljenje i ljubav.

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA RADA 1
1.1. UVOD 1
1.1.1 Hodgkinov limfom 1
1.1.2. Apoptoza 4
1.1.2.1. Aktivacija apoptotičkog puta Fas/FasL u malignim bolestima 7
1.1.3. C-FLIP (*cellular FLICE* – FADD-like 1β-converting enzyme inhibitory protein) 10
1.1.3.1. Funkcija c- FLIP 11
1.1.3.2. Uloga c-FLIP-a u citoprotektivnim i proliferacijskim putevima 13
1.1.3.3. C-FLIP i liječenje malignih bolesti 13
1.1.3.4. Uloga c-FLIP-a u izbjegavanju apoptoze Hodgkin/Reed-Sternbergove stanice 14
1.2. SVRHA RADA 16
2. HIPOTEZA 17
3. CILJEVI RADA 18
3.1 OPĆI CILJ 18
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI 18
4. MATERIJALI I METODE 19
4.1. MATERIJALI 19
4.1.1. Ispitanici 19
4.2. METODE 20
4.2.1. Imunohistokemijske metode 20
4.2.2. Klinički parametri 20
4.2.3. Primarni ishod studije 21
4.2.4. Sekundarni ishod studije 22
4.2.5. Statističke metode 23
5. REZULTATI 24
5.1. Karakteristike bolesnika 24
5.2. Ekspresija c-FLIP 27
5.3. Ekspresija Fas 35
5.4. Ekspresija FasL 41

6. RASPRAVA 48
7. ZAKLJUČAK 52
8. SAŽETAK 53
9. SUMMARY 54
10. POPIS LITERATURE 55
11. ŽIVOTOPIS 70

POPIS OZNAKA I KRATICA

APAF-1 (apoptosis peptidase activating factor-1) – faktor koji aktivira apoptoznu peptidazu

BCL2 – b-cell lymphoma 2 - obitelj proteina regulatora apoptoze

BcR (B-cell receptor) – B – stanični receptor

BH domene- bcl2 homologne domene

BH3-OP (bcl2 homology region 3 only proteins) – proteini koji imaju samo BH3 homolog iz bcl2 skupine proteina

c- FLIP (cellular FLICE inhibitor) – inhibitor staničnog FLICE tj. kaspaze 8

CAR-T (chimeric antigen receptor – T cell) – kimerični antigenski receptor na T stanicama

c-FLIPR (rare) – rijetka aktivna izoforma c-FLIP proteina

c-FLIPL (long) – dugi oblik c-FLIP proteina

c-FLIPS (short) – kratki oblik c-FLIP proteina

cHL – (classical Hodgkin lymphoma) - klasični Hodgkinov limfom

CSC (cancer stem cells) – tumorske matične stanice

DED (death effector domains) – efektorske domene smrti stanice

DICE (death induced by CD95 or CD95L elimination) – smrt uzrokovana eliminacijom CD95(Fas) ili CD95L (FasL)

DISC (death-inducing signaling complex) – signalni kompleks koji inducira staničnu smrt

EBV – Epstein-Barr virus

EORTC - European Organisation for Research and Treatment of Cancer (Europska organizacija za istraživanje i liječenje raka)

ERK (extracellular signal-regulated kinases) – kinaze regulirane izvanstaničnim signalima

FADD- Fas associated death domain – domena smrti u Fas proteinu

Fas (CD95) (first apoptosis signal) – prvi signal apoptoze

FasL (CD95L) (first apoptosis signal ligand) – ligand za prvi signal apoptoze

FLICE - FADD-like IL-1beta-converting enzyme – enzim koji sliči FADD-u i konvertira interleukin 1 beta

GC – germinativni centar

GHSG (German Hodgkin Study Group) - Njemačka radna grupa za Hodgkinov limfom

HRS stanice – Hodgkin/Reed Sternbergove stanice

IAP (inhibitor of apoptosis protein) - protein koji inhibira apoptozu

LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) – laki lanac 3 proteina 1A/1B udruženog s mikrotubulima

LDHL (lymphocyte depleted Hodgkin lymphoma) –Hodgkinov limfom s limfocitnom deplecijom

LRHL (lymphocyte rich Hodgkin lymphoma)- Hodgkinov limfom bogat limfocitima

MMR (mediastinal mass ratio) – omjer mase u medijastinumu i promjera medijastinuma

NF-kappaB (Nuclear Factor Kappa Beta) – jezgreni faktor kappa B

nLPHL - nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma

ROS (reactive oxygen species) – reaktivni kisikovi radikali

siRNA (small interfering RNA) - male interferirajuće RNA

Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases/direct inhibitor of protein with low isoelectric point) – drugi mitohondrijski aktivator kaspaza/direktni inhibitor proteina s niskom izoelektričnom točkom

TNFα (tumor necrosis factor alpha) – faktor tumorske nekroze α

TRAIL (Tumor Necrosis Factor-Alpha-Related Apoptosis-Inducing Ligand) – ligand koji inducira apoptozu povezanu s faktorom tumorske nekroze alfa

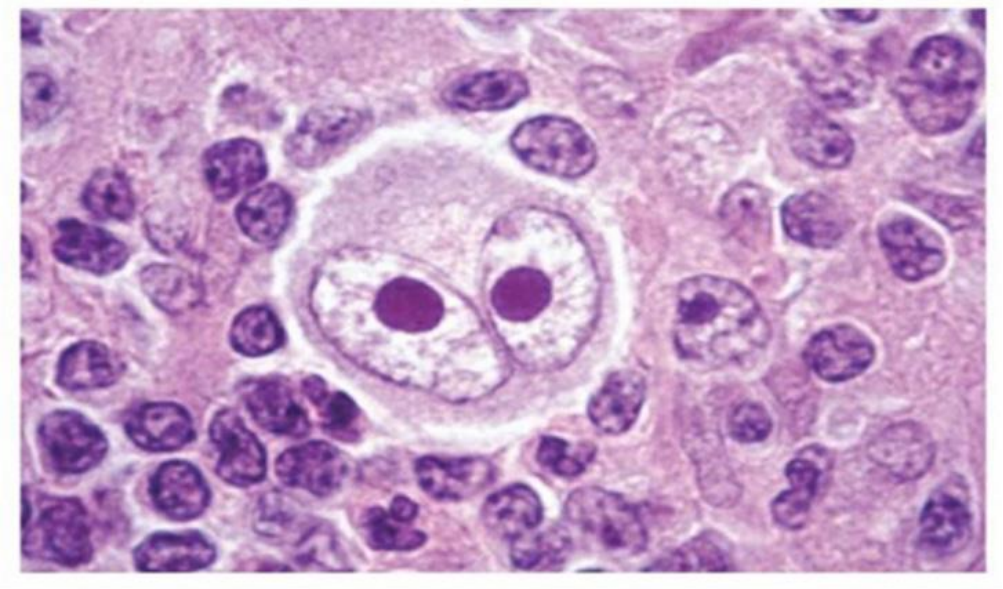
1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. UVOD

1.1.1 Hodgkinov limfom

Hodgkinov limfom je klonalna limfoproliferativna bolest s incidencijom od oko 3.3/100000 ljudi. Prvi opis bolesti koju danas poznajemo kao Hodgkinov limfom, pripisuje se Thomasu Hodgkinu, koji je 1832. godine opisao sedam slučajeva bolesnika s uvećanim limfnim čvorovima i slezenom u svojem radu „*On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen*“. (1) Bolest je karakterizirana postojanjem tzv. Hodgkin/Reed-Sternbergovih (HRS) stanica podrijetla (u najvećem broju slučajeva) germinativnog centra limfocita koje su „uklopljene“ u miješani upalni infiltrat ne-tumorskih stanica (2)(3). (Slika 1.)

Slika 1. Hodgkin/Reed-Sternbergova stanica



Dvije su osnovne vrste Hodgkinovog limfoma: nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma (nLPHL) i klasični Hodgkinov limfom (classical Hodgkin lymphoma; cHL) koji obuhvaća 4 tipa: nodularnu sklerozu (NS; 70% bolesnika), miješanu celularnost (MC; 25% bolesnika), limfocitima bogat HL (LR) te limfocitnu depleciju (LD) (4). Maligne stanice u Hodgkinovom limfomu čine svega 1-2% tumorske mase i porijekla su B limfocita (3)**,** dok ostalo čini mikrookoliš sačinjen pretežito od reaktivnih T limfocita, eozinofila i makrofaga, s većim ili manjim stupnjem fibroze. HRS stanice su CD30 i CD15 pozitivne, a CD20 negativne (klasični oblik) ili CD20 pozitivne, a CD30 i CD15 negativne (nodularna limfocitna predominacija) i obično nemaju izražen B-stanični receptor (BcR). Normalne stanice germinativnog centra limfnog čvora koje nemaju izražen ovaj receptor eliminiraju se preko apoptoze posredovane s Fas (CD95) (5)(6).

Patogeneza cHL, koji je najčešći limfom u mladih ljudi, još uvijek nije do kraja poznata. Razlog tomu je, najviše, gore spomenuta činjenica da HRS stanice zauzimaju jako malo volumena limfnog čvora zbog čega ih je teško analizirati.

Studije mikrodiseciranih HRS stanica pokazale su da su one većinom porijekla B stanica germinativnog (GC), a manji dio potiče iz postgerminativnog centra (post-GC) jer imaju somatsku mutaciju gena za varijabilnu regiju imunoglobulina (IgV) (5). Smatra se da IgV mutacije mogu rezultirati izbjegavanjem apoptoze kod HRS stanice. U 40% slučajeva cHL, HRS stanice su latentno zaražene Epstein Barr virusom (EBV) koji također može spriječiti apoptozu u B stanicama porijekla GC (7).

Kada su se analizirala 2 tipa HRS stanica, tzv. primarne (dobivene mikrodisekcijom) i one u kulturi, nije bilo razlike u ukupnoj ekspresiji tipičnih značajki kod cHL, kao što su jaka ekspresija ciljnih gena NF-kappaB i niska ili odsutna ekspresija B- staničnih gena (8).

Transkripcijskom analizom genoma HRS stanica verificirano je da je cHL zasebni entitet koji ima više značajki nLPHL nego primarnog medijastinalnog B limfoma s kojim ima kliničkih poveznica (pogotovo NS podtip). Zanimljivo je da EBV infekcija, iako ima utjecaja na patogenezu barem 40% cHL, ne utječe značajno na molekularni profil, odnosno ne ostavlja značajan „transkripcijski otisak“. Bilo je i teorija da bi HRS stanice porijekla post-GC B stanica mogle imati neke značajke plazma stanica. No, dokazano je da HRS stanice, iako imaju pojedine

značajke obje vrste, ne sliče niti normalnim stanicama germinativnog centra niti plazma stanicama (8).

Navedena analiza je pokazala i da su u HRS stanicama manje izraženi apoptotički geni, posebno iz BH3-OP grupe Bcl-2 obitelji (BIK, HRK). Oni najviše inhibiraju antiapoptotičke BCL-XL, BCL-W, više nego „poznatije“ bcl-2 i MCL-1 (9). HRS stanice češće izražavaju ove prve. Također, postoje razlike između HRS stanica u histološkim podtipovima, a zbog njih nastaju 4 različita obrasca imunološkog odgovora i posljedične razlike u histološkoj prezentaciji i mikrookolišu.

MYC gen i njegov protein su glavni regulatori staničnog rasta i proliferacije (10). Svi histološki podtipovi cHL imaju izražen MYC, NOTCH1 i IRF4 (11)(12). NOTCH1, iako je transkripcijski faktor T limfocita, ima aberantnu ekspresiju i aktivnost na HRS stanicama te vjerojatno pridonosi supresiji fenotipskih značajki B loze (13).

Kod sumnje na Hodgkinov limfom bolesnici se podvrgavaju kliničkoj, radiološkoj i patohistološkoj obradi. Standard prilikom postavljanja dijagnoze je ekstirpacija cijelog limfnog čvora jer je sama citološka punkcija često nekonkluzivna s obzirom na oskudan udio tumorskih stanica u čvoru. Potrebno je kompjuteriziranom tomografijom (CT) ili, danas češće, pozitronskom emisijskom tomografijom s CT-om (PET-CT) verificirati zahvaćene regije limfnih čvorova te zatim biopsijom kosti ustanoviti eventualnu infiltraciju koštane srži limfomskim stanicama. Nakon provedene obrade, bolesnici se ovisno o broju i regiji zahvaćenih limfnih čvorova, infiltraciji koštane srži, jetre, slezene ili, znatno rjeđe, drugih organa, svrstavaju u kliničke stadije prema Ann Arbor klasifikaciji (14).

Hodgkinov limfom liječi se polikemoterapijskim protokolima (ABVD, escBEACOPP) i danas je bolest koja je izlječiva u oko 80-90% bolesnika (15)(16)(17). U dijagnostičkom postupku, izboru terapije i praćenju bolesnika važnost imaju i standardizirani prognostički sustavi za Hodgkinov limfom.

Postoje ukupno 3 takva sustava.

Za ograničeni oblik bolesti (stadiji I-IIA):

1. EORTC sustav koji ubraja MMR>0.35, SE>50 kod asimptomatskih, a SE>30 kod simptomatskih bolesnika, >3 limfne regije, dob>50 g.

2. GHSG sustav koji ubraja MMR>0.35, SE>50 kod asimptomatskih, a SE>30 kod simptomatskih bolesnika, >2 limfne regije, ekstranodalnu bolest i masivnu bolest slezene.

Prisutnost bilo kojeg faktora smatra se prognostički nepovoljnim. Dvije trećine bolesnika s ograničenim stadijem bolesti ima prisutan 1 ili više nepovoljnih faktora.

Za uznapredovali oblik bolesti postoji internacionalni prognostički skor (International Prognostic Score, IPS) koji ubraja: dob>45 g., stadij 4 po Ann Arbor klasifikaciji, muški spol, L>15 $x10^9$, Ly<0.6$x10^9$ ili <8%, albumin <4g/dl, hemoglobin<10.5 g/dl (faktori se zbrajaju) (18).

Oko 75% bolesnika ima IPS skor između 1 i 3.

1.1.2. Apoptoza

Apoptoza, termin koji su prvi put upotrijebili Wyllie, Kerr i Currie (19), označava smrt stanice, koja se javlja u definiranom vremenu pa se stoga naziva programirana stanična smrt (20). Proces je od iznimne važnosti u čovjeka kako u samoj embriogenezi tako i u cjeloživotnom funkcioniranju organizma. Apoptoza je prisutna i u najnižim vrstama, pa su tako ključni geni za razumijevanje procesa apoptoze otkriveni proučavanjem nematode *Caenorhabiditis elegans*. Dva gena nađena kod navedene nematode - ced-3 i ced-4, imaju apototičku, a jedan, *ced-9*, antiapoptotičku ulogu (21)(22). Homolozi navedenih gena nalaze se i u višim vrstama, pa tako i u čovjeka. Produkti navedenih gena su cisteinske proteaze ("proteaze smrti"), enzimi koji razgrađuju peptide (aspartatne ostatke). Ced-3 je cisteinska proteaza kojoj je prvoj nađen homolog kod sisavaca, a to je enzim koji konvertira IL-1 β (interleukin 1 β-converting enzyme,; ICE). S obzirom na svoju građu (cisteinske proteaze) i razgradnju aspartata, nazvane su *kaspaze* (23). Od preostale dvije prvootkrivene kaspaze tj. gena za njih, homolozi u sisavaca su Apaf-1 (apoptosis peptidase activating factor-1) za ced-4 i antiapoptotički bcl-2 kao homolog ced-9. Bcl-2, nađen u ljudi proučavanjem t(8;14) je prvi otkriveni onkogen (24).

U samoj apoptozi tri su glavna događaja: mitohondrijske promjene, aktivacija kaspaza i fragmentacija kromatina.

a) Mitohondrijske promjene

Osim kao izvor energije za stanice, mitohodriji imaju i ključnu ulogu u regulaciji apoptoze. Najvažniji dio mitohondrija za tu ulogu svakako su vanjska membrana i intermembranski prostor, smješten između vanjske i unutrašnje membrane. Na vanjskoj membrani nalaze se naponski anionski kanali (porinski kanali) koji su propusni za male molekule. U intermembranskom prostoru nalazi se kompleks proteina koji obuhvaća *Smac/DIABLO* (second mitochondrial activator of caspases/direct inhibitor of protein with low isoelectric point); protein koji inhibira apoptozu (IAP); serinsku proteazu *Omi/HtrA2*; faktor koji inducira apoptozu i endonukleazu G (oboje promoviraju fragmentaciju DNA i kondenzaciju kromatina) te citokrom C, koji je kofaktor za aktivaciju kaspaza (25). Svi navedeni faktori regulirani su preko Bcl-2 obitelji proteina, koji najviše utječu na permeabilnost vanjske membrane mitohondrija. Obitelj bcl-2 proteina sastoji se od 3 grupe proteina, ovisno o ulozi te broju bcl-2 homolognih domena (BH domene). Tako antiapoptotički članovi te obitelji (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, MCL-1) imaju četiri BH domene (BH 1-4). Proapoptotički proteini (npr. Bax, Bak) nemaju BH 4 domenu. Postoji i treća grupa proteina, koji su također proapoptotički, a koji imaju samo BH3-homolognu domenu (BH3-only proteins, npr. Bid, Bam, Bim). Proces apoptoze ovisi o interakcijama između antiapoptotičkih (bcl-2) i proapoptotičkih (Bax, Bak) članova. Proteini koji imaju samo BH3 domenu potiču apoptozu vežući se na vezna mjesta za bcl-2 i tako oslobađaju proapoptotičke Bax i Bak ili direktno aktiviraju slobodne navedene proteine (26). Osim ranije spomenutog načina reguliranja promjena mitohondrija u procesu apoptoze preko permeabilnosti membrane, obitelj Bcl-2 utječe i na otpuštanje ili kočenje proteina u intermembranskom prostoru, ponajviše citokroma c. Tako antiapoptotički bcl-2 može kočiti, a proapoptotički Bax stimulirati otpuštanje citokroma c, a time i aktivaciju kaspaza i apoptoze (27).

b) Aktivacija kaspaza

Kaspaze (cisteinske aspartaze) mogu se podijeliti u 3 glavne grupe. Prva grupa uključuje kaspaze kojima je glavna uloga procesiranje citokina. Tu pripadaju ICE (kaspaza-1), kaspaza-4, kaspaza-5. Druga grupa obuhvaća tzv. efektorske kaspaze, najvažnije kaspazu-3, čija je uloga razgradnja

unutarstaničnih proteina. U treću grupu pripadaju signalne kaspaze. Djelovanja ovih grupa su međuovisna. Pretpostavlja se da postoji više načina aktivacije kaspaza, ali dva su najviše proučavana i poznata:

1. **Receptorski put** (aktivacijom tzv. "receptora smrti"; eng. *death receptors*) – u ovom putu se na receptor na površini stanice, npr. Fas (CD95) ili TNF-αR veže određeni ligand. Time dolazi do aktivacije adapternog kompleksa u citosolu. On je specifičan po regiji koja se zove domena smrti (DD – "death domain"). Adapterni kompleks (npr. FADD – Fas-associated death domain) veže se za signalne prokaspaze (prokaspaza-8, -10), aktivira ih, a one zatim aktiviraju efektorne kaspaze (28).

2. **Alternativni put (intrinzički/mitohondrijski)** – ovisi o aktivaciji citokroma c u mitohondriju. Uključuje aktivaciju kaspaze-9 preko interakcije s Apaf-1. Ovaj put je reguliran preko obitelji Bcl-2 proteina. Međutim, postoji i mogućnost direktne interakcije s receptorskim putem jer kaspaza-8 može aktivirati Bid (jedan od BH3-OP) čime dolazi do otpuštanja citokroma c (29).

c) Promjene jezgre (kromatina)

Klasična histološka manifestacija apoptoze je kondenzacija nuklearnog kromatina i fragmentacija jezgre (kao rezultat proteolize lamina kaspazama). Potom dolazi do razgradnje DNA enzimima nazvanim endonukleaze (DNAza I i II).

Apoptoza je, dakle, fiziološki proces u svim tjelesnim sustavima, nužna za funkcioniranje i opstanak organizma od embriogeneze do kraja života. Regulacija apoptoze posredovana je s više mehanizama, a klasičan primjer je međudjelovanje proteina iz Bcl-2 obitelji. Osim u fiziološkim stanjima apoptoza, odnosno poremećaji procesa koji do nje dovode, važna je i u mnogim bolestima. Bolesti se prema tome mogu podijeliti na one s pojačanom ili smanjenom apoptozom. Apoptoza u imunološkom sustavu omogućuje npr. odstranjivanje autoreaktivnih T-limfocita aktivacijom Fas/FasL (CD95/CD95L) puta. Smatra se i da prvi korak u onkogenezi nemalog broja malignih bolesti može biti neuspješna apoptoza. Sam taj događaj obično nije dovoljan za

nastanak bolesti, ali produljeno vrijeme života stanici omogućava stjecanje onkogenih mutacija i potencijalnu malignu transformaciju.

