



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Olivera B. Simonović

**ZNAČAJ GALEKTINA-1
KAO PROGNOŠTIČKOG FAKTORA
U LEČENJU KLASIČNOG
HOČKINOVOG LIMFOMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2017.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Olivera B. Simonović

**THE IMPORTANCE OF GALECTIN-1
AS A PROGNOSTIC FACTOR
IN THE TREATMENT
OF CLASSICAL HODGKIN'S LYMPHOMA**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2017

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: Prof. dr Goran Marjanović, vanredni profesor
Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet

Naslov: Značaj galektina-1 kao prognostičkog faktora u lečenju klasičnog
Hočkinovog limfoma

Rezime: Postojeći prognostički scoring sistemi klasičnog Hočkinovog limfoma (cHL) ne obuhvataju markere koji adekvatno reflektuju interakciju malignih Hodgkinovih Reed-Sternbergovih (HRS) ćelija i tumorskog okruženja. Istraživanje ima za cilj utvrđivanje povezanosti nivoa serumskog galektina-1 (Gal-1) i solubilnog CD163 (sCD163) sa kliničkim statusom obolelih od cHL sa posebnim osvrtom na prisustvo relapsa, progresije ili rezistencije na primenjenu terapiju. Istraživanje je obuhvatilo 79 ispitanika. Od ovog broja, 63 su bili bolesnici sa cHL a kontrolnu grupu činilo je 16 zdravih dobrovoljaca. Studijska grupa sa 63 bolesnika sa cHL obuhvatala je podgrupe novodijagnostikovanih bolesnika kod kojih nije započeto lečenje, novodijagnostikovane bolesnike kod kojih je započeto lečenje, bolesnike sa relapsom i progresijom bolesti kao i primarno refraktorne bolesnike tokom 2014. i 2015. godine. Analiza nivoa sCD163 i Gal-1 pokazala je da su vrednosti oba molekula bolesnika sa cHL bile više u bolesnika sa relapsom i podgrupi sa progresivnom bolešću u poređenju sa podgrupom novodijagnostikovanih bolesnika kod kojih nije započeto lečenje ili bolesnika sa započetim lečenjem. Određivanje nivoa sCD163 i Gal-1 je jednostavna i pouzdana analiza koja može da doprinese identifikaciji bolesnika sa cHL i visokim rizikom i zaslužuje uključivanje u tekući prognostički scoring sistem.

Naučna oblast: Medicina

Naučna disciplina: Interna medicina

Ključne reči: Hočkinov limfom, Internacionalni prognostički skor, sCD163, Gal-1

UDK: 616.42-006.44-08:577.112

CERIF klasifikacija: B 490

Tip licence Kreativne zajednice: CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Goran Marjanović, MD, PhD, associate professor University of Niš, Faculty of Medicine
Title:	The importance of galectin-1 as a prognostic factor in the treatment of classical Hodgkin's lymphoma
Abstract:	In classical Hodgkin's lymphoma (cHL) the existing prognostic scoring systems do not include markers that adequately reflect the interaction of malignant Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells and tumor environment. The research objective is to determine the relationship between serum Galectin-1 (Gal-1) and soluble CD163 (sCD163) and the clinical status of patients with cHL, with special emphasis on the presence of relapse, progression, or resistance to the therapy applied. The research included 79 patients. Of this number, 63 were patients with cHL, and the control group consisted of 16 healthy volunteers. The study group of 63 patients with cHL included a subgroup of newly diagnosed patients without therapy, newly diagnosed patients with therapy, patients with relapse and progression of the disease, and primary refractory patients during 2014 and 2015. Analysis of the levels of sCD163 and sGal-1 within a group of patients suffering from cHL has shown that the values of both molecules were higher in relapsed patients and the subgroup with progressive disease comparing the subgroup of newly diagnosed patients without therapy or patients with therapy onset. Determination of Gal-1 and sCD163 levels is simple and reliable analysis that can contribute to the identification of high-risk patients with cHL, and deserves inclusion in current prognostic scoring systems.
Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Internal medicine
Key Words:	Hodgkin's lymphoma, International prognostic score, Gal-1, sCD163
UDC:	616.42-006.44-08:577.112
CERIF Classification:	B 490
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND

***RAD POSVEČUJEM
OCU I MAJCI***

***Čovek je ono u šta veruje
A.P. Čehov***

ZAHVALNOST AUTORA

Zahvaljujem se prof. dr Goranu Marjanoviću na svim sugestijama pri izradi doktorske disertacije, koje mi je pružio kao mentor rada.

Zahvaljujem se prof. dr Tatjani Jevtović-Stoimenov i Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu gde je realizovana metoda urađenog istraživanja.

Svakako da neizmernu zahvalnost dugujem profesorima koji su svojim sugestijama doprineli da disertacija bude završena, prof. dr Lani Mačukanović-Golubović, prof. dr Biljani Mihaljević i prof. dr Mileni Todorović-Balint.

Klinici za hematologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra u Nišu, Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije i Klinici za onkologiju Kliničkog Centra u Nišu izražavam zahvalnost na ukazanoj podršci pri izradi doktorske disertacije.

Svojoj porodici zahvaljujem na neizmernom strpljenju i razumevanju.

Niš, 2017. godine

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Hoćkinov limfom.....	1
1.2.	Prognostićki faktori Hoćkinovog limfoma.....	3
1.2.1.	Klinićki prognostićki faktori.....	4
1.2.2.	Klinićki prognostićki faktori u eri primene PET /CT	4
1.2.3.	Metabolićki skor bolesnika sa cHL.....	6
1.2.4.	Internacionalni prognostićki skor IPS-7	7
1.2.5.	Novi IPS- 3 prognostićki skor.....	8
1.2.6.	Drugi prognostićki faktori.....	8
1.2.7.	Prognostićki faktori primarno refraktarnog i relapsirajućeg Hoćkinovog limfoma.....	9
1.3.	Maligne ćelije Hoćkinovog limfoma	11
1.4.	Patogeneza Hoćkinovog limfoma.....	12
1.5.	Genetske osobine Hoćkinovog limfoma.....	15
1.6.	Nemaligne ćelije Hoćkinovog limfoma.....	17
1.7.	Imunosupresija u Hoćkinovom limfomu.....	29
1.8.	Galektin-1	38
1.8.1.	Definicija.....	38
1.8.2.	Funkcije galektina-1	40
1.8.3.	Uloga Gal-1 u apoptozi	42
1.8.4.	Imunomodulatorna funkcija Gal-1	42
1.8.5.	Uticaj Gal-1 na preživljavanje ćelija tumora.....	44
1.9.	Lećenje bolesnika sa Hoćkinovim limfomom	45
2.	OSNOVNE HIPOTEZE.....	50
3.	CILJ ISTRAŽIVANJA	51
4.	MATERIJAL I METODOLOGIJA RADA	52
5.	REZULTATI.....	55
5.1.	Pol, starost i patohistoloćki nalaz bolesnika i kontrolne grupe.....	55
5.2.	Klinićki stadijumi bolesnika sa klasićnim Hoćkinovim limfomom	57
5.3.	Zastupljenost klinićkih statusa bolesnika u odnosu na pol i starost	57
5.4.	Vrednosti serumskog CD163 (sCD163) i galektina -1 (Gal-1) bolesnika i kontrolne grupe.....	59
5.5.	Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 u odnosu na pol i starost kontrolne grupe	60
5.6.	Vrednosti odnosa sCD163 i Gal-1 bolesnika sa cHL i kontrolne grupe.....	62
5.7.	Vrednost odnosa sCD163 i Gal-1 u odnosu na pol i starost kontrolne grupe.....	63

5.8. Procena klasifikacionih karakteristika sCD163 i Gal-1.....	64
5.9. Procena klasifikacionih karakteristika odnosa sCD163/ Gal-1	67
5.10. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na laboratorijske parametre	69
5.11. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na patohistološku dijagnozu.....	69
5.12. Vrednost sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički stadijum bolesti	70
5.13. Prisustvo B simptoma kod bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom	71
5.14. Drugi klinički stadijum bolesti sa zahvatanjem medijastinuma i vrednosti serumskog CD163 i Gal-1	72
5.15. Vrednosti sCD163 i Gal-1 pre i posle primene prve terapijske linije u lečenju	73
5.16. Primena radioterapije i vrednosti sCD163 i Gal-1	74
5.17. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u zavisnosti od primenjenog lečenja.....	74
5.18. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika koji su transplatirani	75
5.19. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički status bolesnika	76
5.20. Vrednost odnosa sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički status bolesnika	78
5.21. Vrednost serumskog CD163 i Gal-1 u zavisnosti od IPS skora	79
6. DISKUSIJA.....	82
6.1. Prognostički faktori bolesnika sa cHL.....	84
6.2. Prognostički faktori tumora.....	84
6.3. Prognostički faktori interakcije tumora i bolesnika.....	87
6.4. Prognostički značaj osobina HRS ćelija.....	89
6.5. Prognostički značaj tumorskog okruženja.....	91
6.6. Prognostički skorovi u lečenju bolesnika sa cHL.....	94
6.7. Primena prognostičkih biomarkera u lečenju bolesnika sa cHL	98
7. ZAKLJUČAK	105
8. LITERATURA.....	107
BIOGRAFIJA AUTORA.....	125

LISTA SLIKA

- Slika 1. Rid Šternbergova ćelija u klasičnom Hočkinovom limfomu. Preuzeto iz:
Küppers R, Hansmann ML. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(3): 511-7 [34] 12
- Slika 2. Signalni putevi uključeni u patogenezu cHL i interakciju sa Gal-1.
Preuzeto iz: Rodig SJ, Ouyang J, Juszczynski P, Currie T, Law K, Neuberg DS, et al. AP1-dependent galectin-1 expression delineates classical hodgkin and anaplastic large cell lymphomas from other lymphoid malignancies with shared molecular features. *Clin Cancer Res* 2008; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4709. [55]..... 15
- Slika 3. Nastajanje TAM u okruženju tumora. Preuzeto iz Mallmann MR, Schmidt SV, Schultze JL. Macrophages in human cancer: Current and future aspects. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2012; 16(10): 765-74. [73]..... 21
- Slika 4. Model antitumorskog imunog odgovora u okviru imunoloških kontrolnih tačaka. Preuzeto iz Vardhana S, Younes A. The immune microenvironment In Hodgkin Lymphoma: T Cells, B Cells, And Immune Checkpoints. *Haematologica* 2016; 101(7): 794-802. [103]. 33
- Slika 5. Mehanizmi kojim TAM ostvaruje imunosupresiju. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.217 [116]. 34
- Slika 6. Interakcije HRS ćelija i okruženja Hočkinovog limfoma. Preuzeto iz: Diehl V. Are macrophages the bad guys in Hodgkin lymphoma. *Nat Rev Clin Oncology* 2010; 7: 301-2. [146]..... 38
- Slika 7. Struktura i klasifikacija galektina Preuzeto iz: Fichtner- Feigi S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL 13 signaling through the IL 13 alpha 2 receptor is involved in induction of the TGF β 1 production and fibrosis. *Nat Med* 2006; 12 (1): 99-106. [164]..... 40
- Slika 8. Uloga galektina-1 u homeostazi limfocita. Preuzeto iz Van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2008; 9: 593-601. [158]..... 41

- Slika 9. Uloga okruženja cHL u supresiji antitumorskog T ćelijskog imunog odgovora.
Preuzeto iz Vardhana S, Younes A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T Cells, B Cells, and immune checkpoints. *Haematologica* 2016; 101(7): 794-802. [103].43
- Slika 10. Galektin-1 kao potencijalni target maligniteta. Preuzeto iz: Rabinovich GA.
Galectin-1 as a potential cancer target. *Brit J Cancer* 2005; 92 (7):1188-92. [170]..45

LISTA TABELA

Tabela 1. Grupe rizika bolesnika sa HL sačinjene od strane različitih ekspertskih grupa	3
Tabela 2. Deauville skor (DS) interpretacije FDG PET/ CT	5
Tabela 3. Polna struktura i starost ispitanika studijske i kontrolne grupe	55
Tabela 4. Zastupljenost patohistoloških dijagnoza bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom.....	56
Tabela 5. Polna struktura bolesnika u odnosu na patohistološku dijagnozu Hočkinovog limfoma	56
Tabela 6. Starost bolesnika u odnosu na patohistološku dijagnozu klasičnog Hočkinovog limfoma	56
Tabela 7. Zastupljenost kliničkih statusa bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom	58
Tabela 8. Zastupljenost kliničkih statusa kod bolesnika sa cHL	58
Tabela 9. Starost bolesnika u odnosu na klinički status	59
Tabela 10. Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 u kontrolnoj grupi i studijskoj grupi	60
Tabela 11. Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 u kontrolnoj grupi u odnosu na pol i starost ispitanika	61
Tabela 12. Vrednosti sCD163/Gal-1 u kontrolnoj grupi i studijskoj grupi.....	62
Tabela 13. Vrednosti odnosa sCD163/Gal-1 u kontrolnoj grupi u odnosu na pol i starost ispitanika	63
Tabela 14. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika sCD163.....	65
Tabela 15. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika Gal-1	67
Tabela 16. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika odnosa sCD163/Gal-1	68
Tabela 17. Spearmanovi koeficijenti korelacije sCD163 i Gal-1 sa laboratorijskim parametrima kod bolesnika sa cHL.....	69
Tabela 18. Vrednost sCD163 kod bolesnika sa cHL u odnosu na patohistološku dijagnozu.....	69
Tabela 19. Vrednost serumskog Gal-1 kod bolesnika u odnosu na patohistološku dijagnozu	70
Tabela 20. Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na klinički stadijum	70

Tabela 21. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na prisustvo B simptoma	71
Tabela 22. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa kliničkim stadijumom IIb i zahvatanjem medijastinuma	72
Tabela 23. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL subtipa nodularne skleroze u CSII B i sa zahvatanjem medijastinuma	72
Tabela 24. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i abdominalnom limfadenomegalijom.....	73
Tabela 25. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL kod kojih su određivani pre i posle prve terapijske linije	73
Tabela 26. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na primenu radioterapije.	74
Tabela 27. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na broj primenjenih terapijskih linija	75
Tabela 28. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na primenu transplantacije	76
Tabela 29. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na klinički status.....	76
Tabela 30. Vrednosti odnosa sCD163/Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na klinički status....	78
Tabela 31. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kliničkim statusima u odnosu na vrednost IPS skora	79
Tabela 32. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na vrednost IPS-7 skora..	80
Tabela 33. Spermanovi koeficijenti korelacije IPS-7 skora sa sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kliničkim statusima.....	80
Tabela 34. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kliničkim statusom u odnosu na vrednost IPS-3 skora	80
Tabela 35. Spermanovi koeficijenti korelacije IPS-3 sa sCD163 i Gal-1 kod bolesnika studijske grupe i kliničkim statusom	81

LISTA GRAFIKONA

Grafikon 1. Zastupljenost kliničkih stadijuma kod bolesnika sa cHL	57
Grafikon 2. Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kontrolne grupe ..	60
Grafikon 3. Vrednost sCD163 i Gal-1 u kontrolnoj grupi kod ispitanika do i preko 45 godina	61
Grafikon 4. Korelacija starosti sa sCD163 i Gal-1 kod ispitanika kontrolne grupe	62
Grafikon 5. Vrednost odnosa sCD163/Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kontrolne grupe.....	63
Grafikon 6. Korelacija starosti sa odnosom sCD163/Gal-1 kod ispitanika kontrolne grupe.....	64
Grafikon 7. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika sCD163.....	65
Grafikon 8. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika Gal-1	66
Grafikon 9. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika sCD163/Gal-1	67
Grafikon 10. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički stadijum bolesnika sa cHL	71
Grafikon 11. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički status bolesnika sa cHL.....	77
Grafikon 12. Vrednosti sCD163/Gal-1 u odnosu na klinički status bolesnika sa cHL.....	78

LISTA SKRAĆENICA

cHL	Klasični Hočkinov limfom
HRS	Hočkin i Rid Šternbergove ćelije
Gal-1	Galektin-1
sCD163	Solubilni CD163
HL	Hočkinov limfom
WHO	Svetska Zdravstvena Organizacija
LPHL	Nodularni limfocitima predominantni Hočkinov limfom
EBV	Epštajn Bar virus
ABVD	Protokol lečenja Hočkinovog limfoma
Stanford V	Protokol lečenja Hočkinovog limfoma
ChIVPP/ EVA	Protokol lečenja Hočkinovog limfoma
MEC	Protokol lečenja Hočkinovog limfoma
BEACOPP	Protokol lečenja Hočkinovog limfoma
EORTC	Evropska organizacija za istraživanje i lečenje karcinoma
GELA	Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte
NCIC	National Cancer Institute of Canada
ECOG	Skala opšteg stanja bolesnika
GHSg	German Hodgkin Study Group
ASCT	Autologa transplatacija koštane srži
BV	Brentuksimab vedotin
PD-1	Receptor programirane smrti -1
IPS	Internacionalni prognostički skor
CT	Kompjuterizovana tomografija
MRS	Molekularni risk skor
PET–CT	Pozitronska emisiona tomografija – kompjuterizovana tomografija
DS	Deauville skor
PPV	Pozitivna prediktivna vrednost
MRU	Minimalno rezidualno nakupljanje
TARC	Timusom i aktivacijom regulisan hemokin
RNK	Ribonukleinska kiselina
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
PFS	Preživljavanje bez progresije bolesti
TUNEL	Terminalna dezoksinuklotidil transferaza posredovana dezoksiuridin trifosfat biotinom

TAM	Makrofazi povezani sa tumorom
FFP	Period do progresije bolesti
OS	Opšte preživljanje
DHAP	Protokol lečenja Hočkinovog limfoma
LMP1	Latentni membranski protein 1
LMP2a	Latentni membranski protein 2
EBNA1	Jedarni antigen virusa Epštajn Barr virusa
MC	Mešovita celularnost
NS	Nodularna skleroza
NF-kB	Nuklearni transkripcioni faktor kapa B
AP-1	Aktivator proteina -1
STAT	Aktivator signalne transdukcije i transkripcije
NOTCH1	NOTCH1 gen
TNFRSF	Receptor super familije faktora nekroze tumora
TRAF	TNF vezujući receptor
JNK/SAPK-c	Jun N terminalna kinaza
MLBCL	Medijastinalni B krupnoćelijski limfom
ALCL	Anaplastični krupno ćelijski limfom
NLPH	Nodularna limfocitna predominacija Hočkinovog limfoma
DBCL	Difuzni B krupnoćelijski limfom
ATF	Aktivirajući transkripcioni faktor
JAGGED	Jagged gene
MAPK	Proteinske kinaze aktivirane mitogenom
ERK	Kinaze regulisane vanćelijskim signalom
TNF- α	Faktor nekroze tumora alfa
IL	Interleukin
TGF- β	Transformišući faktor rasta beta
MIPI	Internacionalni prognostički indeks za mantle ćelijski limfom
ANC	Absolutni broj neutrofila
ALC	Absolutni broj limfocita
b FGF	Bazični faktor rasta fibroblasta
FGF	Faktora rasta fibroblasta
CCL	CC hemokin ligandi
VEGF	Vaskularni endotelni faktor rasta
M-CSF	Faktor stimulacije kolonije makrofaga

IFN- γ	Interferon-gamma
LPS	Lipopolisaharid
APC	Antigen prezentujuće ćelije
TIL	Tumor infiltrišući limfociti
MDSC	Supresorske ćelije mijeloidnog porekla
TCR	T ćelijski receptor
CTL-4	Citotoksični T limfocitni protein 4
GITR	Glucocorticoid induced TNFR family related gene
ICCS	Inducibilni T ćelijski kostimulator
BTLA	B i T limfocitni atenuatori
TAP	Mutacija proteina povezanog sa transportom
TIA-1	T ćelijski intracelularni antigen-1
MIF	Makrofag migratornog inhibitornog faktora
PGE2	Prostaglandin E2
cFLIP	Ćelijski FLICE inhibitorni protein
CRD	Domen koji vezuje β galaktozidnu strukturu ugljenih hidrata
PS	Fosfatidilserin
IFRT	Radioterapija involviranog polja
EFRT	Radioterapija proširenog polja
FFS	Preživljavanja bez pogoršanja
DFS	Period bez ponovne pojave bolesti
BNLI	British National Lymphoma Investigation
Ki-67	Proliferaciji pridružen nuklearni antigen
FOXP3	Transkripcioni faktor
EORTC	Evropska organizacija za istraživanje i lečenje karcinoma
ESHAP	Protokol lečenja Hočkinovog limfoma
18FDG	18 -fluor -deoksi glukoza
RANK	Receptor nuklearnog kappa beta
TRAIL	Protein koji funkcioniše kao ligand koji izaziva apoptozu
KIT	Matične ćelije faktor receptor
CSF1R	Kolono stimulišući faktor 1 receptor
FLT3	Fms slična tirozin kinaza

1. UVOD

1.1. Hočkinov limfom

Hočkinova bolest je limfoidni tumor koji čini manje od 1% svih novootkrivenih neoplazmi godišnje u svetu [1]. Prvi opis bolesti dao je Tomas Hočkin 1832. godine. Tokom 20. veka došlo se do saznanja da bolest potiče od limfoidnog tkiva, pa je preimenovana u Hočkinov limfom (HL) i kao takva prepoznata u klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO) 2001 godine [1,2]. On čini oko 10% svih malignih limfoma [2, 3].

Hočkinov limfom je retka bolest, čija je incidenca 2–3 novotkrivena na 100 000 stanovnika u Evropi i SAD. U industrijalizovanim zemljama početak Hočkinovog limfoma pokazuje bimodalnu distribuciju sa prvim pikom u trećoj dekadi, a drugim pikom posle 50-te godine. Češće je zastupljen kod muškaraca nego kod žena u svim subtipovima, izuzev nodularne skleroze, koja se češće javlja kod mlađih žena [4]. Incidencu HL karakteriše heterogenost u pogledu godina, pola, rase, geografske regije, socijalnog statusa i histopatološkog subtipa [5].

Hočkinov limfom čine dva različita entiteta: nodularni limfocitima-predominantni HL (LPHL), koji čini oko 5% i češći, klasični Hočkinov limfom (cHL) koji čini oko 95% svih HL. Pomenuti entiteti se razlikuju u pogledu histopatološkog nalaza, imunofenotipa, kliničkog toka bolesti kao i molekularnih osobina. Naime, LPHL se histološki može prezentovati sa dva različita morfološka obrasca, kao nodularni i difuzni, a cHL karakteriše postojanje 4 histološka subtipa [6]. Pomenute entitete, cHL i LPHL, odlikuju razlike u pogledu imunofenotipa gde cHL karakteriše odsustvo B ćelijskih markera nasuprot njihovom prisustvu u LPHL, zatim u pogledu prisustva crippling mutacija gena teških lanaca imunoglobulina Ig koje se javljaju tokom razvoja B ćelija u cHL, nasuprot i dalje prisutnim somatskim mutacijama u LPHL. Razlike postoje i u signalnim putevima uključenim u malignu transformaciju, u vidu odsustva BCL6 ekspresije u cHL ali i prisustva Epstein Bar virusa (EBV), u oko 80% slučajeva nodularne skleroze u HRS ćelijama i retko u LH ćelijama nodularno limfocitima predominantnog HL [7,8].

Nodularni limfocitima predominantni HL, karakteriše manje agresivan tok bolesti u poređenju sa cHL a lečenje je do nedavno sprovedeno primenom istih protokola kao za cHL. Novije preporuke podrazumevaju primenu terapije bazirane na kliničkom stadijumu bolesti. Njihova primena omogućava postizanje kompletne remisije (CR) u više od 95% bolesnika [6].

Nelečen HL ima fatalnu prognozu, dok rana dijagnoza i lečenje čine ovu bolest izlečivom u većini slučajeva. Primenom odgovarajućeg lečenja postiže se da oko 80% bo-

lesnika preživi 5 godina ili duže. Bolesnici sa HL koji su dijagnostikovani u prvom kliničkom stadijumu (CS) bolesti imaju više od 90% mogućnosti da žive duže od 10 godina. Oni koji su dijagnostikovani u CS IV imaju 50% mogućnosti da žive 10 i više godina [9]. Do sredine prošlog veka, HL je bio neizlečiva bolest za većinu bolesnika. Primena radioterapije i ABVD protokola sedamdesetih godina prošlog veka, predstavljali su veliki napredak u lečenju. Novi vek obeležila je primena poslednje generacije intenziviranih protokola poput Stanford V, ChIVPP/ EVA, MEC kao i BEACOPP koji su uvedeni u lečenje odmaklih stadijuma HL tokom devedesetih godina prošlog veka. Opšte preživljavanje bolesnika lečenih u German Hodgkin Study Group (GHSg) u trajalima HD7 za rani povoljni, HD8 za rani nepovoljni i HD9 za odmakli stadijum HL, dokazalo je da čak i bolesnici sa odmaklom fazom bolesti mogu biti izlečeni u velikom procentu. Poznato je da bolesnici mogu biti izlečeni čak i u slučaju pojave relapsa primenom visokodozne hemioterapije i autologe transplatacije matične ćelije hematopoeze (ASCT) [7].

Naime, uprkos uspehu standardne prve linije hemioterapije u lečenju bolesnika sa cHL jedan procenat bolesnika 10–30%, posebno onih sa lošim prognostičkim faktorima pri dijagnozi (prisustvo B simptoma, bulky bolest, odmakli stadijum bolesti ili ekstranodalna bolest) relapsira nakon postizanja inicijalne remisije, a 5–10% je refraktorno na inicijalnu terapiju [10].

Za bolesnika sa relapsom nakon autologe transplatacije matične ćelije hematopoeze primenjuju se razni modaliteti lečenja, počev od pojedinačne hemioterapije, kombiniranih hemioterapijskih strategija lečenja, imunokonjugata brentuksimaba vedotina (BV), blokatora imunoloških kontrolnih tačaka poput nivolumaba i pembrolizumaba, lenalidomida, evrolismusa, a u pojedinim u prisutvu odgovarajućih donora i alogena transplatacija koštane srži. Treba istaći da je u eri primene imunoterapije u lečenju maligniteta, primena blokatora receptora programirane ćelijske smrti (PD–1) u bolesnika sa relapsom ili refraktornim cHL od posebnog značaja.

Rezultati kliničkih trajala su ohrabrujući u pogledu lečenja bolesnika sa cHL, a napredak u razumevanju biologije HL, omogućio je razmatranje i drugih mogućih terapijskih modaliteta u lečenju bolesnika sa cHL [11,12]. Postojeći prognostički skorovi ne omogućavaju ranu identifikaciju grupe bolesnika koja neće odgovoriti na lečenje, kao ni grupu bolesnika koja će relapsirati, pa je time otežano donošenje odluke o primeni najoptimalnijeg lečenja. Identifikacija biomarkera bolesnika sa cHL predstavlja strategiju lečenja koja treba da omogućiti primenu racionalne terapije bazirane na statifikaciji rizika bolesnika. Naime, u HL neoplastične Reed Sternbergove ćelije (RS) čine manjinu i okružene su heterogenom populacijom neneoplastičnih ćelija, uglavnom B i T ćelija, kao i makrofazima, eozinofilima, bazo-

filima i monocitima. Ekspresija različitih citokina od strane RS ćelija utiče na abnormalni imuni odgovor ali i dodatni faktori sekretovani od strane reaktivnih ćelija tumorskog mikrookruženja takođe potpomažu stvaranje imunosupresivne mikrookoline tumora koja dovodi do izbegavanja imunološkog nadzora. Ove činjenice potenciraju potrebu razmatranja statusa imunosupresije u cHL kroz sagledavanje biomarkera imunosupresije što bi omogućilo praćenje uspeha lečenja, ranu detekciju refraktornosti na lečenje kao i pojavu relapsa bolesti. Time bi se omogućila blagovremena korekcija lečenja i otklonili nedostaci dosadašnjih prognostičkih skorova koji nisu omogućili adekvatnu statifikaciju bolesnika sa cHL a time ni pravilan izbor terapijskog modaliteta lečenja [13].

1.2. Prognostički faktori Hoćkinovog limfoma

Najznačajnije determinante prognoze bolesnika sa cHL su klinički stadijum bolesti i prisustvo sistemskih simptoma. Primenom kliničkih stadijuma bolesti, sistemskih simptoma i faktora rizika najpoznatije grupe istraživača (EORTC, GELA, GHSG, NCIC/ECOG) sastavile su sledeće grupe rizika: Rani povoljni (Stadijum I -II bez B simptoma), rani nepovoljni (Stadijum I- II sa najmanje jednim faktorom rizika) i odmakli stadijum bolesti koji uključuje Stadijum III- IV sa bulky ili intrabdominalnom bolešću. Faktori rizika koje uključuju pomenute grupe eksperata su: prisustvo bulky bolesti (više od 10cm u dijametru), proširenost na više regiona, ektranodalna bolesti, odmakli stadijum i ubrzana SE [10].

Tabela 1. Grupe rizika bolesnika sa HL sačinjene od strane različitih ekspertskih grupa

Grupa rizika	EORTC/ GELA	GHSG	NCIC/ECOG
Rani povoljni stadijum	Povoljni stadijum I-II (Bez faktora rizika) (supradijafragmalno)	Povoljni stadijum I-II (Bez faktora rizika)	Povoljni stadijum I-II (Bez faktora rizika)
Rani nepovoljni stadijum	Stadijum I-II, ≥1 faktora rizika (supradijafragmalno)	Stadijum I,IIA ≥ 1 faktora rizika Stadijum IIB sa C/D bez A/B	Nepovoljni Stadijum I-II ≥ 1 faktora rizika
Odmakli stadijum	Stadijumi III-IV	Stadijum IIB sa A/B; Stadijumi III-IV	Stadijum I-II, Bulky ili intrabdominalna lokalizacija; Stadijumi III-IV
Faktori rizika	A: Velika medijastinalna masa B: Godine ≥ 50 godina C: Ubrzana SE D: > 4 zahvaćena regiona	A: Velika medijastinalna masa B: Ektranodalna bolest C: Ubrzana SE D: ≥ 3 zahvaćena regiona	A: Godine ≥ 40 godina B: Ne LPHL ili NS Histološki C: SE ≥ 50 mm/hr D: ≥ zahvaćenih nodusa

1.2.1. Klinički prognostički faktori

Kao prediktori ishoda bolesti u HL se još uvek koriste pomenuti standardni klinički parametri kao što su: bulky masa, godine starosti, broj nodalnih mesta i sedimentacija eritrocita. U vreme dijagnoze većina bolesnika sa HL se prezentuje supradijafragmalnom limfadenomegalijom, zahvatanjem cervikalnih, supraklavikularnih, axilarnih kao i limfnih nodusa prednjeg medijastinuma, dok su ingvinalni limfni nodusi mnogo manje zahvaćeni. Kod jedne trećine bolesnika postoji prisustvo B simptoma koji uključuju prisustvo povišene temperature, noćnog znojenja i gubitka telesne težine a mnogi bolesnici pri prezentaciji imaju svrab. Bolest uglavnom zahvata susedne limfne noduse, ali su moguća zahvatanja ekstranodalnih lokalizacija direktnom invazijom ili hematogenom diseminacijom. Najčešće ekstranodalne lokalizacije su slezina, pluća, jetra i koštana srž [14].

Opisane kliničke osobine cHL jesu i prognostičke, uključene su u Internacionalni prognostički skor (IPS-7) skor, ali se postavlja pitanje da li su one dovoljne da adekvatno klasifikuju bolesnike sa cHL u grupe rizika. Svakako da kvantifikacija tumorske mase omogućava daleko bolje praćenje terapijskog odgovora i pravilno lečenje bolesnika.

1.2.2. Klinički prognostički faktori u eri primene PET /CT

Prognostički faktori HL koji direktno predstavljaju tumorsku masu i aktivnost su klinički stadijum, broj zahvaćenih limfnih nodusa, bulky masa i B simptomi, a indirektni pokazatelji tumorske mase i aktivnosti jesu bazirani na laboratorijskim parametrima (vrednosti serumskog hemoglobina i albumina). Prisustvo i aktivnost tumorske mase jesu prognostički, ali je za lečenje bolesnika sa cHL važna kvantifikacija tumorske mase. Imajući u vidu da maligne ćelije čine mali procenat u bolesnika sa cHL, postavlja se pitanje načina kvantifikacije tumorske mase.

Staziranje bolesti predstavlja najznačajniju detreminantu prognoze i izbora načina lečenja. Anatomska distribucija, odnosno proširenost Hočkinovog limfoma određuje se modifikovanom Cotswoldovom Ann Arbor klasifikacijom, morfološki volumen tumora primenom kompjuterizovane tomografije (CT), a aktivnost bolesti primenom fluoro-2-deoksi-D-glukoze pozitronske emisije tomografije – kompjuterizovane tomografija FDG PET/ CT [10]. Istraživanje Gobbi i saradnika pokazalo je mogućnost indirektno kvantifikacije tumorskog volumena, za razliku od FDG PET /CT koja omogućava direktno određivanje tumorske mase. [15]. Smatra se da inicijalno primenom FDG PET/ CT treba odrediti metabolički volumen tumora (MVT) kao i Δ SUVmax koji omogućavaju bolju predikciju primene PET /CT [16].

Naime, primenom PET/ CT postiže se restažiranje u 10% do 30% bolesnika sa limfomom, a time i nedovoljno ili prekomerno lečenje. Istraživanja su dokazala prediktivnu ulogu PET /CT bolesnika sa HL, pa tako pozitivna prediktivna vrednost (PPV) postoji kod manje od 65% bolesnika sa HL ali opet više u odnosu na primenu CT. Za bolesnike sa niskim ili intermedijarnim rizikom odmaklih stadijuma HL, PET/CT ima senzitivnost 81% a specifičnost 97% i može da identifikuje bolesnike koji neće odgovoriti na primenjenu terapiju. Smatra se da 30–40% bolesnika sa PET pozitivnom rezidualnom masom neće progredirati ili relapsirati i da je u tim slučajevima neophodna biopsija pre primene salvage terapije. U slučaju bolesnika sa odmaklim stadijumom bolesti i standardnim ili visokim rizikom (IPS 0–2 ili > 3) primena interim PET/CT omogućava primenu agresivnijeg načina lečenja [10]. Poznato je da se pozitronska emisijska tomografija koja koristi [18F]-fluoro-2-deoksi-D-glukozu (FDG-PET) temelji na činjenici da većina limfoma pojačano metabolizira glukozu. Ako se FDG-PET primeni rano u toku standardne hemioterapije, (interim PET), pruža dobar uvid u terapijski odgovor i konačan ishod lečenja. Danas se u interpretaciji nalaza interima PET/ CT koriste kriterijumi Deauville koji čine lestvicu sa DS skorom od 1 do 5, za nakupljanje FDG, pri čemu se kao referentni organ uzima jetra. PET pozitivna lezija se definiše kao ona lezija koja nakuplja FDG više od pozadine, na lokaciji koja nije kompatibilna s normalnom anatomijom i fiziologijom [17]. Tabela 2 prikazuje pomenuti skor [18].

Tabela 2. Deauville skor (DS) interpretacije FDG PET/ CT

Skor 1	Nema nakupljanja
Skor 2	Nakupljanje manjeg ili jednakog intenziteta kao u medijastinumu
Skor 3	Nakupljanje većeg intenziteta u medijastinumu ali manjeg ili jednakog nego u jetri
Skor 4	Nakupljanje umereno jače nego nakupljanje u jetri
Skor 5	Nakupljanje na postojećim i/ ili novim lezijama bolesti je značajno jače nego u jetri
Skor X	Novi regioni nakupljanja koji nisu povezani sa bolešću

Mesta minimalnog rezidualnog nakupljanja (MRU) imaju nakupljanje manje ili jednako od jetre a nastaju kao posledica inflamatorne reakcije tkiva usled citolitičkog efekta terapije koja dovodi do nespecifičnog nakupljanja FGD od strane inflamatornih ćelija koje infiltrišu tumorsko tkivo. Definisane MRU omogućilo je da se i nalaz PET/ CT prikaže dinamskim skorom koji podrazumeva poređenje početnog PET/CT i nalaza interima u pogledu redukcije broja i intenziteta rezidualnih lezija. Primenom ovog dinamičkog PET/ CT se smanje broj pozitivnih nalaza PET/ CT. Time je pokazano da i nalaz PET/ CT treba da

bude kvantifikovan kako bi se izbegli lažno pozitivni nalazi, a samim tim omogućilo adekvatno lečenje bolesnika sa cHL [19].

1.2.3. Metabolički skor bolesnika sa cHL

Aktuelna Lugano klasifikacija iz 2014.godine koristi pomenutu DS skalu sa 5 skor poena u proceni odgovora bolesnika sa cHL, pa se tako odgovor bolesnika na lečenje može klasifikovati kao:

Kompletni metabolički odgovor podrazumeva DS skor 1 ili 2 primenom interima na kraju lečenja. Poznato je da nakupljanje FDG opada tokom terapije u hemosenzitivnih bolesnika a da prisustvo rezidualnog FDG višeg od normalnog nakupljanja u jetri često postoji na interimu u bolesnika koji nisu postigli kompletni metabolički odgovor posle lečenja. Nedavne studije pokazale su da većina bolesnika sa nakupljanjem FDG većeg nego u medijastinumu ali manjeg ili jednakog nego u jetri sa DS skorom 3 ima povoljan ishod bolesti na kraju lečenja standardnom terapijom. Smatra se da skor 3 može biti neadekvatno protumačen pa ga treba interpretirati u skladu sa vremenom kada je urađen, tokom ili na kraju lečenja kao i u zavisnosti od kliničkog statusa bolesti i primenjenog lečenja, kako bi se izbeglo neadekvatno, često nedovoljno lečenje ove grupe bolesnika sa cHL.

Parcijalni metabolički odgovor karakteriše prisustvo skora DS 4 ili 5 koji ukazuje na residualnu bolest, ali je nakupljanje manje od početnog.

Stabilnu bolest ili progresiju karakteriše da se početni skor 4 ili 5 ne menja tokom lečenja ili je veći od početnog uz nove fokuse bolesti [20].

Tokom poslednje decenije dokazana je uloga PET/ CT u stažiranju bolesnika sa cHL, prognozi ishoda bolesti i odgovora na lečenje. Takođe je dobro poznat prognostički značaj negativnog PET/ CT pre autologe transplatacije MČH. Za sada međutim ne postoje vodiči u pogledu upotrebe PET /CT u lečenju bolesnika sa relapsom i refraktornim cHL. Moskowitz i saradnici su dokazali da je postojanje negativnog PET/ CT pre transplatacije rezultovalo ostvarivanjem EFS u više od 80% bolesnika nasuprot 28,6% bolesnika koji su pre transplatacije imali pozitivan PET/ CT. Time je istaknut značaj postojanja hemosenzitivnosti bolesti na salvage terapiju pre transplatacije [18]. Značaj PET/ CT je od naročite važnosti u lečenju odmaklih stadijuma bolesti. Hasenclever i saradnici su ukazali da kliničke karakteristike odmaklog stadijuma bolesti mogu biti nepovoljni prognostički faktori sve do momenta dok se ovi bolesnici leče sličnim terapijskim modalitetima kao i bolesnici sa ograničenim stadijumom bolesti. Primenom drugih, intenzivnijih modaliteta lečenja, ranije prisutne kliničke

karakteristike odmaklih stadijuma bolesti gube prognostički značaj u stratifikaciji rizika za neuspeh terapije. U zaključku se može reći da se u eri novih terapijskih modaliteta, istraživanja fokusiraju na prognostičke faktore koji direktno reprezentuju povezanosti tumorske mase individue, kao što je primena opisanog FDG PET/CT ali i drugih koji omogućavaju izbor optimalnog modaliteta lečenja [21].

1.2.4. Internacionalni prognostički skor IPS-7

Internationalni prognostički skor (IPS) odmaklih stadijuma HL, publikovan je 1998. godine nakon analize 5141 bolesnika sa HL. Baziran je na kliničkim i analitičkim parametrima, a čini ga 7 kliničkih varijabli uključujući nivo albumina manji od 4g/dL, nivo hemoglobina manji od 10,5 g/dl, muški pol, godine starosti (stariji od 45 godina), CS IV, broj leukocita najmanje 15000/mm³ i absolutni broj limfocita manji od 600 /mm³. Biološki faktori inkorporirani u ovaj skor su godine i pol bolesnika, oni utiču na ishod bolesti, a inflamatorni proces uzrokovan oslobađanjem citokina reflektuje se nivoom albumina i hemoglobina, kao i abnormalnostima u broju leukocita i limfocita [22].

Pomenuti IPS je klinički široko prihvaćen, uprkos nedostacima koji se ogledaju u tome da još uvek ne može identifikovati pri dijagnozi značajni procenat bolesnika sa vrlo lošom prognozom, a nije primenljiv ni za bolesnike sa ranim stadijumom bolesti [22, 23].

Primenom već pomenutog IPS-7 skora na osnovu broja faktora rizika bolesnici se klasifikuju u 6 subgrupa sa različitim petogodišnjim periodom do progresije bolesti (FFP) počev od 42% do 84% kao i opštim preživljavanjem (OS) od 56–89%.

Svakako, da je primena novih modaliteta lečenja uticala na bolji ishod bolesti, pa se time nameće pitanje daljeg prognostičkog značaja pomenutog IPS skora, ili kako to novi radovi ističu IPS- 7 skora, imajući u vidu da je ovaj skor kreiran 1998. godine i da se odnosio na bolesnike lečene protokolima ABVD, MOPP ili hibridnim protokolima sa ili bez radioterapije.

Dosadašnje studije su pokazale da je samo četvrti klinički stadijum (CSIV) ostao prognostički signifikantan u multivarijantnim analizama, u odnosu na ostale komponente IPS-7 skora. Istraživanje Sanchez-Espirodion i saradnika dokazano je da se kombinacijom molekularnog risk skora (MRS) bolesnika sa odmaklom bolešću i CSIV mogu otkloniti nedostaci u primeni ranije pomenutog IPS-7 skora i identifikovati grupa bolesnika sa lošom prognozom bolesti kod koje bi trebalo primeniti lečenje agresivnom hemioterapijom [24].

Svakako da je primena MRS od izuzetne važnosti ali je i takođe teško primenljiva u stratifikaciji rizika bolesnika sa cHL u svakodnevnoj praksi.

1.2.5. Novi IPS-3 prognostički skor

Primena novih terapijskih protokola kao i suportivne terapije u lečenju novodijagnostikovanih bolesnika kao i bolesnika u relapsu bolesti, doprinela je signifikantnom poboljšanju ishoda bolesti. Svakako, da je i primena PET/CT, takođe doprinela boljem ishodu bolesti jer je omogućila mnogo preciznije stažiranje bolesti i odgovor na lečenje, pa je time takođe poljuljana validnost dosadašnjeg IPS-7 skora. Iako se on i dalje primenjuje, njegov značaj u bolesnika lečenih novim modalitetima lečenja predstavlja izazov. Već pomenuti IPS-7 skor je ostao prognostički, ali je njegov prognostički značaj sužen. Naime, novije multivarijantne analize pokazale su da samo dva faktora (godine starosti i stadijum bolesti) ostaju signifikantni za FFP, a tri faktora (godine starosti, stadijum bolesti i vrednost hemoglobina) jesu značajni za OS, pa se time nameće pitanje primene novog jednostavnijeg prognostičkog indeksa IPS-3. Diefenbach i saradnici su na osnovu svog istraživanja sačinili novi prognostički skor koji se sastoji samo od tri faktora (godine starosti, stariji od 45 godina, stadijum bolesti- CSIV i vrednost hemoglobina manji od 10,5 g/dl) koji omogućava stratifikaciju bolesnika u 4 posebne grupe rizika, grupu rizika sa 0, 1, 2 ili 3 faktora rizika. Utvrđeno da IPS-3 nadmašuje raniji IPS-7 u predikciji oba kako FFP tako i OS, a razlika postoji i u pogledu stratifikacije rizika ovih bolesnika pa se tako 18 % bolesnika svrstanih u grupu niskog rizika po IPS-7 reklasifikuju u grupu intermedijarnog rizika na osnovu IPS-3 skora, a 13% bolesnika intermedijarnog rizika utvrđenog primenom IPS-7 skora reklasifikuje u grupu niskog rizika [25].

Potencijalno novi skor međutim ima ograničenja imajući u vidu da je kreiran na osnovu istraživanja bolesnika lečenih sa dva hemoterapijska protokola ABVD ili Stanford V pa se postavlja pitanje njegove validnosti u pogledu stratifikacije rizika bolesnika lečenih intenzivnijim protokolima poput eskaliranog BEACOPP ili BV. Drugo, ograničenje novog IPS-3 skora jeste u pogledu broja bolesnika sa sva tri faktora rizika, jer je samo nekoliko bolesnika imalo sva tri faktora rizika. Poslednje ograničenje IPS-3 skora jeste u predikciji FFP jer je za pojedine bolesnike IPS-7 skor imao bolju predikciju dok nije uočena razlika u predikciji ova dva skora u pogledu OS [25].

1.2.6. Drugi prognostički faktori

Napredak u razumevanju biologije HL ukazuje na druge prognostičke faktore kao što su: tumor infiltrišući makrofazi, markeri apoptoze i solubilni markeri.

Tumor infiltrišući makrofazi (TAM) i markeri apoptoze Steidl i saradnici su utvrdili da je kod bolesnika sa cHL prisustvo genskog potpisa TAMa, udruženo sa primarnim

neuspehom terapije. Daljim imunohistohemijskim analizama utvrđeno je da broj CD68+ makrofaga koreliše sa smanjenim preživljavanjem bez progresije bolesti (PFS), povišenom pojavom relapsa nakon ASCT, i kraćim OS. Markeri apoptoze, povišena ekspresija bcl-2 i bcl-2 familije proteina poput bcl-XL, BAX u RS ćelijama omogućavaju izbegavanje apoptoze i objašnjavaju rezistenciju na primenjeno lečenje. Nekoliko studija je ukazalo na sličnu ulogu p53 ekspresije utvrđene imunohistohemijom u nepovoljnom ishodu bolesti. Visoka ekspresija bcl-XL kao i visok apoptski indeks utvrđen terminalnom dezoksinuklotidil transferaza posredovana dezoksiuridin trifosfat biotinom (TUNEL) jesu nezavisno takođe povezani sa lošim ishodom bolesti [10].

Solubilni markeri

Najznačajniji su sledeći solubilni markeri: nivo solubilne forme CD30 antigena, (sCD30) utiče na loš ishod bolesti sa lošim FFS i OS. Drugi solubilni marker bolesnika sa cHL je serumski interleukin-10 (IL-10), citokin IL-10, koji ima antiapoptsku ulogu, a njegov povišen nivo u bolesnika sa cHL inhibiše apoptozu HRS ćelija. Povišen nivo serumskog IL-10 postoji kod oko 50% bolesnika sa HL i utiče na loše FFS kao i OS u bolesnika lečenih ABVD i BEACOPP protokolom. Treći solubilni marker je timusom i aktivacijom regulisan hemokin (TARC), hemokin sekretovan od strane RS ćelija, čiji povišen nivo postoji kod većine bolesnika sa HL. Perzistentno povišen nivo TARC nakon lečenja utiče na loše preživljavanje i važan je za monitoring terapije [10].

Interakcija HRS ćelija i tumorskog okruženja značajno utiče na ishod bolesti. Ekspresija CD68 kao i CD163 od strane tumor infiltrišućih makrofaga koreliše sa lošim, PFS i OS. Prognostički značaj ima i ekspresija EBV kao i odnos limfocita i monocita. Smatra se da pri stratifikaciji rizika bolesnika sa HL zato treba istovremeno razmatrati biološke osobine tumora kao i kliničke prognostičke faktore [25].

1.2.7. Prognostički faktori primarno refraktarnog i relapsirajućeg Hoćkinovog limfoma

Internacionalni prognostički skor Hasenclevera i Diehla, nalazi primenu u stratifikaciji rizika pri inicijalnoj prezentaciji odmaklih stadijuma HL, ali nije pokazan njegov značaj u predikciji prognoze refraktornih i relapsirajućih bolesnika sa HL. Druge retrospektivne i prospektivne studije su definisale prognostičke faktore relapsa i primarno refraktornog HL [26].

Brojne publikacije su počev od 1990. godine ukazale na loše prognostičke faktore relapsa HL poput odmaklog stadijuma bolesti, kraćeg vremena do pojave relapsa, prisustva B

simptoma, ektranodalnog prisustva bolesti. Godine su glavni prognostički faktor prve linije lečenja ali ne i kod relapsa jer većina starijih bolesnika sa HL nije uključena u studije. Jones i saradnici su na osnovu baze podataka GHSG sačinili prognostički skor za pojavu relapsa bolesti koji podrazumeva sledeće nezavisne prognostičke faktore: vreme pojave relapsa bolesti <12 nasuprot >12 meseci, klinički stadijum bolesti u vreme pojave relapsa bolesti CSIII /IV, prisustvo anemije u vreme pojave relapse (kod muškaraca Hb <12 g/l a kod žena Hb <10,5 g/l).

Već pomenuta GHSG je takođe prospektivnom studijom ukazala da su odgovor na lečenje protokolom DHAP, trajanje prve remisije i multipli relapsi nasuprot ranom i kasnom relapsu prognostički značajni za uspeh druge linije lečenja. Odgovor na DHAP, trajanje remisije i prisustvo anemije jesu značajni za preživljavanje [27].

Literaturni podaci ukazuju da grupa primarno refraktornih bolesnika ima najlošiju prognozu u pogledu lečenja, prvenstveno u pogledu primene autologe transplatacije koštane srži, pa je rana identifikacija pacijenata značajna za primenu agresivnijih protokola u lečenju. Negativni klinički prognostički faktori primarno refraktornog HL su povišena laktat dehidrogenaza (LDH) i zahvatanje medijastinuma [28].

Grupa autora je 2012.godine u okviru LYSA asocijacije (Lymphoma Study Association) sačinila preporuke lečenja bolesnika koji su kandidati za transplataciju koštane srži sa relapsom ili refraktornim HL [29].

Neuspeh lečenja odmaklih stadijuma bolesti nije podjednak, već kako to pojedini autori poput Brusalima i saradnika u svom istraživanju ističu, pojava relapsa postoji kod manje od 20% bolesnika sa IPS7 od 0 do 1, a povećanje IPS skora karakteriše i viši procenat pojave relapsa, kod oko 40%.

U zaključku se može reći da ne postoji jedinstven prognostički sistem za relapsirajuće HL, a kao najvažniji faktori pominju se kratko trajanje inicijalne remisije i odmakli klinički stadijum pri pojavi relapsa [26,30].

U bolesnika sa relapsom bolesti stratifikacija bolesnika na osnovu faktora rizika nije postala standard lečenja, pa se bolesnici sa relapsom HL leče hemioterapijom sa autologom transplatacijom matične ćelije hematopoeze, nezavisno od kliničkog stadijuma i prisustva faktora rizika u vreme pojave relapsa bolesti [31].

Svakako da je napredak u razumevanju molekularne biologije HL omogućio primenu drugih terapijskih modaliteta u lečenju ali i primenu biomarkera u stratifikaciji rizika bolesnika.

Mnogo toga je već poznato u pogledu malignih HRS ćelija, ali ono što ovaj limfom čini posebnim jeste interakcija sa tumorskim okruženjem, odnosno mehanizmi tih interakcija.

1.3. Maligne ćelije Hočkinovog limfoma

Iako je bio prvi limfom prepoznat kao klinički entitet, bio je jedan od najkomplikovanijih u pogledu molekularne etiologije. Mikromanipulacije na pojedinačnim klonskim malignim HRS ćelijama, pomoću PCR amplifikacije RNK i genomske DNK omogućile su molekularni prilaz etiologiji i patogenezi HL. Primenom ovih tehnika razjašnjeno je ćelijsko poreklo Hočkinove i Rid Šternbergove ćelije (HRS) ćelije putem analize gena ćelijskih receptora [32].

Kuppers i sar. su 1994. godine utvrdili da maligne, HRS ćelije jesu klonske i da nastaju od odgovarajuće B ćelije [33]. One čine samo 0,1–1% zahvaćenog tkiva, pa je zato analiza ovih ćelija bila enigma dugi niz godina [4].

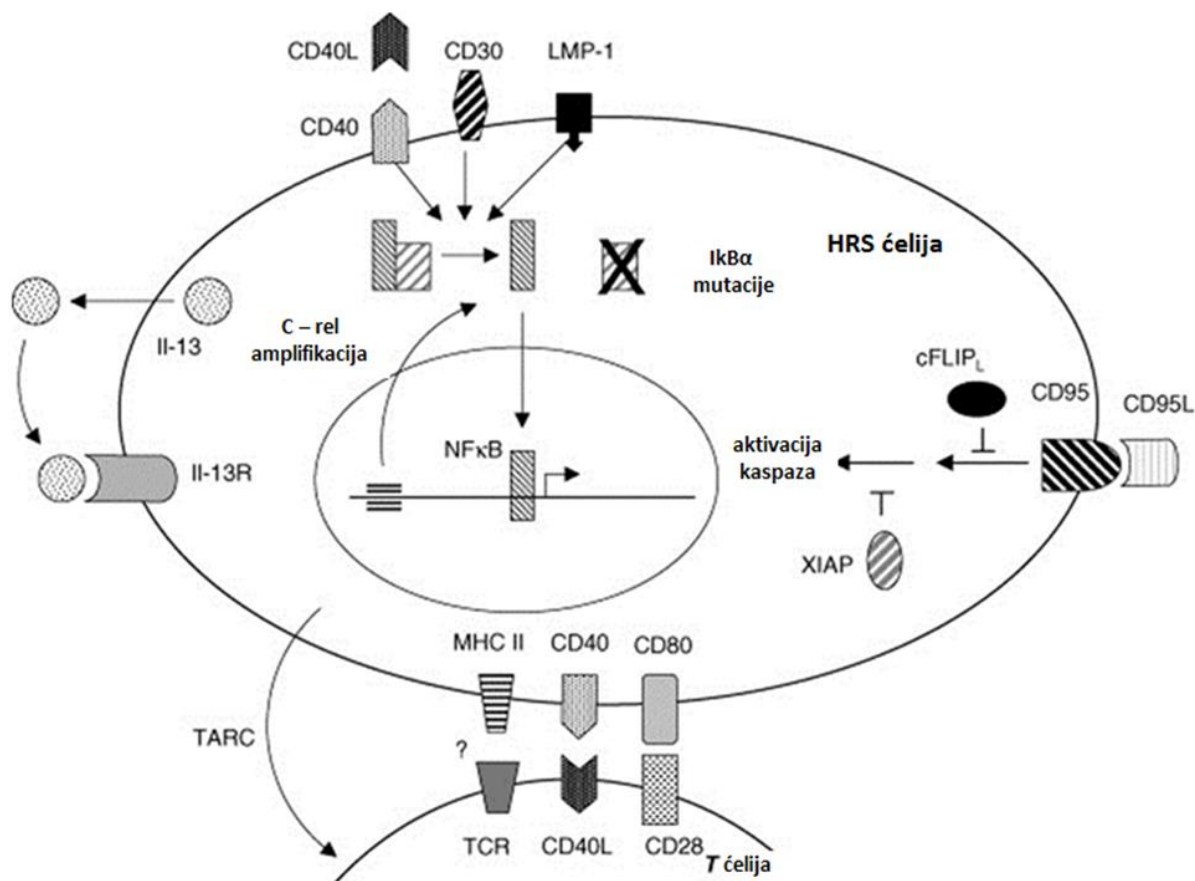
Rid Šternbergove ćelije nisu morfološki uniformne, imaju prečnik 20 -60 μm , obilnu, blago eozinofilnu ili amlofilnu citoplazmu, najmanje dva jedra sa acidofilnim ili amfofilnim jedarcima, prekrivajući više od 50% površine jedra. Monojedarne, Hočkinove ćelije, osrednje razvijene, svetlo eozinofilne citoplazme imaju jedno jedro sa karakterističnim krupnim jedarcem [1].

Molekularne analize su dokazale prisustvo klonskog genskog rearanžmana imunoglobulina Ig pojedinačnih HRS ćelija, što je bio dokaz klonalnosti HRS ćelija, pa je Hočkinova bolest uvrštena u maligne limfome.

Iako su RS ćelije dijagnostičke, one mogu biti prisutne i kod infektivne mononukleoze, B i T ćelijskih limfoma, karcinoma, melanoma i sarkoma [34].

Danas je poznato da NF- κB signalni put omogućava preživljavanje HRS ćelija, a da je izmicanje apoptozi druga bitna osobina ovih ćelija za koju je odgovorno najmanje 6 receptora TNF familije receptora CD30, CD40, CD95, TACI, BCMA i RANK, zatim kostimulatorni receptori CD80 i CD86, kao i E selektinski ligand CD15 [35]. Činjenica da su HRS ćelije rezistentne na CD95 posredovanu apoptozu, kao i da postoji neadekvatna Bax aktivacija, ističe značaj deregulacije signalnih puteva apoptoze. Mnogobrojne studije ukazale su na postojanje alteracija p53, Rb i p27 tumor supresor signalnog puta, prekomernu ekspresiju ciklina G1/S i G2/M faze ćelijskog ciklusa kao što su E, D2, D3, A i B1, takođe prekomernu ekspresiju ciklin zavisnih kinaza CDK1,2 i 6 kao i prekomernu ekspresiju antiapoptskih proteina poput c-FLIP, bcl-xl, c-IAP2, IAP i survina. Nedavne studije su takođe dokazale da IL13 ima važnu ulogu u preživljavanju HRS ćelija, ali i da EBV virus utiče na regulaciju apoptoze u bolesnika sa cHL [36].

Slika 1 prikazuje HRS ćeliju sa pomenutim receptorima i signalnim putem što predstavlja glavno obeležje ovih ćelija [34].



Slika 1. Rid Šternbergova ćelija u klasičnom Hočkinovom limfomu

1.4. Patogeneza Hočkinovog limfoma

Klasični Hočkinov limfom, karakteriše postojanje već opisanih HRS ćelija, klonalnih B ćelija, bez B ćelijskog fenotipa, sposobnih da izmiču apoptozi. Smatra se da upravo ova osobina HRS ćelija predstavlja ključni događaj u patogenezi cHL, a nekoliko mehanizama uključujući latentnu infekciju EBV virusom omogućava ovim ćelijama preživljavanje. Naime, epidemiološke studije ističu virusnu etiologiju HL, a pojedine sugerišu da EBV može biti transformišući agens u HL. Uloga drugih virusa u patogenezi HL je nepoznata. Pomenuti EBV može imati direktnu ili indirektnu ulogu u patogenezi HL, verovatno kao okidač patogenih mehanizama, ili može reflektovati urođenu ili stečenu nishodnu imunoregulaciju koja je uvod u oba, malignitet i reaktivaciju EBV [37]. Istraživanja su ukazala da se u HL genom virusa nalazi u monoklonalnoj formi, ukazujući da se infekcija tumorskih ćelija dogodila pre njihove klonske ekspanzije [38].

Važno je istaći da Hočkinove i Rid Šternbergove ćelije u EBV pozitivnih bolesnika pokazuju ekspresiju EBV latentnih gena LMP1, LMP2a, EBNA1. U zapadnim zemljama, oko 50% svih slučajeva HL je EBV pozitivno, a najviša pozitivnost postoji u subtipu mešo-

vite celularnosti (MC) oko 70%, dok subtip nodularne skleroze (NS) karakteriše manja pozitivnost 15–30% [4]. Pomenuta EBV pozitivnosti je od posebnog značaja obzirom da utiče na aktivaciju signalnih puteva u cHL. Naime, aktivacija NF-kB signalnog puta različita je u EBV pozitivnih i negativnih bolesnika sa HL. Zna se da konstitutivnu aktivaciju NF-kB u EBV pozitivnih podstiče LMP1, a kod EBV negativnih su to mutacije I κ Ba gena HRS ćelija.