1.1.2.1. Aktivacija apoptotičkog puta Fas/FasL u malignim bolestima

Fas (CD95/APO-1/TNFRSF6) je protein koji se nalazi na površini stanice i pripada obitelji receptora faktora tumorske nekroze (TNFR). Vezanjem za svoj ligand, FasL (CD95L/CD178/TNFSF6), dolazi do pokretanja apoptoze. Fas je izražen na svim stanicama u tijelu (najviše u timusu, srcu, jetri i bubrezima), dok je njegov ligand najviše izražen na T-limfocitima i NK stanicama (30). Kao što je već prije spomenuto, apoptoza posredovana aktivacijom Fas važna je za održavanje homeostaze organizma i uklanjanje autoreaktivnih T-stanica. Mutacije tog puta rezultiraju autoimunim bolestima, pa su tako kod ljudi s autoimunim limfoproliferativnim sindromom verificirane mutacije u Fas (tip Ia bolesti) i FasL (tip 2a bolesti) (31). Fas se dominantno nalazi na površini stanice, strukture je homotrimera. Kao i ostali članovi receptorskog puta apoptoze i on sadrži tzv. domenu smrti, koja je u njegovom slučaju sastavljena od 80 aminokiselina i esencijalna je za aktivaciju apoptoze (32). Vezanjem liganda za Fas dolazi do formiranja signalnog kompleksa čija je uloga indukcija stanične smrtu (DISC, *death-inducing signaling complex*). DISC se sastoji od Fas-a, FADD-a, prokaspaze-8 i -10 te c-FLIP-a, koji je regulator kaspaza-8 i -10 (33). Prema dosadašnjim saznanjima, glavna proapoptotička uloga Fas je posredovanje u smrti tumorskih stanica ili stanica zaraženih virusom, nakon što se put aktivira preko FasL na citotoksičnom limfocitu T. Uz dodatak još nekih puteva i mehanizama, Fas/FasL je vrlo važan i izravan put preko kojeg i citotoksični limfociti T, ali i CD4+ efektorni T limfociti eliminiraju maligno transformirane stanice (34)(35). Fas i FasL izraženi su i na tumorskim stanicama. Ta činjenica ukazuje, što su potvrdila i istraživanja, da su tumorske stanice relativno rezistentne na apoptozu posredovanu s Fas (36). Postoji više mehanizama kojima tumorske stanice izbjegavaju ovaj apoptotički put, od mutacija samog receptora do regulacije jačine njegove ekspresije na staničnoj površini. Put može biti inhibiran i nakon stvaranja DISC-a, smanjenjem ekspresije FADD ili kaspaze-8 (FLICE)(37). No, možda je najvažniji način inhibicije navedenog puta, a događa se nakon njegove aktivacije ekspresijom proteina c-FLIP

(cellular FLICE inhibitory protein), koji inhibira kaspazu-8, odnosno interakcije između kaspaza -8 i -10 (38).

Osim indukcije apoptoze Fas receptor ima i druge neapoptotske funkcije poput regeneracije hepatocita, migracije epitelnih stanica bubrežnih tubula, mitogenog signala u stelatnim stanicama jetre, uloge u rastu neurona (39)(40)(41)(42).

Kod malignih bolesti kompleks Fas/FasL ima više uloga, od kojih se jasno može izdvojiti njih šest. Od njih jedino se indukcija apoptoze ne može iskoristiti za terapijsko djelovanje, dok su sve ostale funkcije potencijalni ciljevi terapije (43).

1. Indukcija apoptoze – FasL je jedan od rijetkih proteina koji imunološke stanice koriste za aktiviranje apoptoze u stanicama tumora (44). Smatra se da se navedeno odvija preko limfocita infiltriranih u tumor, a koji izražavaju FasL. Iako bi se iz toga moglo zaključiti da bi indukcija ekspresije ili aktivnosti FasL mogla imati terapijsku ulogu, tome nije tako. Naime, većina tumora ima (neki i jako izraženu) ekspresiju Fas, ali su ipak u većoj ili manjoj mjeri rezistentni na apoptozu. S druge strane, zbog ranije spomenutih neapoptotičkih funkcija Fas (i njegove stimulacije s ligandom) isto bi vjerojatno imalo velike nuspojave, npr. potencijalno masivnu apoptozu hepatocita (45).

2. Tumorski odgovor – na tumorskim stanicama osim Fas, izražen je i FasL. Poznato je da tumorske stanice mogu napasti imunološku stanicu, istu onu kojoj je zadatak napasti tumor, jer su i one osjetljive na apoptozu preko Fas puta (46). Ipak, teorija tumorskog protunapada još uvijek nije sa sigurnošću dokazana.

3. Ekspresija FasL na endotelnim stanicama – FasL izražen je i na endotelnim stanicama i to je mogući način kako tumor smanjuje infiltraciju CD8 limfocitima T (47). Mogućnost smanjenja ekspresije FasL na endotelnim stanicama stoga je mogući terapijski cilj, u smislu povećanja broja limfocita T u tumoru, što je posebno privlačno u doba adoptivne stanične terapije tj. terapije CAR-T stanicama.

4. Uloga Fas u tumorskom rastu – Fas ima ulogu u rastu i proliferaciji više vrsta stanica - jetrenih, T-limfocita, neurona (48). Također, postoje značajni dokazi o njegovom sudjelovanju u brojnim signalnim putevima vezanim za migraciju i preživljavanje raznih vrsta stanica. Stoga je trenutno prihvaćena teorija da jednom kada tumorska stanica postane rezistentna na apoptozu ovisnu o Fas, daljnja stimulacija tog receptora je tumorigenična (49)(50)(51). FasL izražen je u 2 oblika, membranski (mFasL) i topljivi (soluble, sFasL), koji nastaje razgradnjom mFasL metaloproteinazama (52). Kako je u organizmu mFasL najvažniji za indukciju apoptoze, a sFasL ima neapoptotske aktivnosti, moguće da potonji ima ulogu u promoviranju tumorskog rasta (53).

5. Interakcija matičnih stanica tumora (cancer stem cells, CSC) i Fas/FasL – teorija tumorskih matičnih stanica smatra se općeprihvaćenom kod mnogih malignih bolesti. Tumorske matične stanice su na "hijerarhijskom vrhu" tumora i, slično kao i kod npr. hematopoetskih matičnih stanica, imaju sposobnost samoobnavljanja i generiranja diferenciranijih tumorskih stanica. Smatra se da su upravo one odgovorne za neuspjehe liječenja i da su izvor relapsa bolesti (54). Zato je terapijsko djelovanje na njih jako zanimljivo područje. Fas/FasL kompleks je povezan sa signalnim putevima u normalnim matičnim stanicama, npr. neuralnim (55), a budući da tumorske matične stanice nastaju iz normalnih matičnih stanica, moguće je da Fas ima funkciju i u njima. Naime, u tumorskim bolestima signalizacija putem Fas povezana je s diferencijacijom stanica (56). Dokazano je i da je Fas potreban za preživljenje CSC te čak nastanak novih CSC (57). Također, stimulacija Fas na raznim tumorskim stanicama potakla je konverziju iz ne-CSC u CSC i bila je neovisna o apoptotičkoj funkciji.

6. Stanična smrt izazvana eliminacijom Fas receptora/liganda - Hadji i sur. su na temelju činjenice o tumorigenom djelovanju Fas/FasL pokazali da eliminacija Fas ili FasL dovodi do *in vitro* i *in vivo* smrti tumorske stanice u procesu kojeg su nazvali DICE (*death induced by Fas or FasL elimination*) (58). Važnost ekspresije Fas/FasL tijekom

embriogeneze ispitivana je kod miševa i neutralizacija gena za Fas ili FasL nije dovela do nikakvih poremećaja ili stanične smrti. Međutim, u tumorskim stanicama važnost Fas za preživljenje stanice je vrlo velika. U spomenutom radu autori navode da je kod svih tumorskih linija koje su ispitivali (njih više od 40) došlo do smrti stanica putem DICE mehanizma kada su neutralizirani ili Fas ili FasL. Također, do sada se unatoč pokušaju s oko 1200 supstanci, aktivirani proces DICE nije uspio inhibirati, što sugerira da se radi o vrlo velikom i kompleksnom mehanizmu kojega je teško zaustaviti (58). Prema tome, DICE bi se mogao smatrati urođenim antitumorskim mehanizmom, koji omogućuje da tumorske stanice koje su izbjegle apoptozu preko Fas ipak budu eliminirane, što ga čini nekom vrstom osigurača (59). Već je spomenuto da stimulacija Fas inducira konverziju stanica iz ne-CSC u CSC, a one tako postaju i puno manje osjetljive na apoptozu. No, dokazano je da u isto vrijeme postaju osjetljivije na DICE, koji vjerojatno značajno više djeluje na CSC (57).

Dosadašnji podaci dakle sugeriraju da Fas/FasL mijenjaju svoju ulogu u procesu onkogeneze. Jednom kada stanice postanu otporne na apoptozu tim putem (bilo gubitkom ekspresije, mutacijama, ekspresijom c-FLIP) one postaju onkogene. Za smrt tih stanica odgovoran je tada mehanizam DICE-a. Kako pojedine tumorske stanice ipak preživljavaju i izazivaju klinički evidentnu bolest, logičan je zaključak da na neki način ipak izbjegnu i DICE. Smatra se da je mogući mehanizam taj da te stanice ponovno počinju izražavati Fas/FasL (43). No, vjerojatno u istom trenutku postaju i osjetljivije na apoptozu. To je još jedan dokaz dinamičnosti malignih bolesti i potrebe da terapija bude što sveobuhvatnija, odnosno da cilja što više stadija u razvoju tumora. Kako upotreba FasL za liječenje tumora za sada nije opcija zbog potencijalne jetrene nekroze, DICE je stoga vrlo privlačan terapijski cilj bilo u kombinaciji sa standardnom kemoterapijom ili imunoterapijom.

1.1.3. C-FLIP (cellular *FLICE* – FADD-like 1β-converting enzyme inhibitory protein)

C-FLIP (cellular FLICE – FADD-like 1β-converting enzyme inhibitory protein) je veliki antiapoptotički protein i važan faktor rezistencije stanice na citokinski ili kemoterapeutski induciranu apoptozu. Najprije su otkrivene virusne varijante tog proteina (viral, v-FLIP) kada je

pronađeno šest formi v-FLIP-ova te pokazano da su stanice koje ih izražavaju rezistentne na apoptozu induciranu s Fas, TRAILR1- i TNFR1 (60). Ubrzo je pronađen homolog kod sisavaca i nazvan c-FLIP (38). U literaturi se još spominje kao iFLICE, FLAME-1, CASH, CLARP, MRIT ili usurpin (61). Sastoji se od 13 različitih varijanti, međutim samo tri su izražene kao protein: dva kratka oblika, jedan od 26 kDa (c-FLIPS) i drugi od 24 kDa (c-FLIPR), te dugi oblik od 55 kDa (c-FLIPL) (62). Struktura c-FLIPS-a i v-FLIP-a je slična, no c-FLIPS ima dodatak od 20 aminokiselina koje slijede nakon dvije regije koje sadrže efektore stanične smrti (DED; death effector domains), koje se smatraju ključnima za ubikvinaciji i razgradnji proteasomima (63). C-kraj c-FLIPL je duži nego kod C-FLIPS i sliči strukturi kaspaza -8 i -10, ali ne sadrži funkcionalne domene navedenih kaspaza. C-terminalne regije c-FLIPS i c-FLIPR imaju ključnu ulogu u ubikvinaciji i degradaciji te antiapoptotičkoj funkciji ovih izoformi (64)(65)(66). Kod ljudi, polimorfizam jednog nukleotida u 3' regiji c-FLIP gena određuje koja će izoforma proteina nastati (67).

1.1.3.1. Funkcija c- FLIP-a

Izoforme c-FLIP-a su proteini koji sadrže efektorske domene smrti (DED) koji se inkorporiraju u sastav DISC-a i reguliraju aktivaciju kaspaza-8 i -10 u apoptotičkom putu posredovanom tzv. receptorima smrti. Pojednostavljeno, c-FLIP je prvenstveno inhibitor staničnog FLICE-a, odnosno kaspaze-8. Uloga c-FLIPS i c-FLIPL u apoptozi je dobro poznata, no u tumorskim bolestima nije do kraja jasna, kao ni općenita uloga c-FLIPR (68). Nedavne studije pokazuju da ekspresija c-FLIPR u hematopoetskim stanicama potpomaže uspješan imunološki odgovor na bakterijske infekcije (67).

Regulacija ekspresije c-FLIP-a provodi se raznim mehanizmima na transkripcijskoj i posttranskripcijskoj razini (69). Transkripcijska kontrola c-FLIP-a je kompleksna. Postoje brojni faktori koji potiču transkripciju c-FLIP-a poput NF-kappaB, AP-1, p63, FoxO, dok ostali djeluju inhibitorno kao c-Fos, c-myc, FoxO3a, SP53 (70)(71)(72)(73).

Ekspresija c-FLIP-a se također može regulirati posttranskripcijski brojnim faktorima koji pozitivno ili negativno djeluju na njegovu ekspresiju. Jedan od načina posttranskripcijske regulacije c-FLIP-a je i preko reaktivnih kisikovih radikala (ROS, reactive oxygen species) (74).

C-FLIP ima ulogu u rezistenciji na apoptotozu posredovanu Fas, TRAIL, TNFalfa i onu pokrenutu kemoterapijom u širokom spektru malignih bolesti kod ljudi. Uz antiapoptotičku, c-FLIP ima još neke stanične funkcije uključujući pojačanu proliferaciju i tumorigenezu (75)(62)(63). Nadalje, interferencija s c-FLIP-om rezultira osjetljivošću tumorskih stanica na ligande apoptoze i kemoterapiju u eksperimentalnim modelima (76). Sve tri izoforme c-FLIP proteina imaju 2 DED domene i mogu se uklopiti u DISC. I c-FLIPS i c-FLIPR blokiraju aktivaziju prokaspaze-8 i apoptozu (77)(78)(79). C-FLIPL također ima antiapoptotičko djelovanje kada je prisutan u DISC-u u visokim koncentracijama (80). Zna se da c-FLIPL i c-FLIPS sprječavaju aktivaciju kaspaze-8 i -10. (81).

Kod rezistencije tumora na kemoterapiju mogući značaj ima i uloga c-FLIP-a u autofagiji. Autofagija je proces u kojemu se različite komponente citoplazme, ponajviše oštećene stanične organele i potrošeni stari proteini, razgrađuju u kompleksu nazvanom autofagosom te se takve premještaju u lizosom, formiraju autolizosom gdje dolazi do konačne razgradnje. C-FLIP (kao i virusna forma v-FLIP) suprimira autofagiju sprječavanjem vezanja Atg3 za LC3 i konjugaciju LC3, što je nužan korak u procesu autofagije. Stoga, nije iznenađujuće što npr. ekspresija c-FLIP-a omogućuje stanicama suprimiranje autofagije nastale kao posljedica liječenja rapamicinom (kemoterapijskim agensom) i time pridonosi rezistenciji (82)(83).

U nekoliko različitih vrsta malignih bolesti kod ljudi nađena je pojačana ekspresija c-FLIP-a i smatra se da bi navedeno moglo biti povezano s progresijom bolesti zbog izbjegavanja apoptoze. Tako je pojačana ekspresija c-FLIP-a nađena kod kolorektalnog karcinoma (84) (85), karcinoma mokraćnog mjehura (86), karcinoma cerviksa (87), Burkittovog limfoma (88), ne-Hodgkinovog limfoma (89) i mnogih drugih. U karcinomu želuca njegova pojačana ekspresija povezuje se s metastazama u limfne čvorove i progresijom bolesti (90). Kod karcinoma gušterače također je pojačana ekspresija c-FLIP-a, kojeg nema u normalnim stanicama pankreasnih kanala (91). Postoje i dokazi da bi c-FLIP mogao biti i prognostički faktor u akutnoj mijeloičnoj leukemiji (92).

1.1.3.2. Uloga c-FLIP-a u citoprotektivnim i proliferacijskim putevima

C-FLIP aktivira i nekoliko citoprotektivnih signalnih puteva, koji su uključeni u regulaciju preživljenja stanice, proliferaciju i karcinogenezu. Većina ovih uloga odvija se međudjelovanjem c-FLIP-a, NF-kappaB i ERK signalnog puta. C-FLIP, što je vrlo važno, može dovesti do promjene uloge Fas-a iz apoptotičke u proliferacijsku (93). Utišavanje ekspresije c-FLIP-a tako je dovelo do pojačane apoptoze u raznim vrstama stanica: plućnim miofibroblastima, intestinalnim epitelnim stanicama, hepatocitima (94)(95). Dokazana je uloga c-FLIP-a i u regulaciji nekoliko potencijalno štetnih signalnih puteva uključujući proizvodnju upalnih citokina, migraciju tumorskih stanica i aktivaciju transkripcijskih faktora ključnih u karcinogenezi (96)(97)(98).

1.1.3.3. C-FLIP i liječenje malignih bolesti

S obzirom na vrlo diferentnu i važnu ulogu c-FLIP-a u raznim staničnim signalnim putevima, pogotovo onima vezanima za apoptozu, proliferaciju i preživljavanje, terapijsko djelovanje na ovaj protein privuklo je dosta pažnje. Upotreba malih interferirajućih RNA (small interfering RNA; siRNA) koji ciljano smanjuju ekspresiju c-FLIP-a u raznim vrstama ljudskih tumorskih staničnih linija, dovela je do pojačavanja aktivnosti DISC-a i osjetljivosti na kemoterapiju (99). Međutim, zbog velike sličnosti c-FLIP-a i enzima koji inhibira, kaspaze-8 (FLICE), vrlo je komplicirano blokirati c-FLIP, jer bi spojevi koji bi blokirali c-FLIP vjerojatno blokirali i aktivaciju kaspaze-8, a time i apoptozu općenito. Stoga bi terapijski izbor trebale biti male molekule/spojevi koji bi inhibirali c-FLIP bez inhibicije kaspaze-8 i manje kaspaze-10. Mnogi dobro poznati konvencionalni kemoterapeutici smanjuju ekspresiju c-FLIP-a (cisplatina, doksorubicin, topotekan, HDAC-inhibitori) preko utjecaja na njegovu transkripciju, smanjenje translacije ili pojačanu degradaciju putem proteasoma (100). Naravno, djelovanje na c-FLIP nije specifično nego dio njihovog ukupnog kemoterapeutskog učinka. Smanjenje ekspresije varijanti c-FLIP-a umetanjem malih spojeva da bi se pojačala apoptoza i osjetljivost na kemoterapiju ima i jedan veliki problem. Naime, smanjena regulacija c-FLIP-a dovela je kod raznih staničnih linija do značajnog uništenja zdravih stanica (68). Tako da, iako vrlo zanimljiva, inhibicija c-FLIP-a kao terapijska mjera, vrlo je složena i još u začecima.

U zaključku, može se reći da je c-FLIP vrlo bitan protein u procesima apoptoze, autofagije, pa i nekroze. U više je primjera dokazano da je on odgovoran za izbjegavanje apoptoze tumorskih stanica i da je njegova pojačana ekspresija povezana s lošijim kliničkim ishodom. Stoga je vrlo zanimljiva njegova vrijednost kao biomarkera bolesti, ali i kao terapijskog cilja. S obzirom na njegove brojne funkcije, zanimljivi su ciljani agensi koji bi smanjivali ekspresiju njegove mRNA ili uzrokovali razgradnju samog proteina, a bez značajne štete na zdravim stanicama.

1.1.3.4. Uloga c-FLIP-a u izbjegavanju apoptoze Hodgkin/Reed-Sternbergove stanice

Ranije je spomenuto da prema sadašnjem konceptu ontogeneze B limfocita, stanice s nefunkcionalnom (zbog mutacije) ekspresijom imunoglobulina umru apoptozom. To se ne događa s HRS stanicom. Ta činjenica dovodi do zaključka da osim što HRS stanica inicijalno izbjegava apoptozu, također, kada ju jednom izbjegne i dalje preživljava. Smatra se da je za obje ove karakteristike odgovorno izbjegavanje apoptoze preko staničnih receptora smrti posebice onog aktiviranog preko Fas/FasL. Naime, već je ranije dokazano da unatoč ekspresiji divljeg tipa Fas u većini slučajeva cHL, njegovom stimulacijom ipak ne dolazi do apoptoze HRS stanica (6)(101). Iako je ekspresija c-FLIP-a već ranije opisana u HRS stanicama, funkcionalni značaj toga nije bio jasan (6)(102).