LMP-1 je integralni membranski protein od 62 kd, koji je funkcionalno je analogan CD40 molekulu. Signalni put aktivacije preko CD40 receptora ima glavnu ulogu u interakciji T i B ćelija i preživljavanju GC ćelija [4]. On ima najviši potencijal transformacije i može indukovati fenotop HRS ćelija sa konstitutivnom aktivnošću NF-kB [39].

Smatra se da LMP2, koji je takođe eksprimiran u HRS ćelijama utiče na signal transdukcije tako što vrši blokadu signala koji su pokrenuti vezivanjem B ćelijskog receptora BCR kompleksa, a da se B ćelije ekspresijom LMP2 proteina štite od apoptoze [40].

Osim uloge EBV virusa, patogeneza cHL na molekularnom nivou se objašnjava aktivacijom već pomenutog transkripcionog faktora NF-kB, aktivatora proteina 1 (AP-1), člana STAT signalnog puta i deregulisanim NOTCH1 signalnim putem. Simultana, konstitutivna aktivacija svih signalnih puteva jedinstvena je u HL. Deregulacija pomenutih signalnih puteva postoji kod većine, ili gotovo svih HRS ćelija bolesnika sa HL, ističući njihovu centralnu ulogu na preživljavanje, rast i regulaciju ekspresije HRS specifičnih gena. Transkripcioni faktori (NF-kB) i AP-1 sinergistički regulišu antiapoptotske gene i proliferaciju, kao i veliki broj citokina i hemokina koje stvaraju HRS ćelije. Smatra se da su AP-1 i NOTCH1 signalni putevi odgovorni za gubitak B ćelijskog fenotipa, koji karakteriše HRS ćelije [41].

Konstitutivna aktivacija NF-kB signalnog puta je obeležje HRS ćelija i podstiče preživljavanje ćelija. Familija NF-kB sadrži 5 članova p50, p52, p65 (RelA), c-Rel i RelB u formi homodimera ili heterodimera. U mirovanju je NF-kB inaktiviran, u citoplazmi vezan za inhibitorni kappa B (I κ B), posebno I κ B alfa [42]. Kao odgovor na stimulus, I κ B kinaze se aktiviraju, nastupa fosforilizacija I κ B proteina kada se NF-kB oslobađa u jedro i tu započinje transkripciju njegovih ciljnih gena, čime se omogućava da transkripcioni NF-kB podstiče inflamatorni odgovor [43,44]. Aktivacija NF-kB se postiže multpnim mehanizmima: mutacijama NF-kB i JAK/ STAT signalnog puta, signala putem receptora superfamilije tumor nekrosis faktora (TNFRSF), tirozin kinaza i receptora citokina [45]. Pominje se nekoliko mogućih mehanizama aktivacije NF-kB u HL. Hočkinove i Rid Šternbergove ćelije (HRS) ćelije konstitutivno esprimiraju površinski receptor CD40, na čiju aktivaciju utiče latentni membranski protein LMP1i putem TNF vezujućeg receptora (TRAF) aktivise NF-kB [46]. Ligand CD40 se ekspimirira na

T ćelijama koje okružuju RS ćelije. Zna se da CD40 aktivira oba signalna puta NF- κ B i JNK/SAPK. NF- κ B transkripcioni faktori regulišu apoptozu, produkciju citokina, ćelijsku proliferaciju, transformaciju i razvoj tumora [47].

AP-1 familija transkripcionih faktora je uključena u kontrolu proliferacije, apoptoze i maligne transformacije. Njegova uloga u onkogenezi je nejasna. Konstitutivna aktivacija AP-1 sa jakom c-Jun i JunB ekspresijom postoji u svim ćelijama sa cHL. Ista aktivacija postoji i kod anaplastičnog krupno ćelijskog limfoma (ALCL), ali je odsutna u drugim tipovima limfoma. C-Jun je regulisan autoregulatornim procesom, a JunB je pod kontrolom NF- κ B signalnog puta. Aktivisani AP-1 podržava proliferaciju Hočkinovih ćelija, a suprimira apoptozu ćelija ALCL. Smatra se da AP-1 zajedno sa NF- κ B stimuliše ekspresiju regulatora ćelijskog ciklusa, ciklina D2, protoonkogeno c-met, receptora CCR7, koji su jako eksprimirani u HRS ćelijama. Uloga Jun/AP-1 u programiranoj ćelijskoj smrti je kompleksna i zavisno od vrste i tipa ćelija, može biti pro ili anti apoptotskih funkcija [48]. AP-1 čine homo ili heterodimeri sastavljeni od **Jun** (c-Jun, JunB, JunD), **Fos** (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) i **ATF** familije proteina. Transkripcija c-Jun i drugih članova AP-1 familije je brza, stimulirana mnogim ekstraćelularnim signalima, koji pokreću aktivaciju JNK, ERK 1/2 ili p38 MAP kinazni signalni put.

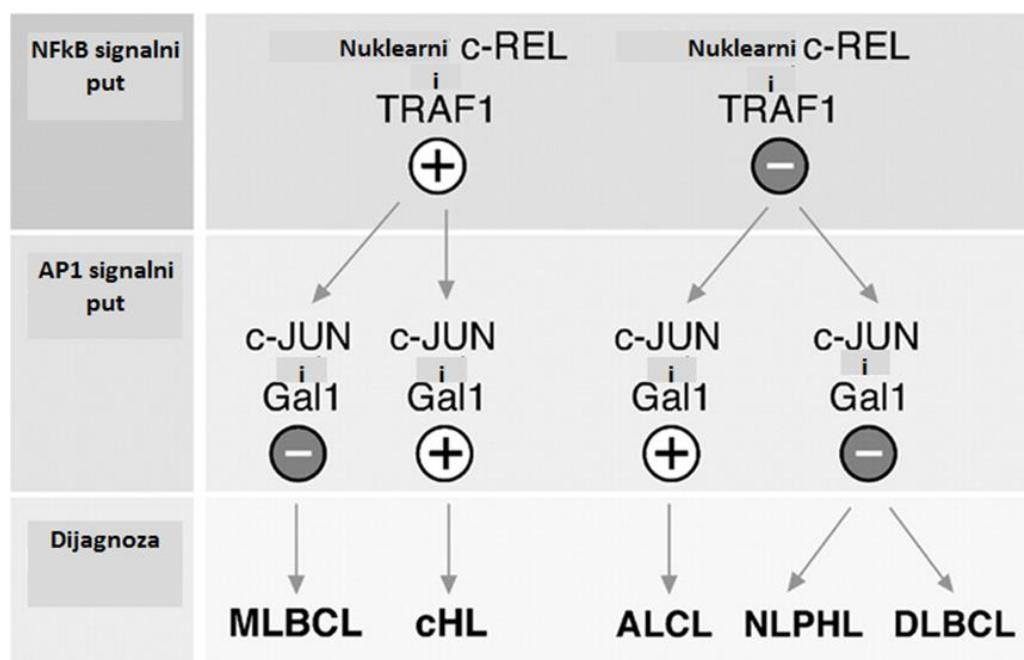
Notch 1 pripada familiji transmembranskih receptora koja kontroliše proliferaciju ćelija i diferencijaciju u odgovoru na ekstracelularne ligande koji su eksprimirani na susednim ćelijama okruženja. Dokazano je da je Notch1 protein jako eksprimiran na tumorskim ćelijama cHL i ALCL kao i da je ligand Notch1, Jagged 1 eksprimiran na malignim HRS ćelijama kao i na ALCL ćelijama i susednim ćelijama tumorskog okruženja. Iako su Notch 1 i njegov ligand eksprimirani na istoj ćeliji pokazano je da se Notch aktivira putem vezivanja na njegov ligand susedne ćelije. Dokazano je da je Notch1 jako eksprimiran na HRS ćelijama kao i na tumorskim ćelijama porekla T ćelija, ALCL. Aktivacijom Notch1 signala tumorskih ćelija putem njihovog liganda Jagged 1 reguliše se rast i preživljavanje tumorskih ćelija. Istraživanje Jundt i saradnika je pokazalo da Notch1 signali aktivisani ligandom Jagged1 ubrzavaju rast i inhibišu apoptozu ćelija cHL kao i ALCL [49].

Ranije pomenute mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) obuhvataju tri grupe molekula: ERK (vanćelijskim signalom regulisane kinaze), JNK (c-Jun N terminalne kinaze) i p38I uključene su u patogenezu cHL [50]. Naime, signalna kaskada Ras /Raf /MEK/ ERK prenosi proliferativni signal od ćelijskog receptora do transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju gena. Aktivacijom CD30, CD40 i receptora aktivatora nuklearnog kappa beta (RANK) putem odgovarajućih liganada u HL, može se povećati fosforilizacija ERK iznad bazalnog nivoa i uticati na preživljavanje ćelija [51,52]. Pored toga ERK signalni put kontroliše ekspresiju

receptora programirane ćelijske smrti (PD-1) ali i B7- H1 membranskog proteina, člana familije B7, koja inhibiše funkciju T limfocita kroz (PD- 1). Ekspimiran je takođe u ALCL i HL [53].

U zaključku se može reći da je uloga signalnih puteva u patogenezi cHL kompleksna u pogledu preživljavanja i proliferacije zahvaljujući MEK/ERK, JAK/STAT i NF-kB signalnom putu, ali i gena uključenih u transkripciju, transdukciju signala preživljavanja i rasta poput STAT1, TLR7, CD40 i IL- 6, kao i antiapoptskih gena BCL2 i BCL2L1. Svi oni doprinose nekontrolisanoj proliferaciji ćelija i antiapoptskom odgovoru u cHL [54].

Ranije opisani signalni put AP1, odnosno interakcija c- JUN sa Gal-1 omogućava diferenciranje cHL i ALCL u odnosu na MLBCL, NLPHL i DBCL, dok interakcija c-REL i TRAF1 u okviru NFkB signalnog puta razdvaja cHL i MLBCL od ostalih limfoma kako je prikazano na slici 2 [55].



Slika 2. Signalni putevi uključeni u patogenezu cHL i interakciju sa Gal-1

1.5. Genetske osobine Hoćkinovog limfoma

Genomska nestabilnost karakteriše Hoćkinove i Rid Štrenbergove ćelije. Može se podeliti u četiri kategorije: DNK mutacije, numeričke aberacije, strukturalne aberacije, delecije i/ ili povećan broj kopija regiona hromozoma [4].

Opisane promene genoma utiču na razvoj, kliničku sliku, kao i odgovor na terapiju bolesnika sa HL. Dokazano je da na razvoj HL utiču translokacije gena BCL2, BCL6, c- MYC, delecija 9q34 kao i povećan broj kopija gena p53.

Ključni događaj u patogenezi HL predstavlja mogućnost HRS ćelija da izbegnu apoptozu, pa su zato proučavane genetske aberacije koje utiču na aktivaciju ili inhibiciju apoptoze. Tako je utvrđeno da u gotovo svim ćelijskim linijama HL postoje mutacije TP53, FAS, kaspaze 8, kaspaze 10, FAS posredovanog domena smrti (FADD), BCL2 agonista ćelijske smrti (BAD) ili translokacije BCL2 [56].

Tokom poslednje decenije učinjeni su važni pomaci u razumevanju biologije HL kao i razvoj novih molekularnih tehnologija za identifikaciju novih prognostičkih faktora koji mogu biti korisni za stratifikaciju bolesnika u grupe rizika kao i predikciji odgovora na terapiju. Ranije pomenuti Sančes i saradnici su u svom istraživanju sačinili model od 11 najboljih prognostičkih gena koji su uključeni u 4 signalna puta (ćelijski ciklus, apoptozu, aktivaciju makrofaga i interferon regulatorni faktor 4). Ovim modelom identifikovali su grupu niskog i visokog rizika sa različitim petogodišnjim preživljavanjem 74% nasuprot 44,1%. Ovaj model može biti kombinovan sa četvrtim kliničkim stadijumom (CSIV) u konačni model predikcije koji identifikuje grupu bolesnika sa lošim ishodom bolesti i petogodišnjim preživljavanjem od 25,5% [24,57].

Druga grupa autora, Montalban i saradnici je definisala četiri molekularna markera koji utiču na ishod bolesti, a multivarijantna analiza je pokazala da p53, Bcl-Xl i terminalna dezoksinuklotidil transferaza posredovana dezoksiuridin trifosfat biotinom (TUNEL) imaju nezavistan značaj. Kombinacijom ovih faktora definisane su dve grupe bolesnika, prva bez ijednog ili sa jednim molekularnim prognostičkim faktorom i druga grupa sa dva do tri molekularna prognostička faktora. Uočeno je da unutar grupe niskog rizika IPS skora postoje dve grupe bolesnika sa različitim ishodom bolesti. Akumulacija molekularnih događaja uticala je na lošu prognozu bolesti. Nažalost, unutar grupe visokog rizika IPS skora nije uočena takva podela [24,58].

Uprkos mnogobrojnim istraživanjima nije utvrđen jedinstven genomski defekt malignih HRS ćelija, već postojanje brojnih defekata na molekularnom nivou, čime je pokazano da je genetska baza HL mnogo kompleksnija nego što se očekivalo, a samim tim i lečenje ovih bolesnika. Dosadašnji prognostički skorovi koriste kliničke prognostičke faktore koji opisuju tumorsku masu ali ne i patogenezu bolesti, pa imaju ograničenu vrednost u razumevanju limfomageneze kao i progresije bolesti. Naime, kliničke i patološke osobine HL reflektuju abnormalni imuni odgovor, pa se samim tim nameće potreba uključivanja statusa imunosupresije u prognostičke skorove. Identifikacija genskih lokusa koji su u osnovi imunoloških mehanizama odgovora na lečenje i toksičnosti može doprineti individualizaciji lečenja i omogućiti primenu novih terapijskih modaliteta.

1.6. Nemaligne ćelije Hočkinovog limfoma

Hočkinov limfom je tip limfoproliferativnog oboljenja koje se razlikuje od drugih nehočkin limfoma kliničkim i patološkim karakteristikama. Glavna osobina cHL jeste da samo 1% ćelija tumorske mase čine neoplastične ćelije, a njihovo inflamatorno okruženje čine uglavnom mali limfociti, neutrofili, eosinofili, plazma ćelije, mast ćelije i neki drugi tipovi ćelija. Ovo biološko okruženje jeste rezultat autokrine i parakrine interakcije između neoplastičnih i reaktivnih ćelija putem cito i hemokina. To vodi formiranju povoljnog okruženja neoplastičnih ćelija u kome one proliferišu i izbegavaju apoptozu [59].

Brojna istraživanja ukazala su na ulogu tumorskog okruženja u molekularnoj patogenezi cHL i rasvetlila kompleksnu interakciju malignih HRS i nemalighnih reaktivnih ćelija okruženja.

Tako se danas ćelije imunološkog sistema koje infiltrišu tumor smatraju njegovim integralnim delom. Paradoksalna je pro i antitumorska uloga imunog sistema kojom se objašnjava mogućnost tumora da izbegne imunološki nadzor. Odavno se zna za postojanje antitumorskih CTL i NK ćelija, ali je prisustvo protumorskih ćelija (makrofaga, mastocita, neutrofila, T i B limfocita) ustanovljeno krajem prošlog veka i bazirano na udruženosti tumora i hronične inflamacije. Poznato je da hronična inflamacija pokreće celularne događaje koji promovišu malignu transformaciju ćelija i karcinogenezu. Dokazano je da inflamatorni medijatori poput TNF-a, IL-6, TGF- β i IL-10 učestvuju u inicijaciji i progresiji kancera [60]. Smatra se da inflamatorne ćelije kao i citokini tumorskog okruženja više doprinose rastu tumora, progresiji kao i imunosupresiji nego što pokreću adekvatan antitumorski imuni odgovor [61].

Neutrofili imaju centralnu ulogu u tumorskom antiinflamatornom odgovoru. Proučavan je prognostički značaj apsolutnog broja neutrofila, a rezultati pokazuju da neutrofili periferne krvi pružaju značajne informacije pri praćenju progresije tumora, predviđanju mogućih komplikacija i oceni terapijskog odgovora [62]. Apsolutni broj neutrofila predstavlja marker infekcije i inflamacije. Poznato je da inflamatorni proces, ima ulogu u razvoju i progresiji kancera i reflektuje se brojem leukocita. U hematološkim malignitetima broj leukocita je prognostički faktor ishoda bolesti uključujući internacionalni prognostički sistem [62]. Tako na primer u IPS-7 za bolesnike sa odmaklim stadijumom HL loš ishod bolesti prezentuje broj leukocita viši ili jednak od $15.000/\text{mm}^3$.

Pored već pomenutog IPS-7 skora, povišen broj leukocita uključuje i MIPI prognostički skor mantle ćelijskih limfoma, koji potvrđuje da visok broj leukocita predstavlja negativni prognostički faktor preživljavanja [62].

Pored već istaknutog prognostičkog značaja broja leukocita u hematološkim malignitetima, broj leukocita predstavlja takođe prognostički faktor u solidnim tumorima. Koh i saradnici su u svom istraživanju pokazali prognostički značaj odnosa apsolutnog broja neutrofila i limfocita u bolesnika sa cHL. Univarijantna analiza je pokazala da visok odnos ANC/ALC >4,3 koreliše sa lošim opštim preživljavanjem. Analiza odmaklih stadijuma pokazala je da odnos ANC/ALC jeste značajan za opšte preživljavanje, a multivarijantana analiza da odnos ANC/ALC jeste nezavistan prognostički faktor opšteg preživljavanja. Pomenuti odnos ANC/ALC omogućava dalju stratifikaciju rizika bolesnika koji su klasifikovani u grupu niskog rizika na osnovu IPS-7 skora manjeg od 4 [63].

Postojeći prognostički skorovi ne uključuju eosinofile koji imaju važnu ulogu u patobiologiji HL, za sada nedovoljno poznatim mehanizmom, koji uključuje IL-5 i GM-CSF. Incidenca eozinofilije u HL je oko 15%, a opisana je pojava obe, periferne i tkivne eozinofilije [64].

Pinto i saradnici ukazuju da eosinofili deluju kao važni elementi u patobiologiji HL pružanjem ćelijskih liganada TNF superfamilije receptora CD40, CD30, CD95/Fas, sposobnim da prenesu signale proliferacije i antiapoptoze na površinu HRS ćelija [65].

Istraživanje Von Wasilewskog i saradnika pokazalo je postojanje značajne tkivne eozinofilije kod oko 38% bolesnika, ali u različitom procentu kod pojedinih histoloških subtipova, tako da prisustvo tkivne eozinofilije nije utvrđeno u podtipu NLPH, a prisutno je u 14% u podtipu limfocitima bogatog cHL, u 40% podtipu nodularne skleroze gradusa 1, u 55% podtipu NS gradusa 2, u 43% mešovite celularnosti i 54% limfocitne deplecije. Multivarijantne analize su pokazale da je tkivna eozinofilija najjači prognostički faktor perioda bez bolesti i opšteg preživljavanja. Ovaj efekat je značajan kod NS1 bolesnika, ali kod MC nije pokazan efekat tkivne eozinofilije na preživljavanje.

Eosinofili sekretuju CD30 ligand koji je sposoban da veže CD30 pozitivne HRS ćelije. Aktivacija TRAF2, praćena je aktivacijom NF-kappaB koja se dešava vezivanjem CD30L /CD30 i može objasniti neoplastičnu proliferaciju kao i apoptozu HRS ćelija [66].

Posebno se ističe histološki subtip nodularne skleroze koji karakterišu fibrozna vlakna koja nisu prisutna u ostalim subtipovima HL. Bazični faktor rasta fibroblasta (bFGF) jeste jedan od moćnih stimulatora fibroblasta koji je uključen u proces proliferacije. Dokazano je da HRS ćelije kao i stromalne ćelije i histiociti okruženja tumora ekspimiraju pomenuti bFGF u NS subtipu HL, koji doprinosi razvoju fibroze [67].

Ekspresija faktora rasta fibroblasta (FGF1 i FGF2) kao i njihovih receptora postoji u mnogim neoplazmama, uključujući hematološke malignitete. Ovi faktori mogu izazvati rast

tumora direktno ili indirektno putem promovisanja rasta krvnih sudova. Pomenuti FGF za razliku od VEGF mogu biti esprimirani kao odgovor na parakrini stimulus [68].

Eotaxin je CC hemokin koji privlači eosinofile i T helper 2 (Th2) ćelije u alergijsku inflamaciju. Jundt i saradnici ističu u svom istraživanju da je eotaxin jako eksprimiran na fibroblastima tkiva HL, dok HRS ćelije ne eksprimiraju ovaj hemokin u kulturi tkiva. Dokazano je da HRS ćelije stvaranjem tumor nekrosis faktora alpha (TNF- α) omogućavaju ekspresiju eotaxina od strane fibroblasta, a time i privlačenje eosinofila kao i T limfocita [69]. Važno je istaći ulogu mast ćelija, obzirom da bolesnici sa cHL i velikim brojem mast ćelija u tkivu tumora imaju lošu prognozu. Mast ćelije produkuju funkcionalno aktivni CD30 ligand a loša prognoza jeste rezultat stimulacije HRS ćelija putem CD30 liganda. Mast ćelije pod uticajem stimulacije CD30 oslobađaju citokine i hemokine poput IL-8 koji ima angiogene osobine [70].

Apsolutni broj limfocita je analiziran u hematološkim malignitetima kao i solidnim tumorima kao marker antitumorskog imuniteta bolesnika. Prognostički značaj je evaluiran tokom različitih faza lečenja hemoterapije i radioterapije, kao i posle autologe transplatacije matične ćelije hematopoeze (ASCT). Dokazano je da ALC predstavlja nezavistan prognostički faktor preživljavanja nezavisno od tipa karcinoma i uključen je u nekoliko važećih prognostičkih skorova poput IPS-7 za odmakle stadijume HL [62].

Apsolutni broj limfocita pri dijagnozi se može razmatrati kao biomarker imunog statusa maligniteta. Nekoliko studija je potvrdilo značaj ALC u predikciji preživljavanja bolesnika sa limfomom. Jedna od prvih studija koja je izučavala prognostički značaj ALC u vreme dijagnoze bolesti bila je kod bolesnika sa folikularnim limfomom, a odnosila se na ALC viši od $1 \times 10^9/L$.

Potom je izučavan apsolutni broj limfocita periferne krvi kao odraz imunog statusa novodjagnostikovanih bolesnika sa multiplim mijelom kao i mijelodisplastičnim sindromom.

Utvrđeno je da $ALC > 1,4 \times 10^9/L$ utiče na bolje opšte preživljavanje bolesnika sa MM, a slični rezultati su bili i za $ALC > 1,2 \times 10^9/L$ bolesnika sa mijelodisplastičnim sindromom.

Dokazano je da povišen broj leukocita pri dijagnozi HL koreliše sa smanjenim opštim preživljavanjem bolesnika sa cHL kao i kod DBCL bolesnika koji se leče hemioterapijom.

Nedavne studije ukazale su na prognostički značaj apsolutnog broja limfocita periferne krvi na preživljavanje bolesnika sa metastatskim karcinomima koji su primali hemioterapiju nakon prve linije lečenja. Konstatovano je da broj limfocita niži od $700/\mu l$ jeste nezavisni prediktor smanjenog preživljavanja bolesnika sa metastazama koji se leče hemioterapijom [62].

Dokazano je da prisustvo monocita promoviše progresiju tumora i podržava antitumorski imunitet. Štaviše, povišen broj monocita periferne krvi predstavlja prediktivni faktor lošeg preživljavanja bolesnika sa malignitetima. Njegov značaj izučavan je i kod bolesnika sa hematološkim malignitetima pa je tako utvrđeno da kod bolesnika sa DBCL, $AMC \geq 630 \mu/L$ u vreme dijagnoze jeste povezan sa lošim PFS kao i OS. Dokazano je i da odnos AMC/ALC jeste prognostički i da može da identifikuje bolesnike niskog, intermedijarnog i visokog rizika. Pomenuti odnos AMC/ALC pruža dodatne informacije kada se poredi sa IPS-7 skorom.

U bolesnika sa cHL odnos limfocita i monocita periferne krvi u vreme dijagnoze bolesti jeste jak prediktor OS, PFS i vremena progresije bolesti. Studija je pokazala da $AMC > 900 \mu/L$ u vreme dijagnoze jeste indikator lošeg preživljavanja i ishoda bolesti [62].

Makrofazi povezani sa tumorom (TAM) imaju glavnu ulogu u povezivanju inflamacije i kancera, zahvaljujući brojnim funkcijama koje bitno utiču na progresiju bolesti. Oni čine 50% tumorske mase i svakako da reprezentuju nove targete biološke terapije tumora. Nastaju iz monocita periferne krvi koji se diferentuju u različite tipove makrofaga, M1 tip i M2 tip makrofaga. Danas je opšte prihvaćeno da TAM imaju M2 fenotip i pokazuju uglavnom protumorske funkcije promovišući preživljavanje tumorskih ćelija, proliferaciju kao i diseminaciju. Visok nivo TAM često, ali ne uvek, koreliše sa lošom prognozom. Nedavne studije su ukazale na povezanost njihovog prisustva i pojavu metastaza. Ovaj patološki nalaz potvrđen je na nivou gena, pri čemu molekularni potpis povezan sa lošom prognozom postoji kod limfoma, karcinoma dojke i uključuje gene karakteristične za makrofage [71].

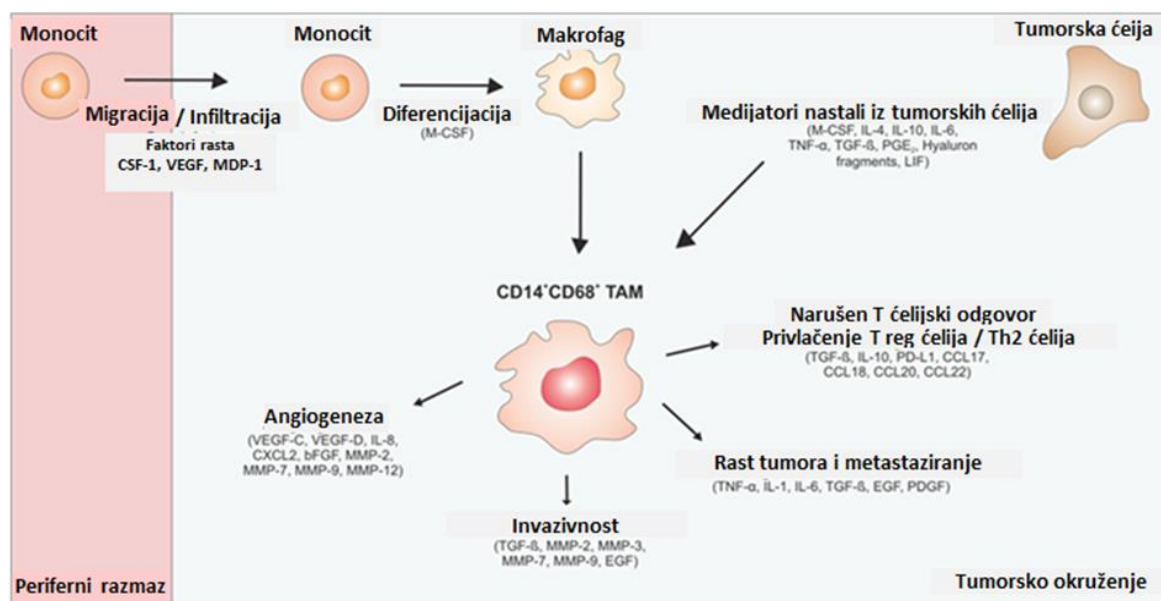
Infiltracija makrofazima započinje rano pre invazivnog stadijuma bolesti i progresivno se povećava.

Dokazano da molekuli neoplastičnih i stromalnih ćelija privlače monocite periferne krvi, a hemokin CCL2, ranije opisan kao hemotaksični faktor nastao iz tumora ima glavnu u ovom procesu. Produkcija CCL2 postoji i od strane TAM ukazujući na ulogu u pojačanju ovog procesa privlačenja monocita. Drugi hemokini koji su uključeni u proces privlačenja monocita periferne krvi su CCL5, CCL7, CXCL8 i CXCL12 kao i citokini poput VEGF, PDGF, faktor rasta makrofaga (M-CSF) [68]. Monociti mogu biti privučeni fibronektinom, fibrinogenom kao i drugim faktorima. Nakon što monociti, a zatim makrofazi nasele tkivo tumora bivaju okruženi signalima koji su u stanju da oblikuju nove ćelije koje su potrebne tumoru. Faktori rasta i hemokini privlače cirkulišuće monocite periferne krvi u tkivo tumora, gde se pod uticajem M-CSF privučeni monociti diferentuju u makrofage. Faktori nastali iz tumora omogućavaju polarizaciju makrofaga u TAM i podržavaju dalju angiogenezu, rast tumora i pojavu metastaza.

Pomenuti TAM uzrokuju lokalnu imunosupresiju privlačenjem Treg ili direktno supresijom T ćelijskog imunog odgovora.

Makrofazi predstavljaju esencijalnu komponentu urođenog imuniteta i imaju centralnu ulogu u inflamaciji i odbrani bolesnika.

U tkivu makrofazi sazrevaju i aktiviraju se kao odgovor na kombinaciju stimulusa da bi stekli specijalizovane funkcionalne fenotipove. Postoji dihotomija aktivacije makrofaga, klasična nasuprot alternativnoj, odnosno M1 i M2 aktivaciji [72]. Slika 3 opisuje nastajanje TAM u tkivu tumora kao i njegovu ulogu u daljem razvoju istog [73].



Slika 3. Nastajanje TAM u okruženju tumora

Kao odgovor na različite signale makrofazi prolaze kroz M1 aktivaciju stimulisanu Toll sličnim receptorima, (TLR) ligandima i interferon gamma (IFN- γ) ili alternativnoj M2 aktivaciji stimulisanj IL-4/IL-13, a ovaj status odražava Th1- Th2 polarizaciju T ćelija.

M1 fenotip karakteriše ekspresija visokog nivoa proinflamatornih citokina, visoka produkcija reaktivnog nitrogena i kiseoničnih medijatora, promocija Th1 odgovora, jaka mikrobiološka i antitumorska aktivnost. Suprotno njima, M2 makrofazi, jesu uključeni u odbranu od parazita i promociju remodelovanja tkiva i progresije tumora, dakle posedovanjem imunoregulatornih funkcija. Karakterišu se efikasnom fagocitnom aktivnošću visokom ekspresijom scavenging molekula kao i receptora manoze i galaktoze produkcijom ornitina i poliamina putem arginaze i fenotipom IL-12, IL-10, IL-1 decoyR, IL-1 RA [74]. Klasični IRF/STAT signalni put aktivira putem IFN i TLR signala koji promenu funkcije makrofaga u M1 fenotip putem STAT1 ili putem IL-4 ili IL-13 u M2 fenotip putem STAT6.

M1 makrofazi ushodno regulišu IRF5 koji je esencijalan za indukciju citokina IL-12, IL-23, TNF uključenih u pokretanje Th1 i Th17 imunog odgovora. Receptori tipa I i II za IL-4 aktivišu STAT6 koji povratno aktivira transkripciju gena tipičnih za M2 polarizaciju. Dokazano je da IL-10 aktivira STAT3 posredovanu ekspersiju gena povezanih sa M2 fenotipom [74].

M1 makrofazi, klasično aktivisane ćelije, nastaju u prisustvu IFN- γ i stimulusa od strane infektivnih agenasa kao što je lipopolisaharid (LPS) i karakteriše ih stvaranje IL-12 i IL-23 i posledične aktivacije T ćelijskog imunog odgovora T1 tipa, citotoksične aktivnosti fagocitovanih mikroorganizama i neoplastičnih ćelija, ekspresije visokog nivoa ROL i dobre sposobnosti antigen prezentujućih ćelija (APC). Uopšteno, M1 makrofazi deluju kao vojnici u odbrani domaćina od virusnih i mikrobni infekcija, borbi protiv tumora, stvaranju velikog broja inflamatornih citokina i aktiviranja imunog odgovora.

Na drugoj strani M2 ćelije, se diferenciraju stimulacijom monocita od strane IL-4 i IL-13 imunim kompleksom TLR ligandom ili sa IL-10 i glikokortikosteroidima. Karakteriše ih stvaranje CCL17 i CCL22 kao i sekrecija visoka ekspresija manoze, scavering i galaktosa tipa receptora, loša sposobnost antigen prezentujuće ćelije i zarastanja rana. M2 ćelije promovišu čišćenje debris, angiogenezu, remodelovanje i oporavak oštećenog tkiva.

Treba istaći da M2 ćelije kontrolišu inflamatorni odgovor nishodnom regulacijom M1 posredovanih fukcija [71].

Već je rečeno da TAM predstavljaju M2 polarizovane makrofage, a ova polarizacija jeste rezultat odsustva M1 signala kao što je IFN- γ ili bakterijske komponente u tumoru [68]. Suprotno makrofazima prognostički značaj visokog broja tumor infiltrišućih limfocita (TIL) je obično povezan sa boljom prognozom melanoma, kolorektalnog i ovarijalnog karcinoma ali to nije slučaj kod karcinoma želuca gde visok broj TIL ne koreliše sa lošom prognozom, a u slučaju skvamoznog karcinoma glave i vrata je još uvek diskutabilan značaj.

Unutar tumorske mase postoji druga mijeloidna ćelijska populacija koju karakteriše imunosupresivna aktivnost. Prepoznate su u ranijim studijama, ali su tek nedavno definisane kao supresorske ćelije mijeloidnog porekla (MDSC) koje imaju sposobnost da suprimiraju blastogenezu T ćelija u tkivu tumora [71].

Infiltracija tumor infiltrišućim makrofazima (TAM) je generalno povezana sa lošom prognozom kao što je dokazano u HL, gliomu, holangiokarcinomu kao i karcinomu dojke. Ipak, unutar istog tumora mogu da postoje različiti funkcionalni statusi TAM-a. Limfociti su ti koji rukovode funkcijom TAM-a, ali su putevi različiti u pojedinim organima [74].

Makrofazi su uključeni u patogenezu cHL i imaju negativan uticaj na ishod bolesti. Studija Barrosa i saradnika je pokazala značaj M1 i M2 polarizovanih makrofaga na sastav T ćelija, primenom dvostrukih markera, kombinovanjem CD68 i CD163 sa pSTAT1 ili CMAF. Naime u slučaju EBV+ cHL dominira M1 polarizovano mikrookruženje, slično Th1 posredovanoj inflamatornoj bolesti, a u slučaju EBV- cHL postoji dominantno M2 polarizovano mikrookruženje slično Th2 posredovanoj inflamatornoj bolesti. U zaključku se može reći da polarizacija makrofaga u cHL koreliše sa dominantnim T ćelijskim odgovorom i na nju može uticati EBV status neoplastičnih ćelija [75].

Nastajanje i preživljavanje kancerskih ćelija predstavlja multifaktorijalni proces koji uključuje i promene unutar mehanizama odbrane.

Virchow je prvi opisao prisustvo leukocitne infiltracije u solidnim tumorima, ali je tek nedavno razjašnjena različita regulatorna uloga ćelija imunog sistema tokom razvoja tumora. Nesumnjivo je da leukociti, uključujući T limfocite kao i natural killer ćelije, imaju ključnu ulogu u odbrani od tumora. Pored već pomenutih T limfocita, antitumorsku aktivnost ima i nekoliko podskupova mijeloidnih ćelija uključujući mast ćelije, monocite granulocite, neutrofile i makrofage [76].

Hannahan i Weiber su 2000. godine definisali 6 fundamentalnih obeležja karcinoma koji uključuju da rast tumora postoji u prisustvu sopstvenih signala, neosetljivost na signale koji inhibišu rast tumora, sposobnost da izbegnu apoptozu, ograničen potencijal rasta, sposobnost da utiču na angiogenezu kao i sposobnost da nasele okolna tkiva i metastaziraju u druge organe. Ova obeležja definišu karcinom na osnovu molekularnih, biohemijskih i celularnih osobina tumorskih ćelija. Nedavno je prihvaćeno da sedmo obeležje karcinoma jeste posledica nesposobnosti imunog sistema da eliminiše tumor [77].

Ključnu ulogu u odbrani od tumora imaju T ćelije, T limfociti koje predstavljaju deo specifične, stečene imunosti. Poznato je da T limfociti sazrevaju u timusu i da dugo opstaju u krvnoj cirkulaciji.

Danas se zna da postoje sledeće podvrste T limfocita: citotoksični T limfociti (CD8+ T ćelije), pomoćnički T limfociti (CD4+ T limfociti) i regulatorni T limfociti (Treg).

Citotoksični T limfociti, T_c ili CTL mogu da unište ćelije zaražene virusom, tumorske ćelije i učestvuju u odbacivanju transplantanata. One predstavljaju CD8+ limfocite koji prepoznaju antigen ako je vezan uz molekul MCH klase I koji je prisutan na svim nuklearnim ćelijama. Aktivaciju CD8+ T limfocita stimuliše prepoznavanje peptida u sklopu MHC

molekula I klase i zahteva kostimulaciju i /ili pomoć CD4+ T ćelija. Nakon aktivacije T limfociti počinju da proliferišu što dovodi do ekspanzije antigen specifičnih klonova.

Nasuprot solidnim tumorima gde je infiltracija T limfocitima minorna, oni čine većinu tumorskog infiltrata u HL. Poznato je da većinu T limfocita tumorskog tkiva cHL čine CD4+ T limfociti, dok CD8 +T limfociti ekspimiraju granzyme B i perforin i čine oko 25% infiltrata. Nejasno je međutim da li prisustvo ovih ćelija reflektuje citotoksični odgovor usmeren direktno na HRS ćelije tumora. Pomenute HRS ćelije prezentuju antigene peptide uz molekul MHC klase I, i mogu biti lizirane od strane CTL, što se posebno odnosi na peptide nastale posredovanjem EBV ili drugim tumorskim antigenom. Smatra se da CD8+ T ćelije u tkivu HL predstavljaju poliklonsku populaciju sa ograničenom klonskom ekspanzijom ali su dokazi o antigenoj selekciji nedovoljni. Ovi rezultati ukazuju da i CD8+ T ćelije kao i CD4+ mogu biti privučene u tkivo tumora na antigen nespificičan način, obzirom da HRS ćelije seketuju TARC koji privlači CD4+ kao i CD8+ T limfocite u tkivo tumora.

Dokazano da kod oko 40% slučajeva HL, HRS ćelije jesu EBV pozitivne, a ta pozitivnost je povezana sa višim procentom CD8+ limfocita, što rezultuje nižim CD4/CD8 odnosom. Naime, kod EBV negativnih HL, CD8+ T ćelije čine oko 21% reaktivnih limfocita, a kod EBV pozitivnih je procenat viši i iznosi 34%. Nedavno je međutim dokazano da viši procenat aktivisanih CD8+ ćelija infiltrata limfnih nodusa HL utiče na lošu prognozu bolesti [78].

Pomoćnički T limfociti, Th su CD4+ limfociti koji se aktiviraju nakon prezentacije antigena uz pomoć MCH klase II molekula koje su izražene na površini APC kao što su dendritične ćelije, monociti periferne krvi, tkivni makrofazi i B limfociti.

Nasuprot ulozi CD8+ CTL limfocita, funkcioni značaj CD4+ T limfocita u progresiji tumora izgleda paradoksalan. Tako na primer, retrospektivne analize ukazuju da kod karcinoma kolona i pluća ekstenzivna infiltracija tkiva tumora CD4+ T ćelijama koreliše sa povoljnim ishodom bolesti, a u slučaju karcinoma dojke i bubrega koreliše sa smanjenim opštim preživljavanjem. Ova istraživanja ukazuju da je imuni odgovor organ zavistan i baziran na neoplastičnom okruženju, sa pro ili anti tumorimunim odgovorom. Moguće objašnjenje nalazi se u heterogenosti CD4+ T podskupa ćelija koje se akumulira u tkivima [76].

Najvažniji membranski protein koji ima ulogu u efektorskoj funkciji T ćelija je C40 ligand (CD40L). On se vezuje za svoj receptor CD40, koji se nalazi na makrofazima, B limfocitima, i dendritskim ćelijama, koje se nakon toga aktiviraju.

Podskup CD4+ T limfocita, privučen od strane HRS ćelija ima ključnu ulogu u okruženju cHL i može da stvara veliki broj hemokina CCL5, CCL17 i CCL22. Zavisnost HRS

ćelija od CD4+ T ćelija okruženja, potvrđuje nekoliko istraživanja. Ove ćelije uvek okružuju HRS ćelije čak i kada se HL diseminuje u druge organe kao što je koštana srž. Fenomen rozete podrazumeva da su HRS ćelije blisko povezane sa okolnim CD4+ ćelijama koje čine Th i Treg ćelije. Kontakt HRS ćelija sa T ćelijama posredovan je uglavnom, sa nekoliko parova adhezionih molekula naročito CD54CD11a i CD58CD2. Uticaj HRS ćelija na osobine T ćelija uključuje postojanje nekoliko površinskih ligand receptora i solubilnih faktora, poput CD40 (TNFRSF5) koji je član TNFRSF i visoko je eksprimiran na HRS ćelijama. Pokretanje CD40 rezultuje aktivacijom NF-kB signalnog puta i poboljšava formiranje kolonija HRS ćelija. Aberantna aktivnost NF-kB signalnog puta predstavlja obeležje HL i olakšana je mutacijama NF-kB inhibitora. Rozete T ćelija eksprimiraju CD40L, obeležje Th2 i Treg ćelija i tako podržavaju signale preživljavanja HRS ćelija [79].

CD4+ T ćelije predstavljaju visoko heterogenu populaciju ćelija koja se razvija duž različitih funkcionalnih linija, koje zavise od citokina polarizacije tokom aktivacije antigenima. Naime, nastanak Th1 i Th2 ćelija nije slučajan proces, već je regulisan signalima koje naivne CD4 +T ćelije dobijaju kada prepoznaju antigene mikroorganizama. Kada naivne T ćelije prepoznaju antigene mikroorganizama prezentovane na APC one bivaju izložene dejstvu IL-12 koji pospešuje diferencijaciju T ćelija u Th1 pravcu. Ukoliko same T ćelije proizvode IL-4, on indukuje diferencijaciju ovih ćelija u Th2 pravcu.

Pomoćničke CD4 +T ćelije mogu, da se diferenciraju u podgrupe efektorskih ćelija čija se funkcija razlikuje zahvaljući produkciji različitih citokina.

Nakon aktivacije CD4+T ćelije, Th1 fenotipa sekretuju IFN- γ , TNF- α , IL-2 i IL-12. Putem stvaranja ovih citokina Th1 ćelije regulišu imuni nadzor ushodnom regulacijom antigena i prezentacijom MCH molekula I i II klase, od strane profesionalnih APC koje mogu da regulišu trajanje i veličinu CD8+ CTL odgovora. Kao najvažniji citokin ističe se IFN- γ , koji predstavlja snažan aktivator makrofaga pa se time omogućava da Th1 ćelije stimulišu unošenje i ubijanje patogena od strane fagocita što predstavlja ključnu komponentu ćelijske imunosti.

Možemo reći da Th1 ćelije nakon jake antigen specifične aktivacije mogu direktno da ubiju ćelije tumora oslobađanjem visokog nivoa IFN- γ , TNF- α i citolitičnih granula. Tako, Th1 odgovor može direktno ili indirektno da reguliše antitumorski odgovor koji sprečava razvoj tumora.

Suprotno tome Th2 CD4+ T ćelije eksprimiraju visok nivo IL-4,5,6,10 i 13 koji zajedno menjaju stečeni imuni odgovor indukovanjem anergije T ćelija, inhibicijom T ćelijski posredovane citotoksičnosti kao i podsticanje humoralnog imunog odgovora direktno putem B ćelija.

Od nedavno CD4+ T limfociti uključuju i Th17 subset, koji nastaje u prisustvu IL-6 i faktora transformacije rasta (TGF- β) i ostvaruje svoju ulogu putem sekrecije IL-17, 21 i 22. Uloga ovih ćelija je dobro proučena u hroničnim inflamatornim kao i u autoimunim bolestima. Istraživanja su pokazala da u okruženju karcinoma postoji prisustvo tumor infiltrirajućih Th17 ćelija i njihovih citokina, ali je pokazano da njihova uloga može biti dvostruka i pro i anti tumorska [76].

Naivni CD4 +T limfociti se po prepoznavanju antigena u odsustvu IL-6 pod uticajem TGF β diferencijuju u četvrtu subpopulaciju T efektornih ćelija (Teff) koja ima regulatornu funkciju u imunskom odgovoru sa karakterističnim fenotipom koji uključuje ekspresiju CD4 i CD25 molekulana površini ćelije i transkripcijski faktor Foxp3.

Ćelije prirodne ubice, (natural killer cells NK ćelije) čine 10–15% populacije limfocita periferne krvi. One predstavljaju subpopulaciju limfocita poreklom iz koštane srži koja se razlikuje od T i B limfocita. Karakteriše ih funkcionalna sposobnost lize ciljnih ćelija bez prethodne senzibilizacije i restrikcije od MHC. Pomenuta populacija NK ćelija je heterogena i čine je tri podgrupe međusobno različitih ćelija u pogledu fenotipa, funkcionalnih karakteristika i vrste površinskih receptora. Fenotip NK ćelija karakteriše ekspresija CD56 i CD16 antigena, a odsustvo CD3 antigena [80].

Nedavna klinička i eksperimentalna istraživanja ukazala su da su NK ćelije uključene u prepoznavanje i eliminaciju tumorskih ćelija. One predstavljaju urođeni imunitet u borbi protiv karcinoma. HL karakteriše prisustvo CD30 tumorskih ćelija i masivna infiltracija imunih efektornih ćelija limfnih nodusa. Reiners i saradnici su pokazali da periferne NK ćelije bolesnika sa HL ne mogu da eliminišu HL ćelije, kao i da oštećena funkcija NK ćelija koreliše sa povišenim nivoom solubilnih liganada za NK ćelijske receptore NKp30 i NKG2D, faktora koji umanjuju funkciju NK ćelija. Pomenuti autori su pokazali da je oštećenje funkcije NK ćelija reverzibilno kao i da može biti antagonizovano kombinovanom target terapijom CD16 i CD30 molekula [81].

Urođeno ubilačke T ćelije, NKT (natural killer T cells) jesu posebna vrsta T limfocita koji imaju neka obeležja urođene i stečene imunosti. One poseduju T ćelijski receptor, TCR limitiranog raspona, prepoznaju lipide i glikolipide prezentovane molekulom CD1d, a ne putem MHC, a mogu biti CD4+ ili CD8+. Aktivacija NKT ćelija dovodi do stvaranja velikog broja Th1 kao i Th2 citokina koji aktiviraju druge komponente imunog sistema pa su tako NKT ćelije uključene u oba, urođeni i stečeni imunski odgovor.

Pomenuti CD1 molekuli, jesu neklasični molekuli slični MHC molekulima, koji predstavljaju lipidne antigene T ćelija i pokreću specifični imuni odgovor. Postoji 5 izoformi CD1 molekula (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d i CD1e), ali su samo CD1c i CD1d eksprimirani na B ćelijama. Posebno se ističe imunoregulatorna uloga CD1 T ćelija u patogenezi mnogih maligniteta ali je njihova uloga u HL još uvek nedovoljno poznata [82].

$\gamma\delta$ T Limfociti čine 2% T limfocita koji poseduju T ćelijski receptor (TCR) na svojoj površini. Pomenuti T ćelijski receptor se sastoji bilo iz gama-delta ($\gamma\delta$) ili alfa-beta ($\alpha\beta$) heterodimera koji se eksprimira sa CD3 kompleksom proteina na površini ćelije. Većina zrelih T ćelija eksprimira $\alpha\beta$ TCR ali kod 5% normalnih T ćelija postoji ekspresija $\gamma\delta$ TCR, koje imaju citotoksične osobine i mogu odgovoriti na stimuluse stvaranjem hemokina i proliferacijom, a većina ovih ćelija ne poseduje CD4 i CD8 površinski marker, a samo su pojedini CD8+. Nepoznata je funkcija $\gamma\delta$ T ćelija [83].

Regulatorne T limfocite (Treg), ranije nazivane supresorski T limfociti, karakteriše ekspresija CD4, CD25 i Foxp3. Mogu da nastanu u timusu ili u perifernim limfnim organima ali su nedovoljno poznati uslovi koji dovode do njihovog razvoja. Ove ćelije konstitutivno ispoljavaju sledeće molekule: CD25 (α lanac receptora za IL-2), CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen -4) i GITR (glucocorticoid induced TNFR family related gene), koji su ispoljeni i na aktiviranim efektorskim CD4+ T limfocitima, ali ih u odnosu na njih karakteriše i prisustvo Foxp3 transkripcionog faktora. Molekul Foxp3 funkcioniše kao supresor gena za IL-2, IL-4 i IFN- γ , pa predstavlja važan faktor nastanka i razvoja supresorske aktivnosti Treg limfocita.

Pomenuti Treg limfociti čine oko 5% cirkulišućih CD4+ T limfocita periferne krvi i imaju antinflatornu ulogu zaustavljajući imuni odgovor nakon eliminacije patogena, pa su neophodni za održavanje imunološke tolerancije. Postoji podela na dve subpopulacije ćelija na osnovu različite specifičnosti i mehanizma delovanja, pa tako prvu predstavljaju urođeni Treg limfociti (natural, nTreg) koji svoje regulatorne funkcije stižu u timusu i ne menjaju ih na periferiji, a drugu čine adaptivni (inducibilni) iTreg limfociti, koji nastaju diferencijacijom zrelih konvencionalnih T limfocita pod specifičnim uslovima izlaganja antigenima i/ili kostimulacijom. Pored ove dve populacije Treg limfocita postoje urođeni i inducibilni CD8+ Treg limfociti kod bolesnika sa karcinomima. Studije su pokazale da nekoliko molekula učestvuje u indukovanju razvoja Treg na periferiji a oni uključuju glikosteroide, estrogene, TGF- β , kao i IL-2, kao i stimulatorne molekule poput CD80/ CD86 i CD70. Zajedno sa urođenim Treg limfocitima periferno nastali Treg limfociti imaju važnu ulogu u supresiji imunog odgovora posebno antitumorskog.

Dokazano je da Treg limfociti suprimiraju različite tipove imunog odgovora uključujući autoimuni, antimikrobni i antitumorski imuni odgovor inhibicijom T, B i NK ćelija. Incijalno su Treg limfociti identifikovani kao subset CD4+ T ćelija koji suprimira proliferaciju i produkciju citokina od strane konvencionalnih CD4+ CD25- T ćelija. Naredne studije su pokazale da su Treg ćelije takođe sposobne da suprimiraju proliferaciju, produkciju citokina i sekreciju granula od strane CD8+ T ćelija. Pored već opisane supresije T ćelija, Treg ćelije mogu takođe suprimirati proliferaciju i produkciju imunoglobulina od strane CD19+ B ćelija. Najpre, Treg ćelije mogu indirektno da inhibišu B ćelijski imunogloblinski odgovor suprimirajući CD57+GC-Th ćelije. Drugi način inhibicije je direktni, supresija B ćelijskog imunoglobulinskog odgovora, bez suprimiranja Th ćelija. Pored supresije imunih ćelija stečenog imunog odgovora Treg ćelije imaju uticaj i na urođeni imuni odgovor. Pokazano je da Treg ćelije inhibišu citotoksične CD3-CD56+ NK ćelije kao i upravljanje diferencijacijom monocita u alternativno aktivisane makrofage, subseta ćelija sa imunim regulatornim osobinama koje doprinose promociji tumora [84].

Prva otkrića o postojanju CD4+CD25+ T ćelija u tkivu tumora, datiraju od 2001. godine kada su ove ćelije dokazane kod bolesnika sa ranim stadijumom nemikrocelularnog karcinoma pluća ili kasnijim stadijumima karcinoma ovarijuma, a kasnije studije su pokazale prisustvo ovih ćelija u tkivu tumora kao i u perifernoj krvi. Povišen nivo Treg ćelija koreliše sa stadijumom bolesti, histološkim subtipom ili opštim preživljavanjem bolesnika sa karcinomima. Postoji neslaganje u pogledu povišenog broja Treg ćelija i predikcije lošeg ili povoljnog ishoda bolesti za sve bolesnike sa karcinomima. Tako na primer, za razliku od bolesnika sa solidnim tumorima gde povišen broj Treg ćelija utiče na loš ishod bolesti, broj Treg ćelija koreliše sa povoljnim ishodom bolesti bolesnika sa hematološkim malignitetima. Naime, u hematološkim malignitetima maligne T ili B ćelije ili mijeloidne ćelije je su targeti Treg ćelija. Obzirom na to da su maligne ćelije imune ćelije, Treg ćelije mogu da interaguju različito sa ovim ćelijama u odnosu na intreakciju sa malignim ćelijama solidnih tumora. Pokazano je da Treg ćelije direktno suprimiraju B ćelijski zavisnu produkciju imunoglobulina bez suprimiranja Th ćelija i mogu da indikuju apoptozu aktivisanih B ćelija putem povećane regulacije perforina i granzima.

Zato, Treg ćelije u hematološkim malignitetima mogu direktno da suprimiraju maligne ćelije i to može objasniti zašto povećan procenat Treg ćelija unutar tkiva tumora prediktuje bolje opšte preživljavanje bolesnika sa hematološkim malignitetima [84].

Povišen broj Treg ćelija postoji kod mnogih tumora uključujući karcinom dojke, melanom, kao i hepatocelularni karcinom. Većina ćelija strome tumora poput T i B limfocita, dendritskih ćelija i makrofaga predstavlja taržete Treg ćelija. Zato je funkcija Treg ćelija pre svega protumorska. Poznato je da Treg inhibišu ekspresiju kostimulatornih molekula uključujući CD80, CD83, i CD86 na površini dendritičnih ćelija i tako inaktiviraju T ćelije. Još jedna od funkcija Treg ćelija je da suprimiraju aktivnost Th17 ćelija koja je povezana sa lošom prognozom nekoliko karcinoma. Produkcija IL-10 od strane Treg ćelija ograničava broj Th17 ćelija kako u slezini tako i u tumoru i tako ograničava Th17 inflamaciju. U zaključku se može reći da Treg ćelije posle infiltracije u tumorsko mikrookruženje značajno blokiraju aktivaciju efektnih T ćelija i direktno suprimiraju antitumorski imunitet kod većine produkcijom CTL-4 i IL-10. Antitumorska uloga Treg ćelija ogleda se i u teškom oštećenju kapaciteta CD8+ T ćelija putem inhibicije proliferacije i infiltracije CD8+ ćelija u tumorsko okruženje. Pojedini autori su pokazali da Treg ćelije lokalno indukuju disfunkcionalni status infiltrirajućih CTL utičući na balans kostimulatornih i koinhibitornih signala unutar tumorskog okruženja. Treg ćelije direktno suprimiraju B ćelijsku proliferaciju, produkciju imunoglobulina a povećavaju i smrtnost ćelija [85].

Imunosupresija je prepoznata i u cHL ali je nedovoljno poznata pozadina izostanka efektivnog imunog odgovora protiv tumora. Utvrđeno je da mikrookruženje HL i prefirena krv sadrže povećan broj regulatornih CD4+ T limfocita kojim bi se mogao objasniti status anergije u HL. Istraživanje Penna i saradnika je poredilo procenat regulatornih CD4+CD25+FoxP3+ i efektnih CD4+IL 17+ T limfocita pri dijagnozi cHL kao i nakon lečenja i pokazalo da nakon lečenja postoji smanjenje procenta CD4+ T ćelija sa regulatornim fenotipom zajedno sa smanjenjem IL-6, IL-10 i $\text{Si1-2}\alpha$. Poznavanje imunosupresije u cHL i imunog oporavka posle lečenja može biti ključno za razvoj novih terapijskih strategija koje treba da utiču na regulatornu aktivnost [86].

1.7. Imunosupresija u Hočkinovom limfomu

Izbegavanje imunološkog nadzora tumora, može se objasniti nedovoljnim prisustvom kostimulatornih molekula i stvaranjem koinhibitornih molekula od strane tumora, zatim prisustvom poremećene prezentacije antigena, kao i anergijom efektnih ćelija u prisustvu TGF- β i IL-10, koje stvaraju tumorske ćelije.

U cHL se imunosupresija može takođe objasniti dodatnim mehanizmima: Da bi T limfociti ostvarili svoju efektorsku funkciju moraju najpre biti aktivisani. Poznato je da su za potpunu aktivaciju T limfocita neophodna dva signala, prvi koji se ostvaruje posredstvom TCR kompleksa/receptora, a drugi signal posredstvom kostimulacionih molekula.

Prototip članova familije kostimulatornih molekula predstavlja CD28 koji se vezuje za B71 (CD80) i B72 (CD86) koji su ekspimirani na APC. Drugi članovi pomenute familije kostimulatornih molekula su citotoksični T limfocitni antigen 4 (CTLA-4), inducibilni T ćelijski kostimulator (ICOS), receptor programirane smrti (PD-1) i BTLA (B i T limfocitni atenuatori). Treba istaći da su interakcije CD28 i B7 kostimulatorne, za razliku od vezivanja CTLA-4 i B7 koje imaju inhibitorni efekat. Svakako, da su interakcije PD-1, imunoinhibitornog receptora koji se eksprimira na aktivisanim T, B i mijeloidnim ćelijama od posebne važnosti u regulaciji imunog odgovora imajući u vidu to da PD-1 može da interaguje sa dva različita liganda PDL-1 i PDL-2, članovima B7 familije gena, što za posledicu može imati kostimulaciju ili nishodnu regulaciju imunog odgovora zavisno od celularnog okruženja. Vezivanje PD-1 sa PD-L1 vodi inhibiciji TCR posredovane limfocitne proliferacije i sekreciji citokina, a PD-1 signali mogu inhibisati CD28 posredovanu stimulaciju [87]. Drugu grupu kostimulacionih molekula čine CD40L na T limfocitima i CD40 na APC. Interakcija CD40L/CD40 ne aktivira direktno T limfocite već stimuliše APC da ispolje više B7 molekula i sekretuje citokine.

Važno je istaći ulogu dendritičnih ćelija (eng. Dendritic Cells, DCs), najvažnijih i moćnih antigen prezentujućih ćelija koje prepoznaju, preuzimaju, obrađuju i prezentuju tumorske antigene aktivisanim T ćelijama specifičnim imunim odgovorom [88]. Svakako da je za izbegavanje imunološkog nadzora važna aktivacija DCs koja dovodi do različite ekspresije gena, jakih kostimulatornih signala poput CD80/ CD86/ CD40 i oslobađanja efektornih citokina koji stimulišu T ćelijsku aktivaciju. Smanjen broj funkcionalnih DC kao i povećan broj nefunkcionalnih DC vodi progresiji tumora [89]. Akumulacijom nefunkcionalnih DC promovisu se negativni kostimulatorni signali koji indukuju T ćelijsku toleranciju i anergiju [90]. Imunosupresivni faktori koji doprinose oštećenju DC su VEGF, IL10, PG2, TGFβ, kao i hipoksija, ekstracelularni adenozin i akumulacija laktata u tumoru koji čine DCs ćelije nefunkcionalnim [91].

Aktivaciju T limfocita čini niz događaja koji započinje kada TCR prepozna peptid prezentovan u okviru MHC molekula. Nakon aktivacije Th limfocita sekretuje se IL-2 koji služi kao signal Tc limfocitima. Uništavanje tumorskih ćelija ostvaruje se putem perforinskog mehanizma koji dovodi do nekroze/apoptoze ili putem prepoznavanja membranskog proteina

Fas na koji se veže Fas ligand NK ćelija i posledični proapoptotični signal. Dendritične ćelije prerađuju antigene i nastaju zrele DĆ koje stvaraju IL-12, a potom se naseljavaju u drenirajuće limfne čvorove gde stimulišu CD4 +Th1 limfocite koji stvaraju IFN- γ . Druga vrsta tumorskih antigena podstiče stvarenje nezrelih DĆ koje luče IL-6 i TNF što omogućava proliferaciju drugog tipa limfocita CD4+ Th2. Pomenute CD4+ Th2 ćelije stvaraju proinflamatorne citokine IL-4 i IL -13 i nisu efektivne u odbacivanju tumora.