U radu Mathasa i suradnika prvi je puta dokazano da je za razliku od brojnih drugih tumora, ekspresija Fas u staničnim linijama HRS vrlo jaka te da se FADD, kaspaza-8, kaspaza-10 te c-FLIPS i c-FLIPL vrlo brzo inkorporiraju u DISC. Formiranje DISC-a je nužno za normalnu signalizaciju preko Fas. Iako je, dakle, ekspresija Fas na HRS vrlo jaka, istraživanjem na staničnim linijama pokazalo se da je signalni put ovisan o Fas inhibiran tj. da se radi o svojevrsnoj funkcionalnoj inhibiciji kaskade apoptoze. Za to se smatra odgovornim c-FLIP jer se za razliku od drugih staničnih linija c-FLIPS i c-FLIPL ugradio u DISC HRS stanice nakon stimulacije Fas. C-FLIPS potpuno inhibira aktivaciju kaspaze-8, dok c-FLIPL omogućuje stvaranje intermedijarnog produkta razgradnje C-8 p43/p41, ali bez nastanka aktivne kaspaze. Zato se u HRS stanicama ponekad može detektirati prokaspaza-8 i p43/p41 intermedijarni produkt razgradnje, ali ne i aktivna kaspaza-8 (103).

U radu se također pokazalo da je ekspresija c-FLIP-a izazito jaka u staničnim linijama HRS stanica, posebice c-FLIPS-a. Aktivacija NF-kappaB pojačava ekspresiju c-FLIP-a i smatra se da je c-FLIP jedan od najjačih gena reguliranih preko NF-kappaB (104). S obzirom na ovu ovisnost nije iznenađujuće što inhibicijom NF-kappaB dolazi za brzog gubitka ekspresije c-FLIP-a. Kada se stanične linije HRS-a tretiraju cikloheksimidom (CHX) već nakon 30-60 minuta dolazi do značajnog smanjenja ekspresije c-FLIPS-a i c-FLIPL-a, dok razina ostalih komponenti DISC-a ostaje ista. Također, nakon inhibicije c-FLIP-a, došlo je do jake aktivacije kaspaze-8 i cijelog apoptotičkog puta ovisnog o Fas. Autori su zaključili da je protein koji je ihibiran CHX-om, a to je c-FLIP, odgovoran za inhibiciju apoptoze ovisne o Fas u HRS stanicama (103). Tome u prilog govori i podatak da je smanjenje ekspresije c-FLIP-a na staničnim linijama dovelo do senzitizacije tih stanica na apoptozu ovisnu o tzv. receptorima smrti (u ovom slučaju Fas i TRAIL). Aktivirani put NF-kappaB je dakle ključni faktor preživljenja HRS stanica (aktivacijom c-FLIP-a), ali usto i prevenira smrt stanice od strane mikrookoliša. No, zanimljivo je da je smanjenje ekspresije c-FLIP-a dovoljno da HRS stanica postane osjetljiva na apoptozu uzrokovanu receptorima smrti, iako može i dalje izražavati i druge, o NF-kappaB ovisne, antiapoptotičke proteine (105). Kako je ranije spomenuto, blokada signalnog puta Fas-a od strane c-FLIP-a, uz jaku ekspresiju Fas-a, ima za posljedicu promjenu uloge Fas-a, koji tada može potaknuti proliferaciju, dakle djelovati tumorigeno.

Imunohistokemijska analiza u HRS stanicama pokazala je jaku ekspresiju Fas-a. U svim HRS stanicama izražen je i FADD, kao i kaspaza-8, no u većini slučajeva kod kaspaze-8 bojanje je bilo vrlo slabo. C-FLIP bio je jako izražen u HRS stanici, što je u suglasju s ranijim istraživanjima. Nasuprot tome, HRS stanice rijetko izražavaju FasL, ali on je često izražen u stanicama mikrookoliša. Uzevši sve u obzir, na HRS stanicama postoji imunohistokemijska ekspresija svih komponenti Fas kompleksa. U slučaju aktivacije Fas na HRS stanicama očekivana je i jaka ekspresija c-FLIP-a, koji se inkorporira u DISC i prevenira apoptozu. U Mathasovom radu bojanja (ispitivana i kontrolna) uspjela su u tri slučaja i u sva tri c-FLIP je bio izražen (103).

1.2. SVRHA RADA

Istraživanjem povezanosti imunohistokemijske ekspresije Fas, FasL te c-FLIP-a i prognostički relevantnih laboratorijsko-kliničkih parametara mogla bi se iskazati stvarna vrijednost i važnost apoptotičkog puta ovisnog o Fas, utjecaja različite ekspresije c-FLIP-a na bolest te da li je različita ekspresija navedenih proteina kliničko-prognostički značajna. S obzirom na mogućnost imunohistokemijskih metoda, eventualni prognostički značaj ekspresije pojedinih proteina (posebice c-FLIP-a) mogao bi biti i novi prognostički parametar prilikom same dijagnoze klasičnog Hodgkinovog limfoma. Nadalje, moguća povezanost pojedinog ispitivanog markera i lošije kliničke prognoze mogla bi, pogotovo u eri ciljanog liječenja, imati dodatnog utjecaja i na terapijski pristup.

2. HIPOTEZA

Jača ekspresija c-FLIP proteina na Hodgkin/Reed-Sternbergovoj stanici povezana je s više nepovoljnih prognostičkih parametara prema standardnim prognostičkim indeksima.

3. CILJEVI RADA

3.1 OPĆI CILJ

U ovom radu cilj je istražiti značaj ekspresije Fas, FasL i c-FLIP-a kao prognostičkih čimbenika u klasičnom Hodgkinovom limfomu čime bi se na indirektan način moglo ukazati na ulogu aktivacije i inhibicije apoptotičkog puta ovisnog o Fas u patogenezi klasičnih oblika Hodgkinovog limfoma.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI

1. istražiti odnos između ekspresije Fas, FasL i c-FLIP-a i prognostički povoljnih i nepovoljnih skupina bolesnika te standardnih histoloških tipova

2. istražiti utjecaj i korelaciju različitih ekspresija c-FLIP-a na preživljenje bolesnika

3. istražiti povezanost ekspresije navedenih proteina s kliničkim stadijem bolesti te pokazateljima kao što su vrijednost koncentracije hemoglobina i broj limfocita

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Ispitanici

U izradi rada korišten je arhivski materijal Kliničkog zavoda za patologiju KB Dubrava, tj. parafinske kocke limfnih čvorova bolesnika kod kojih je dijagnosticiran klasični oblik Hodgkinovog limfoma. U analizu su uključeni patohistološki materijali 40 bolesnika s klasičnim oblikom Hodgkinovog limfoma kod kojih je dijagnoza postavljena u razdoblju od srpnja 2006.g. do zaključno lipnja 2015.g. Uzorci za studiju su prikupljeni u skladu s Etičkim principima Helsinške deklaracije, na način da je identitet bolesnika u svakom trenutku bio zaštićen.

4.2. METODE

4.2.1. Imunohistokemijske metode

Na svim preparatima određena je ekspresija ispitivanih proteina na Hodgkin/Reed-Sternbergovim stanicama. Imunohistokemijsko određivanje proteinske ekspresije provedeno je imunoenzimatskim bojanjem na parafinskim rezovima tkiva Hodgkinovog limfoma, koje je nakon biopsije bilo rutinski fiksirano u 10% puferiranom formalinu i uklopljeno u parafin. Nakon deparafinizacije i toplinskog otkrivanja antigena, uzorci su inkubirani primarnim protutijelima. Za prikaz Fas (CD95) koristli smo poliklonalno zečje protutijelo Fas c-20 (sc 956, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), za Fas ligand poliklonalno zečje protutijelo Fas-L Q-20 (sc -715, Santa Cruz Biotechnology, California, USA), a za c-FLIP poliklonalno zečje protutijelo FLIP $_{S/L}$ H-202 (sc-8347, Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Imunohistokemijska reakcija vizualizirana je Dako REAL EnVision detekcijskim kitom (K5007, DAKO,Glostrup Danska) i kromogenim diaminobenzidinom (DAB, K 348, DAKO, Glostrup, Danska), uz kontrastno bojanje Mayerovim hematoksilinom. Pri procjeni kromogene reakcije u svjetlosnom mikroskopu, pozitivna reakcija na Fas i Fas-L protutijelo prikazala se kao membranska smećkasta obojanost, a na FLIP $_{S/L}$ protutijelo kao smećkasta citoplazmatska obojanost. Razina ekspresije određena je semikvantitativno sljedećim stupnjevima: negativna reakcija ako je nađeno 0-10% pozitivnih HRS stanica, slabo izražena ako je nađeno 10-50% pozitivnih HRS stanica i jako izražena s više od 50% pozitivnih HRS stanica.

4.2.2. Klinički parametri

Kod svakog bolesnika su određeni nepovoljni prognostički parametri prema kliničkim i laboratorijskim pokazateljima prilikom postavljanja dijagnoze. Za niže kliničke stadije (CS I – IIA) korišten je GHSG i EORTC prognostički indeks, a za uznapredovale stadije međunarodni prognostički skor (IPS).

4.2.3. Primarni ishod studije

Kao primarni ishod studije promatrala se razlika u ekspresiji c-FLIP proteina između prognostički povoljnih i nepovoljnih skupina bolesnika. Prognostički nepovoljnim Hodgkinovim limfomom u nižem stadiju smatralo se kada je bolesnik imao 1 ili više nepovoljnih faktora, a istim se u skupini s uznapredovalim kliničkim stadijem smatralo kada je bolesnik imao 3 ili više nepovoljnih prognostičkih faktora. S obzirom da prema našem znanju ne postoje podatci o jačini ekspresije c-FLIP-a u klasičnim oblicima Hodgkinovog limfoma, kao klinički značajnu smatrali smo razliku od 40 postotnih bodova između prognostički povoljnih i nepovoljnih skupina bolesnika. Uz pogrešku tipa 1 od 0.05, snagu od 80%, razinu ekspresije od 50% i 10% u prognostički povoljnoj odnosno nepovoljnoj skupini, u istraživanje je bilo potrebno uključiti 40 bolesnika.

4.2.4. Sekundarni ishod studije

Kao sekundarni ishod studije promatrana je razlika u preživljenju između tri skupine bolesnika ovisno o ekspresiji c-FLIP proteina, Fas i FasL. Također smo uspoređivali eventualno postojanje statistički značajne povezanosti ekspresije navedenih proteina i pojedinih parametara sadržanih u prognostičkim indeksima. S obzirom da glavninu klasičnih Hodgkinovih limfoma čini histološki tip nodularne skleroze, istražili smo moguću razliku u ekspresiji navedenih proteina između bolesnika s nodularnom sklerozom i ostalih.

4.2.5. Statističke metode

Normalnost distribucije numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Normalno distribuirane numeričke varijable prikazane su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i uspoređene između grupa koristeći T-test i jednosmjernu analizu varijance (ANOVA). Numeričke varijable koje nisu pratile normalnu distribuciju prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon (IQR prema eng. interquartile range) i uspoređene su između grupa koristeći Mann Whitney U test i Kruskal-Wallis ANOVA. Povezanost dvije numeričke varijable testirana je Spearmanovom korelacijom i izražena je Spearmanovim koeficijentom korelacije Rho. Kategorijske varijable prikazane su kao omjer i postotak, a uspoređene su između grupa koristeći X^2 test/Fisherov test gdje je to bilo prikladno. Trend porasta ili smanjenja pojedinih parametara u odnosu na kategorije ekspresije testiran je Spearmanovom korelacijom i X^2 testom za trend.

Analiza preživljenja temeljena je na metodi prema Kaplan i Meieru. Analizirani su ukupno preživljenje (OS prema eng. overall survival), vrijeme do progresije bolesti (TTDP prema eng. time to disease progression) i preživljenje bez progresije bolesti (PFS prema eng. progression free survival). Krivulje preživljenja uspoređene su koristeći log-rank test.

P vrijednosti manje od 0.05 smatrane su statistički značajnima. P vrijednosti za višestruke istovremene usporedbe interpretirane su u skladu s Bonferronijevom korekcijom. Za sve analize korišten je statistički program MedCalc, verzija 18 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

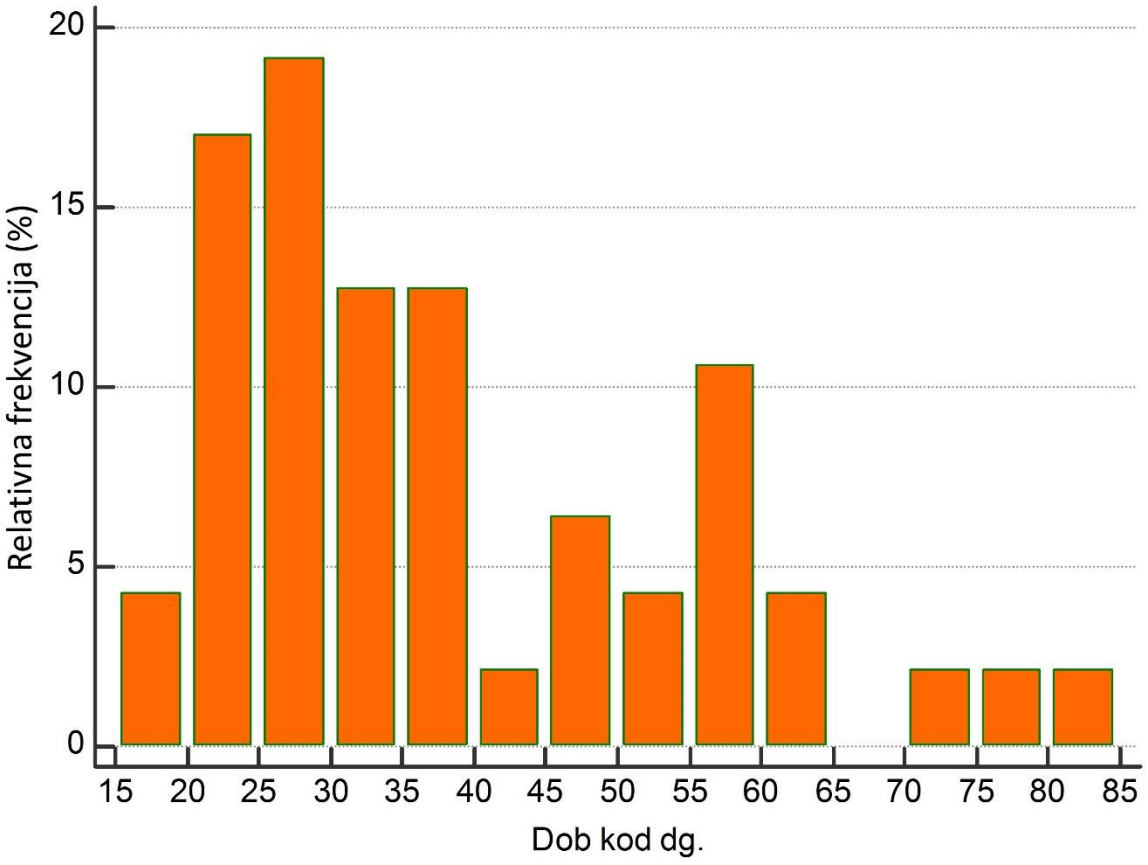
5. REZULTATI

5.1. Karakteristike bolesnika

Analizirano je ukupno 40 bolesnika s klasičnim Hodgkinovim limfomom. Medijan dobi bio je 33 godine, distribucija bolesnika prema dobi prikazana je na Slici 2. Većina analiziranih bolesnika bile su žene (55%), najčešći podtip bio je nodularna skleroza (83%). Od 40 bolesnika njih 14 (23%) imalo je ograničenu, a 26 (77%) uznapredovalu bolest te su prema tome i skorirani odgovarajućim prognostičkim sustavom. U grupi bolesnika s ograničenim stadijem bolesti njih 9 (64%) imalo je nepovoljnu prognozu i po GHSG i po EORTC sustavu. U grupi bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti njih 13 (50%) imalo je nepovoljnu prognozu. Karakteristike bolesnika navedene su u Tablici 1.

Medijan praćenja bio je 79 mjeseci. Petogodišnji OS bio je 87%, medijan OS nije dostignut. Petogodišnji PFS bio je 80%, medijan PFS nije dostignut. Petogodišnji TTDP bio je 87%, medijan TTDP nije dostignut. Bolesnici s ograničenom u odnosu na uznapredovalu bolest imali su statistički značajno bolje PFS (100% vs 69%; P=0.037) i TTDP (100% vs 78%; P=0.027), dok razlika u OS nije bila statistički značajna (100% vs 81%; P=0.294).

Slika 2**:** Distribucija bolesnika prema dobi.



Tablica 1**:** Karakteristike bolesnika.

Dob bolesnika (godine) <45 godina ≥45 godina	Medijan 33 IQR (25.8 – 51.5) 27/40 (67.5%) 13/40 (32.5%)
Spol M Ž	 18/40 (45%) 22/40 (55%)
Dijagnoza Nodularna skleroza Miješana celularnost Neklasificirani	 33/40 (82.5%) 5/40 (12.5%) 2/40 (5%)
Ann Arbor I II	 1/40 (2.5%) 21/40 (52.5%)

III IV	8/40 (20%) 10/40 (25%)
B simptomi Da Ne	 22/40 (55%) 18/40 (45%)
Ograničena bolest* Uznapredovala bolest	14/40 (35%) 26/40 (65%)
Bulky bolest Da Ne	 9/39 (23.1%) 30/39 (76.9%)
Ekstranodalna bolest** Da Ne	 13/39 (33.3%) 26/39 (66.7%)
Splenomegalija** Da Ne	 4/39 (10.3%) 35/39 (89.7%)
Hemoglobin (g/L)** <105 ≥105	120.6 ± 18.2 7/39 (18%) 32/39 (82%)
Leukociti ($x10^9$/L)** ≥15 $x10^9$/L <15 $x10^9$/L	Medijan 9.3 IQR (7.8 – 10.6) 7/39 (18%) 32/39 (82%)
Aps. limfociti ($x10^9$/L)** <0.6 $x10^9$/L ≥0.6 $x10^9$/L	Medijan 1.4 IQR (1.2 – 2.0) 5/38 (13.2%) 33/38 (86.8%)
Albumin (g/L)** <40 g/L ≥40 g/L	41.5 ± 4.85 13/38 (34.2%) 25/38 (65.8%)
SE (mm/h)	62.7 ± 35.3
GHSG (ograničena bolest)	1 IQR (0 - 2)
GHSG nepovoljni	9/14 (64.3%)
EORTC (ograničena bolest)	1 IQR (0 - 1)
EORTC nepovoljni	9/14 (64.3%)
IPS (uznapredovala bolest)	2.5 IQR (1 - 4)
IPS nepovoljni	13/26 (50%)
Monociti ($x10^9$/L)	0.6 IQR (0.5 - 0.8)
LMR (ly/mo ratio)	2.4 IQR (1.6 - 3.4)

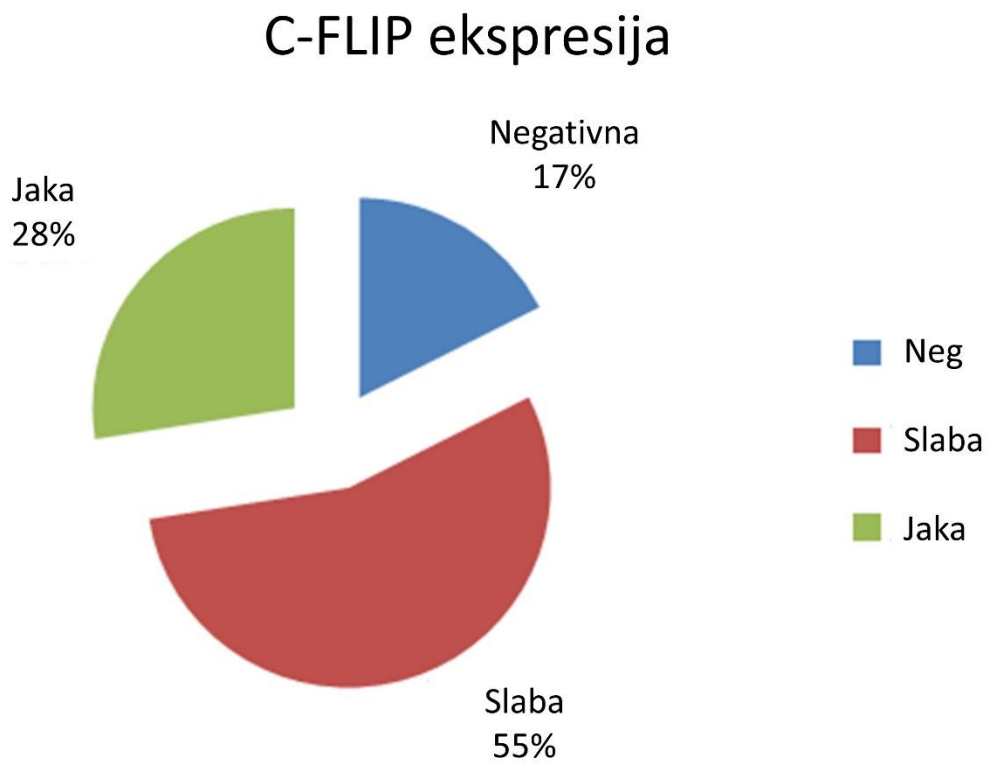
*bolesnici u stadiju I-IIA

**nisu dostupni svi podaci za sve bolesnike – bez utjecaja na izračun skorova

5.2. Ekspresija c-FLIP

Od ukupno 40 bolesnika, 7 (17%) je bilo negativno na c-FLIP, 22 (55%) je slabo eksprimiralo, a 11 (28%) je jako eksprimiralo c-FLIP (Slika 3.).