Antitumorski imuni odgovor je dakle ćelijski posredovan, predvodi ga Th1 verovatno time što suprimira Th2 posredovan imuni odgovor. U cHL to međutim nije slučaj, TH ćelije su Th2 i regulatorne T ćelije (Treg), koje su hipofunkcionalne i hipoproliferativne, čime se i objašnjava neadekvatan imuni odgovor [92].

Izbegavanje imunog nadzora HRS ćelija od strane CTL ćelija omogućeno je i nishodnom regulacijom molekula MHC I i II klase, čime je onemogućeno prepoznavanje malignih ćelija od strane CTL i Th. Naime, maligne HRS ćelije imaju povišenu regulaciju nekласičnog MHC I molekula HLA-G, koji predstavlja ligand za inhibitorne receptore antitumorskih ćelija. Tako, površinska ekspresija FasL (CD95L) kao i PD-L1(CD274) i PD-L2(CD273) može takođe direktno da utiče na zaštitu HRS ćelija od tumor specifičnih CTL i NK ćelija. Prekomerna ekspresija FasL postoji kod HRS ćelija subtipa nodularne skleroze i mešovite celularnosti cHL i može indukovati apoptozu aktivisanih CD95 pozitivnih Th1 i CD8+ T ćelija. Ekspresija PD-L1 i PD-L2 od strane HRS ćelija inhibiše T ćelijsku aktivnost i može da izazove T ćelijsku iscrpljenost.

Nishodna regulacija antigen prezentujućih ćelija predstavlja inače jedan od najčešćih načina kojim tumorske ćelije izbegavaju T ćelijski imuni odgovor. Česta mutacija $\beta 2$ mikroglobulina i MHC I α lanaca smanjuje ekspresiju MHC I kompleksa i selektivan gubitak HLA alela [93,94]. Mutacija proteina povezanog sa transportom (TAP) tokom antigene prezentacije i komponente kompleksa imunih proteozoma LMP2 i LMP7 takođe indukuju izbegavanje imunog nadzora u malignitetu [93,95]. U stadijumu metastaza tumor infiltrišući limfociti (TIL) pokazuju smanjene nivoe CD3 ζ lanaca kao i p56^{LCK} i p59^{FYN} tirozin kinaze koji imaju krucijalnu ulogu u TCR signalima koja vodi aktivaciji T ćelija [96,97]. Nedavne studije su pokazale da narušavanje proksimalnih TCR signala inhibiše CTL litičku funkciju i smanjuje efektorni imuni odgovor u odmaklim stadijumima karcinoma[98].

Fenotip i funkcija efektornih T ćelija su bitno promenjeni u okruženju tumora, pa tako ćelije urođenog (makrofazi i NK ćelije) kao ni ćelije stečenog imuniteta (CTL i efektorne T ćelije) ne mogu da prepoznaju i indukuju specifični odgovor protiv tumora.

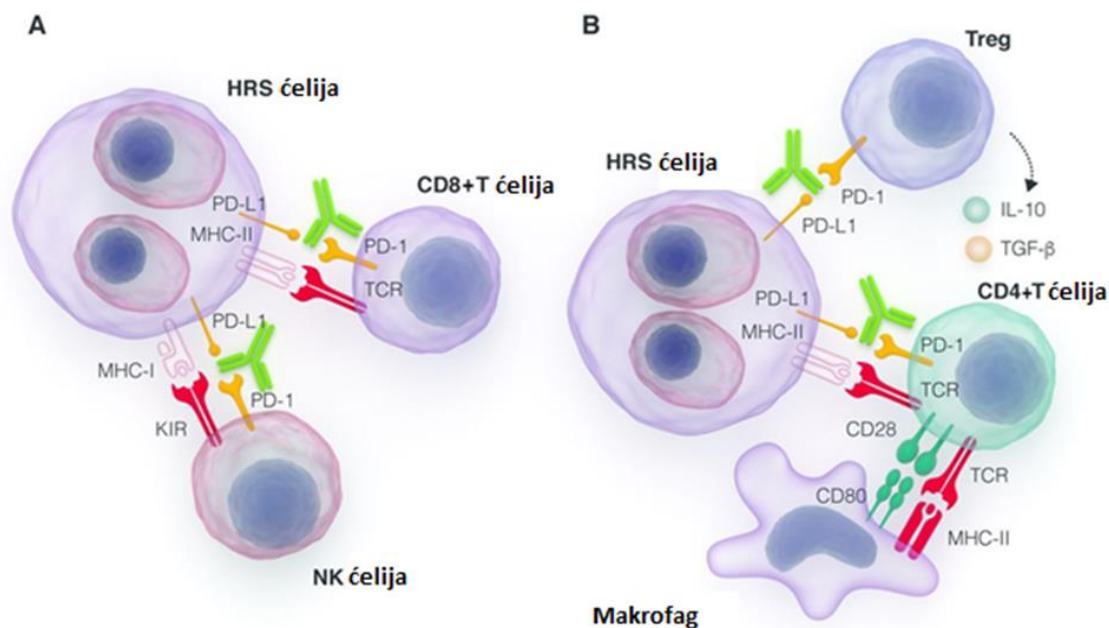
Postojanje anergije T ćelija objašnjava se nemogućnošću T ćelija da stvaraju IL-2 nakon restimulacije i omogućavanjem prekida ćelijskog ciklusa u antigen nezavisnom tumorskom okruženju [99]. U statusu anergije, naivne T ćelije primaju malo kostimulatornih i dosta inhibiranih signala, koji izazivaju nishodnu regulaciju TCR posredovanih signala putem smanjenja nivoa proteina i disregulacijom fosforilizacije [100,101]. Iscrpljenost T ćelija karakteriše progresivni gubitak proliferacije i sekrecije efektivnih citokina koji dovode do apoptoze T ćelija [102]. Dokazano je da B7H1/ PD1 signali karakterišu iscrpljenost CD8+ T ćelija u mnogim modelima humanih tumora, a da je PD1 marker iscrpljenosti T ćelija [102].

U slučaju cHL efektorne T ćelije pokazuju osobine hroničnog iscrpljenja u susretu sa antigenom, koji karakteriše povišena regulacija negativnih regulatornih receptora poput PD-1, (CD279) u bolesnika sa cHL. Ekspresija PD1 na T ćelijama vodi konstitutivnoj regulaciji njegovih liganada PDL1 i PDL2 na RS ćelijama. Konačno, prisustvo PD-1 T ćelija kako u okruženju tumora tako i u perifernoj krvi predstavlja negativan prognostički marker bolesnika sa cHL. Amplifikacija lokusa 9p34 rezultuje u konstitutivnoj ekspresiji PD-L1 kao i PD-L2 u više od 85% bolesnika sa cHL. EBV pozitivni cHL imaju veću ekspresiju PDL-1 ukazujući na ulogu EBV virusa u ekspresiji PDL-1 [103].

Pomenute T ćelije, osim anergije i iscrpljenosti pokazuju osobine starenja, koje karakteriše skraćanje telomera, niska ekspresija CD28 i akumulacija proteina koji kontrolišu ćelijski ciklus poput p16, p21, ili p53 koji inhibišu proliferaciju ćelija [104,105]. Ove ćelije imaju neadekvatne osobine ćelija ubica i izazivaju inhibitorne regulatorne funkcije u tumorskom okruženju [106,107]. Treba istaći da same CD8 +T ćelije kao i naivne CD4+ T ćelije mogu poprimiti osobine matičnih ćelija i mogu se diferencovati u različite subsetove efektivnih T ćelija u zavisnosti od okruženja tumora [108].

Postojanje anergije, iscrpljenosti i osobine starenja T ćelija utiču na izbegavanje imunološkog nadzora.

Može se reći da za razliku od solidnih tumora u cHL, ne postoji blokada PD1 čime bi se ostvario antitumorski imuni odgovor posredovan CD8 + T ćelijama i da u većini slučajeva cHL postoji nishodna regulacija molekula MHC I kompleksa, čime se onemogućava prepoznavanje HRS ćelija od strane CD8+ T ćelija kako je prikazano na slici 4A, dok slika 4B prikazuje nishodnu regulaciju molekula MHC II kompleksa HRS ćelija koja ograničava CD4+ T ćelijski imuni odgovor, blokadom imunoloških kontrolnih tačaka, ali se isti može ostvariti vezivanjem za MHC II molekule APC okruženja tumora. Smatra se da CD4+ T ćelije jesu glavni posrednici anti PD1 posredovanog imunog odgovora u cHL[103].



Slika 4. Model antitumorskog imunog odgovora u okviru imunoloških kontrolnih tačaka

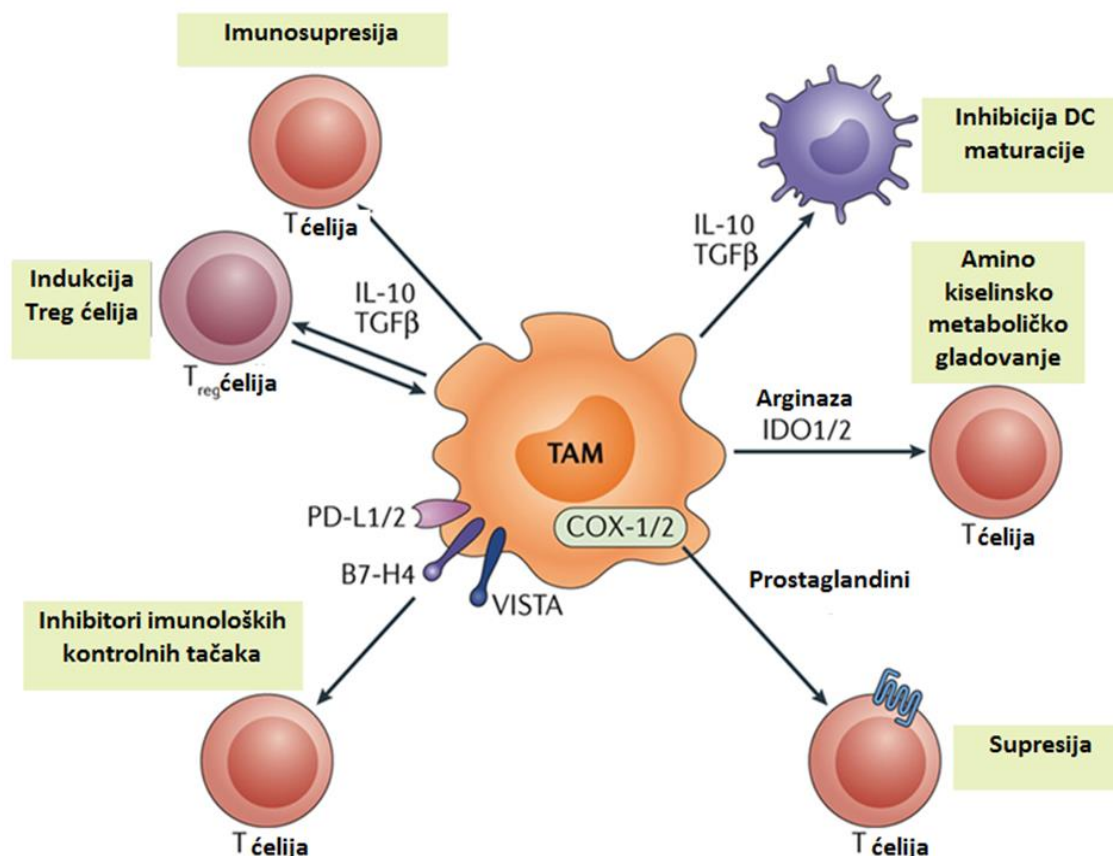
Posebno se ističe uloga makrofaga u neadekvatnom antitumorskom imunom odgovoru bolesnika cHL. Poznato je da su makrofazi terminalno diferentovane mijelodne ćelije blisko povezane sa dendritičnim ćelijama [109]. Tkivni makrofazi pokazuju veliki funkcionalni i fenotipski plasticitet u odgovoru na promene stimulusa mikrookruženja uključujući malignitet [110]. Makrofazi koji su prisutni unutar neoplastičnog tkiva (TAM) uglavnom pripadaju M2 makrofazima. U prisustvu TAM, M1 makrofazi ne mogu da stvaraju IL-12, pa NK ćelije, Th1 ćelije kao i CTL ne mogu da posreduju u imunom odgovoru protiv tumora [111]. Sekretijom IL-10 od strane M2 omogućava se nastajanje Th2 ćelija koje dalje indukuju nastajanje TAM [112]. TAM oslobađa CCL22 koji omogućava privlačenje Treg u tkivo tumora, a TAM takođe sekretuje PGE2, TGF β i eksprimira PDL1 koji izaziva imunosupresiju i apoptozu T ćelija [113]. Ćelije tumora takođe podržavaju nastajanje M2 makrofaga povećanjem nivoa IL-10, CCL22, CCL5 i drugim [88,114].

Imajući u vidu da M2 makrofazi reprezentuju urođeni imunitet, njihov prognostički značaj u bolesnika sa cHL zavisi od regulatornih i citotoksičnih T ćelija, pa se zato i razlikuju cutt off vrednosti procenta makrofaga koji utiče na EFS i OS [115].

Slika 5 prikazuje načine imunosupresivne funkcije TAMa. Pomenuti TAM svoju imunosupresivnu ulogu ostvaruje putem Treg ćelija, kao i citokina IL10 i TGF β . Pomenuti citokini onemogućavaju maturaciju DĆ.

Metabolička aktivnost TAM utiče na gladovanje T ćelija putem aktivnosti arginaze, i/ili putem stvaranja imunosupresivnog IDO1/ 2 signalnog puta. Prostaglandini, COX- 1 kao i

COX-2, koje stvaraju TAM imaju immunosupresivnu ulogu naročito na T ćelije. Važno je istaći da TAM eksprimiraju PDL1 kao i PDL2 koji pokreću inhibicioni PD1 imuni odgovor T ćelija, a B7- H4 i V domen Ig supresora T ćelijske aktivacije (VISTA) imaju slične funkcije kao i pomenuti PDL [116].



Slika 5. Mehanizmi kojim TAM ostvaruje immunosupresiju

NK ćelije predstavljaju subset limfoidnih ćelija urođenog imuniteta koje mogu da deluju direktnim citotoksičnim efektom, antitelima zavisnom citotoksičnosti i sekrecijom citokina IFN- γ , TNF- α i GM-CSF [117]. Smatra se da povišena ekspresija tumorskih liganada NKG2D kao i NKp30 u serumu bolesnika sa HL utiče na fenotip i funkciju NK ćelija i doprinosi izbegavanju imunološkog nadzora [118]. Dokazano je da citoksični receptori NKp46 NKp44 i NK30 kao i NKG2D imaju ulogu u lizi različitih tumora pri čemu je neophodno njihovo sinergističko dejstvo [117]. Istraživanja su pokazala da u HL nema povišene ekspresije citotoksičnih receptora NK ćelija, kao ni CD16, niti aktivacionih markera CD69 ali da postoji niža ekspresija NKG2D u poređenju sa zdravim osobama. Smatra se da u pojedinim malignitetima kao i u leukemijama postoji viša sekrecija NKG2D u serumu a manja ekspresija pa

to utiče na prepoznavanje i izostanak liziranja tumorskih ćelija od strane NK ćelija [119]. Oslobođanje imunosupresivnih faktora tumorskog okruženja TGF β , aIDO PGE2 smanjuje NK ćelijsku aktivaciju i doprinosi NK ćelijskoj toleranciji.

NKT ćelije poseduju karakteristike obe vrste ćelija, NK kao i T ćelija i smanjuju proliferaciju tumorskih ćelija [120]. Pomenute NKT ćelije eksprimiraju $\alpha\beta$ TCR varijante receptora i NK1.1 receptor [121].

Tumorsko okruženje doprinosi takođe imunosupresiji u cHL na više načina. Naime, uloga negativnih kostimulatornih signala u izbegavanju imunološkog nadzora ogleda se u tome da aktivisane T ćelije eksprimiraju CTLA-4 koji se suprotstavlja CD28 i indukuje negativne inhibitorne signale da onemogući aktivaciju T ćelija [122]. Treba istaći da oba stimulatorna molekula, CD28 i CTLA-4, mogu da interaguju sa istim ligandima CD80 i CD86, ali da CTLA-4 ima veći afinitet za oba liganda pa se suprotstavlja vezivanju CD28 za CD80 i CD86 [123,124]. Vezivanjem CTLA-4 inhibiše se protein fosfataza SHP2 i kinaza PP2A koji su neophodni za aktivaciju T ćelija u okruženju tumora [123,124,125,126]. Pomenuti stimulator CTLA-4 takođe odvaja CD80 i CD86 od CD28 i uklanja ih sa površine antigen prezentujućih ćelija [127].

Od nedavno se ističe i uloga regulatornih T limfocita ne samo u kontroli autoimuniteta već i u supresiji razvoja reaktivnih limfocita povezanih sa tumorskim antigenima.

Regulatorne T ćelije mogu inhibisati produkciju IL-2 koji reguliše visoku ekspresiju IL-2R α (CD25), što omogućava odlaganje ili blokiranje aktivacije CD8⁺ ćelija i NK ćelija protiv tumorskih antigena. Imunosupresivni efekat regulatornih T ćelija je potencijalno važan zbog velikog efekta na celularnu citotoksičnost reprezentovanu CTL i NK ćelijama. Regulatorne T ćelije mogu ograničiti inflamatorni podsticaj drugih ćelija imunog sistema uključujući T efektorne ćelije, stvaranjem IL-10 i TGF- β , a ovaj koristan efekat može prevazići oštećenje efektivnog T ćelijski posredovanog imunog odgovora kao i uticaj na ishod bolesti. U slučaju postojanja tumorskog okruženja sastavljenog od mast ćelija i makrofaga, funkcija regulatornih T limfocita može biti neadekvatna da balansira pro i antinflatorne stimuluse a Treg mogu čak pojačati inflamaciju otpuštanjem TGF- β i TH17 [128,129,130].

Treg ćelije mogu inhibisati citotoksične ćelije sekrecijom IL-10, ekspresijom T ćelijskog inhibitornog receptora citotoksičnog T limfocitnog proteina 4 (CTLA-4), koji je inače povišeno eksprimiran na aktivisanim Th ćelijama okruženja HL, što dalje suprimira anti HRS citotoksične ćelije.

Transkripcioni faktor FoxP3, je neophodan i dovoljan da indukuje Treg imunosupresivne funkcije. Aktivacija Treg vodi povećanoj produkciji imunosupresivnih medijatora kao što su IL-10, TGF- β i IL-35, indukuje apoptozu aktivisanih efektornih CD4⁺ Th ćelija i CD8⁺ CTL, bilo oslobađanjem granzima A i B ili promenom metaboličkog statusa usled smanjenja IL-2 i treći način kojim Treg utiče na antitumorski odgovor jeste sposobnost Treg da inhibiše maturaciju DC ćelija putem interakcije CTLA-4 sa CD80/CD86 na DC. Treg ćelije jako ekspiriraju CTLA-4, kao posledicu izostajanja pozitivnog kostimulisa od strane B7/CD28 koji vodi smanjenoj aktivnosti tumor specifičnih efektorskih ćelija [131].

Treg ćelije omogućavaju toleranciju tumorskog okruženja time što inhibišu aktivaciju dendritičnih ćelija, indukuju M2 tip makrofaga i indukuju apoptozu T ćelija koje pokreću izbegavanje imunog nadzora. Obe vrste Treg limfocita natural Treg i iTreg doprinose toleranciji tumorskog okruženja i imunosupresivnim aktivnostima u tumorskom okruženju [132]. Transkripcioni faktor FOXP3 može da deluje kao transkripcioni aktivator i represor. Naime, pomenuti FOXP3 u asocijaciji sa NFATc2 aktivira CTLA-4, CD25 kao i GITR koji promovišu supresivne aktivnosti, dok iste asocijacije nishodno regulišu ekspresiju IL-2 a time promovišu smrt efektornih T ćelija [133,134]. Nedavne studije su pokazale da FOXP3⁺ deluje kao kotranskripcioni faktor sa STAT3 koji povišeno reguliše IL-10 transkripciju u tumor indukovanim Treg ćelijama [135,136].

Mali procenat infiltracije FOXP3 ćelijama zajedno sa visokim procentom infiltracije TIA-1 ćelijama u cHL može reprezentovati biološke markere, prediktore nepovoljnog ishoda bolesti. Kod bolesnika sa relapsom bolesti postoji viša infiltracija TIA-1 ćelijama i manji procenat FOXP3 ćelija reaktivnog mikrookruženja u odnosu na novodijagnostikovane bolesnike [137].

Manje je poznata uloga nemalignih B ćelija u patogenezi i odgovoru na terapiju bolesnika sa cHL, u poređenju sa T ćelijama. Smatra se da produkcija IL-10 od strane B ćelija može da suprimira antitumorski T ćelijski imuni odgovor [103,138].

Dokazano je da rozete, fenomen koji označava CD4⁺ T ćelije koje okružuju HRS ćelije, čine Th i Treg ćelije, ekspiriraju drugi kostimulatorni molekul CD40L koji predstavlja osobinu Th2 i Treg ćelija i time omogućava signale održavanja HRS ćelija. Inače, maligne HRS ćelije visoko ekspiriraju CD40 (TNFRSF5) koji je član TNFRSF i omogućava aktivaciju NF- κ B signalnog puta, a time podržava formiranje kolonija HRS ćelija [79].

Maligne, HRS ćelije mogu da indukuju direktno povlačenje nekoliko tipova imunih ćelija iz periferne cirkulacije i takođe služe kao okidač lokalne ekspanzije ćelija. Medijatori sintetisani od strane HRS ćelija sa aktivnošću cito i hemokina su IL-5, IL-8, IL-9, CCL-5,

CCL-28 i omogućavaju povlačenje granulocita, mast ćelija i makrofaga, dok IL-7 CCL-5 CCL-17, CCL-20 i CCL-22 jesu efektori limfocita. Reaktivne ćelije, naročito makrofazi i mast ćelije utiču i same na infiltrat imunih ćelija sintetisanjem CCL-3, CCL-4 i CCL-8 hemokina.

Receptori hemokina CXCR3, CXCR4 i CCR7 jesu adhezioni molekuli uključujući CD62 ligand koji je utvrđen na većini T ćelija, dok su odgovarajući ligandi eksprimirani na malignim ćelijama i vaskularnom endotelijumu [123]. Obzirom da HRS ćelije sekretuju CCL5, CCL17, CCL20, kao i CCL22 one mogu privući CCR4 pozitivne Treg ćelije u tkivo limfoma, kao i IL-13 koji promovise diferencijaciju naivnih T ćelija u Th2 i Treg fenotip. Sekrecija IL-7 od strane HRS ćelija podržava preživljavanje i proliferaciju Treg ćelija.

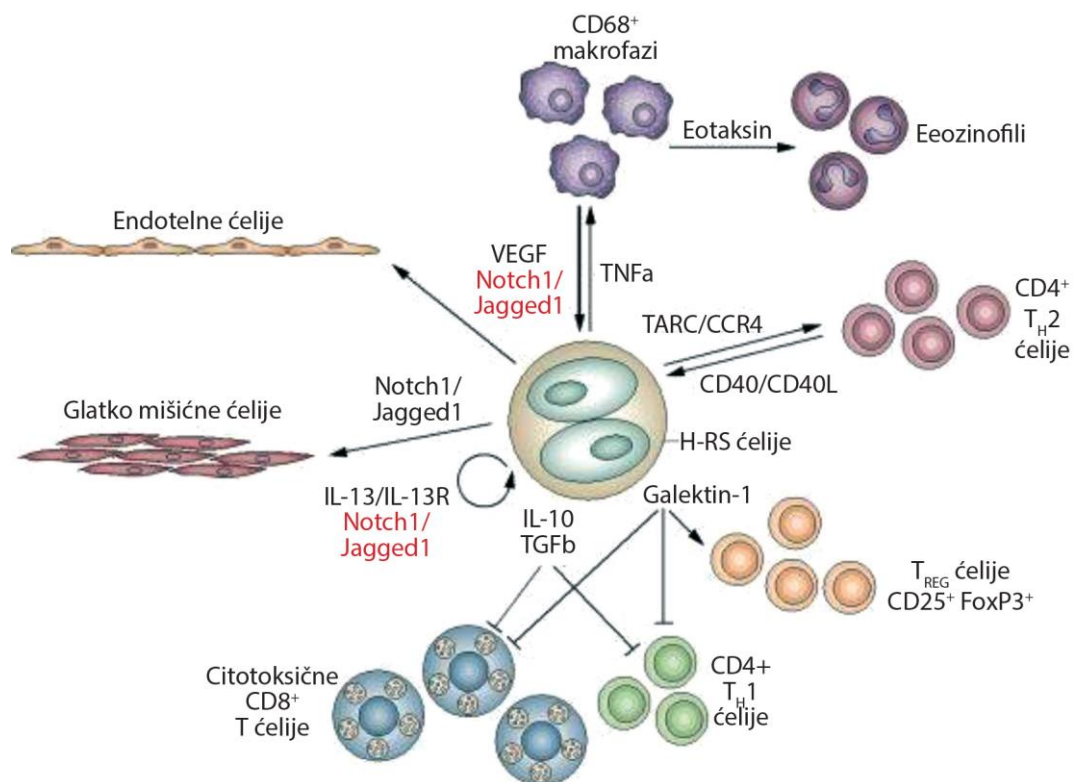
Kod bolesnika sa cHL postoji zaštita HRS ćelija, a bitna osobina HRS ćelija je da mogu da modulišu njihovo celularno okruženje promenom Th1 tipa odgovora u Th2 odgovor koji obično promovise tumorsku aktivnost [139]. Maligne, HRS ćelije izmiču CTL i NK ćelijama, a to se može objasniti sekrecijom immunosupresivnih faktora od strane samih HRS ćelija. Naime, pomenute maligne ćelije sekretuju immunosupresivne faktore TGF- β , makrofag migratornog inhibitornog faktora (MIF) kao i galektin-1 (LGLAS1).

Kao najznačajniji immunosupresivni faktori pominju se TGF- β citokin, koji inhibiše aktivaciju T ćelija, indukuje diferencijaciju, proliferaciju kao i maturaciju dendritičnih ćelija i makrofaga. Pomenuti TGF- β sekretuju ćelije tumora, kao i različite imune ćelije poput Treg, TAM, kao i NKT ćelija [140]. Njegova uloga je i to prvenstveno CTL, da spreči transkripciju perforina, granzima i IFN- γ koji su uključeni u imuni odgovor tumora, ali da takođe promovise proliferaciju makrofaga i fibroblasta koji sekretuju pojedine angiogene i antiapoptske faktore poput VEGF i ciklooksigenaze-2 [141]. Ćelije tumora sekretuju takođe i brojne imunomodulatorne faktore pored već pomenutog TGF- β , poput IL-10, PGE2 i drugih koji utiču na okruženje i blokiraju efektni imuni odgovor putem različitih mehanizama. Ovi immunosupresivni faktori utiču na ekspresiju antiapoptskih molekula poput BCLxL, cFLIP, MCL1 [142,143].

Tumorske ćelije indukuju receptore smrti poput FasL, koji interaguje sa njegovim receptorom Fas na T ćelijama i pokreće kaskadu intracelularnih signala koji dovode do apoptoze T ćelija. [144,145].

Imunosupresivna uloga Gal- 1 se posebno ističe u bolesnika sa cHL imajući u vidu da predstavlja jedan od potencijalnih biomarkera.

Sve pomenute interakcije HRS ćelija i okruženja prikazane su na Slici 6 [146].



Slika 6. Interakcije HRS ćelija i okruženja Hoćkinovog limfoma

1.8. Galektin-1

1.8.1. Definicija

Galektini su animalni lektini, definisani zajedničkim aminokiselinskim redosledom i afinitetom za β galaktozidne oligosaharide. Oni su evolutivno visoko očuvana i homologa familija koja postoji u sisara, kao i u nižih organizama kao što su nematode, sunđer i mikroorganizmi. Članovi su sastavljeni od jednog ili dva domena, od otprilike 130 aminokiselina koji prepoznaje β galaktozidnu strukturu ugljenih hidrata (CRDs) [147].

Svi su klasifikovani, na osnovu strukture i broja CRD u tri grupe galektina: prototip, himerički i tandem.

Prototip galektina sadrži jednu CRD i može formirati homodimere, galektin -3 je jedinstven, himerički galektin, ima jedan CRD sa produženim N terminusom, a tandem galektini sadrže dva neidentična CRD povezana kratkim peptidom.

Galektini, su numerisani prema svom otkriću [148]. Do sada je identifikovano 19 pripadnika ove familije lektina kod sisara, od čega je 13 eksprimirano kod čoveka [149].

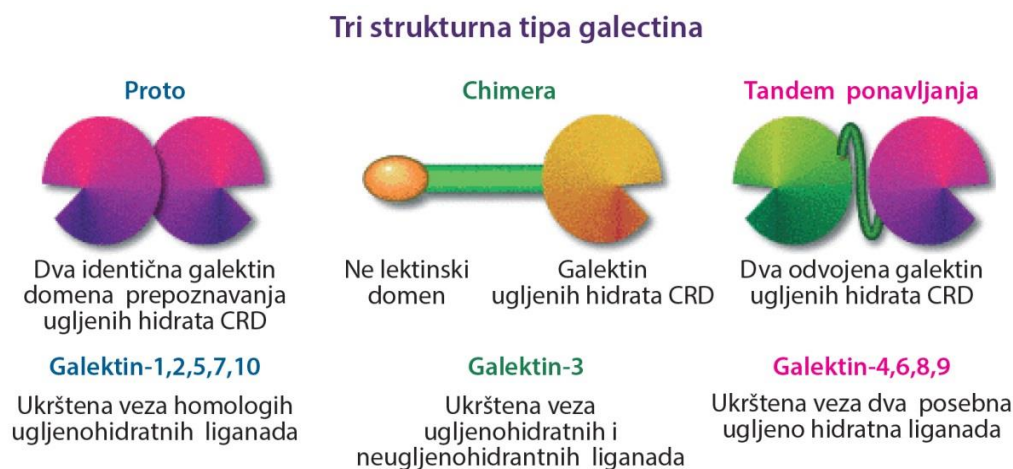
Definicija, struktura, specifičnost saharida i biohemijske osobine ovog velike familije animalnih proteina su dobro poznati.

Galektini su prisutni unutar i van ćelije, pa je njihova funkcija intra i ekstracelularna. Iako galektini imaju osobine proteina citosola, oni se sekretuju neklasičnim, (ne ER- Golgi putem) [150]. Ekstracelularno, galektini mogu da vežu glikokonjugat površine ćelije, koji sadrži odgovarajući oligosaharidni galaktozid. S obzirom na to da se galektini vezuju bivalentno ili multivalentno za ugljenohidratne ligande, oni unakrsno vezuju glikokonjugate ćelijske površine, pa kao i drugi receptor ligand sistemi, pokreću kaskadu transmembranskih signala. Na ovaj način galektini mogu da moduliraju procese koji uključuju apoptozu, sekreciju citokina i imunološke interakcije [151]. Intracelularno, galektini jesu uključeni u proces koji je esencijalan za bazične funkcije ćelija kao što je obrada primarnih transkriptata pre mRNK regulacija rasta ćelije i progresija ćelijskog ciklusa [152,153,154].

Galektin-1, (Gal-1) je prvi identifikovan član galektinske familije. On ostvaruje biološke funkcije kao monomer (mgal-1, 14,5 kDa) ili kao nekovalentni homodimer (dgal-1, 29kDa) [155,156,157]. Struktura galektina-1 prikazana je slici 7.

Još nakon otkrića, ustanovljeno je da galektini zahtevaju redukujuće uslove mikrookruženja da bi ostvarili svoju funkciju. Shvatanje da oksidacija proteina, jeste deo inaktivisućeg procesa odgovornog za izostanak aktivnosti galektina, jeste negirano nedavnim studijama, koje su pokazale da oksidisani Gal-1 može ostvariti svoju funkciju nezavisnu od galektina, uključujući povećanje regeneracije perifernih nerava. Jedna od glavnih karakteristika homodimera dGal-1 jeste da pri nižim koncentracijama (Kd -7 μ) može spontano da disocira u monomerne forme koje mogu da vežu ugljene hidrate, ali sa manje afiniteta [156,157,158]. Važna osobina Gal-1 je da može da postoji u oksidisanom formi, ali pri tome gubi aktivnost lektina [159]. Vezivanjem Gal-1 za glikane povećava se dimerizacija i smanjuje senzitivnost na oksidativnu inaktivaciju. Galektini se vezuju za N-acetyllactosamin (GalB1, 3GlcNAc ili GalB1, 4 GlcNAc), čest oligosaharid u mnogim N ili O vezujućim glikanima, a Gal -1 prvenstveno prepoznaje GalB1, 4GlcNAc (LacNAc) sekvencu pomenutih glikana [160]. Galektin-1 je najčešći ekspimirani lektin familije. Ekspimirira se na tkivu skeleta, ovarijuma, miokarda i masnom tkivu, kao i u hepatocitima, miofibroblastima, leukocitima, stromalnim ćelijama prostate. Koekspimirira se sa galektinom-3 u limfoidnim ćelijama uključujući T i B ćelije, natural killer ćelijama i monocitima/makrofazima [143]. Obzirom da se galektini obično nalaze u ekstracelularnom okruženju, većina studija se fokusira na sposobnost galektina da se veže za površinske glikoproteine koji su ekspimirani na normalnim ili tumorskim ćelijama. Postoje takođe galektini koji imaju nekarbohidratne vezujuće partnere, uglavnom su to oni galektini koji su pronađeni u citoplazmi ili nukleusu [148]. Može se zaključiti da intracelularni galektini jesu uglavnom neza-

visni od CRDr, dok su njihove ekstracelularne funkcije zavisne od osobina lektina. Ovde takođe, postoje izuzeci, neki glikolizirani intracelularni proteini vezuju galektine uključujući citokeratine i transkripcioni faktor CBP70, za koje je dokazano da vezuju galektin-3 [161]. Sekretija galektina od strane tumorskih ćelija ima značajan lokalni imunosupresivni efekat putem eliminacije infiltrišućih efektornih T limfocita. Klonalne maligne HRS ćelije, sekretuju solubilne medijatore koji stvaraju abnormalni imuni odgovor. Sekretija Gal-1 preko AP1 signalnog puta u HL smanjuje održivost Th1 ćelija i favorizuje aktivaciju Th2 ćelije koje sekretuju imunosupresivne citokine kao što je IL-13. Novo okruženje tumora favorizuje aktivaciju lokalnih imunosupresivnih CD4+CD25+FOXP3 + Treg limfocita [162]. Sekretija IL-13 je česta osobina cHL, a pomenuti IL-13 aktivira RS ćelije putem STAT6 a možda i IL-13 aktivira sekretiju galektina-1 i tako stvara autokrino imunosupresivno okruženje [163]. Galektin -1 ima sposobnost da redukuje broj Th1 ćelija i da poveća sekretiju Th2 specifičnih citokina u T ćelijski posredovanim autoimunim bolestima. U nekoliko vrsta ćelija signali preko IL-13 receptora jesu povezani sa AP1 zavisnom indukcijom gena. Ovaj mehanizam može objasniti zašto se visoke vrednosti galektina-1 sekretovanog u tumorsko okruženje korelišu sa lošim preživljavanjem u cHL.



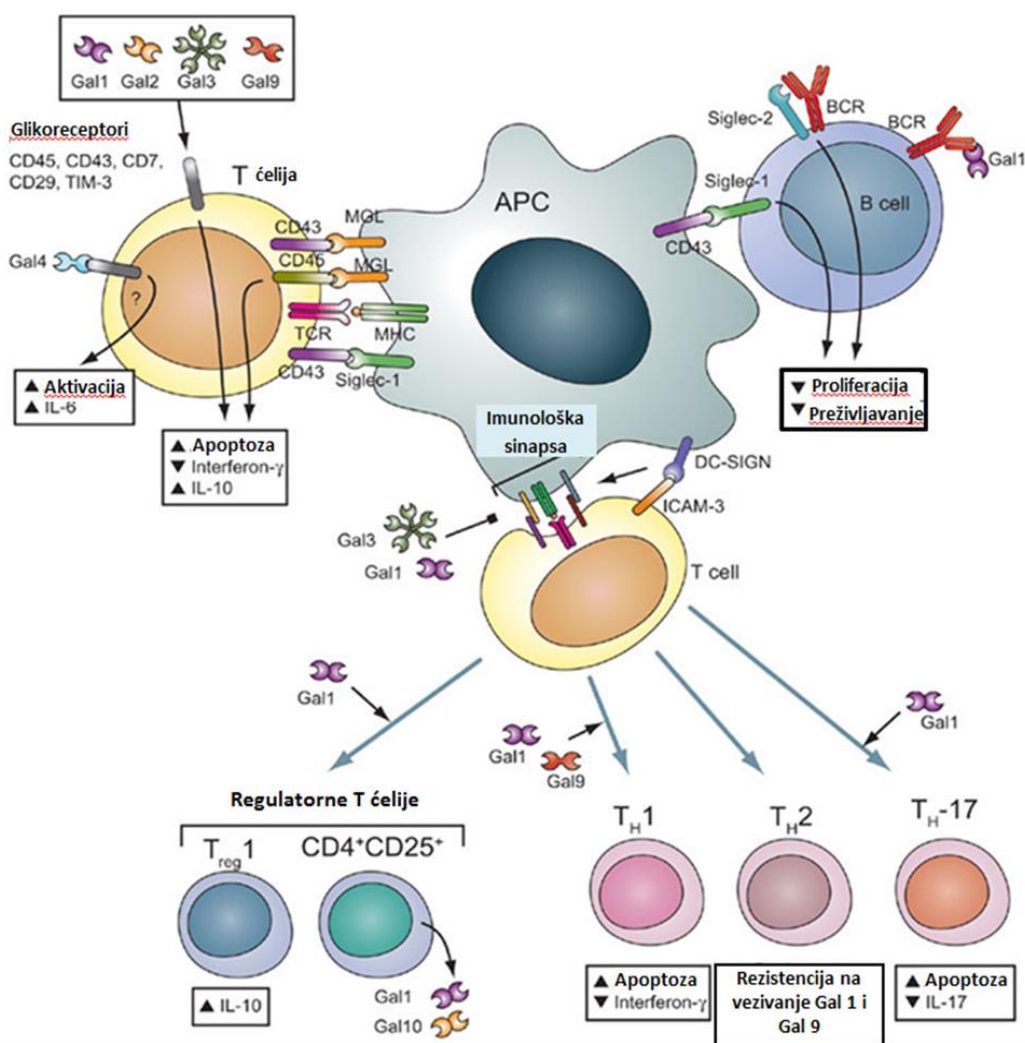
Slika 7. Struktura i klasifikacija galektina.[164]

1.8.2. Funkcije galektina-1

Opisane su brojne biološke funkcije Gal-1: ćelijska adhezija, proliferacija, apoptoza, imunomodulatorni efekti, prekid ćelijskog ciklusa, pre B ćelijski signali, RNK transkripcija i predstavljanje H Ras membranskog mesta [160]. Biološke funkcije Gal-1 su da može da promoviše ili inibiše ćelijski rast u različitim tipovima ćelija. Dokazano je da postoji bimodalna, dozna zavisnost aktivnosti Gal-1, pa visoke koncentracije (1 μ M) rekombinantnog Gal-1 inhibišu proliferaciju ćelija nezavisno od aktivnosti CRD, dok male doze (1nM) jesu mitogene i

osetljive na inhibiciju laktozom. Paradoksalno, pozitivan i negativan efekat Gal-1 ćelijski rast jeste visoko zavistan od tipa ćelije i statusa aktivacije, a na njega može uticati distribucija monomernih nasuprot dimerne, ili intracelularna nasuprot ekstracelularnim formama. Tako na primer Gal-1 inhibiše rast ćelija neuroblastoma i stromalnih ćelija koštane srži, a ima mitogen efekat na različite tipove normalnih i patoloških mišjih i humanih ćelija, kao što su vaskularne ćelije sisara. Dokazano je da visoke koncentracije Gal-1 deluju kao klasičan proapoptski faktor za nezrele hematopoetske ćelije [157].

Značaj glikolizacije u regulaciji urođenog i stečenog imunog odgovora ogleda se u mogućnosti prepoznavanja patogena, modulaciji urođenog imunog odgovora, kontroli homeostaze imunoloških ćelija i inflamacije. Sličan značaj ima i glikanom posredovano pothranjivanje informacija u pogledu pojave autoimunih bolesti i karcinoma. Slika 8 prikazuje ulogu Gal-1 u homeostazi limfocita.



Slika 8. Uloga galektina- 1 u homeostazi limfocita. [158]

1.8.3. Uloga Gal-1 u apoptozi

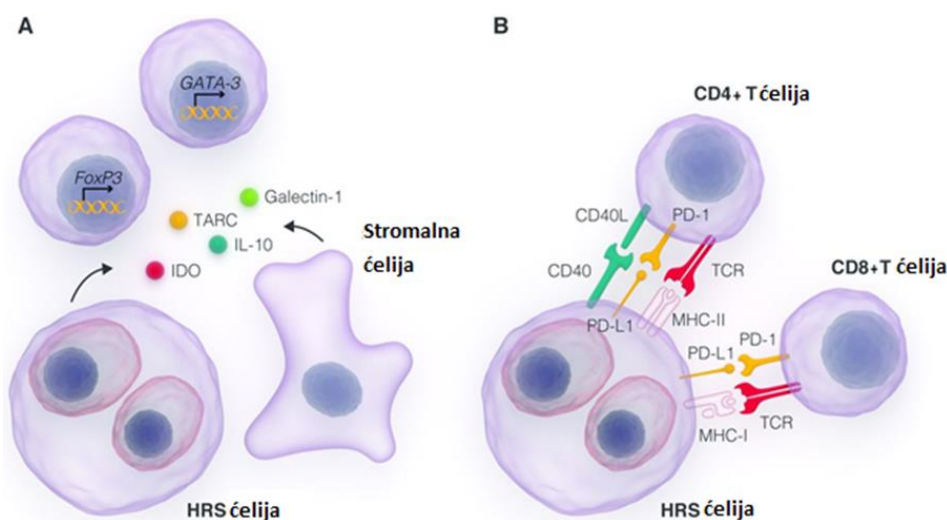
Apoptoza, programirana ćelijska smrt ima centralnu ulogu u imunoregulaciji. Zahva-
ljujući njoj se tokom procesa T ćelijske maturacije u timusu otklanjaju potencijalno auto-
agresivne ćelije, koje mogu da podstaknu mnoge autoimune bolesti, ukoliko se nađu na periferiji.
Prisustvo Gal-1 na timusnim epitelnim ćelijama, dovodi do apoptoze nezrelih timocita. Ovi
rezultati ukazuju na funkcionalnu ulogu Gal-1 u pozitivnoj i/ili negativnoj selekciji u timusu.
Dosadašnja istraživanja su istakla da Gal-1 može selektivno da promoviše negativnu selekciju u
timusu kao i suprotno, pozitivnu selekciju promovišući smanjenje i povećanje TCR signala.
Aktivisane zrele T ćelije podležu apoptozi i preveniraju prekomerni imuni odgovor. Različite
studije su pokazale da egzogeni Gal-1 indukuje apoptozu zrelih i aktivisanih, ali ne i preostalih
T ćelija, putem prepoznavanja glikolizirane CD45R0 iso forme PTPRC, prikazane na memo-
rijskim T ćelijama. Iako ima ulogu u apoptozi, dokumentovano je da Gal-1 ima antiinflama-
torne efekte putem mehanizama koji su nezavisni od apoptoze [165]. Regulacija apoptoze pu-
tem galektina, jeste jedna od najproučavanijih funkcija galektina. Nekoliko studija je pokazalo
da galektini bilo pozitivno ili negativno regulišu apoptozu u različitim ćelijama kancera, kao na
primer povećavaju apoptozu u LnCap malignim ćelijama prostate, Col0201 malignim ćelijama
kolona, ali nasuprot tome redukuju apoptozu u gliomima, karcinomu cerviksa i pluća. Meha-
nizam regulacije apoptoze putem galektina nije u potpunosti razjašnjen, ali se može razma-
trati homologija sapro i antiapoptotskim članovima familije bcl 2 [166]. Signal transdukcije
koji vodi apoptozi posredovanoj Gal-1, uključuje indukciju specifičnih transkripcionih faktora
AP-1, modulaciji stvaranja bcl2 proteina, aktivaciji kaspaza, modulaciji ceramida, i oslobađanje
citohroma-c. Nedavna studija je pokazala da apoptoza uzrokovana Gal-1 u T ćelijama nije za-
visna od aktivacije kaspaze 3 ili oslobađanja citohroma-c. Smatra se da Gal-1 može pokrenuti
različite signalne puteve ili apoptozu u različitim tipovima ćelija. Pokazano je da galektin-1 može
da se veže za površinske glikoproteinske receptore uključujući CD45, CD43 i CD7 na površini ti-
mocita, aktivisanih T limfocita i T ćelijske linije [154].

1.8.4. Imunomodulatorna funkcija Gal-1

Galektin deluje i putem modifikacije sekrecije citokina. On inhibira IL-2, IFN- γ i
TNF- α , ali indukuje stvaranje IL-10. Prvi korak u inflamaciji je mobilizacija hematopoetske
progenitorske ćelije u koštanoj srži. Smatra se da Gal-1 stimuliše HPC ekspanziju i akumulaciju u
koštanoj srži, a dramatično inhibiše migraciju HPG ćelije u periferiju i smanjuje perifernu
neutrofiliju i monocitozu. Galektin-1 modulira ćelije imunog sistema na više načina. Galektin-1

koga proizvode epitelne ćelije timusa izaziva apoptozu humanih timocita. U perifernoj krvi Gal-1 izaziva apoptozu aktivisanih T ćelija saradujući sa T ćelijskim receptorom (TCR), ali podržava preživljavanje naivnih T ćelija. Galektin-1 takođe utiče na polarizaciju Th1 u Th2 reakciju pokretanjem apoptoze Th1 ćelija zatim promoviše površinsku ekspresiju fosfatidilserina (PS) bez prateće apoptoze humanih T ćelijskih linija. Galektin-1 je eksprimiran u stromalnim ćelijama koštane srži, a sekrecija Gal-1 predvodi integraciju interakcija sa pre B ćelijama i deluje kao signal preživljavanja za pre B ćelije tokom razvoja. Intracelularni Gal-1 može sa B ćelijskim specifičnim Oct-1 koaktivatorom, OCA-B negativno regulisati BCR signalni put. Uloga Gal-1 u diferencijaciji plazma ćelija je nerazjašnjena. Galektin-1 doprinosi regulaciji ektopične ekspresije, transkripcionog supresora, Blimp-1 u zrelih B ćelijama. Smatra se da Gal-1 promoviše stvaranje Ig posredovanjem ekstracelularnih receptora i da zavisi od vezivanja β galaktozida pre terminalne diferencijacije B ćelija [167].

Slika 9A prikazuje način na koji HRS ostvaruju svoju imunomodulatornu funkciju, najpre pomenute HRS i stromalne ćelije sekretuju citokine, hemokine ali i druge solubilne imunomodulatorne faktore poput IL-10, CCL17/TARC, galektin-1 i indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) koji povlače Th2 i regulatorne CD4+ T ćelije i time favorizuju diferencijaciju tumor infiltrišućih limfocita u Th2 kao i regulatorne ćelije putem specifičnih linijskih transkripcionih faktora Gata3 (Th2) and FoxP3 (Treg). Slika 9B prikazuje kako HRS ćelije nishodnom regulacijom molekula MHC I kao i molekula MHC II klase izmiču prepoznavanju od strane CD8+ i CD4+ ćelija, a prezentacijom pojedinih liganada aktiviraju negativne regulatorne receptore T ćelija poput PD1. Nasuprot tome, HRS ćelije sprovode signale CD40 L prisutnog na T ćelijama okruženja cHL i aktiviraju CD40 HRS ćelija putem NF κ B signalnog puta koji omogućava proliferaciju HRS ćelija [103].



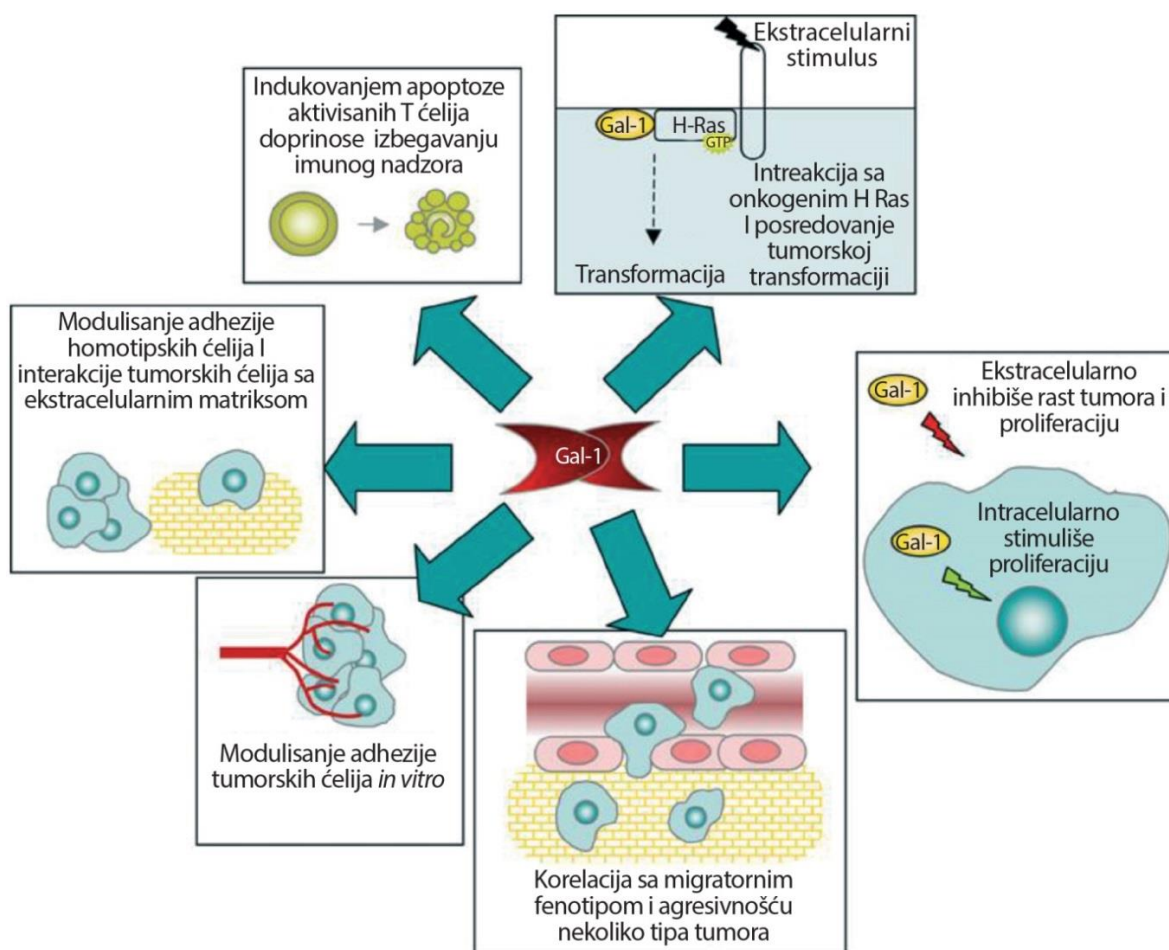
Slika 9. Uloga okruženja cHL u supresiji antitumorskog T ćelijskog imunog odgovora

1.8.5. Uticaj Gal-1 na preživljavanje ćelija tumora

Utvrđena je pozitivna korelacija ekspresije galektina-1 i galektina -3 na malignu transformaciju ćelija. Nepoznat je tačan mehanizam koji je uključen u transformaciju, ali on potencijalno podrazumeva interakciju membranskog, graničnog H- Ras i K- Ras. Indukcija transformacije nije samo posledica aktivacije Ras signalnog puta, ona je pre sekundarni efekat ćelijske transformacije. Ras transformisane ćelije imaju transformisani fenotip, ekspimiraju Gal-1 i Gal-3. Smatra se da galektini 1 i 3 utiču na procese obrade primitivne RNK tokom maligne transformacije [166].

Pojava metastaza malignih ćelija inicirana je disregulacijom ćelijske adhezije, migracije i sposobnosti invazije. Tako na primer Gal-1 povećava adheziju malignih ćelija kolorektalnog karcinoma i prostate, ali smanjuje migraciju malignih ćelija kolorektalnog karcinoma [125]. Nedavno je dokazano da Gal-1 ima ključnu ulogu u promovisanju angiogeneze u anti VEGF- A refraktarnim tumorima. Galektin-1 reaguje sa N-glikanima na Ig domenu 3, 4 i 7 VEGFR2, izazivajući fosforilizaciju VEGFR2 i nishodnu aktivaciju signalnog puta endotelnih ćelija. Pomenuti anti-VEGF-A refraktorni tumori unapređuju sekreciju Gal-1, zajedno sa njegovim povećanim vezivanjem za neovaskularne endotelne ćelije usled izmenjenih glikoliziranih obrazaca VEGFR2, koja dovodi do angiogeneze i progresije tumora [168]. U imunom sistemu Gal-1 je ekspimiran u timusu, slezini, limfnim odusima, koštanoj srži, jetri i imunoprivilegovanim mestima [160]. Obrasci ekspresije su značajno različiti među različitim članovima familije galektina. Zato ne iznenađuje da posebni obrasci ekspresije jesu ustanovljeni za galektine u različitim populacijama limfoidnih linija. Galektin-1 je ekspimiran na makrofazima, u nekim NK ćelijama, na primer uterusnim ćelijama decidue, ali ne i na perifernim NK ćelijama [148]. Galektin-1 sekretuju aktivisane CD4+ i CD8+ efektorne ćelije, posebno posle antigene stimulacije. Pomenuti profili ekspresije podržava ulogu članova familije galektina u funkciji limfoidnih ćelija, a samim tim i limfoidnih maligniteta. Ekspresija galektin familije jeste kontrolisana barem delom DNA metilacijom. Zato ne iznenađuje de novo ekspresija galektina u tumorskim ćelijama i njegovom odsustvu u normalnim ćelijama. Nije neobičajeno da galektini imaju dihotomnu ulogu u kontroli apoptoze, dvostruka uloga je možda posledica distribucije, nuklearne nasuprot citoplazmatske, što zavisi od tipa ćelije ili statusa aktivacije [148]. Galektin-1 indukuje ekspresiju FcγRI kao i MCH II ekspresiju monocita/makrofaga, čime povećava njihovu sposobnost u prezentaciji antigena i posredovanju fagocitne funkcije. U nekim B ćelijama galektin-1 modulira diferencijaciju i povećava produkciju antitela [167]. Vezivanje Gal-1 za integrine, posreduje u interakciji sa pre B ćelijskim receptorom u stvaranju signala preživljavanja [169]. Sposobnost galektina da se vežu za mnogobrojne površinske receptore i da izmene signale jeste čest

mehanizam kojim galektini modulišu imuni odgovor [148]. Sve opisane funkcije Gal-1 prikazuje Slika 10 [170].



Slika 10. Galektin-1 kao potencijalni target maligniteta

1.9. Lečenje bolesnika sa Hočkinovim limfomom

Poznato je da bolesnici sa HL danas mogu biti izlečeni u velikom procentu primenom hemioterapije, radioterapije ili kombinovanim modalitetom lečenja.

Postojeći modaliteti lečenja praćeni su sporednim efektima i kasnom toksičnošću poput infertiliteta, kardiovaskularnih oštećenja i pojavom sekundarnih maligniteta. Štaviše, određen procenat bolesnika karakteriše refraktarnost na lečenje i nemogućnost lečenja postojećim modalitetima lečenja uključujući visokodoznu hemioterapiju i transplataciju matične ćelije hematopoeze [171].

Uvođenje kombinovane hemioterapije u lečenje bolesnika sa HL kasnih sedamdesetih godina, kao i razvoj mnogo agresivnijih hemioterapijskih protokola lečenja za odmakle stadijume bolesti tokom osamdesetih i devedesetih godina, omogućilo je visok stepen izlečenja HL.

Naime, 80% bolesnika svih anatomskih lokalizacija i histoloških subtipova može biti izlečeno savremenim terapijskim protokolima [172].

Primena prognostičkih skorova omogućava određivanje grupe rizika a samim tim i način lečenja.

Sadašnja strategija lečenja bolesnika sa HL u prvoj liniji lečenja ima za cilj da utiče na bolji ishod bolesti ali i komplikacije koje su uzrokovane primenjenom terapijom, poput kardiopulmonarne toksičnosti, sekundarnih maligniteta i infertiliteta. Trajali, koji su u toku za bolesnike u ranom stadijumu bolesti proučavaju manje doze radijacije i manja polja radijacije, kao i moguću redukciju doze i broja ciklusa hemioterapije. Za odmakle stadijume bolesti dosadašnja istraživanja kao i trajali koji su toku preporučuju primenu novih kombinacija lekova sa većom dozom i intenzitetom [173].

Terapijski pristup relapsa HL podrazumeva primenu salvage radioterapije, salvage hemioterapije i visokodozne hemioterapije praćene autologom transplantacijom matične ćelije hematopoeze. Klinički trajali ukazuju na uspešnu primenu radioimunokonjugata i monoklonskih antitela u lečenju bolesnika sa relapsom bolesti [173].

Poznato je da rani stadijumi HL imaju odličnu prognozu, ali se postavlja pitanje optimalnog lečenja baziranog na faktorima rizika i PET nalazu.

Postojeći klinički faktori rizika bazirani na parametrima IPS-7 skora ne omogućavaju identifikaciju bolesnika koji mogu da se leče manje intenzivnom terapijom. Primena PET može pomoći u identifikaciji bolesnika niskog i visokog rizika, rano tokom lečenja hemioterapijom. Cilj lečenja ranih stadijuma jeste u redukciji prve linije lečenja koja omogućava održavanje kontrole tumorske mase. Svakako da se taj cilj može postići modifikacijom radioterapije baziranoj na nalazu PET ali i redukciji ABVD protokola u pogledu broja ciklusa ali i sastava ABVD protokola.

Ranija istraživanja konkretno HD7 trajal, GHSG su pokazala da u lečenju ranih stadijuma HL bez faktora treba primeniti 2 ciklusa ABVD sa radioterapijom proširenog polja EFRT 30 Gy+10 Gy IFRT na zahvaćena područja. Narednim HD10 istraživanjem iste grupe pokazano je da su 2 ciklusa ABVD sa IFRT dovoljna u lečenju ovih stadijuma. Nedavna HD13 studija je procenila da lečenje bolesnika sa dva ciklusa ABVD protokola i sa izostavljanjem pojedinih lekova ovog protokola AVD, ABV, ili AV i 30 Gy IFRT jeste podjednako efikasno [174,175].

Lečenje ranih stadijuma sa nepovoljnim faktorima rizika takođe podrazumeva primenu kombinovanog modaliteta lečenja [176]. Predmet istraživanja mnogih studija predstavlja optimalni broj hemioterapijskih ciklusa, optimalni protokol lečenja ali i doza i veličina polja radijacije bolesnika CSI /II A. Utvrđeno je da doza radijacije 30 Gy jeste superiornija u odnosu

na 20 Gy u pogledu preživljavanja bez pogoršanja (FFS) kada se primeni u kombinaciji sa ABVD protokolom a slični rezultati uočeni su kod primena istih doza sa eskaliranim BEACOPP protokolom. Poređenjem 4 ciklusa ABVD protokola i intenzivnijeg eskaliranog BEACOPP (2 ciklusa eBEACOPP i 2ABVD) u lečenju ovog stadijuma bolesnika utvrđena je superiornost BEACOPP u pogledu FFS ali ne i u pogledu opšteg preživljavanja [14].