Slika 3: Prikaz udjela bolesnika prema ekspresiji c-FLIP.



C-FLIP ekspresija nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC i IPI skorovima (P>0.05 za sve analize). Ekspresija c-FLIP u odnosu na kliničke karakteristike bolesnika i prognostičke skorove prikazana je u Tablici 2. Jača ekspresija c-FLIP-a bila je povezana s fenotipom nodularne skleroze (P=0.020). Jača ekspresija c-FLIP-a također je

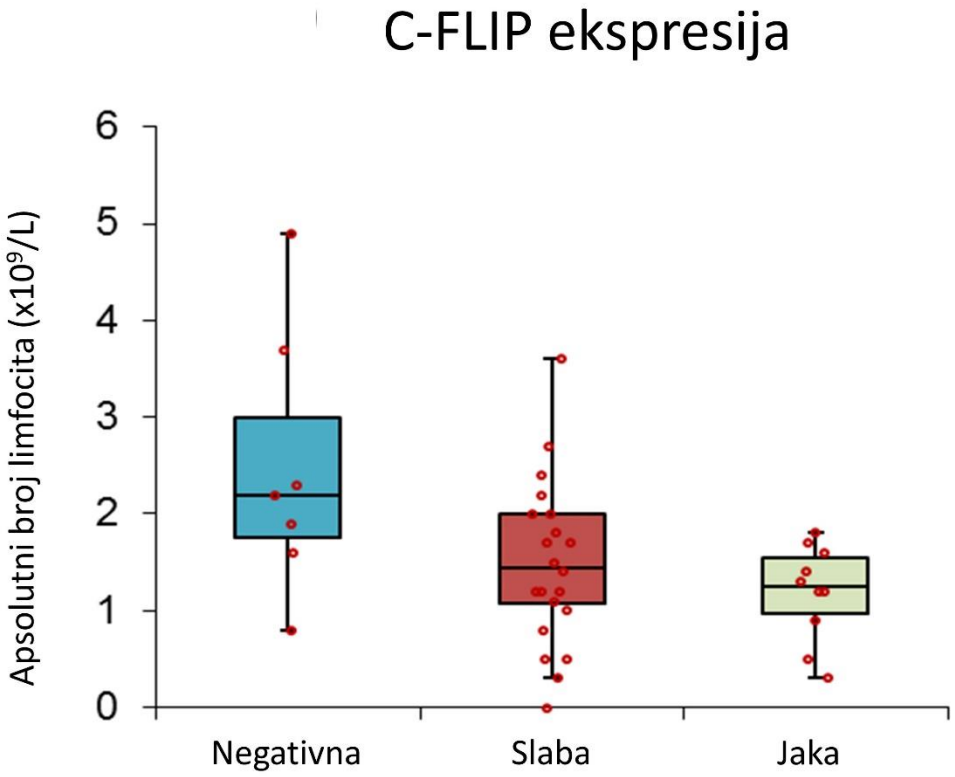
bila povezana s nižim apsolutnim brojem limfocita (P=0.015) (Slika 4.). Nitko od bolesnika s jakom ekspresijom c-FLIP-a nije imao apsolutne limfocite više od 1.8 $x10^9$/L.

Na graničnoj vrijednosti limfocita ≤1.5 $x10^9$/L vidi se statistički značajan trend porasta bolesnika s limfopenijom s obzirom na jaču ekspresiju c-FLIP-a (14%, 47% i 70% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom c-FLIP-a ima limfopeniju definiranu na taj način; P=0.025).

Analizom u podgrupama bolesnika s različitim rizikom uočili smo da je ovaj fenomen jasnije prisutan u bolesnika s manje proširenom/manje aktivnom bolesti, dok nije bio statistički značajan u bolesnika s uznapredovalom bolesti, ali pokazuje vrlo jasnu tendenciju povezanosti izražaja c-FLIP-a i limfopenije. Povezanost c-FLIP i limfopenije bila je prisutna u bolesnika s Ann Arbor I i II (0%, 50% i 80% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom c-FLIP; P=0.018), a nije bila statistički značajna u bolesnika s Ann Arbor III i IV (25%, 58% i 63% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom c-FLIP; P=0.466). Slično tome limfopenija <1.5 $x10^9$/L je bila prisutna u bolesnika s odsustvom B simptoma (0%, 33% i 100% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom c-FLIP; P=0.012), a nije bila statistički značajna u bolesnika s B simptomima (25%, 67% i 57% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom c-FLIP; P=0.403), Također, bila je prisutna u bolesnika s limitiranom bolesti (0%, 33% i 100% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom c-FLIP; P=0.027), dok nije bila statistički značajna u bolesnika s uznapredovalom bolesti (33%, 44% i 60% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom C-FLIP; P=0.274).

Nismo zamijetili povezanost s drugim kliničkim karakteristikama.

Slika 4: Negativna povezanost nižeg apsolutnog broja limfocita i ekspresije c-FLIP.



Tablica 2: Ekspresija c-FLIP u odnosu na kliničke karakteristike bolesnika.

	Negativna c-FLIP ekspresija (1)	**Slaba c-FLIP ekspresija (2)**	**Jaka c-FLIP ekspresija (3)**	Ukupna P vrijednost za razliku**	P vrijednost za trend
Broj bolesnika	7/40(17.5%)	22/40 (55%)	11/40(27.5)	-	-
Dob bolesnika (godine)	36.9 IQR (24.7 - 53.2)	33 IQR (27.7 - 45)	28.9 IQR (22.2 - 49.7)	0.724	0.507
<45 godina	4/7 (57.1%)	16/22(72.7%)	7/11 (63.6%)		
≥45 godina	3/7 (42.9%)	6/22 (27.3%)	4/11 (36.4%)	0.708	0.879
Spol					
M	5/7 (71.4%)	7/22 (31.8%)	6/11 (54.5%)		
Ž	2/7 (28.6%)	15/22(68.2%)	5/11 (45.5%)	0.141	0.701
Dijagnoza					
NS	**3/7 (42.9%)**	**20/22(90.9%)**	**10/11(90.9)**	**0.010* (1 vs 2)**	
ostali	4/7 (57.1%)	2/22 (9.1%)	1/11 (9.1%)		**0.020***
Ann Arbor					
I	0/7 (0%)	0/22 (0%)	1/11 (9.1%)		0.169
II	4/7 (57.1%)	13/22 (59.1%)	4/11 (36.4%)		0.316
III	0/7 (0%)	5/22 (22.7%)	3/11 (27.3%)		0.190
IV	3/7 (42.9%)	4/22 (18.2%)	3/11 (27.3%)	0.374	0.582
B simptomi					
Da	4/7 (57.1%)	10/22 (45.5%)	8/11 (72.7%)		
Ne	3/7 (42.9%)	12/22 (54.5%)	3/11 (27.3%)	0.330	0.388
Limitirana bolest					
Uznapredovala bolest	3/7 (42.9%) 4/7 (57.1%)	9/22 (40.9%) 13/22 (59.1%)	2/11 (18.2%) 9/11 (81.8%)	0.388	0.230
Bulky bolest					
Da	3/7 (42.9%)	4/22 (18.2%)	2/10 (20%)		
Ne	4/7 (57.1%)	18/22 (81.8%)	8/10 (80%)	0.388	0.327
Ekstranodalna bolest					
Da	2/7 (28.6%)	8/22 (36.4%)	3/10 (30%)		
Ne	5/7 (71.4%)	14/22 (63.6%)	7/10 (70%)	0.899	1.000
Splenomegalija					
Da	0/7 (0%)	3/22 (13.6%)	1/10 (10%)		
Ne	7/7 (100%)	19/22 (86.4%)	9/10 (90%)	0.585	0.577
Hemoglobin (g/L)	124.1 ±20.6	119 ±18.8	121.8 ±13.9	0.902	0.837
<105 g/L	1/7 (14.3%)	5/21 (23.8%)	1/11 (9.1%)		
≥105 g/L	6/7 (85.7%)	16/21 (76.2%)	10/11(90.9%)	0.566	0.656
Leukociti	8.7 IQR (7.7 -	10 IQR (8.9 -	8.9 IQR (7.9 -	0.209	0.909

($x10^9$/L)	9.6)	14.9)	9.9)		
≥15 $x10^9$/L	1/7 (14.3%)	5/21 (23.8%)	1/11 (9.1%)	0.566	0.656
<15 $x10^9$/L	6/7 (85.7%)	16/21 (76.2%)	10/11 (90.9%)		
Aps. limfociti ($x10^9$/L)	**2.2 IQR (1.8 - 3)**	**1.5 IQR (1.1 - 2)**	**1.3 IQR (0.98 - 1.6)**	**0.052 (1 vs 3)**	**0.015***
<0.6 $x10^9$/L	0/7 (0%)	3/21 (14.3%)	2/10 (20%)		
≥0.6 $x10^9$/L	7/7 (100%)	18/21 (85.7%)	8/10 (80%)	0.474	0.246
Albumin (g/L)	43.4 ±5.5	40.3 ±5.1	42 ±3.6	0.288	0.681
<40 g/L	1/7 (14.3%)	10/21 (47.6%)	2/10 (20%)		
≥40 g/L	6/7 (85.7%)	11/21 (52.4%)	8/10 (80%)	0.149	0.989
SE (mm/h)	70.6 ±41.3	62.9 ±37.5	56.8 ±27.9	0.776	0.483
GHSG (ograničena bolest)	2 IQR (1 - 2)	1 IQR (0 - 1)	1 IQR (1 - 1)	0.806	0.775
GHSG nepovoljni	2/3 (66.7%)	5/9 (55.6%)	2/2 (100%)	0.492	0.546
EORTC (ograničena bolest)	1 IQR (0.5- 1)	1 IQR (0 - 1)	1.5 IQR (1.25 - 1.75)	0.322	0.323
EORTC nepovoljni	2/3 (66.7%)	5/9 (55.6%)	2/2 (100%)	0.492	0.546
IPS (uznapredovala bolest)	2.5 IQR (1.8 - 3.3)	3 IQR (1 - 4)	2 IQR (1 - 4)	0.985	0.904
IPS nepovoljni	2/4 (50%)	7/13 (53.8%)	4/9 (44.4%)	0.910	0.773
Monociti ($x10^9$/L)	0.5 IQR (0.5 - 0.8)	0.6 IQR (0.5 - 0.7)	0.6 IQR (0.5 - 0.9)	0.887	0.758
LMR (ly/mo ratio)	2.8 IQR (1.7 - 4.7)	2.4 IQR (1.4 - 3.3)	2.2 IQR (1.445 - 2.929)	0.454	0.257

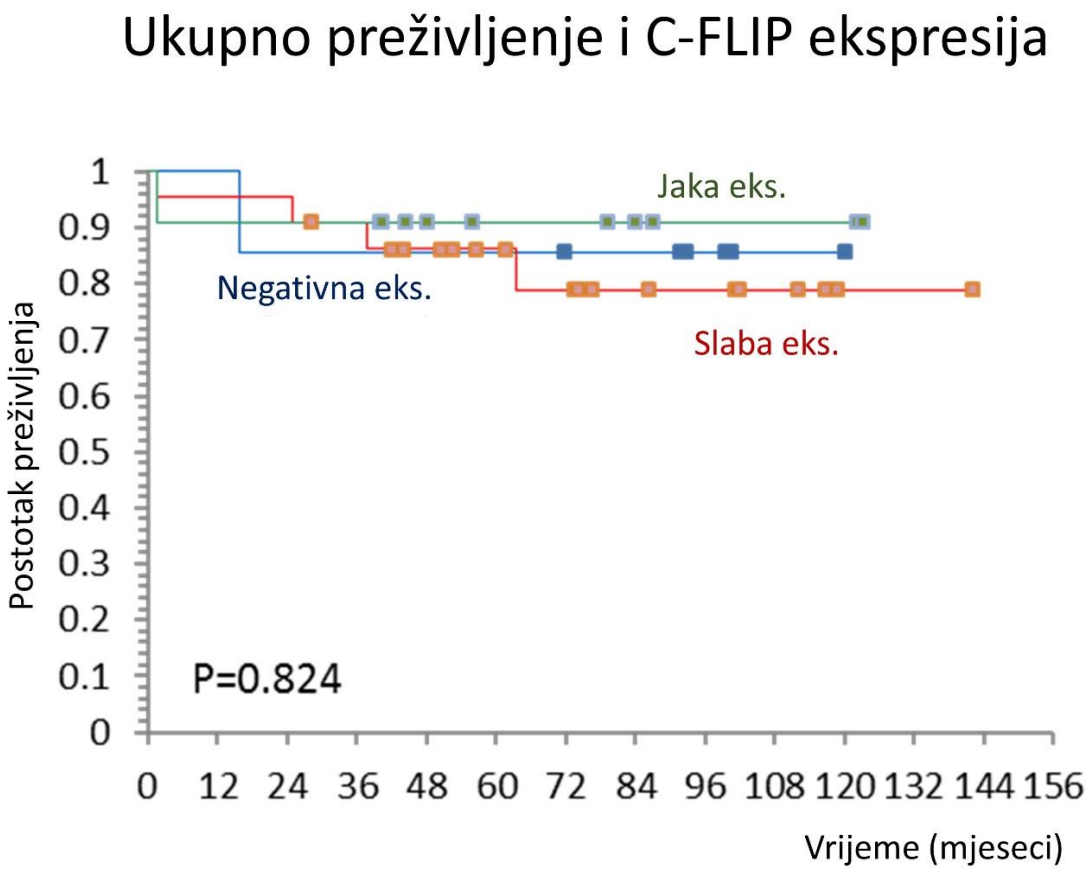
*statistički značajno na razini P<0.05

**u slučaju ukupno značajnog/blizu značajnog rezultata u zagradi su dane podgrupe među kojima je prisutna statistički značajna razlika (P<0.05)

Ekspresija c-FLIP-a nije utjecala na OS, TTDP niti PFS (P>0.05 za sve analize) u našoj kohorti bolesnika (Slike 5., 6., 7.)

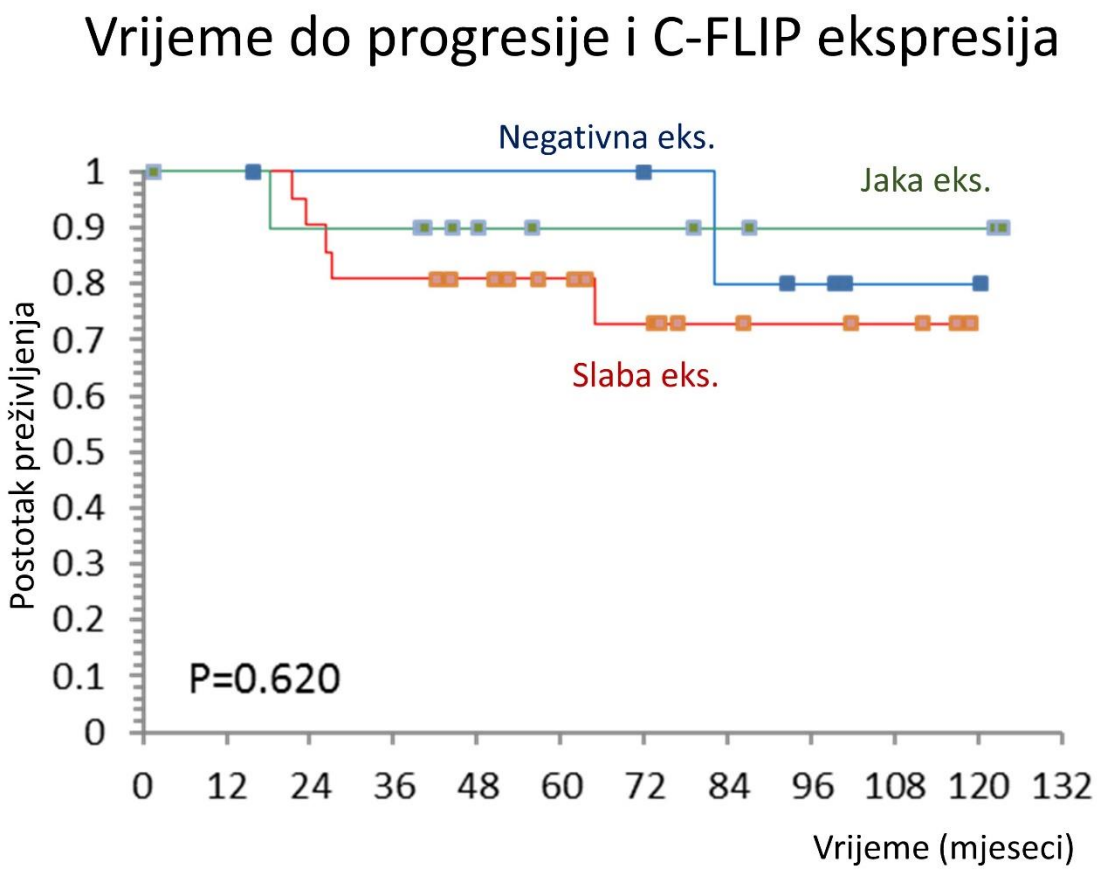
Slika 5: Povezanost c-FLIP i OS.

Medijan OS nije dostignut niti u jednoj podgrupi bolesnika.



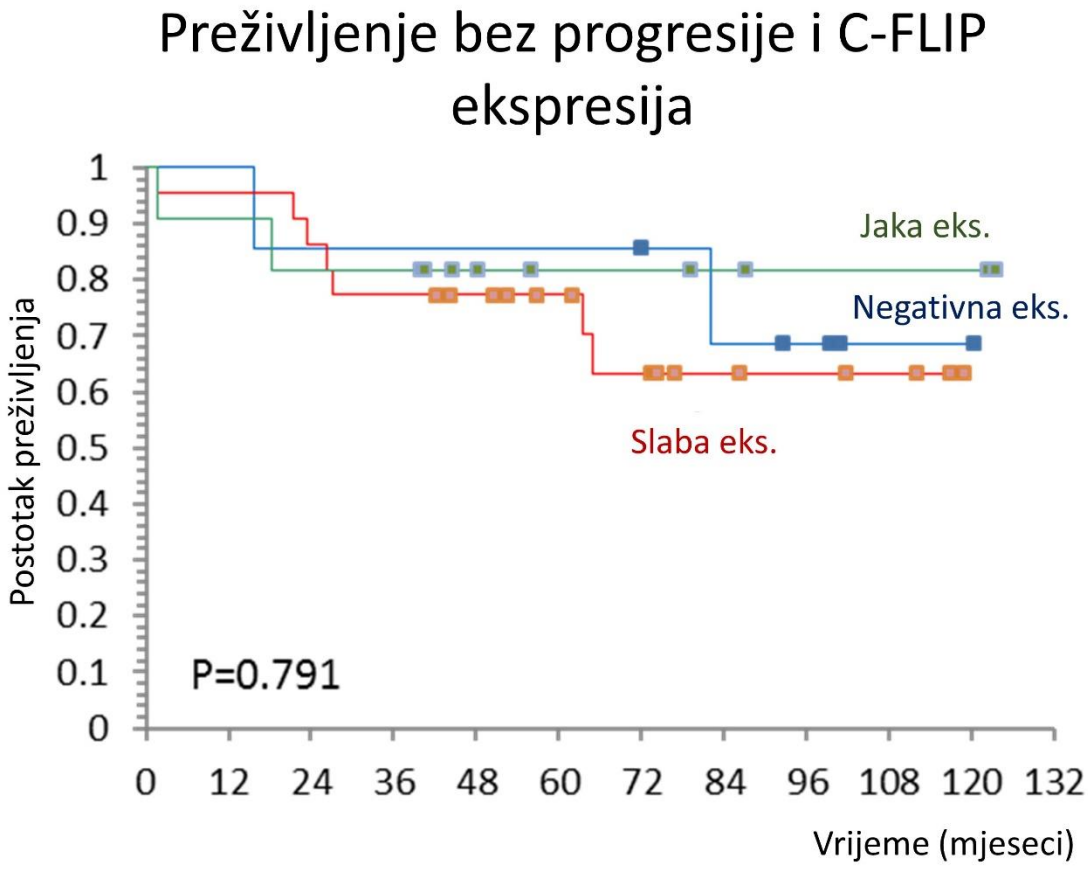
Slika 6**:** Povezanost c-FLIP i TTDP.

Medijan TTDP nije dostignut niti u jednoj podgrupi bolesnika.



Slika 7: Povezanost c-FLIP i PFS.

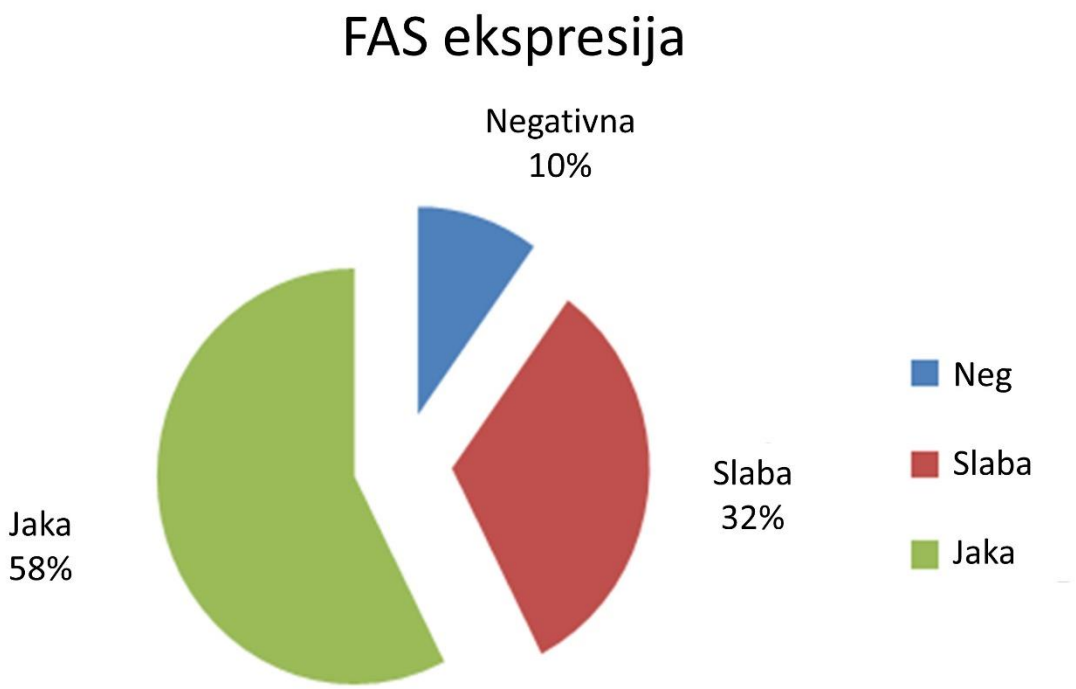
Medijan PFS nije dostignut niti u jednoj podgrupi bolesnika.



5.3. Ekspresija Fas

Od ukupno 40 bolesnika, 4 (10%) je bilo negativno na Fas, 13 (32%) je slabo eksprimiralo, a 23 (58%) je jako eksprimiralo Fas (Slika 8.).

Slika 8: Prikaz udjela bolesnika prema ekspresiji Fas.



Fas ekspresija nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC i IPI skorovima (P>0.05 za sve analize). Ekspresija Fas u odnosu na kliničke karakteristike bolesnika i prognostičke skorove prikazana je u Tablici 3. Nismo utvrdili statistički značaje korelacije.

Tablica 3: Ekspresija Fas u odnosu na kliničke karakteristike bolesnika.

	Negativna Fas ekspresija (1)	**Slaba Fas ekspresija (2)**	**Jaka Fas ekspresija (3)**	Ukupna P vrijednost za razliku**	P vrijednost za trend
Broj bolesnika	4/40 (10%)	13/40 (32.5%)	23/40 (57.5%)	-	-
Dob bolesnika (godine)	30.3 IQR (22.9 - 43.7)	33.7 IQR (27.3 - 46)	32.2 IQR (25.7 - 50.9)	0.819	0.932
<45 godina	3/4 (75%)	9/13 (69.2%)	15/23 (65.2%)		
≥45 godina	1/4 (25%)	4/13 (30.8%)	8/23 (34.8%)	0.916	0.678
Spol					
M	1/4 (25%)	6/13 (46.2%)	11/23 (47.8%)		
Ž	3/4 (75%)	7/13 (53.8%)	12/23 (52.2%)	0.695	0.492
Dijagnoza		12/13			
NS	2/4 (50%)	(92.3%)	19/23 (82.6%)		
ostali	2/4 (50%)	1/13 (7.7%)	4/23 (17.4%)	0.150	0.411
Ann Arbor					
I	0/4 (0%)	0/13 (0%)	1/23 (4.3%)		0.428
II	4/4 (100%)	7/13 (53.8%)	10/23 (43.5%)		0.060
III	0/4 (0%)	1/13 (7.7%)	7/23 (30.4%)		0.059
IV	0/4 (0%)	5/13 (38.5%)	5/23 (21.7%)	0.246	0.892
B simptomi					
Da	2/4 (50%)	7/13 (53.8%)	13/23 (56.5%)		
Ne	2/4 (50%)	6/13 (46.2%)	10/23 (43.5%)	0.966	0.794
Ograničena bolest					
Uznapredovala bolest	2/4 (50%) 2/4 (50%)	4/13 (30.8%) 9/13 (69.2%)	8/23 (34.8%) 15/23 (65.2%)	0.779	0.748
Bulky bolest					
Da	0/4 (0%)	4/13 (30.8%)	5/22 (22.7%)		
Ne	4/4 (100%)	9/13 (69.2%)	17/22 (77.3%)	0.442	0.633
Ekstranodalna bolest					
Da	0/4 (0%)	7/13 (53.8%)	6/22 (27.3%)		
Ne	4/4 (100%)	6/13 (46.2%)	16/22 (72.7%)	0.090	1.000
Splenomegalija					
Da	0/4 (0%)	3/13 (23.1%)	1/22 (4.5%)		
Ne	4/4 (100%)	10/13(76.9%)	21/22 (95.5%)	0.169	0.507
Hemoglobin (g/L)	115.8 ±13.8	125.3 ±21.3 2/12 (16.7%)	119.1 ±16.1	0.441	0.690
<105 g/L	1/4 (25%)	10/12	4/23 (17.4%)		
≥105 g/L	3/4 (75%)	(83.3%)	19/23 (82.6%)	0.926	0.800

Leukociti ($x10^9$/L)	8.9 IQR (8.3 - 9.2)	9.9 IQR (7.9 - 16.9)	9.5 IQR (7.9 - 10.4)	0.175	0.976
≥15 $x10^9$/L	0/4 (0%)	4/12 (33.3%)	3/23 (13%)		
<15 $x10^9$/L	4/4 (100%)	8/12 (66.7%)	20/23 (87%)	0.204	0.800
Aps. limfociti ($x10^9$/L)	2.1 IQR (1.6 - 2.2)	1.6 IQR (1.2 - 2.6)	1.4 IQR (1 - 1.8)	0.388	0.189
<0.6 $x10^9$/L	1/4 (25%)	1/12 (8.3%)	3/22 (13.6%)		
≥0.6 $x10^9$/L	3/4 (75%)	11/12 (91.7%)	18/22 (81.8%)	0.653	0.917
Albumin (g/L)	41.8 ±2.2	42.6 ±5.6	40.5 ±4.8	0.537	0.328
<40 g/L	1/4 (25%)	3/12 (25%)	9/22 (40.9%)		
≥40 g/L	3/4 (75%)	9/12 (75%)	13/22 (59.1%)	0.594	0.353
SE (mm/h)	71.8 ±38	59.1 ±35.6	63 ±36.1	0.848	0.986
GHSG (ograničena bolest)	0 IQR (0 - 0)	2.5 IQR (1.5 - 3)	1 IQR (0.75 - 1)	0.096	0.833
GHSG nepovoljni	0/2 (0%)	3/4 (75%)	6/8 (75%)	0.122	0.101
EORTC (ograničena bolest)	0 IQR (0 - 0)	1 IQR (1 - 1.3)	1 IQR (0 - 1)	0.095	0.739
EORTC nepovoljni	0/2 (0%)	4/4 (100%)	5/8 (62.5%)	0.054	0.382
IPS (uznapredovala bolest)	2.5 IQR (1.8 - 3.3)	3 IQR (1 - 4)	2 IQR (1 - 4)	0.954	0.801
IPS nepovoljni	1/2 (50%)	6/9 (66.7%)	6/15 (40%)	0.449	0.355
Monociti ($x10^9$/L)	0.6 IQR (0.4 - 0.7)	0.7 IQR (0.5 - 1)	0.6 IQR (0.5 - 0.7)	0.417	0.561
LMR (ly/mo ratio)	4 IQR (2.7 - 6.2)	2.3 IQR (1.6 - 2.9)	2.2 IQR (1.55 - 3.2)	0.413	0.586

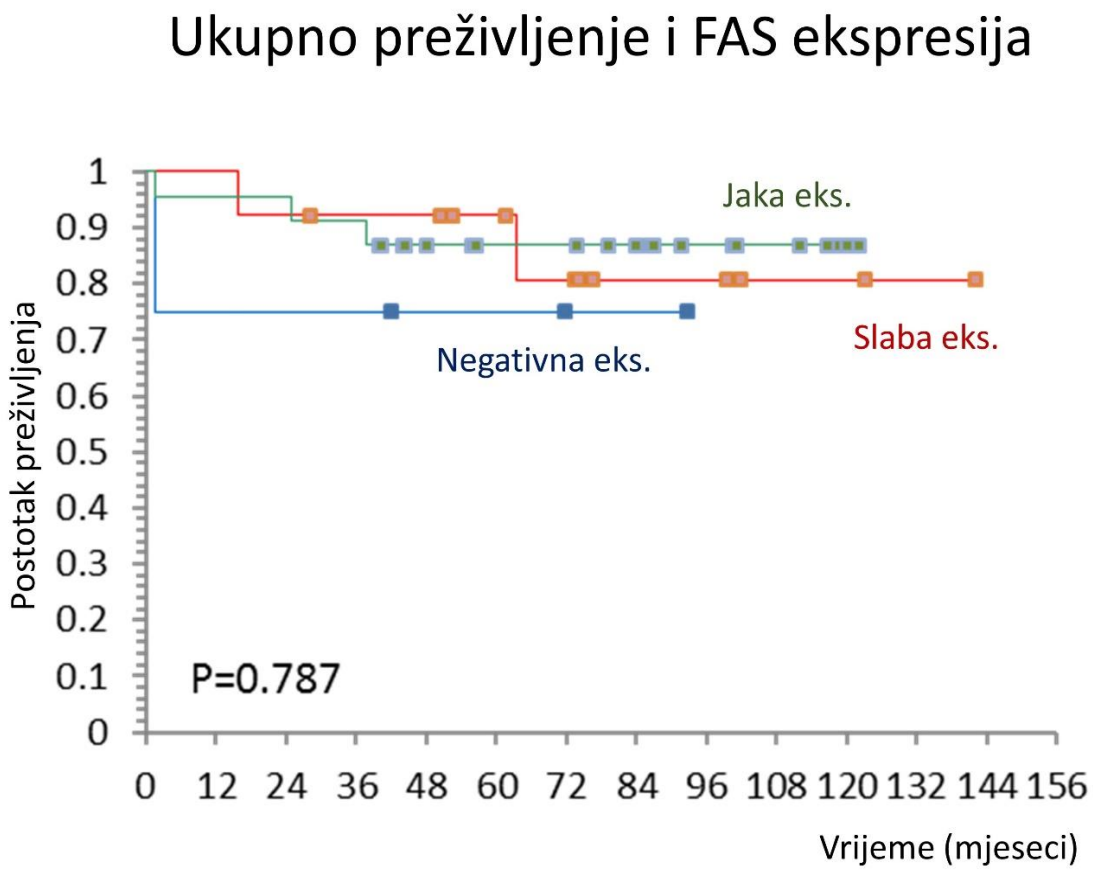
*statistički značajno na razini P<0.05

**u slučaju ukupno značajnog/blizu značajnog rezultata u zagradi su dane podgrupe među kojima je prisutna statistički značajna razlika (P<0.05)

Ekspresija Fas nije utjecala na OS, TTDP niti PFS (P>0.05 za sve analize) u našoj kohorti bolesnika (Slike 9., 10. i 11.)

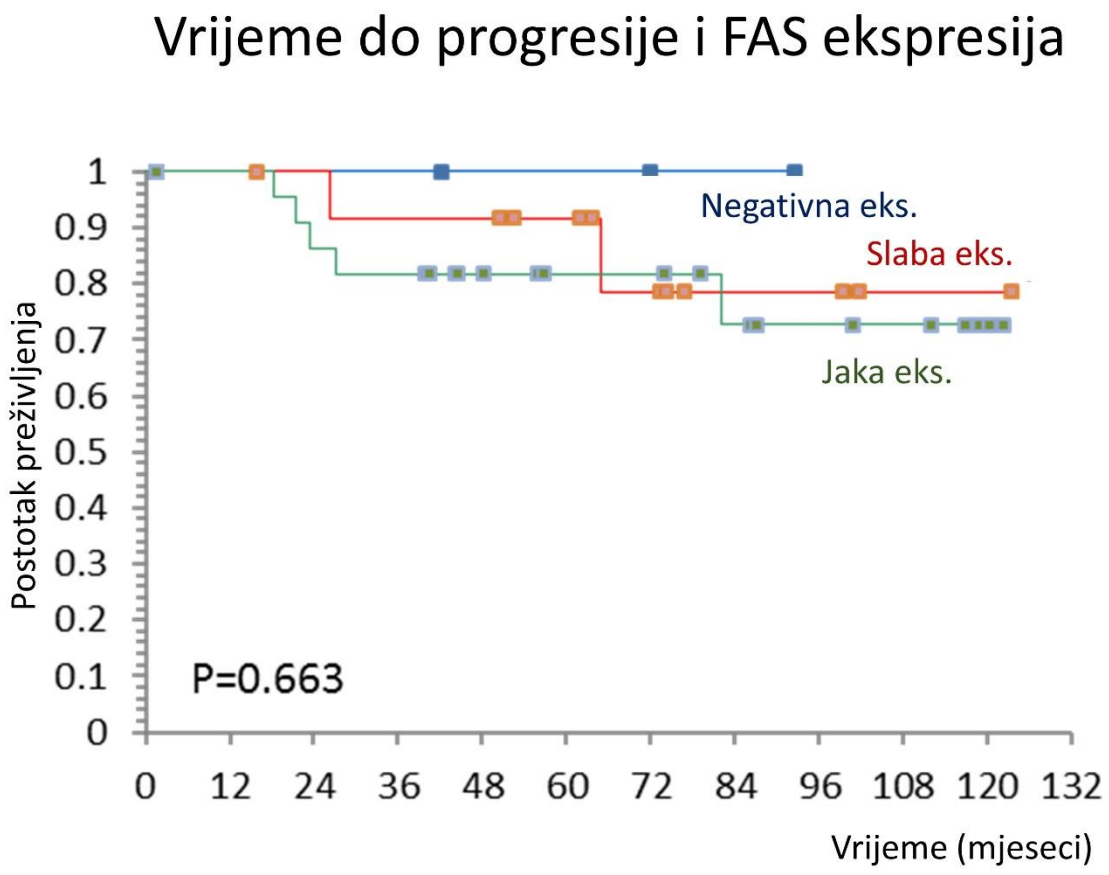
Slika 9: Povezanost Fas i OS.

Medijan OS nije dostignut niti u jednoj podgrupi bolesnika.



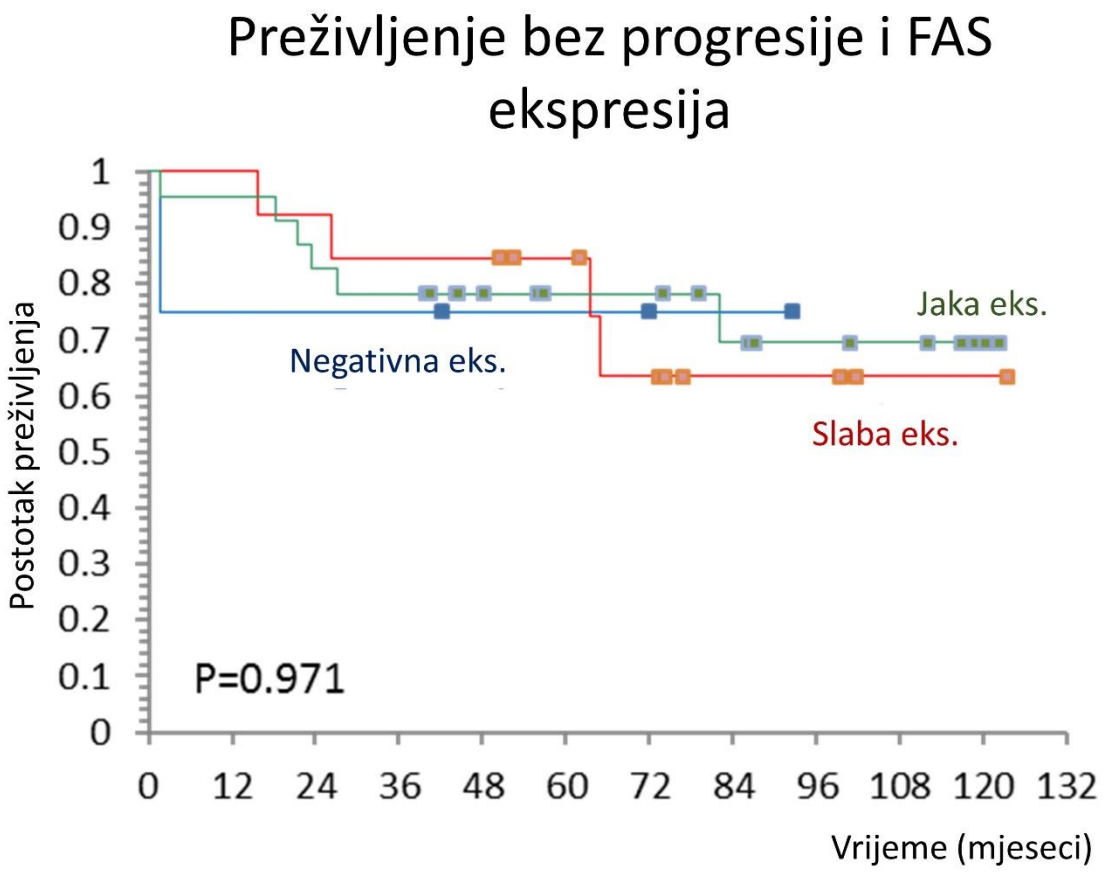
Slika 10: Povezanost Fas i TTDP.

Medijan TTDP nije dostignut niti u jednoj podgrupi bolesnika.



Slika 11: Povezanost Fas i PFS.

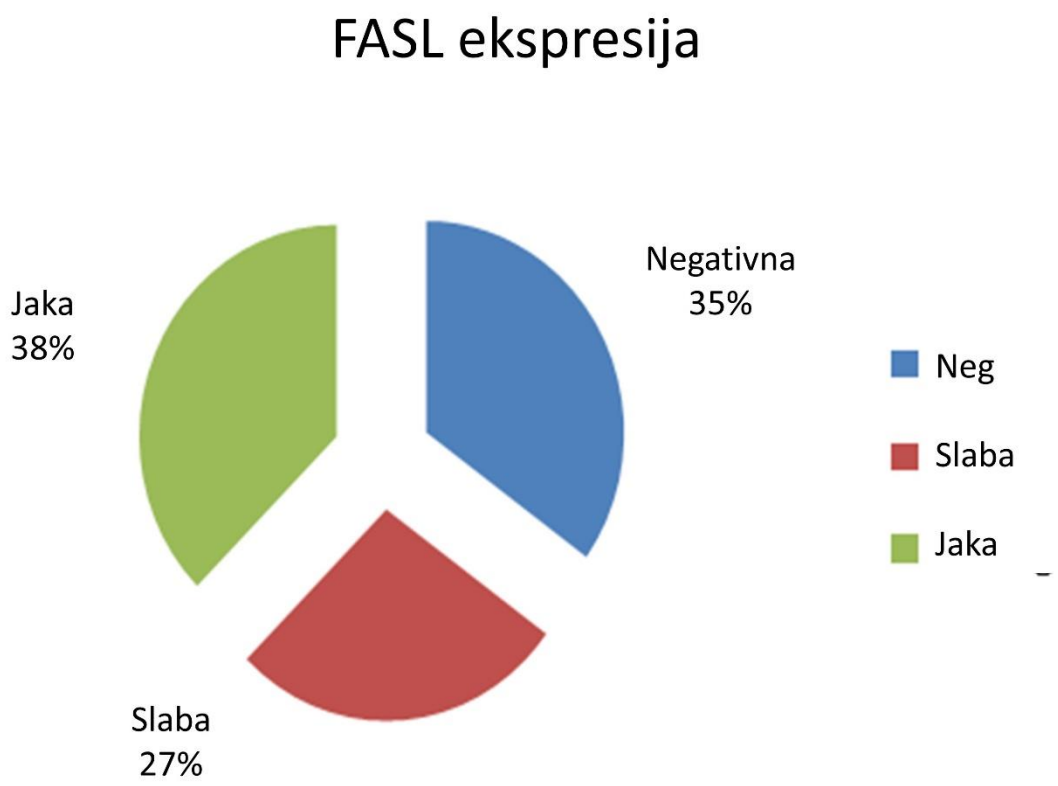
Medijan PFS nije dostignut niti u jednoj podgrupi bolesnika.