Strategija lečenja bolesnika sa HL jeste u primeni agresivnijeg modaliteta lečenja za bolesnike sa odmaklom bolešću [21].

Pri planiranju lečenja treba proceniti potrebu za intenzivnim lečenjem i mogućom toksičnošću izabrane terapije.

Pojedine studije ukazuju da ne treba sve bolesnike sa HL u odmaklom stadijumu lečiti agresivnijim eskaliranim BEACOPP protokolom u odnosu na ABVD protokol imajući u vidu toksičnost protokola kao i faktore rizika bolesnika. Svakako, da primena pojedinih hemioterapijskih protokola može takođe kao i kod ranih stadijuma bolesti biti modifikovana nalazom PET, koji može uticati na intenzifikaciju lečenja ili deeskalaciju terapije.

Intenzifikacija terapije odmaklih stadijuma sa lošim prognostičkim osobinama podrazumeva primenu novih lekova poput brentuksimab vedotina, rituksimaba i lenalidomida u kombinaciji sa hemioterapijskim protokolima u prvoj liniji lečenja. Tako je BV inicijalno kombinovan sa ABVD protokolom a potom sa AVD, bez bleomicina koji je isključen zbog pulmonarne toksičnosti pri istovremenoj primeni sa BV. Drugi istraživači su poput GHSG kombinovali BV sa BEACOPP protokolom i njegovim varijantama i pokazali efikasnost ove kombinacije. Dva trajala su primenila rituksimab u kombinaciji sa ABVD protokolom u cilju eliminacije B ćelija koje podržavaju opstanak i rast malignih ćelija i pokazala postizanje kompletnog odgovora naročito u bolesnika sa visokim IPS-7 skorom.

Primena Lenalidomida u kombinaciji sa hemioterapijom je takođe efikasna u lečenju novodijagnostikovanih bolesnika sa odmaklim stadijumom HL. Istraživači GHSG su primenili Lenalidomid u kombinaciji sa AVD protokolom i radioterapijom u lečenju starijih bolesnika [14].

Odmakli stadijumi HL uključuju sve bolesnike sa Ann Arbor stadijumom III i IV. Mnoge studijske grupe u odmakli stadijum uključuju CSII sa drugim faktorima rizika poput velike medijastinalne mase i/ili ektranodalne bolesti [177].

Glimelius i saradnici su svojim istraživanjem ukazali da je jedino bulky bolest bila signifikantni negativni prognostički faktor za bolesnike sa HL u CSIIB mlađih od 60 godina, a faktori poput IPS, broja zahvaćenih regiona limfnih žlezdi, ektranodalne lokalizacije i broja leukocita višeg od 15 000 imaju negativan uticaj na prognozu bolesti ali ne statistički značajno [178].

Primena prognostičkih skorova treba da onemogući prekomerno lečenje bolesnika sa HL, a istraživanja ukazuju da se to može postići određivanjem tumorske mase. Optimalni vid lečenja podrazumeva primenu prognostičkih faktora koji direktno reprezentuju povezanost individualne tumorske mase i potrebnog broja ciklusa terapije u lečenju.

Posebno se ističe uloga metaboličkog volumena tumora (MTV) utvrđenog PET/ CT om u planiranju lečenja bolesnika sa ranim stadijumima HL [179].

Rani stadijumi bolesti se klasifikuju u grupu povoljnog i nepovoljnog ishoda bolesti na osnovu starosti, prisustva B simptoma, broja zahvaćenih limfnih nodusa kao i njihove maksimalne veličine. Bolesnici odmaklih stadijuma bolesti se klasifikuju primenom pomenutog IPS-7 skora, koji uključuje 7 kliničkih parametara. Nedostaci kliničkih prognostičkih faktora u stratifikaciji rizika bolesnika i odluke o lečenju nametnuli su potrebu evaluacije primene molekularnih i imunoloških biomarkera. Oni uključuju primenu cirkulišuće mikro RNA, infiltrišućih imunih ćelija poput makrofaga, prisustva Epstein Bar virusa, cirkulišućih cito i hemokina kao i površinskog proteina poput CD30, stvorenih od strane malignih ćelija kao i imunih ćelija domaćina. Sačinjen je panel sa 23 gena koji može da identifikuje bolesnike već pri dijagnozi koji imaju rizik neuspeha terapije i smrti obzirom na biologiju tumora i supresiju antitumorskog imunog odgovora [180].

Svakako, da hemosenzitivnost i radiosenzitivnost predstavljaju faktore koji utiču na ishod lečenja bolesnika sa HL. Neoplastične HRS ćelije stvaraju hemokine TARC/CCL7 i MDC koji indukuju ekspresiju antiapoptskih proteina HRS ćelija ali i privlačenje ćelija koje ekspimiraju CCR4. Primenom hemioterapije utiče se na stvaranje hemokina od strane HRS ćelija, koju prati korelacija sa serumskim nivoom TARCa, a metabolička aktivnost netumorskih ćelija tumorskog okruženja se određuje primenom FDG/ PET. Istraživanje Cuccara i saradnika je pokazalo da iako TARC jeste biomarker procene ranog terapijskog odgovora on ne može da zameni primenu PET/CT kao prediktora ishoda bolesti HL.

Praćanje broja CD68 i prisustva B simptoma pri dijagnozi može pomoći u identifikaciji grupe bolesnika niskog rizika uprkos pozitivnom nalazu interim PET /CT [18, 181].

Važeće ESMO preporuke iz 2014. godine nalažu primenu kombinovanog modaliteta lečenja bolesnika sa HL i ograničenom bolešću, koje se sastoji od hemioterapije praćene radioterapijom, a rezultati ukazuju da je kombinovani modalitet lečenja superioran u odnosu na radioterapiju kao jedini vid lečenja. Standard lečenja predstavlja primena dva do tri ciklusa ABVD protokola praćenog IFRT. Primena interim PET može uticati na način lečenja bolesnika ove grupe.

Za lečenje bolesnika intermedijarnog stadijuma se prema ovim preporukama preporučuje primena kombinovanog modaliteta lečenja koji kao zlatni standard podrazumeva 4 ciklusa

ABVD praćenog sa 30 Gy IFRT. Kod bolesnika mlađih od 60 godina ovaj standard podrazumeva 2 ciklusa eBEACOPP i potom 2 ciklusa ABVD protokola. Novija istraživanja primenjuju redukovana polja radioterapije u odnosu na raniju IFRT.

Odmakli stadijum bolesti se prema ovim preporukama leći samo hemioterapijom, a radioterapija se razmatra kod bolesnika sa rezidualnom masom nakon hemioterapije. Preporuke nalažu primenu 6 do 8 ciklusa ABVD praćenih lokalnom RT rezidualne mase veće od 1,5 cm kod bolesnika mlađih od 60 godina ili sa 6 ciklusa eBEACOPP praćenih lokalnim RT ili PET pozitivnim rezidualnim limfomom većim od 2,5 cm. Protokol ABVD predstavlja standard lečenja starijih bolesnika. Studije ukazuju da rani interim PET može ukazati na grupu bolesnika koja neće postići odgovor a prima ABVD protokol. Za sada se ne može vršiti stratifikacija lečenja na osnovu nalaza interim PET.

Bolesnike sa refraktornom bolesti, kao i one sa relapsom treba lečiti visokodoznom hemioterapijom praćenom ASCT. Kod bolesnika visokog rizika se može primeniti tandem ASCT. Salvage protokoli u lečenju ovih bolesnika podrazumevaju primenu DHAP, IGEV, ICE koji se primenjuju u cilju redukcije tumorske mase i mobilizacije stem ćelije pre visokodozne hemioterapije i ASCT. Primena BV je terapijski izbor za bolesnike sa relapsom posle ASCT.

Alogena transplatacija matične ćelije hematopeze predstavlja modalitet lečenja mlađih bolesnika hemosenzitivnih, u dobrom opštem stanju koji su relapsirali nakon visokodozne hemioterapije i ASCT. Kod bolesnika sa multiplim relapsima treba razmotriti primenu palijsativnog lečenja jednim lekom kao što je gemcitabin ili bendamustini/ili regionalnim RT. Pomenuti BV je takođe indikovani za bolesnike sa relapsom nakon prethodne dve terapijske linije lečenja a koji nisu kandidati za visokodoznu hemioterapiju i ASCT [182].

2. OSNOVNE HIPOTEZE

Osnovna hipoteza u našem istraživanju je da galektin-1 (Gal-1) i serumski CD163 (sCD163) mogu biti prognostički biomarkeri tumorske mase novodijagnostikovanih bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom, relapsa i progresije bolesti, kao i rezistencije na primenjeno lečenje.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Cilj istraživanja je da se kod novodijagnostikovanih bolesnika sa cHL kao i kod bolesnika sa relapsom, progresijom i refraktarnošću bolesti, ispita prognostički značaj biomarkera Gal-1 i sCD163 u odnosu na kliničke i histopatološke prognostičke faktore.
2. Utvrditi značaj nivoa Gal-1 i sCD163 u serumu u odnosu na klinički stadijum cHL novodijagnostikovanih bolesnika, relapsa, progresije i refraktarnosti na lečenje
3. Utvrditi značaj istovremene primene Gal-1 i sCD163 kao biomarkera cHL u predikciji pojave relapsa i refraktarnosti na lečenje

Očekivani rezultati

Povišene vrednosti Gal-1 korelišu sa tumorskom masom, pojavom relapsa i rezistentnim cHL. Vrednosti serum CD163 korelišu sa prisustvom B simptoma i Ann Arbor stadijumom.

4. MATERIJAL I METODOLOGIJA RADA

Studija je multicentrična i prospektivna, obuhvatila je bolesnike koji su lečeni u Klinici za hematologiju i kliničku imunologiju Kliničkog centra u Nišu, Klinici za onkologiju u Nišu i Klinici za hematologiju Kliničkog centra Srbije.

Istraživanje je obuhvatilo 79 ispitanika. Od ovog broja, 63 su bili bolesnici sa cHL a kontrolnu grupu činilo je 16 zdravih dobrovoljaca. U studijskoj grupi bolesnika sa cHL, bilo je 29 (46,03%) bolesnika ženskog i 34 (53,97%) bolesnika muškog pola, prosečne starosti $34,89 \pm 13,79$.

Studijska grupa sa 63 bolesnika sa cHL obuhvatala je podgrupe novodijagnostikovanih bolesnika kod kojih nije započeto lečenje, novodijagnostikovane bolesnike kod kojih je započeto lečenje, bolesnike sa relapsom i progresijom bolesti kao i primarno refraktorne bolesnike tokom 2014. i 2015. godine. Tokom istraživanja dva bolesnika su egzistirala.

Kontrolnu grupu činilo je 16 dobrovoljaca, prosečne starosti $39,75 \pm 12,81$ godina.

Studija je izvedena u skladu sa pravilima deklaracije iz Helsinkija. Dizajn studije i njeno izvođenje je odobren rešenjima lokalnih etičkih komiteta ustanove u kojoj su izvođene.

Dijagnoza i određivanje kliničkih stadijuma obolelih sa cHL postavljeni su u skladu sa ESMO preporukama. Kod bolesnika su sagleđavane vrednosti parametara koji su obuhvaćeni scoring sistemom Hasenclevera sa sledstvenim parametrima loše prognoze: vrednosti serumskih albumina niže od 40 g/L, Hgb < 105 g/L, prisustvo muškog pola, starost > 45 godina, IV stadijum bolesti prema kriterijumima iz Ann Arbor, vrednost leukocita $> 15 \times 10^9$ /L i manje od 8% limfocita ili u apsolutnim vrednostima $< 0.6 \times 10^9$ /L. U skladu sa brojem negativnih scoring poena, bolesnici se klasifikuju u grupe od 0–5 pri čemu se IPS 5 smatra kada bolesnik ima 5 i više tih negativnih poena.

Bolesnici su u prvoj terapijskoj liniji lečeni polihemioterapijom po protokolu ABVD ili eBEACOPP uz primenu radioterapije u cilju konsolidacije ili u slučaju relapsa/refraktarne (R/R) bolesti salvage hemioterapijom po protokolu DHAP uz visokodoznu hemioterapiju sa autolognom transplantacijom matičnih ćelija hematopoeze.

Koncentracija cirkulišućeg Galektin-1 merena je komercijalnim imunoabsorpcionim enzimskim testovima (sandwich enzyme linked immunosorbent assay- ELISA) u plazmi ispitanika, koji se zasniva na kompetitivnom vezivanju poliklonalnih antitela specifičnih za Galektin-1, prema uputstvu proizvođača (Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA). Koncentracija je određivana pomoću standardne krive i izražena u ng/ml. Referentne

vrednosti Gal-1 u serumu su 0.313–20 ng/ml. Prema uputstvu proizvođača, ne postoji značajna ukrštena reaktivnost ili interferencija sa drugim proteinima.

Koncentracija cirkulišućeg CD163 merena je komercijalnim imunoadsorpcionim enzimskim testovima (sandwich enzyme linked immunosorbent assay- ELISA) u plazmi ispitanika, koji se zasniva na kompetitivnom vezivanju poliklonalnih antitela specifičnih za CD163, prema uputstvu proizvođača (Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, USA). Koncentracija je određivana pomoću standardne krive i izražena u ng/ml. Referentne vrednosti sCD163 u serumu su 1.60–100 ng/ml. Prema uputstvu proizvođača, ne postoji značajna ukrštena reaktivnost ili interferencija sa drugim proteinima.

Statističke metode za obradu i analizu dobijenih podataka

Statistička analiza podataka rađena je u programskom paketu SPSS 15.0. Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Kontinualne varijable su predstavljene osnovnim statističkim parametrima – aritmetičkom sredinom (\bar{X}), standardnom devijacijom (SD) i medijanom (Me) kao merom centralne tendencije. Kvalitativna obeležja ispitivanih promenljivih data su učestalošću (n) i procentualnom zastupljenošću (%).

Normalnost distribucije kontinualnih varijabli, u zavisnosti od veličine uzorka, ispitivana je Kolmogorov-Smirnov ili Shapiro-Wilk-ovim testom. Obzirom da distribucija većine varijabli nije bila normalna njihove vrednosti su predstavljene medijanom (Me) i interkvantilnim vrednostima (25.–75. percentil). Za ocenu značajnosti razlike (p) kontinualnih varijabli između dve nezavisne grupe ispitanika korišćeni su Studentov t-test nezavisnih uzoraka, kod normalne distribucije podataka, ili Mann-Whitnijev U test, kod distribucije koja odstupa od normalne. Kao prag statističke značajnosti definisana je standardna vrednost – $p < 0,05$.

U zavisnosti od distribucije podataka za testiranje značajnosti razlike u okviru grupa za ponovljena merenja je korišćen Studentov t-test uparenih uzoraka u slučaju normalne distribucije podataka, odnosno Wilcoxonov test ranga kod varijabli čija distribucija odstupa od normalne.

Za testiranje značajnosti razlike između više nezavisnih grupa korišćena je ANOVA, za normalnu distribuciju podataka, ili Kruskal-Wallisov test pri odstupanju distribucije od normalne.

Za testiranje statističke značajnosti razlika apsolutnih frekvencija između uzoraka korišćen je χ^2 test, ili Fisher-ov test egzaktno verovatnoće, ukoliko je apsolutna frekvencija obeležja manja od 5.

Za ispitivanje povezanosti kontinualnih promjenljivih korišćen je Pearsonov koeficijent linearne korelacije za normalnu distribuciju varijabli ili Spearmanov koeficijent korelacije rangova za varijable čija distribucija odstupa od normalne.

Za procenu klasifikacionih karakteristika izabranih varijabli, odnosno utvrđivanje njihove senzitivnosti i specifičnosti sprovedena je ROC analiza.

5. REZULTATI

5.1. Pol, starost i patohistološki nalaz bolesnika i kontrolne grupe

Istraživanje je obuhvatilo uzorak od 79 ispitanika. Od ovog broja 63 su bili bolesnici sa klasičnim Hočkinovim limfomom (cHL), a kontrolnu grupu činilo je 16 zdravih ispitanika.

Starosna dob i pol bolesnika sa cHL predstavljaju prognostičke faktore Internacionalnog prognostičkog skora (IPS-7), pa su oni prvi analizirani u istraživanju. Noviji, prognostički skor IPS-3 ne uključuje pol kao prognostički faktor.

U studijskoj grupi bolesnika sa cHL bilo je 29 (46,03%) bolesnika ženskog i 34 (53,97%) bolesnika muškog pola, prosečne starosti $34,89 \pm 13,79$ sa medijanom kao merom centralne tendencije od 33,00 godine.

Kontrolnu grupu činilo je 16 zdravih ispitanika, prosečne starosti $39,75 \pm 12,81$ (37,00) godina, pri čemu je 12 (75,00%) ispitanika bilo ženskog, a 4 (25,00) muškog pola.

Tabela 3 prikazuje polnu strukturu i starost ispitanika studijske i kontrolne grupe.

Tabela 3. Polna struktura i starost ispitanika studijske i kontrolne grupe

Ispitanici	Ženski pol		Muški pol		Ukupno		Godine
	n	%	n	%	n	%	
Studijska grupa	29	46,03%	34	53,97%	63	100,00%	$34,89 \pm 13,79$ (33,00)
Kontrolna grupa	12	75,00%	4	25,00%	16	100,00%	$39,75 \pm 12,81$ (37,00)

Zastupljenost polova data je frekvencijama (n) i % učešćem, a starost je data kao $X \pm SD$ (Me)

Patohistološka dijagnoza (phd) bolesnika sa cHL ne predstavlja prognostički faktor Internacionalnog prognostičkog skora (IPS-7). Istraživanjem je utvrđeno prisustvo pojedinih patohistoloških subtipova cHL, imajući u vidu da sastav tumorskog okruženja može uticati na prognozu bolesnika, koji su prikazani u Tabeli 4.

Statistički značajno najviše bolesnika ima patohistološku dijagnozu nodularne skleroze (NS), te je njihov broj statistički značajno veći u odnosu na sve ostale phd ponaosob.

Tabela 4. Zastupljenost patohistoloških dijagnoza bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom

Patohistološka dijagnoza	Bolesnici	
	n	%
Nodularna skleroza (NS)	49	77,78%
Mešovita celularnost (MC)	7	11,11%
Limfocitna deplecija (LD)	2	3,17%
Neklasifikovan Hočkinov limfom (cHL)	5	7,94%
Ukupno	63	100,00%

U Tabeli 5 prikazana je polna struktura bolesnika i njihova patohistološka dijagnoza. Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti polova u okviru patohistoloških dijagnoza.

Tabela 5. Polna struktura bolesnika u odnosu na patohistološku dijagnozu Hočkinovog limfoma

Patohistološka dijagnoza	Ženski pol		Muški pol	
	n	%	n	%
Nodularna skleroza (NS)	23	46,94%	26	53,06%
Mešovita celularnost (MC)	3	42,86%	4	57,14%
Limfocitna deplecija (LD)	1	50,00%	1	50,00%
Neklasifikovan Hočkinov limfom (cHL)	2	40,00%	3	60,00%

Pored već utvrđene starosti i pola bolesnika sa cHL, istraživanjem je utvrđena starosna dob i pol u odnosu na patohistološku dijagnozu.

Starosna dob je različita kod pojedinih patohistoloških subtipova cHL i prikazana je u Tabeli 6.

Tabela 6. Starost bolesnika u odnosu na patohistološku dijagnozu klasičnog Hočkinovog limfoma

Patohistološki subtip cHL	Godine	
Nodularna skleroza (NS)	32,92 ± 12,32	(32,00)
Mešovita celularnost (MC)	43,86 ± 13,51	^{a*} (43,00)
Limfocitna deplecija (LD)	45,50 ± 37,48	(45,50)
Neklasifikovan Hočkinov limfom (cHL)	37,40 ± 15,77	(40,00)

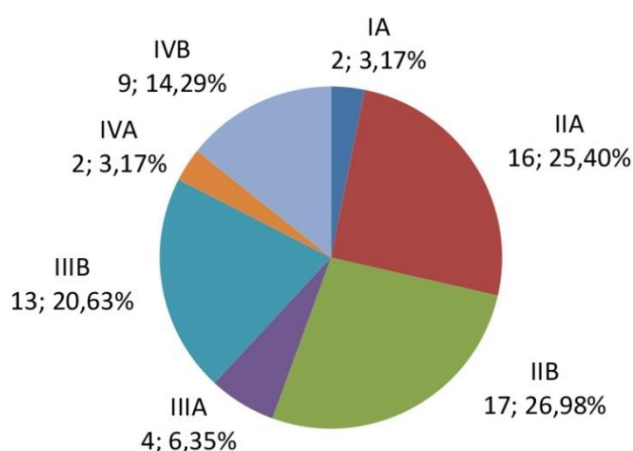
Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me);

a – vs NS, * – $p < 0,05$ (Mann–Whitney U test)

Najstariji bolesnici imali su phd limfocitne deplecije (LD), a nešto mlađi bolesnici bili su sa phd dijagnozom mešovite celularnosti (MC). Kruskal-Wallis testom nije utvrđena statistički značajna povezanost starosti i phd dijagnoze, ali je statistički značajno veća starost bolesnika sa MC u odnosu na bolesnike sa NS ($p < 0,05$).

5.2. Klinički stadijumi bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom

Klinički stadijum bolesti određen Ann Arbor klasifikacijom predstavlja prognostički faktor pomenutog IPS-7 skora.



Grafikon 1. Zastupljenost kliničkih stadijuma kod bolesnika sa cHL

Grafikon 1 prikazuje strukturu bolesnika u odnosu na klinički stadijum bolesti. Najveći broj bolesnika pripada kliničkom stadijumu IIB, njih 17 (26,98%), ali je prisutna gotovo podjednaka zastupljenost bolesnika IIA kliničkog stadijuma, njih 16 (25,40%). Konstatovano je nešto manje bolesnika IIIB kliničkog stadijuma, njih 13 (20,63%), zatim IVB sa 9 (14,29%), a zastupljenost bolesnika sa ostalim kliničkim stadijumima bila je znatno manja.

5.3. Zastupljenost kliničkih statusa bolesnika u odnosu na pol i starost

Klinički status bolesnika sa cHL (novodijagnostikovani bolesnici kod kojih nije započeto lečenje, novodijagnostikovani bolesnici sa započetim lečenjem, remisije, relapsa, progresije osnovne bolesti kao i refraktarnosti na lečenje) jeste uzrokovan interakcijom malignih, HRS ćelija i ćelija tumorskog okruženja. Istraživanjem je utvrđena sledeća zastupljenost kliničkih statusa bolesnika sa cHL.

Tabela 7. Zastupljenost kliničkih statusa bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom

Bolesnici sa cHL		
Klinički status	n	%
NovoDg bez Th	13	20,63%
NovoDg sa Th	12	19,05%
Remisija	18	28,57%
Relaps	4	6,35%
Progresija	5	7,94%
Refraktarnost	11	17,46%
Ukupno	63	100,00%

NovoDg bez Th – novodijagnostikovani bolesnici sa cHL kod kojih nije započeto lečenje,

NovoDg sa Th – novodijagnostikovani bolesnici kod kojih je započeto lečenje

Klinički status bolesnika sa dijagnozom cHL prikazan je u Tabeli 7. Najveći broj bolesnika bio je u statusu remisije bolesti, njih 18 (28, 57%), a najmanji u statusu relapsa, njih 4 (6,35%). Konstatovano je 13 (20,63%) novodijagnostikovanih bolesnika kod kojih nije primenjeno lečenje i 12 (19,05%) novodijagnostikovanih bolesnika kod kojih je započeto lečenje.

U istraživanju je posebno razmatran pol bolesnika u odnosu na klinički status bolesnika sa cHL i Pearsonov χ^2 testom je utvrđeno da nema statistički značajnih razlika u zastupljenosti polova u okviru kliničkog statusa. Rezultati su prikazani u Tabeli 8.

Tabela 8. Zastupljenost kliničkih statusa kod bolesnika sa cHL

Klinički status	Ženski pol		Muški pol	
	n	%	n	%
NovoDg bez Th	7	53,85%	6	46,15%
NovoDg sa Th	6	50,00%	6	50,00%
Remisija	7	38,89%	11	61,11%
Relaps	4	100,00%	0	0,00%
Progresija	1	20,00%	4	80,00%
Refraktarnost	4	36,36%	7	63,64%

Godine, predstavljaju glavni prognostički faktor prve linije lečenja ali ne i pojave relapsa bolesti, pa je istraživanjem utvrđen uticaj starosne dobi na klinički status bolesnika sa cHL.

Tabela 9. Starost bolesnika u odnosu na klinički status

Klinički status	Starost
NovoDg bez Th	35,31 ± 14,64 (32,00)
NovoDg sa Th	36,42 ± 12,99 (32,00)
Remisija	34,61 ± 16,81 (31,00)
Relaps	33,75 ± 6,55 (36,50)
Progresija	39,00 ± 16,90 (40,00)
Refraktarnost	31,73 ± 10,27 (32,00)

Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me)

NovoDg bez Th – novodijagnostikovani bolesnici sa cHL kod kojih nije započeto lečenje,

NovoDg sa Th – novodijagnostikovani bolesnici kod kojih je započeto lečenje

Starosna struktura bolesnika sa cHL i klinički status bolesnika prikazani su u Tabeli 9. Najstariji bolesnici bili su u remisiji (39,00±16,90 (40,00)), a najmlađi u statusu refraktarnosti njih (31,73±10,27 (32,00)), ali ni Kruskal-Wallis testom, kao ni poređenjem starosti ispitanika različitog kliničkog statusa ponaosob, nije utvrđena statistički značajna povezanost starosti i kliničkog statusa, kao ni statistički značajna razlika.

5.4. Vrednosti serumskog CD163 (sCD163) i galektina-1 (Gal-1) bolesnika i kontrolne grupe

Upoređivanje nivoa sCD163 i Gal-1 između kontrolne grupe zdravih ispitanika i grupe obolelih sa cHL pokazalo je da su srednje vrednosti sCD163 bile statistički značajno više u grupi obolelih u odnosu na kontrolnu grupu (92,63 ± 47,74 ng/ml vs 67,76 ± 11,91ng/ml, $p < 0,05$). Nivo Gal-1 obolelih bio je statistički značajno viši u poređenju sa kontrolnom grupom (30,28 ± 5,2 ng/ml vs 27,28 ± 1,33 ng/ml, $p < 0,001$). Tabela 10 prikazuje vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kontrolne grupe.

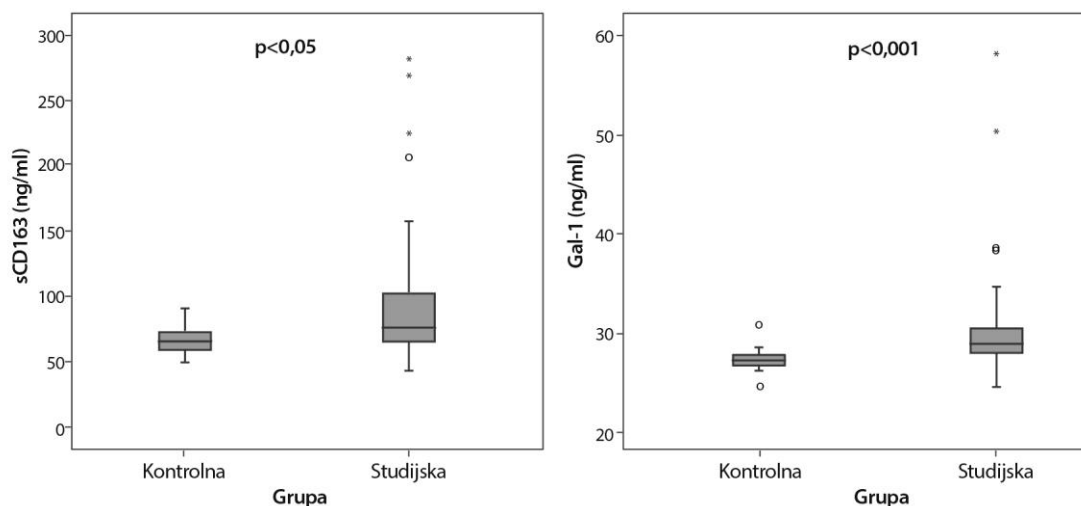
Tabela 10. Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 u kontrolnoj grupi i studijskoj grupi

	sCD163 (ng/ml)			Gal-1 (ng/ml)		
Studijska grupa	92,63 ± 47,74*	(77,30)	30,28 ± 5,20***	(28,90)		
Kontrolna grupa	67,76 ± 11,91	(66,80)	27,28 ± 1,33	(27,15)		

Vrednosti su date kao X ± SD (Me)

* – p<0,05, *** – p<0,001 (Mann–Whitney U test)

Vrednosti sCD163 i Gal-1 bile su statistički značajno više u grupi obolelih od cHL u odnosu na kontrolnu grupu, sCD163 razlika je imala statistički značaj (p<0.05) kao i Gal -1 na nivou statističke značajnosti od (p<0.001) (Grafikon 2).

**Grafikon 2.** Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kontrolne grupe

5.5. Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 u odnosu na pol i starost kontrolne grupe

Ekspresija Gal-1 i sCD163 se razlikuje kod polova ali ne podjednako kod svih maligniteta. Naše istraživanje pokazalo je da su povišene vrednosti serumskog Gal-1 i CD163 prisutne kod starijih od 45 godina u odnosu na mlađe od 45 godina, ali da su različito zastupljene kod polova (Tabela 11).

Vrednost serumskog CD163 u kontrolnoj grupi je viša kod ispitanika muškog pola i starijih od 45 godina, ali ne i statistički značajno u odnosu na suprotni pol i mlađu grupu ispitanika ove grupe.