5.4. Ekspresija FasL

Od ukupno 40 bolesnika, 14 (35%) je bilo negativno na FasL, 11 (27%) je slabo eksprimiralo, a 15 (38%) je jako eksprimiralo FasL (Slika 12.).

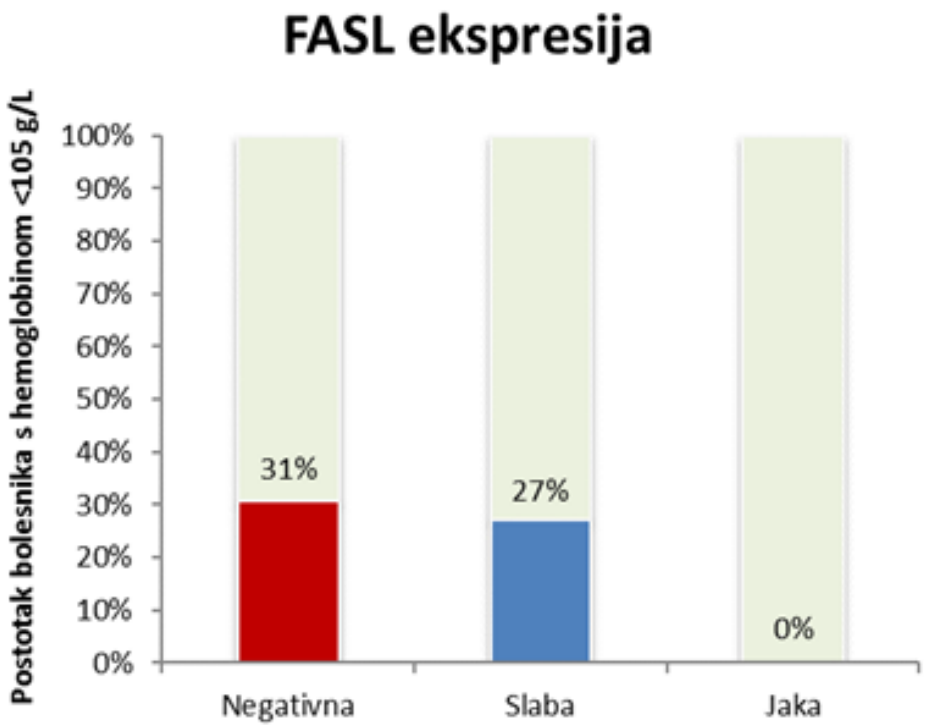
Slika 12: Prikaz udjela bolesnika prema ekspresiji FasL.



FasL ekspresija nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC skorovima (P>0.05 za obje analize), ali je bila povezana s prognostički povoljnom podgrupom bolesnika prema IPS skoru (P=0.018). Ekspresija FasL u odnosu na kliničke karakteristike bolesnika i prognostičke skorove prikazana je u Tablici 4. Bolesnici sa snažnijom ekspresijom FasL rjeđe su imali anemiju (P=0.032) (Slika 13.)

Povezanost slabije FasL ekspresije i anemije bila je prisutna u bolesnika s izraženim B simptomima (50%, 29% i 0% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom FasL; P=0.028), dok nije bila statistički značajna u bolesnika bez B simptoma (14%, 25% i 0% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom FasL; P=0.395). Slično tome povezanost je bila prisutna u bolesnika s uznapredovalom bolesti (44%, 25% i 0% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom FasL; P=0.033), dok nije bila statistički značajna u bolesnika s ograničenom bolesti (0%, 33% i 0% bolesnika s negativnom, slabom i jakom ekspresijom FasL; P=0.796).

Slika 13: Među bolesnicima s jačom ekspresijom FasL bio je manji udio bolesnika s anemijom (hemoglobin <105 g/L)



Tablica 4: Ekspresija FasL u odnosu na kliničke karakteristike bolesnika.

	Negativna FasL ekspresija (1)	**Slaba FasL ekspresija (2)**	**Jaka FasL ekspresija (3)**	Ukupna P vrijednost za razliku**	P vrijednost za trend
Broj bolesnika	14/40 (35%)	11/40(27.5%)	15/40 (37.5%)	-	-
Dob bolesnika (godine)	31.4 IQR (26 - 57.4)	36.9 IQR (26.5 - 47.2)	32.2 IQR (25.1 - 46.2)	0.875	0.611
<45 godina	9/14 (64.3%)	8/11 (72.7%)	10/15 (66.7%)		
≥45 godina	5/14 (35.7%)	3/11 (27.3%)	5/15 (33.3%)	0.901	0.897
Spol					
M	6/14 (42.9%)	4/11 (36.4%)	8/15 (53.3%)		
Ž	8/14 (57.1%)	7/11 (63.6%)	7/15 (46.7%)	0.678	0.563
Dijagnoza					
NS	11/14(78.6%)	9/11 (81.8%)	13/15 (86.7%)		
ostali	3/14 (21.4%)	2/11 (18.2%)	2/15 (13.3%)	0.846	0.566
Ann Arbor					
I	0/14 (0%)	0/11 (0%)	1/15 (6.7%)		0.246
II	6/14 (42.9%)	7/11 (63.6%)	8/15 (53.3%)		0.583
III	4/14 (28.6%)	2/11 (18.2%)	2/15 (13.3%)		0.307
IV	4/14 (28.6%)	2/11 (18.2%)	4/15 (26.7%)	0.766	0.915
B simptomi					
Da	7/14 (50%)	7/11 (63.6%)	8/15 (53.3%)		
Ne	7/14 (50%)	4/11 (36.4%)	7/15 (46.7%)	0.783	0.867
Ograničena bolest	4/14(28.6%)	3/11 (27.3%)	7/15 (46.7%)		
Uznapredovala bolest	10/14(71.4%)	8/11 (72.7%)	8/15 (53.3%)	0.487	0.302
Bulky bolest					
Da	4/14 (28.6%)	2/11 (18.2%)	3/14 (21.4%)		
Ne	10/14(71.4%)	9/11 (81.8%)	11/14 (78.6%)	0.815	0.654
Ekstranodalna bolest					
Da	6/14 (42.9%)	3/11 (27.3%)	4/14 (28.6%)		
Ne	8/14 (57.1%)	8/11 (72.7%)	10/14 (71.4%)	0.639	0.423
Splenomegalija					
Da	1/14 (7.1%)	2/11 (18.2%)	1/14 (7.1%)		
Ne	13/14(92.9%)	9/11 (81.8%)	13/14 (92.9%)	0.593	1.000
Hemoglobin (g/L)	118.2 ±22.8	117.3 ±14.8	125.3 ±13.9	0.526	0.331
<105 g/L	**4/13 (30.8%)**	**3/11 (27.3%)**	**0/15 (0%)**		
≥105 g/L	**9/13 (69.2%)**	**8/11 (72.7%)**	**15/15 (100%)**	**0.068**	**0.032***
Leukociti	10.1 IQR (7.8	9 IQR (8.3 -	9.5 IQR (7.8 -	0.794	0.549

($x10^9$/L)	- 14.9)	11.3)	10)		
≥15 $x10^9$/L	3/13 (23.1%)	2/11 (18.2%)	2/15 (13.3%)	0.799	0.503
<15 $x10^9$/L	10/13(76.9%)	9/11 (81.8%)	13/15 (86.7%)		
Aps. limfociti	1.4 IQR (0.8 -				
($x10^9$/L)	2.1)	1.7 IQR (1.2	1.4 IQR (1.2 -		
<0.6 $x10^9$/L	2/13 (15.4%)	- 2.2)	1.8)	0.754	0.971
≥0.6 $x10^9$/L	10/13	2/11 (18.2%)	1/14 (7.1%)		
	(76.9%)	9/11 (81.8%)	13/14 (92.9%)	0.690	0.519
Albumin (g/L)	39.7 ±5.9	40.6 ±4.2	43.4 ±3.8	0.123	0.055
<40 g/L	6/13 (46.2%)	5/11 (45.5%)	2/14 (14.3%)		
≥40 g/L	7/13 (53.8%)	6/11 (54.5%)	12/14 (85.7%)	0.141	0.078
SE (mm/h)	77 ±42.6	57.4 ±32.7	54.6 ±28.4	0.386	0.231
GHSG (ograničena bolest)	1 IQR (0 - 2.3)	0 IQR (0 - 0.5)	1 IQR (1 - 1.5)	0.361	0.559
GHSG nepovoljni	2/4 (50%)	1/3 (33.3%)	6/7 (85.7%)	0.222	0.179
EORTC (ograničena bolest)	1 IQR (0.8 - 1.3)	0 IQR (0 - 0.5)	1 IQR (0.5 - 1)	0.422	0.989
EORTC nepovoljni	3/4 (75%)	1/3 (33.3%)	5/7 (71.4%)	0.448	0.963
IPS (uznapredovala bolest)	3 IQR (3 - 4)	1.5 IQR (0.8 - 4)	2 IQR (1 - 2.75)	0.324	0.240
IPS nepovoljni	**8/10 (80%)**	**3/8 (37.5%)**	**2/8 (25%)**	**0.047***	**0.018***
Monociti ($x10^9$/L)	0.6 IQR (0.5 - 1)	0.5 IQR (0.5 - 0.9)	0.6 IQR (0.5 - 0.7)	0.433	0.247
LMR (ly/mo ratio)	1.7 IQR (1.2 - 2.8)	3 IQR (2.1 - 4)	2.4 IQR (1.65 - 3.2)	0.209	0.247

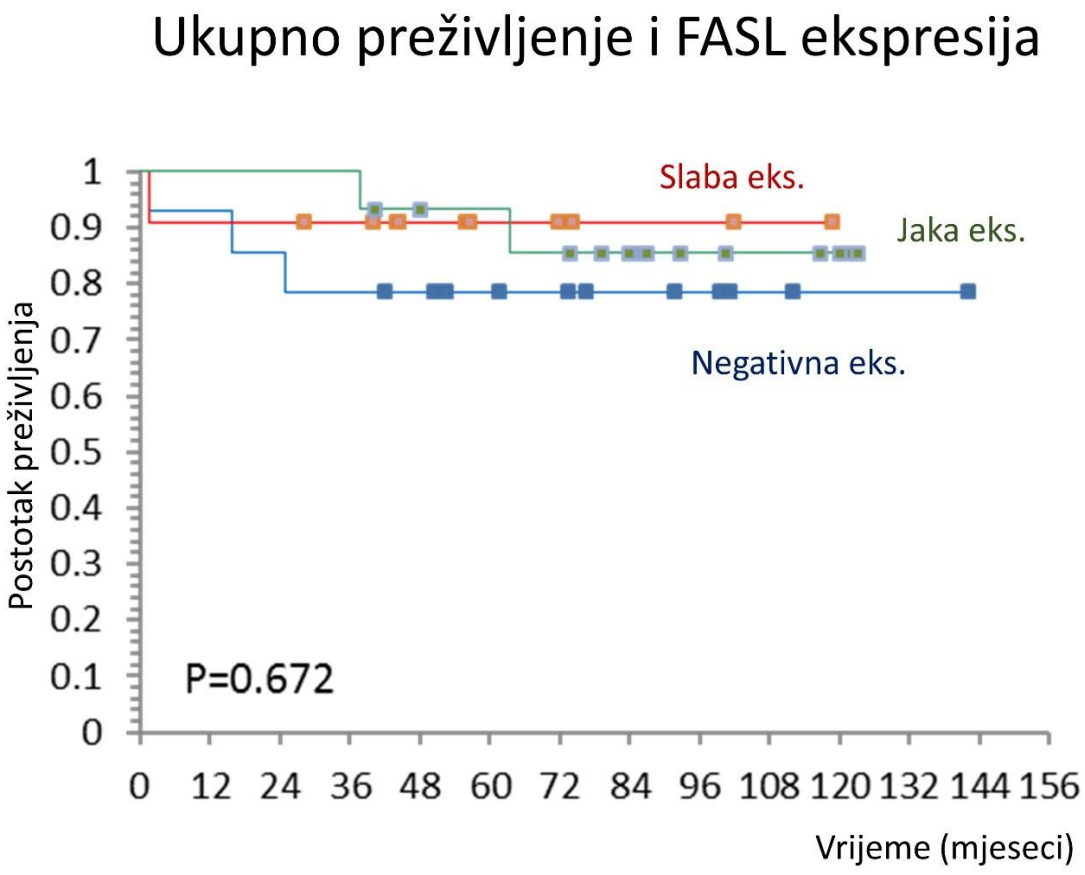
*statistički značajno na razini P<0.05

**u slučaju ukupno značajnog/blizu značajnog rezultata u zagradi su dane podgrupe među kojima je prisutna statistički značajna razlika (P<0.05)

Ekspresija FasL nije utjecala na OS, TTDP niti PFS (P>0.05 za sve analize) u našoj kohorti bolesnika (Slike 14., 15.,16.). Obzirom na oblik krivulja, postoje naznake da bi negativna ekspresija FasL mogla biti povezana s kraćim vremenom do progresije i kraćim PFS.

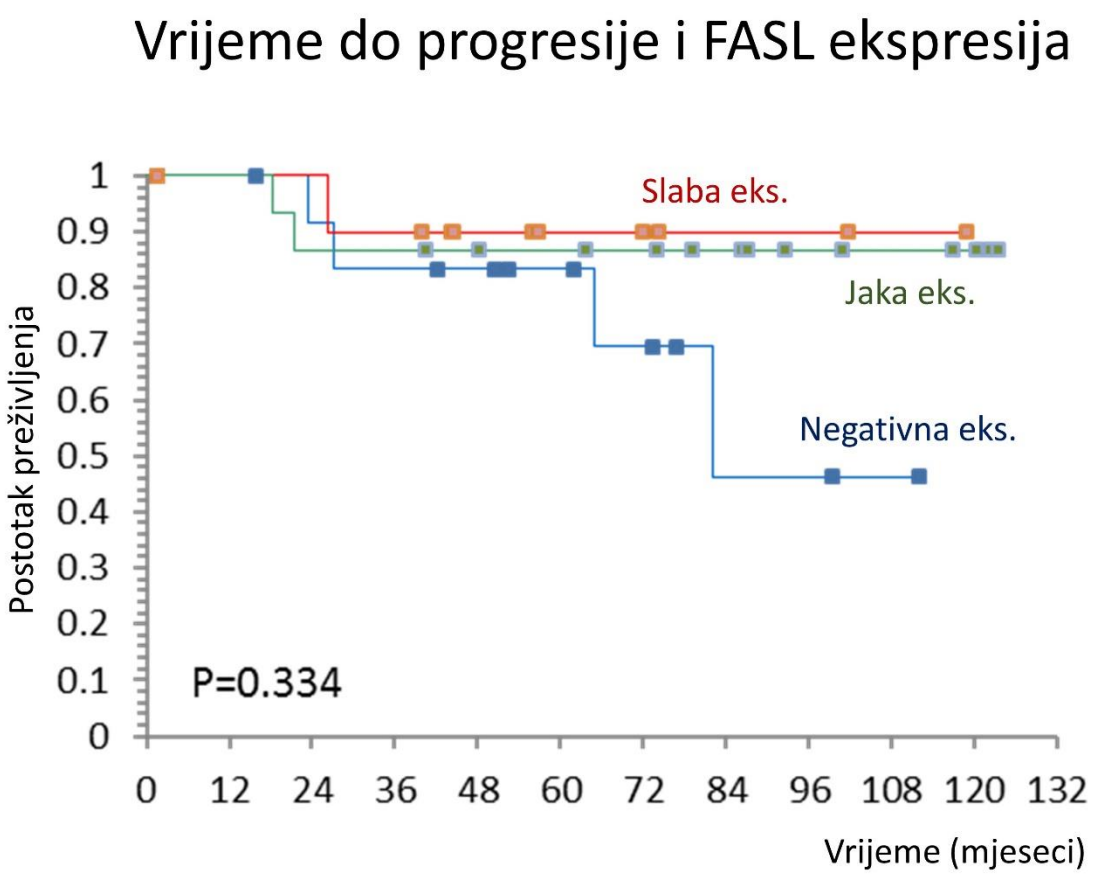
Slika 14: Povezanost FasL i OS.

Medijan OS nije dostignut niti u jednoj podgrupi bolesnika.



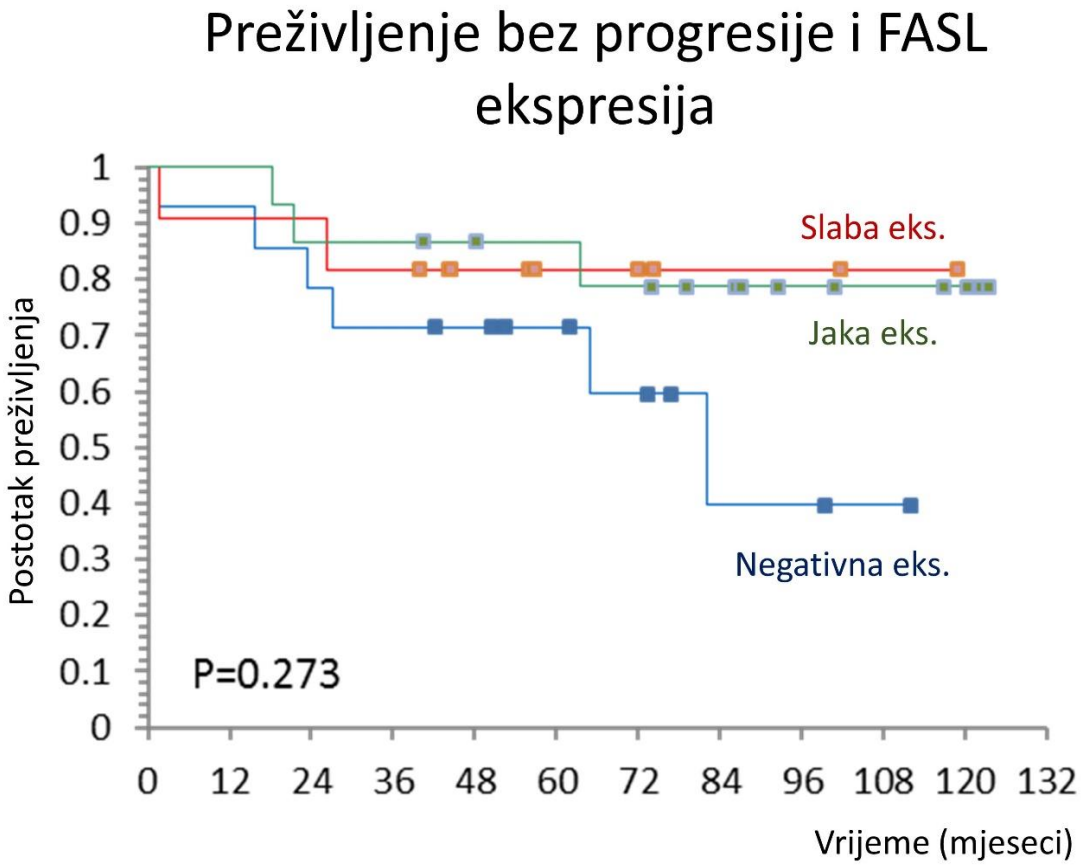
Slika 15: Povezanost FasL i TTDP.

Medijan TTDP nije dostignut u skupinama bolesnika sa slabom i jakom ekspresijom dok je bio 82 mjeseca u onih s negativnom.



Slika 16: Povezanost FasL i PFS.

Medijan PFS nije dostignut u skupinama bolesnika sa slabom i jakom ekspresijom dok je bio 82 mjeseca u onih s negativnom.



6. RASPRAVA

Ova studija je, prema našim saznanjima, prva u kojoj je ispitan odnos ekspresije faktora apoptotičkog puta ovisnog o Fas te c-FLIP proteina kao njegovog inhibitora na Hodgkin/Reed-Sternbergovoj stanici s priznatim kliničkim prognostičkim sustavima u klasičnom obliku Hodgkinovog limfoma. Po prvi put smo pokazali da bolesnici s jačom ekspresijom c-FLIP proteina na tumorskoj stanici imaju značajno češće limfopenije te da je jaka ekspresija c-FLIP-a povezana s podtipom nodularne skleroze, koji je i najčešći histološki tip Hodgkinovog limfoma. Važno je naglasiti da je broj bolesnika u našoj kohorti s drugim histološkim podtipovima vrlo mali zbog čega ne možemo sa sigurnošću tvrditi kakva je ekspresija c-FLIP-a u preostalim histološkim oblicima. Međutim, naš rezultat ipak sugerira da je jača ekspresija c-FLIP-a povezana prvenstveno s podtipom nodularne skleroze. Većina bolesnika imala je pozitivnu ekspresiju c-FLIP proteina (33/40; 83%) što je u skladu s dosad objavljenim radovima.

Osim s fenotipom nodularne skleroze jača ekspresija c-FLIP-a također je bila povezana s nižim apsolutnim brojem limfocita. Limfopenija je poznata karakteristika klasičnog oblika Hodgkinovog limfoma. Snižen apsolutni broj limfocita je neovisno povezan s lošijom prognozom, iako se u radovima često koriste različite apsolutne granične vrijednosti (106)(107)(108). Nitko od bolesnika u našoj kohorti s jakom ekspresijom c-FLIP-a nije imao apsolutne limfocite više od 1.8 $x10^9$/L. Važno je naglasiti da u našoj studiji nismo zasebno ispitivali povezanost ekspresije c-FLIP-a i različitih gradacija dubine limfopenije, nego samo povezanost s limfopenijom, arbitrarno određenom kao ALC ≤1.5 x109/L (što je i definicija limfopenije u većini radova) i s granicom vrijednosti limfocita <0.6 × 109/L (granica teške limfopenije prema Hasenclever indeksu). Prema prvoj navedenoj definiciji limfopenije vidi se statistički značajan trend porasta bolesnika s obzirom na jaču ekspresiju c-FLIP-a. Analizom u podgrupama bolesnika s različitim rizikom uočili smo da je ovaj fenomen prisutan jasnije u bolesnika s manje proširenom/manje aktivnom bolesti, dok nije bio statistički značajan u bolesnika s uznapredovalom bolesti. Vjerojatno isto vrijedi i za granicu definiranu prema Hasencleverovom indeksu (teška limfopenija), ali nismo to uspjeli pokazati kao statistički značajan rezultat zbog ograničenog broja ispitanika uključenih u istraživanje. Ipak, dobiveni rezultati ukazuju na jasnu tendenciju produbljenja limfopenije s jačom ekspresijom c-FLIP-a. Naš rezultat upućuje da već i u ograničenim stadijima Hodgkinovog limfoma postoji limfopenija

ukoliko je jače eksprimiran c-FLIP. Mehanizam kojim bi c-FLIP utjecao na smanjenje broja cirkulirajućih limfocita je nejasan. Moguće je da je jača ekspresija c-FLIP-a i blokiranje Fas, čime se promijenila uloga Fas u protumorsku, utjecala na način i jačinu signalizacije i izlučivanje upalnih citokina (npr. smanjenjem izlučivanja IL-2) te na taj način još jačeg djelovanja na mikrookoliš i supresiju limfocita. Također, blokada apoptoze, na neki način „oslobađa“ i potiče tumorski protunapad, s obzirom na prisutan izražaj Fas i FasL na HRS stanicama. S obzirom na blokadu apoptoze od strane c-FLIP-a moguće je da stimulacija Fas receptora topljivim oblikom FasL (sFasL, soluble FasL) koji nastaje razgradnjom mFasL metaloproteinazama (52) ima, kako je u literaturi i opisano, ulogu u promoviranju tumorskog rasta (53), a time moguće pridonosi i limfopeniji. Zanimljiva bi mogla biti i pretpostavka da se zbog jake ekspresije c-FLIP-a ne realizira biološki pretpostavljena apoptoza HRS stanice preko Fas/FasL. Zbog biološkog nastojanja imunološkog sustava da ipak eliminira HRS stanicu dolazi do porasta ekspresije Fas na površini HRS stanice. Ta povećana ekspresija Fas mogla bi dovesti do olakšanog vezanja s FasL na limfocitima mikrookoliša tj. limfocitima koji infiltriraju tumor, i posljedično, limfopenije.

C-FLIP ekspresija nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC i IPS skorovima ($P>0.05$ za sve analize). Također, kod ostalih faktora koji sačinjavaju kliničke prognostičke sustave nije bilo korelacije s jačinom ekspresije c-FLIP proteina. Ekspresija c-FLIP proteina nije utjecala na OS, TTDP niti PFS ($p>0.05$ za sve usporedbe) u našoj kohorti bolesnika. Moguće je da učinak kemoterapije poništava i negativan efekt jake ekspresije c-FLIP. Navedeno je relativno teško ispitati obzirom na odlične rezultate liječenja Hodgkinovog limfoma danas. Istraživanja će svakako biti konkluzivnija uključenjem većeg broja bolesnika i njihovim dužim praćenjem.

Od ukupno 40 bolesnika njih 90% bilo je pozitivno na Fas. Od toga njih 13 (32%) je imalo slabu, a 23 (58%) jaku ekspresiju Fas. Navedeno je sukladno dosadašnjim podacima iz literature (103). Naime, za razliku od solidnih tumora u klasičnim oblicima Hodgkinovog limfoma nalazimo jaku ekspresiju Fas. Unatoč tome, ne dolazi do pojačane apoptoze, ponajviše zahvaljujući inkorporaciji c-FLIP-a u DISC, nego naprotiv, Fas izražava “protumorski” efekt. Fas ekspresija također nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC i IPS skorovima ($P>0.05$ za sve analize). Usporedbom ekspresije Fas s kliničkim

karakteristikama bolesnika i njihove bolesti nismo utvrdili statistički značaje korelacije. Također, ekspresija Fas nije utjecala na OS, TTDP niti PFS ($p>0.05$ za sve usporedbe) u našoj kohorti bolesnika.

Ekspresija FasL bila je prisutna u 26 od 40 (65%) naših bolesnika. Od toga je njih 11 (27%) imalo slabu, a 15 (38%) jaku ekspresiju FasL. Navedeno je u suprotnosti s rijetkim radovima o ekspresiji FasL na Reed-Sternbergovoj stanici (103). Naime, HRS stanica rijetko izražava FasL, dok je u našoj kohorti više od trećine bolesnika imalo jaku ekspresiju, a dodatna trećina slabu, ali prisutnu ekspresiju FasL. Ekspresija FasL nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC skorovima ($P>0.05$ za obje analize), ali je bila povezana s prognostički povoljnom podgrupom bolesnika prema IPS skoru.

Naši rezultati pokazuju povezanost između slabije ekspresije FasL i lošije prognoze u bolesnika s uznapredovalom bolešću. To se vidi iz značajno većeg udjela bolesnika s nepovoljnim IPS-om u skupinama s manjom ekspresijom FasL. Također, krivulje preživljenja bez progresije moguće pokazuju tendenciju lošije prognoze bolesnika s negativnom ekspresijom FasL. Čini se da je vrijeme do progresije kraće u bolesnika s negativnom ekpresijom FasL. Nepostojanje statističke značajnosti rezultata u smislu PFS-a posljedica je malog broja događaja u istraživanoj grupi bolesnika.

Usporedbom kliničko-patoloških karakteristika bolesnika s ekspresijom FasL, vidljivo je da su u našoj kohorti bolesnici s jačom ekspresijom FasL rjeđe imali anemiju od bolesnika s negativnom ekspresijom. Povezanost slabije FasL ekspresije i anemije bila je prisutna u bolesnika s izraženim B simptomima, dok nije bila statistički značajna u bolesnika bez B simptoma. Slično tome povezanost je bila prisutna u bolesnika s uznapredovalom bolesti, dok nije bila statistički značajna u bolesnika s ograničenom bolesti. Nema puno poveznica između aktivacije Fas/FasL apotpotičkog puta i anemije u hematološkim bolestima. Postoji nekoliko istraživanja tog puta u patogenezi teške aplastične anemije (severe aplastic anemia, SAA) gdje je nađena značajno jača ekspresija FasL u CD8+ limfocitima kod bolesnika sa SAA u odnosu na kontrolu, što je shvaćeno kao uzrok pojačane apoptoze hematopoetskih stanica u toj bolesti (109). U studiji u kojoj je ispitivana ekspresija FasL u koštanoj srži bolesnika s mijelodisplastičnim sindromom (MDS) i akutnom mijeloičnom leukemijom (AML), nađena je značajno jača ekspresija FasL u odnosu na kontrole. Bolesnici s jačom ekspresijom FasL imali su značajno niže vrijednosti

hemoglobina. Jaka ekspresija FasL kod bolesnika s MDS-om korelirala je s lošijim ukupnim preživljenjem (110). Nije jasan mehanizam kojim bi pojačana ekspresija FasL kod naših bolesnika utjecala na manju učestalost anemije. Činjenica je da se kod prethodno opisanih bolesti radi o stanicama koje su u koštanoj srži, a anemija se objašnjava pojačanom apoptozom hematopoetskih, posebno eritroidnih prekursora. U klasičnim oblicima Hodgkinovog limfoma infitracija koštane srži nije česta. No, opisano je i da FasL u kulturi hematopoetskih stanica ima protektivnu ulogu inhibirajući apoptozu (111), a da FasL ima i trofičke efekte na hematopoetske progenitore (112). Navedeno bi moglo objasniti i protektivni učinak FasL, oslobađanjem FasL u cirkulaciju (soluble Fas, sFas) s površine HRS stanice. U našoj studiji jača ekspresija FasL na HRS stanici pokazala se na neki način "protektivnom", pogotovo u uznapredovalim stadijima bolesti. Naime, osim pojedinačnog utjecaja na manju učestalost anemije i bolesnici s uznapredovalom bolesti i jačim izražajem FasL imali su, kako je već spomenuto, povoljniji IPS. U skupini s negativnom ekspresijom FasL čak 80% bolesnika s uznapredovalom bolesti imalo je nepovoljniji IPS, nasuprot samo 25% u skupini s jakim izražajem FasL. Navedeno je svojevrsno iznenađenje, s obzirom da se ekpresija FasL obično smatra negativnom karakteristikom, ali ranije spomenuto govori i o mogućnosti stimulativnog učinka FasL na hematopoezu (dualna uloga FasL). Sveukupno, ekspresija FasL u našoj studiji nije utjecala na OS, TTDP niti PFS ($p>0.05$ za sve usporedbe), no postoje naznake da bi nedostatak ekspresije mogao biti povezan s kraćim TTDP i PFS-om.

Ograničenja ovog rada su relativno mali broj bolesnika, heterogena populacija, iskustvo jednog centra i retrospektivni dizajn studije. Unatoč tome, naši rezultati ukazuju na moguću važnost medijatora apoptoze u patofiziologiji klasičnog Hodgkinovog limfoma. Neki od ispitivanih proteina mogli bi predstavljati zanimljive terapijske ciljeve, kao i potencijalno korisne prognostičke biomarkere.

7. ZAKLJUČAK

Zaključno, c-FLIP ima dokazano bitnu ulogu u izbjegavanju apoptoze od strane HRS stanice u klasičnom obliku Hodgkinovog limfoma. Naši rezultati sugeriraju da je jača ekspresija c-FLIP-a povezana s najčešćim histološkim podtipom, nodularnom sklerozom. Limfopenija je značajan negativni prognostički faktor kod bolesnika s klasičnim Hodgkinovim limfomom i jedini čimbenik koji jasno korelira s ekspresijom c-FLIP-a u našoj kohorti bolesnika. No, c-FLIP ekspresija nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC i IPI skorovima. Istraživanja će svakako biti konkluzivnija uključenjem većeg broja bolesnika i njihovim dužim praćenjem. Za razliku od nekih radova, trećina naših bolesnika imala je jaku ekspresiju FasL. FasL ekspresija nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC skorovima, ali je bila povezana s prognostički povoljnom podgrupom bolesnika prema IPS skoru. Naši rezultati pokazuju povezanost između slabije ekspresije FasL i lošije prognoze kod bolesnika s uznapredovalom bolesti. Bolesnici s jakom ekspresijom FasL imali su značajno manju učestalost anemije od bolesnika s negativnom ekspresijom. Navedeno je vjerojatno rezultat kompleksnih interakcija s mikrookolišem koje su za sada nepoznate. Obzirom na rezultate naše studije imunohistokemijsko određivanje ekspresije Fas, FasL i c-FLIP-a bi, zbog jednostavnosti izvedbe, moglo biti od dodatne pomoći kao biološko-prognostički parametar pri dijagnozi klasičnog oblika Hodgkinovog limfoma.

8. SAŽETAK

Hodgkinova/Reed Sternbergova stanica je stanica porijekla B limfocita i kompleksnim interakcijama sa svojim okolišem odgovorna je za biološke i kliničke efekte bolesti. HRS stanice obično nemaju izražen B-stanični receptor (BcR). Normalne stanice germinativnog centra limfnog čvora koje nemaju izražen ovaj receptor eliminiraju se preko apoptotičkog puta ovisnog o Fas. Smatra se da je za rezistenciju HRS stanice na Fas posredovanu apoptozu odgovoran c-FLIP protein. Iako je patogeneza Hodgkinovog limfoma, a time i mehanizmi preživljavanja Reed Sternbergove stanice već dugo istraživana, postoji malo relevantnih radova o utjecaju Fas i FasL proteina na klinički tijek i prognozu bolesti. Korelacijom između imunohistokemijske ekspresije markera apoptoze i laboratorijsko-kliničkih parametara koji sačinjavaju poznate prognostičke indekse (EORTC/GHSG, IPS) u našoj kohorti bolesnika utvrdili smo po prvi puta da bolesnici s jačom ekspresijom c-FLIP proteina na HRS stanici imaju značajno češće limfopeniju te da je jaka ekspresija c-FLIP-a povezana s podtipom nodularne skleroze, koji je i najčešći histološki tip Hodgkinovog limfoma. No, c-FLIP ekspresija nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC i IPS skorovima. FasL ekspresija nije bila povezana s prognostički nepovoljnom skupinom bolesnika prema GHSG, EORTC skorovima, ali je bila povezana s prognostički povoljnom podgrupom bolesnika prema IPS skoru. Također, jača ekspresija FasL povezana je sa značajno nižom učestalošću anemije. Usporedbom ekspresije Fas, FasL i c-FLIP s ostalim kliničkim karakteristikama bolesnika i njihove bolesti nismo utvrdili statistički značajne korelacije. Nije bilo utjecaja jačine ekspresije navedenih proteina, pa ni c-FLIP-a na ukupno preživljenje ili vrijeme do progresije bolesti.

9. SUMMARY

Hodgkin/Reed Sternberg cell is a cell of lymphocyte B origin and due to its complex interactions with its microenvironment, is responsible for biological and clinical manifestations of Hodgkin lymphoma. HRS cells usually lack B-cell receptor (BcR). Normal lymph node cells without BcR undergo Fas (CD95)-mediated apoptosis. Mechanisms of HRS cell survival, although explored, have not been truly elucidated yet. It is believed that c-FLIP mediates resistance of HRS to Fas-mediated apoptosis. Correlation between immunohistochemical expression of apoptosis markers and clinical and laboratory parameters integrated in standardized prognostic indexes (EORTC/GHSG/IPS) in our study cohort showed for the first time that patients with stronger c-FLIP expression had significantly more lymphopenias. Also, expression of c-FLIP showed strong correlation to nodular sclerosis subtype, which is the most common histologic type of Hodgkin lymphoma. C-FLIP expression did not correlate with unfavourable prognosis according to GHSG, EORTC and IPS. There were significantlly less patients with unfavourable IPS score in group of patients with stronger FasL expression. Also, patients with stronger FasL expression had significantly less anemia compared to those without it. Comparison of Fas, FasL and c-FLIP expression with other clinical and laboratory parameters did not show any statistically significant correlations. Expression of any of these proteins did not show influence on overall survival or time to disease progression in our study cohort.

Željko Prka, 2019.

10. POPIS LITERATURE

1. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. Med Chir Trans [Internet]. 1832 [cited 2018 Apr 5];17:68–114. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20895597

2. Kaushansky K, Williams WJ (William J. Williams hematology. McGraw-Hill Medical; 2010. 2439 p.

3. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1994 Nov 8 [cited 2018 Apr 4];91(23):10962–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7971992

4. Green AR, Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD. Postgraduate Haematology [Internet]. John Wiley & Sons; 2011 [cited 2018 Apr 4]. Available from: https://www.wiley.com/en-us/Postgraduate+Haematology%2C+6th+Edition-p-9781444348057

5. Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. Hematology [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2018 Apr 4];2009(1):491–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008234

6. Maggio EM, Van Den Berg A, de Jong D, Diepstra A, Poppema S. Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. Am J Pathol [Internet]. 2003 Jan [cited 2018 Apr 4];162(1):29–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507887

7. Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann M-L, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. Int J Cancer [Internet]. 2006 Apr 15 [cited 2018 Apr 4];118(8):1853–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385563

8. Tiacci E, Döring C, Brune V, Noesel CJM Van, Klapper W, Falini B, et al. Analyzing

primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin. 2013;120(23):4609–20.

9. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. Differential Targeting of Prosurvival Bcl-2 Proteins by Their BH3-Only Ligands Allows Complementary Apoptotic Function. Mol Cell [Internet]. 2005 Feb 4 [cited 2018 Apr 4];17(3):393–403. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15694340

10. Oster SK, Ho CSW, Soucie EL, Penn LZ. The myc oncogene: MarvelouslY Complex. Adv Cancer Res [Internet]. 2002 [cited 2018 Apr 4];84:81–154. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11885563

11. Jundt F, Anagnostopoulos I, Förster R, Mathas S, Stein H, Dörken B. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. Blood [Internet]. 2002 May 1 [cited 2018 Apr 4];99(9):3398–403. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11964309

12. Jiwa NM, Kanavaros P, van der Valk P, Walboomers JM, Horstman A, Vos W, et al. Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed-Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus. J Clin Pathol [Internet]. 1993 Mar [cited 2018 Apr 4];46(3):211–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385158

13. Jundt F, Acikgöz Ö, Kwon S-H, Schwarzer R, Anagnostopoulos I, Wiesner B, et al. Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. Leukemia [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2018 Apr 4];22(8):1587–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18449208

14. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. Cancer Res [Internet]. 1971 Nov [cited 2018 Apr 4];31(11):1860–1. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5121694

15. Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, Nissen N, Cooper MR, Henderson ES, et al. Chemotherapy of Advanced Hodgkin's Disease with MOPP, ABVD, or MOPP

Alternating with ABVD. N Engl J Med [Internet]. 1992 Nov 19 [cited 2018 Apr 4];327(21):1478–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1383821

16. Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, Glick JH, Fisher RI, Connors JM, et al. Randomized Comparison of ABVD and MOPP/ABV Hybrid for the Treatment of Advanced Hodgkin's Disease: Report of an Intergroup Trial. J Clin Oncol [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2018 Apr 4];21(4):607–14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586796

17. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D, et al. Standard and Increased-Dose BEACOPP Chemotherapy Compared with COPP-ABVD for Advanced Hodgkin's Disease. N Engl J Med [Internet]. 2003 Jun 12 [cited 2018 Apr 4];348(24):2386–95. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa022473

18. Hasenclever D, Diehl V, Armitage JO, Assouline D, Björkholm M, Brusamolino E, et al. A Prognostic Score for Advanced Hodgkin's Disease. N Engl J Med [Internet]. 1998 Nov 19 [cited 2018 Apr 4];339(21):1506–14.

19. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer [Internet]. 1972 Aug [cited 2018 Apr 4];26(4):239–57. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027

20. Wickremasinghe RG, Hoffbrand A V. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. Blood [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2018 Apr 4];93(11):3587–600. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10339463

21. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans. Cell [Internet]. 1986 Mar 28 [cited 2018 Apr 4];44(6):817–29. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3955651

22. Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in C. elegans: past, present and future. Trends Genet [Internet]. 1998 Oct [cited 2018 Apr 4];14(10):410–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820030

23. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell [Internet]. 1996 Oct 18 [cited 2018 Apr 4];87(2):171. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861900

24. Korsmeyer SJ. Chromosomal Translocations in Lymphoid Malignancies Reveal Novel Proto-Oncogenes. Annu Rev Immunol [Internet]. 1992 Apr [cited 2018 Apr 4];10(1):785–807. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1591003

25. Festjens N, van Gurp M, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Bcl-2 Family Members as Sentinels of Cellular Integrity and Role of Mitochondrial Intermembrane Space Proteins in Apoptotic Cell Death. Acta Haematol [Internet]. 2004 [cited 2018 Apr 4];111(1–2):7–27. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14646342

26. Adams JM, Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. Cell Death Differ [Internet]. 2017;25(1):27–36. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cdd.2017.161

27. Susnow N, Zeng L, Margineantu D, Hockenbery DM. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. Semin Cancer Biol [Internet]. 2009 Feb [cited 2018 Apr 4];19(1):42–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138742

28. Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase Mechanisms. In: Advances in experimental medicine and biology [Internet]. 2008 [cited 2018 Apr 4]. p. 13–23. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437889

29. Yin X-M. Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death. Gene [Internet]. 2006 Mar 15 [cited 2018 Apr 4];369:7–19. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446060

30. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell [Internet]. 1997 Feb 7 [cited 2018 Apr 4];88(3):355–65. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039262

31. Bidère N, Su HC, Lenardo MJ. GENETIC DISORDERS OF PROGRAMMED CELL DEATH IN THE IMMUNE SYSTEM. Annu Rev Immunol [Internet]. 2006 Apr [cited 2018 Apr 4];24(1):321–52. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551252

32. Algeciras-Schimnich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. Mol Cell Biol [Internet]. 2002 Jan [cited 2018 Apr 4];22(1):207–20. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739735

33. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ [Internet]. 2003 Jan [cited 2018 Apr 4];10(1):26–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12655293

34. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. Nature [Internet]. 1994 Aug 25 [cited 2018 Apr 4];370(6491):650–2. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520535

35. Kägi D, Vignaux F, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. Science [Internet]. 1994 Jul 22 [cited 2018 Apr 4];265(5171):528–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7518614

36. Algeciras-Schimnich A, Pietras EM, Barnhart BC, Legembre P, Vijayan S, Holbeck SL, et al. Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2003 Sep 30 [cited 2018 Apr 4];100(20):11445–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504390

37. Tourneur L, Mistou S, Michiels F-M, Devauchelle V, Renia L, Feunteun J, et al. Loss of FADD protein expression results in a biased Fas-signaling pathway and correlates with the development of tumoral status in thyroid follicular cells. Oncogene [Internet]. 2003 May 9 [cited 2018 Apr 4];22(18):2795–804. Available from: http://www.nature.com/articles/1206399

38. Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature [Internet]. 1997 Jul 10 [cited 2018 Apr 4];388(6638):190–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9217161

39. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. Cytokine Growth Factor Rev [Internet]. 2003 Feb [cited 2018 Apr 4];14(1):53–66. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12485619

40. Newell MK, Desbarats J. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. Nat Med [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2018 Apr 4];6(8):920–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10932231

41. Jarad G, Wang B, Khan S, DeVore J, Miao H, Wu K, et al. Fas activation induces renal tubular epithelial cell beta 8 integrin expression and function in the absence of apoptosis. J Biol Chem [Internet]. 2002 Dec 6 [cited 2018 Apr 4];277(49):47826–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324452

42. Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schreglmann N, et al. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). Cell Death Differ [Internet]. 2006 Jan 8 [cited 2018 Apr 4];13(1):31–40. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16003386

43. Peter ME, Hadji A, Murmann AE, Brockway S, Putzbach W, Pattanayak A, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. Cell Death Differ [Internet]. 2015;22(4):549–59. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2015.3

44. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. Immunity [Internet]. 2009 Feb 20 [cited 2018 Apr 4];30(2):180–92. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239902

45. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. Nature [Internet]. 1993 Aug 26 [cited 2018 Apr 4];364(6440):806–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689176

46. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. J Exp Med [Internet]. 1996 Sep 1 [cited 2018 Apr 4];184(3):1075–82. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9064324

47. Motz GT, Santoro SP, Wang L-P, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, et al. Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. Nat Med [Internet]. 2014 Jun 4 [cited 2018 Apr 4];20(6):607–15. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24793239

48. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. J Exp Med [Internet]. 1993 Dec 1 [cited 2018 Apr 4];178(6):2231–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504062

49. Zhang Y, Liu Q, Zhang M, Yu Y, Liu X, Cao X. Fas Signal Promotes Lung Cancer Growth by Recruiting Myeloid-Derived Suppressor Cells via Cancer Cell-Derived PGE2. J Immunol [Internet]. 2009 Mar 15 [cited 2018 Apr 4];182(6):3801–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265159

50. Hoogwater FJH, Nijkamp MW, Smakman N, Steller EJA, Emmink BL, Westendorp BF, et al. Oncogenic K-Ras Turns Death Receptors Into Metastasis-Promoting Receptors in Human and Mouse Colorectal Cancer Cells. Gastroenterology [Internet]. 2010 Jun [cited 2018 Apr 4];138(7):2357–67. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188103

51. Trauzold A, Röder C, Sipos B, Karsten K, Arlt A, Jiang P, et al. CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. FASEB J [Internet]. 2005 Apr [cited 2018 Apr 4];19(6):620–2. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15670977

52. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. Nat Med [Internet]. 1998 Jan [cited 2018 Apr 4];4(1):31–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427603

53. O' Reilly LA, Tai L, Lee L, Kruse EA, Grabow S, Fairlie WD, et al. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis. Nature [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2018 Apr 4];461(7264):659–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794494

54. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2018 Apr 4];414(6859):105–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689955

55. Corsini NS, Sancho-Martinez I, Laudenklos S, Glagow D, Kumar S, Letellier E, et al. The Death Receptor CD95 Activates Adult Neural Stem Cells for Working Memory Formation and Brain Repair. Cell Stem Cell [Internet]. 2009 Aug 7 [cited 2018 Apr 4];5(2):178–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664992

56. Shell S, Park S-M, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA, et al. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2007 Jul 3 [cited 2018 Apr 4];104(27):11400–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600087

57. Ceppi P, Hadji A, Kohlhapp FJ, Pattanayak A, Hau A, Liu X, et al. CD95 and CD95L promote and protect cancer stem cells. Nat Commun [Internet]. 2014 Nov 4 [cited 2018 Apr 4];5:5238. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25366259

58. Hadji A, Ceppi P, Murmann AE, Brockway S, Pattanayak A, Bhinder B, et al. Death Induced by CD95 or CD95 Ligand Elimination. Cell Rep [Internet]. 2014 Apr 10 [cited 2018 Apr 4];7(1):208–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24656822

59. Peter ME. DICE. Cell Cycle [Internet]. 2014 May [cited 2018 Apr 4];13(9):1373–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24690893

60. Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F, et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. Nature [Internet]. 1997 Apr 3 [cited 2018 Apr 4];386(6624):517–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087414

61. Micheau O. Cellular FLICE-inhibitory protein: an attractive therapeutic target? Expert Opin Ther Targets [Internet]. 2003 Aug 2 [cited 2018 Apr 4];7(4):559–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12885274

62. Bagnoli M, Canevari S, Mezzanzanica D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: A key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. Int J Biochem Cell Biol [Internet]. 2010 Feb [cited 2018 Apr 4];42(2):210–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932761

63. Öztürk S, Schleich K, Lavrik IN. Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): Fine-tuners of life and death decisions. Exp Cell Res [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2018 Apr 4];318(11):1324–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22309778

64. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. Cell Death Differ [Internet]. 2012 Jan 11 [cited 2018 Apr 4];19(1):36–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075988

65. Safa AR, Day TW, Wu C-H. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. Curr Cancer Drug Targets [Internet]. 2008 Feb [cited 2018 Apr 4];8(1):37–46. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288942

66. Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. J Biol Chem [Internet]. 2009 Aug 14 [cited 2018 Apr 4];284(33):21777–81. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19473994

67. Ueffing N, Singh KK, Christians A, Thorns C, Feller AC, Nagl F, et al. A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-FLIP protein. Blood [Internet]. 2009 Jul 16 [cited 2018 Apr 4];114(3):572–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439735

68. Safa AR. Roles of c-FLIP in Apoptosis, Necroptosis, and Autophagy. J Carcinog Mutagen [Internet]. 2013 [cited 2018 Apr 4];Suppl 6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25379355

69. Fulda S. Targeting c-FLICE-like inhibitory protein (CFLAR) in cancer. Expert Opin Ther Targets [Internet]. 2013 Feb 20 [cited 2018 Apr 4];17(2):195–201. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23252466

70. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF- B Signals Induce the

Expression of c-FLIP. Mol Cell Biol [Internet]. 2001 Aug 15 [cited 2018 Apr 4];21(16):5299–305. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463813

71. Borrelli S, Candi E, Alotto D, Castagnoli C, Melino G, Viganò MA, et al. p63 regulates the caspase-8-FLIP apoptotic pathway in epidermis. Cell Death Differ [Internet]. 2009 Feb 17 [cited 2018 Apr 4];16(2):253–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18927586

72. Ricci MS, Jin Z, Dews M, Yu D, Thomas-Tikhonenko A, Dicker DT, et al. Direct Repression of FLIP Expression by c-myc Is a Major Determinant of TRAIL Sensitivity. Mol Cell Biol [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2018 Apr 4];24(19):8541–55. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15367674

73. Li W, Zhang X, Olumi AF. MG-132 Sensitizes TRAIL-Resistant Prostate Cancer Cells by Activating c-Fos/c-Jun Heterodimers and Repressing c-FLIP(L). Cancer Res [Internet]. 2007 [cited 2018 Apr 4];67(5):2247–55. Available from: https://pdfs.semanticscholar.org/ab3e/85ff137ddf7b068ba2ce4a81e8ce9f20e3e4.pdf

74. Wilkie-Grantham RP, Matsuzawa S-I, Reed JC. Novel Phosphorylation and Ubiquitination Sites Regulate Reactive Oxygen Species-dependent Degradation of Anti-apoptotic c-FLIP Protein. J Biol Chem [Internet]. 2013 May 3 [cited 2018 Apr 4];288(18):12777–90. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519470

75. Safa AR, Pollok KE. Targeting the Anti-Apoptotic Protein c-FLIP for Cancer Therapy. Cancers (Basel) [Internet]. 2011 Mar 29 [cited 2018 Apr 4];3(2):1639–71. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348197

76. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2008 Sep 2 [cited 2018 Apr 4];105(35):12815–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723680

77. Silke J, Strasser A. The FLIP Side of Life. Sci Signal [Internet]. 2013 Jan 15 [cited 2018 Apr 4];6(258):pe2-pe2. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322903

78. Dohrman A, Kataoka T, Cuenin S, Russell JQ, Tschopp J, Budd RC. Cellular FLIP (long form) regulates CD8+ T cell activation through caspase-8-dependent NF-kappa B activation. J Immunol [Internet]. 2005 May 1 [cited 2018 Apr 4];174(9):5270–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843523

79. Kataoka T. The caspase-8 modulator c-FLIP. Crit Rev Immunol [Internet]. 2005 [cited 2018 Apr 4];25(1):31–58. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15833082

80. PETER ME. The flip side of FLIP: Figure 1. Biochem J [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2018 Apr 4];382(2):e1. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15317488

81. Day TW, Huang S, Safa AR. c-FLIP knockdown induces ligand-independent DR5-, FADD-, caspase-8-, and caspase-9-dependent apoptosis in breast cancer cells. Biochem Pharmacol [Internet]. 2008 Dec 15 [cited 2018 Apr 4];76(12):1694–704. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840411

82. Leidal AM, Cyr DP, Hill RJ, Lee PWK, McCormick C. Subversion of Autophagy by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Impairs Oncogene-Induced Senescence. Cell Host Microbe [Internet]. 2012 Feb 16 [cited 2018 Apr 4];11(2):167–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22341465

83. Walsh CM, Edinger AL. The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis. Immunol Rev [Internet]. 2010 Jun 15 [cited 2018 Apr 4];236(1):95–109. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20636811

84. Ryu B-K, Lee M-G, Chi S-G, Kim Y-W, Park J-H. Increased expression of cFLIPL in colonic adenocarcinoma. J Pathol [Internet]. 2001 May [cited 2018 Apr 4];194(1):15–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11329136

85. Ullenhag GJ, Mukherjee A, Watson NFS, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG. Overexpression of FLIP L Is an Independent Marker of Poor Prognosis in Colorectal Cancer Patients. [cited 2018 Apr 4]; Available from: https://pdfs.semanticscholar.org/ae6e/1f529a613d137847ce165ead97bf9e52de13.pdf

86. Korkolopoulou P, Goudopoulou A, Voutsinas G, Thomas-Tsagli E, Kapralos P, Patsouris E, et al. c-FLIP expression in bladder urothelial carcinomas: its role in resistance to Fas-mediated apoptosis and clinicopathologic correlations. Urology [Internet]. 2004 Jun [cited 2018 Apr 4];63(6):1198–204. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183989

87. Wang W, Wang S, Song X, Sima N, Xu X, Luo A, et al. The relationship between c-FLIP expression and human papillomavirus E2 gene disruption in cervical carcinogenesis. 2007 [cited 2018 Apr 4]; Available from: https://pdfs.semanticscholar.org/da56/be2c51343d1c8b596b57bbcd3136ebe477ca.pdf

88. Valnet-Rabier M-B, Challier B, Thiebault S, Angonin R, Margueritte G, Mougin C, et al. c-Flip protein expression in Burkitt's lymphomas is associated with a poor clinical outcome. Br J Haematol [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2018 Apr 4];128(6):767–73. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2005.05378.x

89. Valente G, Manfroi F, Peracchio C, Nicotra G, Castino R, Nicosia G, et al. cFLIP expression correlates with tumour progression and patient outcome in non-Hodgkin lymphomas of low grade of malignancy. Br J Haematol [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2018 Apr 4];132(5):560–70. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.2005.05898.x

90. ZHOU X-D, YU J-P, LIU J, LUO H-S, CHEN H-X, YU H-G. Overexpression of cellular FLICE-inhibitory protein (FLIP) in gastric adenocarcinoma. Clin Sci [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2018 Apr 4];106(4):397–405. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636156

91. Haag C, Stadel D, Zhou S, Bachem MG, Moller P, Debatin K-M, et al. Identification of c-FLIPL and c-FLIPS as critical regulators of death receptor-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. Gut [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2018 Apr 4];60(2):225–37. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876774

92. McLornan D, Hay J, McLaughlin K, Holohan C, Burnett AK, Hills RK, et al. Prognostic and therapeutic relevance of c-FLIP in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol [Internet].

2013 Jan [cited 2018 Apr 4];160(2):188–98. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167276

93. Gilot D, Serandour A-L, Ilyin GP, Lagadic-Gossmann D, Loyer P, Corlu A, et al. A role for caspase-8 and c-FLIP L in proliferation and cell-cycle progression of primary hepatocytes. Carcinogenesis [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2018 Apr 4];26(12):2086–94. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033771

94. Golan-Gerstl R, Wallach-Dayan SB, Zisman P, Cardoso W V., Goldstein RH, Breuer R. Cellular FLICE-like Inhibitory Protein Deviates Myofibroblast Fas-Induced Apoptosis Toward Proliferation during Lung Fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol [Internet]. 2012 Sep [cited 2018 Apr 4];47(3):271–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22582174

95. Piao X, Komazawa-Sakon S, Nishina T, Koike M, Piao J-H, Ehlken H, et al. c-FLIP Maintains Tissue Homeostasis by Preventing Apoptosis and Programmed Necrosis. Sci Signal [Internet]. 2012 Dec 18 [cited 2018 Apr 4];5(255):ra93-ra93. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250397

96. Leverkus M, Diessenbacher P, Geserick P. FLIP ing the coin? Death receptor-mediated signals during skin tumorigenesis. Exp Dermatol [Internet]. 2008 Jul [cited 2018 Apr 4];17(7):614–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558995

97. Shen Y, Herde R, Doxey BW, Xu C, Gray PD, Kuwada SK. Pharmacologic downregulation of c-FLIPL restores juxtacrine death receptor-mediated apoptosis in cancer cells in a peritoneal carcinomatosis model. Int J Cancer [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2018 Apr 4];130(7):1494–503. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21480219

98. Naito M, Katayama R, Ishioka T, Suga A, Takubo K, Nanjo M, et al. Cellular FLIP Inhibits -Catenin Ubiquitylation and Enhances Wnt Signaling. Mol Cell Biol [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2018 Apr 4];24(19):8418–27. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15367663

99. Shirley S, Micheau O. Targeting c-FLIP in cancer. Cancer Lett [Internet]. 2013 May 28

[cited 2019 Apr 3];332(2):141–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071136

100. Yang JK. FLIP as an anti-cancer therapeutic target. Yonsei Med J [Internet]. 2008 Feb 29 [cited 2018 Apr 4];49(1):19–27. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18306465

101. Re D, Hofmann A, Wolf J, Diehl V, Staratschek-Jox A. Cultivated H-RS cells are resistant to CD95L-mediated apoptosis despite expression of wild-type CD95. Exp Hematol [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2018 Apr 4];28(3):348. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X00001478

102. Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, Schultze JL, Draube A, Vockerodt M, et al. Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. Am J Pathol [Internet]. 2002 Apr [cited 2018 Apr 4];160(4):1521–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943736

103. Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, Hummel F, Wiesner B, Janz M, et al. c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. J Exp Med [Internet]. 2004 Apr 19 [cited 2018 Apr 4];199(8):1041–52. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078899

104. Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. Mol Cell Biol [Internet]. 2001 Jun [cited 2018 Apr 4];21(12):3964–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359904

105. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, et al. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. J Exp Med [Internet]. 2002 Sep 2 [cited 2018 Apr 4];196(5):605–17. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208876

106. Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Kontopidou FN, Dimopoulou MN, Barbounis A, et al. Prognostic factors in advanced stage Hodgkin's lymphoma: the

significance of the number of involved anatomic sites. Eur J Haematol [Internet]. [cited 2018 Apr 5];67(5–6):279–88. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872075

107. Vassilakopoulos TP, Dimopoulou MN, Angelopoulou MK, Petevi K, Pangalis GA, Moschogiannis M, et al. Prognostic Implication of the Absolute Lymphocyte to Absolute Monocyte Count Ratio in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma Treated With Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastine, and Dacarbazine or Equivalent Regimens. Oncologist [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2018 Apr 5];21(3):343–53. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26921291

108. Low SE, Horsman JM, Walters SJ, Hancock H, Smith P, Linch D, et al. Risk-adjusted prognostic models for Hodgkin's disease (HD) and grade II non-Hodgkin's lymphoma (NHL II): validation on 6728 British National Lymphoma Investigation patients. Br J Haematol [Internet]. 2003 Jan [cited 2018 Apr 5];120(2):277–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542487

109. Liu CY, Fu R, Wang HQ, Li LJ, Liu H, Guan J, et al. Fas/FasL in the immune pathogenesis of severe aplastic anemia. Genet Mol Res [Internet]. 2014 May 30 [cited 2018 Apr 5];13(2):4083–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24938700

110. Gupta P, Niehans G, Leroy S, Gupta K, Morrison V, Schultz C, et al. Fas ligand expression in the bone marrow in myelodysplastic syndromes correlates with FAB subtype and anemia, and predicts survival. Leukemia [Internet]. 1999 [cited 2018 Apr 5];13:44–53. Available from: http://www.stockton-press.co.uk/leu

111. Josefsen D, Myklebust JH, Lynch DH, Stokke T, Blomhoff HK, Smeland EB. Fas ligand promotes cell survival of immature human bone marrow CD34 ♀ CD38 ♓ hematopoietic progenitor cells by suppressing apoptosis. 1999;27(0301):1451–9.

112. Pearl-Yafe M, Stein J, Yolcu ES, Farkas DL, Shirwan H, Yaniv I, et al. Fas transduces dual apoptotic and trophic signals in hematopoietic progenitors. Stem Cells. 2007;25(12):3194–203.

11. ŽIVOTOPIS

Željko Prka rođen je u Zagrebu 1982. godine, gdje je završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2000., a diplomirao 2006. godine. Pripravnički staž odradio je tijekom 2007. godine, a zatim je radio kao znanstveni novak na projektu Ministarstva znanosti „Novi klinički pristupi kroničnim mijelo i limfoproliferacijama“ (mentor i voditelj projekta prof.dr.sc. Vlatko Pejša). Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo upisao je 2008, a završio 2014. godine. Specijalizaciju iz interne medicine u Kliničkoj bolnici Dubrava započeo je 2009., a specijalistički ispit položio je 2013. godine. Subspecijalistički ispit iz hematologije položio je 2017. godine. Trenuto radi u Zavodu za hematologiju Kliničke bolnice Dubrava. Oženjen je i otac dvoje djece.