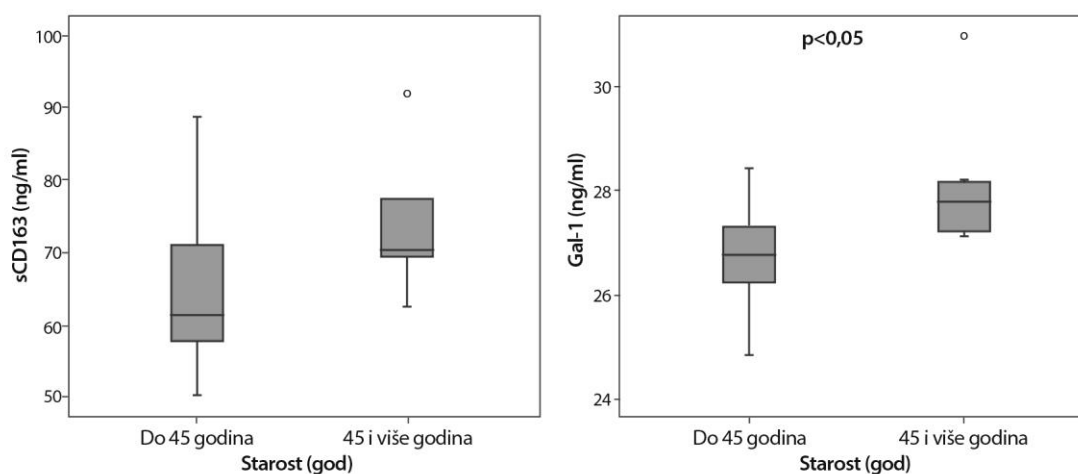
Tabela 11. Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 u kontrolnoj grupi u odnosu na pol i starost ispitanika

Vrednosti	sCD163(ng/ml)	Vrednosti Gal-1(ng/ml)
Pol		
Ženski	67,28 ± 12,94 (66,10)	27,53 ± 1,26 (27,25)
Muški	69,20 ± 9,56 (70,55)	26,53 ± 1,44 (26,55)
Starost		
< 45 god.	64,21 ± 11,86 (61,40)	26,73 ± 0,95 (26,75)
≥45 god.	73,68 ± 10,25 (70,25)	28,18 ± 1,45 * (27,80)

Vrednosti su date kao X ± SD (Me)

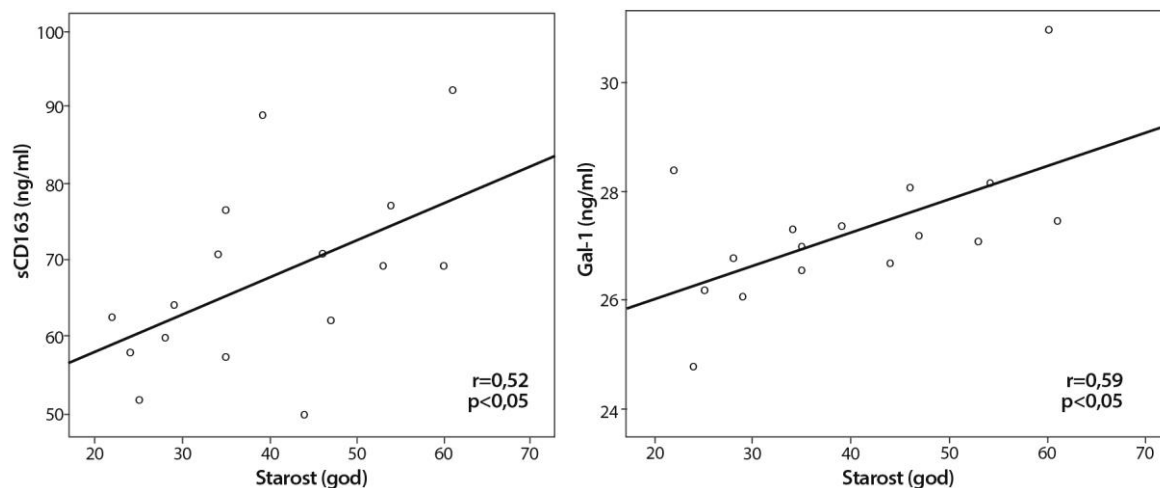
* – p<0,05 (Mann-Whitney U test)

Vrednost serumskog Gal-1 u kontrolnoj grupi je višai kod ispitanika ženskog pola. Gal-1 je statistički značajno veće vrednost kod ispitanika kontrolne grupe starijih od 45 u odnosu na mlađe od 45 godina (p<0,05) (Grafikon 3).

**Grafikon 3.** Vrednost sCD163 i Gal-1 u kontrolnoj grupi kod ispitanika do i preko 45 godina

Grafikon 3 prikazuje vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 kontrolne grupe mlađih i starijih od 45 godina.

Istraživanjem je utvrđeno postojanje korelacije vrednosti Gal-1 i sCD163 sa starošću ispitanika kontrolne grupe. Grafikon 4 prikazuje vrednosti sCD163 i Gal-1 i starosti ispitanika kontrolne grupe.



Grafikon 4. Korelacija starosti sa sCD163 i Gal-1 kod ispitanika kontrolne grupe

Vrednost Pearsonovog koeficijenta korelacije starosti sa sCD163 ($r = 0,52$) i Gal-1 ($r = 0,59$) u kontrolnoj grupi ukazuju na jake statistički značajne ($p < 0,05$) pozitivne korelacije starosti sa navedena dva parametra kod ispitanika kontrolne grupe.

5.6. Vrednosti odnosa sCD163 i Gal-1 bolesnika sa cHL i kontrolne grupe

Imajući u vidu interakciju malignih HRS ćelija, koje su predstavljene galektinom-1 i tumorskog okruženja koje je predstavljeno serumskim CD163 proučavan je odnos sCD163 i Gal-1.

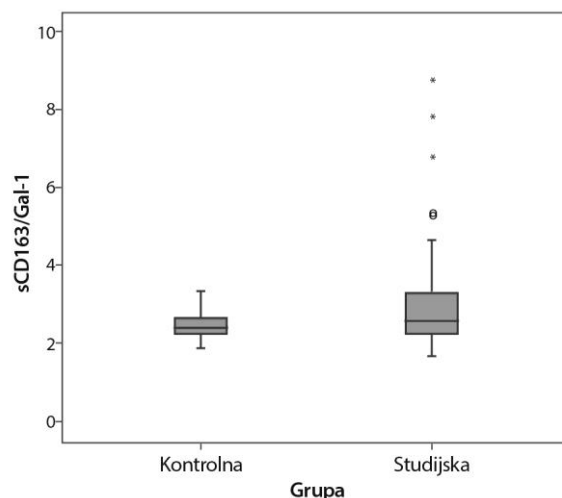
Tabela 12. Vrednosti sCD163/Gal-1 u kontrolnoj grupi i studijskoj grupi

	sCD163 / Gal-1	
Ispitanici	ng/ ml	
Studijska grupa	3,05 ± 1,40	(2,58)
Kontrolna grupa	2,48 ± 0,41	(2,40)

Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me)

Tabela 12 prikazuje vrednosti odnosa sCD163 i Gal-1 ispitanika kontrolne grupe i bolesnika sa cHL.

Odnos sCD163/Gal-1 je više vrednosti u grupi bolesnika sa cHL u odnosu na kontrolnu grupu, ali ne statistički značajno (Grafikon 5).



Grafikon 5. Vrednost odnosa sCD163/Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kontrolne grupe

5.7. Vrednost odnosa sCD163 i Gal-1 u odnosu na pol i starost kontrolne grupe

Naše istraživanje pokazalo je da su povišene vrednosti serumskog Gal -1 i CD163 prisutne kod starijih od 45 godina u odnosu na mlađe od 45 godina, ali da su različito zastupljene kod polova pa je bilo potrebno utvrditi vrednosti odnosa sCD163 i Gal -1 u odnosu na pol i starosnu dob kontrolne grupe.

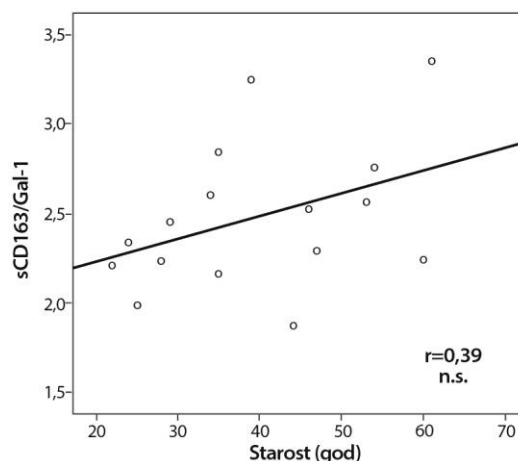
Tabela 13. Vrednosti odnosa sCD163/Gal-1 u kontrolnoj grupi u odnosu na pol i starost ispitanika

Kontrolna grupa ispitanika	Odnos sCD163/Gal-1	
	ng/ ml	
Pol		
Ženski	2,44 ± 0,46	(2,27)
Muški	2,60 ± 0,24	(2,60)
Starost		
< 45 god.	2,40 ± 0,41	(2,29)
≥45 god.	2,62 ± 0,40	(2,54)

Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me)

Tabela 13 prikazuje vrednosti odnosa sCD163 i Gal-1 kontrolne grupe. Odnos sCD163/Gal-1 je veći kod muškaraca i starijih od 45 godina kontrolne grupe i više ali ne i statistički značajno.

Prethodni rezultati pokazali su da pojedinačne vrednosti sCD163 i Gal-1 korelišu sa starošću ispitanika kontrolne grupe, a istraživanjem je utvrđena i korelacija odnosa sCD163/Gal-1.



Grafikon 6. Korelacija starosti sa odnosom sCD163/Gal-1 kod ispitanika kontrolne grupe

Grafikon 6 prikazuje vrednosti odnosa serumskog CD163 i Gal-1 u odnosu na starost kontrolne grupe.

Pearsonov koeficijent linearne korelacije starosti sa CD163/Gal-1 ($r = 0,39$) u kontrolnoj grupi ukazuju na pozitivnu korelaciju srednjeg intenziteta, ali koja nije statistički značajna.

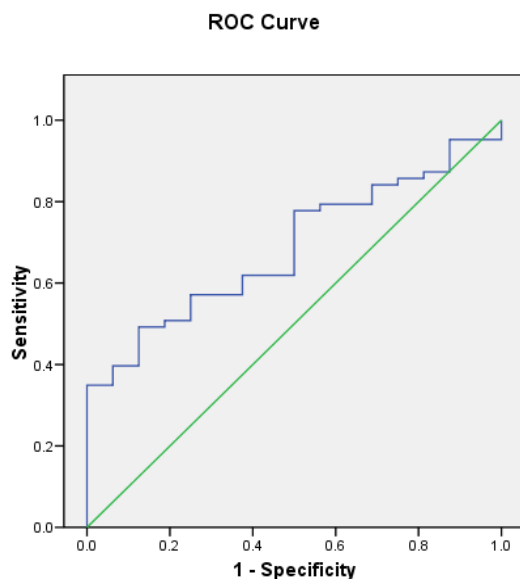
5.8. Procena klasifikacionih karakteristika sCD163 i Gal-1

Primena sCD163 i Gal-1 kao biomarkera cHL zavisi od njihove specifičnosti i senzitivnosti da klasifikuje bolesnike sa cHL u odnosu na zdrave ispitanike. U istraživanju je korišćena ROC analiza za procenu klasifikacionih karakteristika sCD163 i Gal -1.

Pokazalo se da granične vrednosti od 78,45 ng/ml sCD163 mogu klasifikovati bolesnike od zdravih dobrovoljaca sa senzitivnošću od 49,2% i specifičnošću od 87,5%. Ista analiza je pokazala da je vrednost Gal-1 od 28,45 ng/ml seruma imala senzitivnost 63,5% a specifičnost 93,8%.

Grafikon 7 prikazuje klasifikacione karakteristike sCD163. Izgled krive ukazuje na relativno dobre karakteristike sCD163 u klasifikaciji ispitanika na studijsku i kontrolnu grupu. Naime, specifičnost počinje značajnije da opada kada senzitivnost pređe 49,2%. Površina ispod

krive (area under the curve – AUC) iznosi 0.686 sa standardnom greškom procene od 0.063, tako da je statistička značajnost $p < 0,05$, a 95% interval poverenja (0,56 do 0,80) ukazuje na solidnu pouzdanost u zaključivanju.



Grafikon 7. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika sCD163

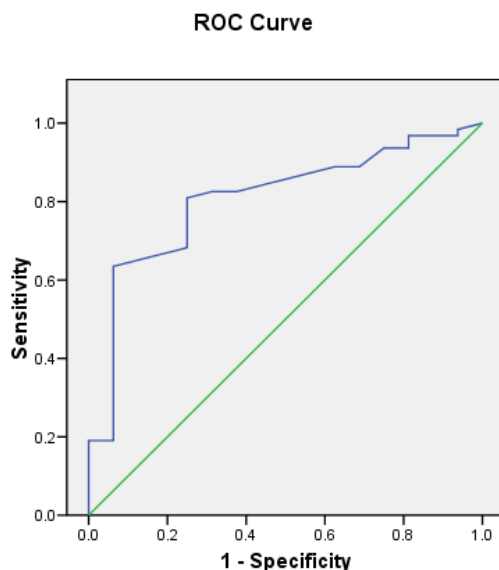
Klasifikacione karakteristike sCD163 prikazane su u Tabeli 14.

Tabela 14. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika sCD163

Vrednost sCD163 ng/ml	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost +specifičnost
...
75,150	0,540	0,750	1,290
76,000	0,524	0,750	1,274
76,550	0,508	0,750	1,258
77,100	0,508	0,813	1,320
77,400	0,492	0,813	1,305
78,450	0,492	0,875	1,367
79,500	0,476	0,875	1,351
80,050	0,460	0,875	1,335
80,650	0,444	0,875	1,319
82,600	0,429	0,875	1,304
86,300	0,413	0,875	1,288
...

Sumiranjem vrednosti senzitivnosti i specifičnosti za oba parametra dobijenih ROC analizom izračunato je da granične vrednosti od 78,45 ng/ml sCD163 mogu klasifikovati bolesnike od zdravih ispitanika.

Primenom ROC analize utvrđeno je da Gal-1 ima bolje klasifikacione karakteristike u odnosu na sCD163 (Grafikon 8).



Grafikon 8. ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika Gal-1

Grafikon 8 prikazuje klasifikacione karakteristike za Gal-1. Izgled krive ukazuje na dobre karakteristike Gal-1 u klasifikaciji ispitanika na studijsku i kontrolnu grupu. Naime, specifičnost počinje značajnije da opada kada senzitivnost pređe 63,5%. Površina ispod krive (area under the curve – AUC) iznosi 0,807 sa standardnom greškom procene od 0,058, tako da je statistička značajnost $p < 0,001$, a 95% interval poverenja (0,69 do 0,92) ukazuje na veliku pouzdanost u zaključivanju.

Klasifikacione karakteristike Gal-1 prikazane su u Tabeli 15.

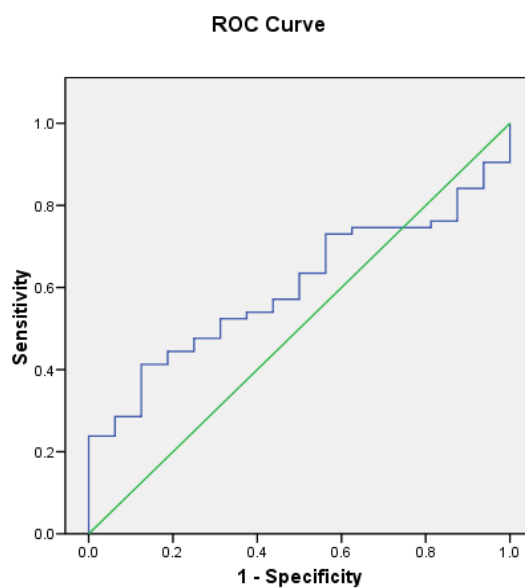
Sumiranjem vrednosti senzitivnosti i specifičnosti za oba parametra dobijenih ROC analizom izračunato je da vrednost Gal-1 viša od 28,45 ng/ml preciznije klasifikuje cHL bolesnike u odnosu na zdravu populaciju.

Tabela 15. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika Gal-1

Vrednost Gal-1 ng/ml	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost +specifičnost
...
27,850	0,746	0,750	1,496
27,950	0,714	0,750	1,464
28,050	0,683	0,750	1,433
28,150	0,667	0,813	1,479
28,300	0,651	0,875	1,526
28,450	0,635	0,938	1,572
28,600	0,619	0,938	1,557
28,750	0,556	0,938	1,493
28,850	0,524	0,938	1,461
29,000	0,476	0,938	1,414
29,150	0,444	0,938	1,382
...

5.9. Procena klasifikacionih karakteristika odnosa sCD163/ Gal-1

Obzirom da su utvrđene pojedinačne klasifikacione karakteristike Gal-1 i sCD163 bilo je važno odrediti i potencijalnu ulogu odnosa ovih markera u prognozi bolesnika sa cHL.

**Grafikon 9.** ROC kriva za procenu klasifikacionih karakteristika sCD163/Gal-1

Grafikon 9 prikazuje klasifikacione karakterstike odnosa sCD163/ Gal-1. Izgled krive ukazuje na nepouzdana karakteristika sCD163/Gal-1 u klasifikaciji ispitanika na studijsku i kontrolnu grupu. Specifičnost počinje značajnije da opada kada senzitivnost pređe već 41,3%. Površina ispod krive (area under the curve – AUC) iznosi 0.600 sa standardnom greškom procene od 0.066, bez statističke značajnosti, a 95% interval poverenja (0.47 do 0.73) ukazuje na slabu pouzdanost u zaključivanju.

ROC analiza definiše senzitivnost i specifičnost za svaku vrednost odnosa sCD163/Gal-1. Kada se kao presek (cut off) izabere vrednost skale od 2,924 zbir senzitivnosti i specifičnosti je najveći, odnosno senzitivnost metode tada iznosi 41,3%, a specifičnost je 87,5%.

Tabela 16 prikazuje koordinate ROC krive za procenu karakteristika sCD163/Gal-1.

Tabela 16. Koordinate ROC krive za procenu karakteristika odnosa sCD163/Gal-1

sCD163/Gal-1	Senzitivnost	Specifičnost	Senzitivnost +specifičnost
...
2,651	0,460	0,750	1,210
2,707	0,444	0,750	1,194
2,755	0,444	0,813	1,257
2,802	0,429	0,813	1,241
2,846	0,413	0,813	1,225
2,924	0,413	0,875	1,288
3,022	0,397	0,875	1,272
3,047	0,381	0,875	1,256
3,077	0,365	0,875	1,240
3,126	0,349	0,875	1,224
3,161	0,333	0,875	1,208
...

5.10. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na laboratorijske parametre

Pojedini, indirektni biomarkeri biološke aktivnosti predstavljaju sastavni deo IPS-7 skora, (broj limfocita, vrednost albumina, broj leukocita i drugi). Oni imaju prognostičku vrednost na početku lečenja u stratifikaciji rizika.

Tabela 17. Spearmanovi koeficijenti korelacije sCD163 i Gal-1 sa laboratorijskim parametrima kod bolesnika sa cHL

	SE	CRP	ALB	LDH	LY	LUCI	HGB
sCD163	0,13	0,03	0,01	0,17	-0,11	-0,17	*-0,28
Gal-1	0,09	**0,37	*-0,28	0,22	-0,08	0,19	-0,13

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$

Tabela 17 prikazuje vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na SE, CRP, ALB, LDH, LY, LUCI i HGB. Kod bolesnika sa cHL, su na osnovu vrednosti Spearmanovog koeficijenta utvrđene statistički značajne korelacije: negativne malog intenziteta između sCD163 i HGB, kao i Gal-1 sa ALB ($p < 0,05$) i pozitivna, srednjeg intenziteta između Gal-1 i CRP ($p < 0,01$).

5.11. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na patohistološku dijagnozu

Histološki subtip cHL utiče na sastav tumorskog okruženja, pa su istraživanjem utvrđene sledeće vrednosti pomenutih markera kod pojedinih patohistoloških subtipova cHL.

Tabela 18. Vrednost sCD163 kod bolesnika sa cHL u odnosu na patohistološku dijagnozu

Patohistološka dijagnoza	Vrednost sCD163 ng /ml
Nodularna skleroza (NS)	88,71 ± 44,52 (75,80)
Mešovita celularnost (MC)	127,50 ± 75,51 (103,60)
Limfocitna deplecija (LD)	90,75 ± 3,61 (90,75)
Hoćkinov limfom (cHL)	83,00 ± 23,54 (70,40)

Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me)

Tabela 19 prikazuje vrednosti serumskog Gal-1 u odnosu na patohistološku dijagnozu. Vrednosti Gal-1 kod bolesnika sa cHL sa patohistološkom dijagnozom MC statistički je značajno viša nego kod bolesnika sa neutvrđenom patohistološkom dijagnozom sa cHL ($p < 0,05$).

Tabela 19. Vrednost serumskog Gal-1 kod bolesnika u odnosu na patohistološku dijagnozu

Patohistološka dijagnoza	Vrednost Gal-1 ng /ml
Nodularna skleroza (NS)	30,03 ± 4,23 (28,90)
Mešovita celularnost (MC)	33,99 ± 10,63^{d*} (30,60)
Limfocitna deplecija (LD)	29,55 ± 2,19 (29,55)
Hoćkinov limfom (cHL)	27,82 ± 1,11 (27,90)

Vrednosti su date kao X ± SD (Me)

d- vs cHL, * - p<0,05 (Mann/Whitney test)

5.12. Vrednost sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički stadijum bolesti

Imajući u vidu da klinički stadijum bolesti određen Ann Arbor klasifikacijom, predstavlja prognostički faktor IPS-7 skora, bilo je važno odrediti vrednosti Gal-1 i sCD163 u odnosu na klinički stadijum bolesti.

Tabela 20 prikazuje vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 u odnosu na klinički stadijum bolesti. Najviše vrednosti odnosa sCD163, kao i Gal-1 imaju bolesnici IIIA kliničkog stadijuma. Kruskal-Wallis testom je utvrđena statistički značajna povezanost kliničkog stadijuma i vrednosti sCD163 (p<0,05), ali ne i sa vrednošću Gal-1. Poređenjem vrednosti parametara između kliničkih stadijuma ponaosob utvrđeno je da je sCD163 statistički značajno viših vrednosti u IIIA i IIIB nego u IIB kliničkom stadijumu, a vrednost Gal-1 u IIIA stadijumu statistički značajno viša nego u IIB stadijumu (p<0,05).

Tabela 20. Vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na klinički stadijum

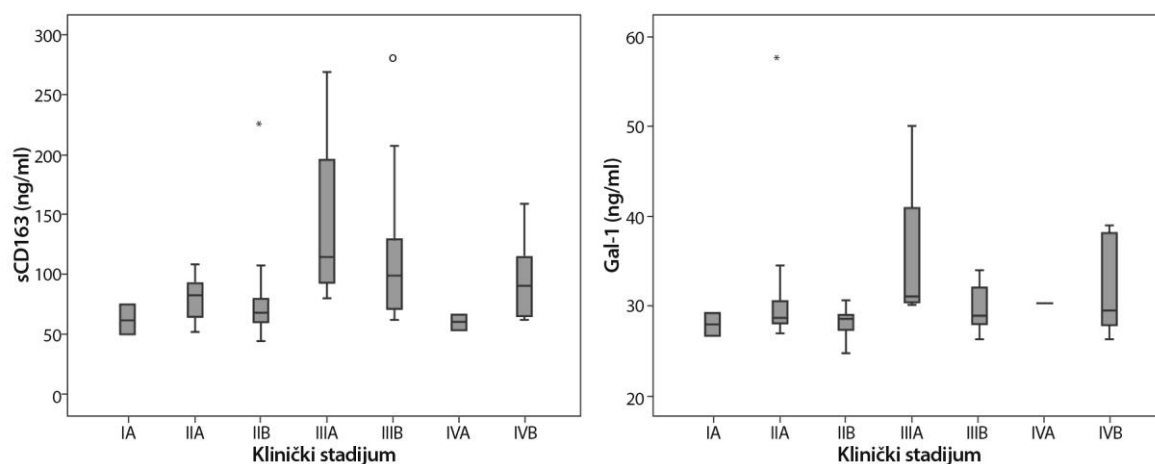
Klinički status	n	(%)	sCD163(ng/ml)	Gal-1(ng/ml)
IA	2	(3,17%)	62,15 ± 17,47 (62,15)	28,05 ± 1,91 (28,05)
IIA	16	(25,40%)	80,56 ± 17,97 (82,60)	30,91 ± 7,44 (28,70)
IIB	17	(26,98%)	79,98 ± 41,22 (67,80)	28,20 ± 1,60 (28,70)
IIIA	4	(6,35%)	144,33 ± 84,94^{c*} (114,45)	35,63 ± 9,61^{c*} (31,15)
IIIB	13	(20,63%)	114,13 ± 64,70 ^{c*} (98,90)	29,85 ± 2,54 (28,90)
IVA	2	(3,17%)	60,20 ± 8,20 (60,20)	30,40 ± 0,14 (30,40)
IVB	9	(14,29%)	97,97 ± 37,17 (90,00)	31,79 ± 5,24 (29,50)

Vrednosti su date kao X ± SD (Me)

* - p<0,05, c - vs IIB (Mann-Whitney U test)

Primenom kliničkih skorova poput Internacionalnog prognostičkog skora (IPS-7) ne može da se identifikuje grupa bolesnika visokog rizika koja neće odgovoriti na terapiju, pa su u istraživanju određene su vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički stadijum bolesti, kako bi se potencijalno koristili u stratifikaciji rizika bolesnika sa cHL.

Grafikon 10 prikazuje vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL.



Grafikon 10. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički stadijum bolesnika sa cHL

5.13. Prisustvo B simptoma kod bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom

Prisustvo opštih simptoma bolesti (povišena telesna temperatura, noćno znojenje ili gubitak telesne težine preko 10% u periodu od 6 meseci) takođe ne predstavlja sastavni deo pomenutog IPS-7 skora, a smatra se prognostičkim faktorom relapsa bolesti.

Prisustvo B simptoma kod bolesnika sa cHL prikazano je u Tabeli 21. Od ukupnog broja bolesnika, njih 39 (61,90%) imalo je B simptome. Bolesnici sa B simptomima imaju nešto više vrednosti sCD163, a nešto niže vrednosti Gal-1 nego bolesnici bez simptoma, ali ne i statistički značajno različite.

Tabela 21. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na prisustvo B simptoma

Bolesnici sa cHL	n	sCD163(ng/ml)	Gal-1(ng/ml)
Sa B simptomima	39 (61,90%)	95,51 ± 50,56 (75,80)	29,58 ± 3,31 (28,90)
Bez simptoma	24 (38,10%)	87,96 ± 43,40 (80,20)	31,42 ± 7,25 (29,25)

Vrednosti su date kao X ± SD (Me)

5.14. Drugi klinički stadijum bolesti sa zahvatanjem medijastinuma i vrednosti serumskog CD163 i Gal-1

Bolesnici drugog B kliničkog stadijuma (CSII B) Hočkinovog limfoma ne čine uniformnu grupu bolesnika. Presentacija ovog stadijuma bolesti može biti različita, a posebno se ističe istovremeno prisustvo zahvatanja medijastinuma (M) koje utiče na dalji tok bolesti i lečenja.

Tabela 22 prikazuje vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika drugog kliničkog stadijuma i zahvatanja medijastinuma. Od ukupnog broja bolesnika njih 15 (23,80%) imalo je klinički stadijum IIB i zahvatanje medijastinuma (M).

Tabela 22. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa kliničkim stadijumom IIB i zahvatanjem medijastinuma

Bolesnici sa cHL CSII B	
n=15 (23,81%)	
sCD163(ng/ml)	Gal-1(ng/ml)
79,83 ± 43,87 (67,00)	28,15 ± 1,68 (28,70)

Vrednosti su date kao X ± SD (Me)

Histološki podtip cHL, nodularna skleroza, je najčešće udružen sa zahvatanjem medijastinuma i prisustvom Bulky bolesti, pa je bilo važno odrediti vrednosti sCD163 i Gal-1 kod ove grupe bolesnika.

Tabela 23 prikazuje vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika u drugom B kliničkom stadijumu nodularne skleroze sa zahvatanjem medijastinuma. Od ukupnog broja bolesnika, njih 12 (19,05%), imalo je patohistološki nalaz nodularne skleroze i klinički status IIB i M (medijastinum).

Tabela 23. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL subtipa nodularne skleroze u CSII B i sa zahvatanjem medijastinuma

Bolesnici sa cHL	
n=12 (19,05%)	
sCD163(ng/ml)	Gal-1(ng/ml)
80,18 ± 48,80 (66,75)	28,17 ± 1,86 (28,75)

Vrednosti su date kao X ± SD (Me)

Svakako da je od posebnog značaja bilo utvrđivanje vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i zahvatanjem abdomena, koje takođe može biti od značaja za prognozu bolesti, kao i medijastinum.

Tabela 24. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i abdominalnom limfadenomegalijom

	sCD163(ng/ml)	Gal-1(ng/ml)
Studijska grupa sa zahvaćenim abdomenom (n=3; 4,76%)	153,30 ± 100,09 (99,20)	35,53 ± 12,54 (28,90)

Vrednosti su date kao X ± SD (Me)

U tabeli 24 prikazane su vrednosti sCD163 i Gal-1 bolesnika sa cHL i zahvatanjem abdominalnih limfnih žlezdi. Bila su tri bolesnika (4,76%) sa abdominalnom limfadenomegalijom, a rezultati pomenutih parametara ukazuju na više vrednosti sCD163 kod bolesnika sa zahvatanjem abdomena u odnosu na prethodne vrednosti sCD163 kod bolesnika sa zahvatanjem medijastinuma.

5.15. Vrednosti sCD163 i Gal-1 pre i posle primene prve terapijske linije u lečenju

Primena lečenja bolesnika sa cHL utiče na status imunosupresije, koji prezentuju sCD163 i Gal-1.

Tabela 25 prikazuje vrednosti Gal-1 i sCD163 kod 6 bolesnika pre i posle primenjene prve linije terapije. Kod 6 bolesnika kod kojih su sCD163 i Gal-1 mereni pre i posle primene lečenja dobijene su vrednosti prikazane u tabeli 24. Konstatovan je porast sCD163 koji je statistički značajan ($p < 0,01$), kao i pad Gal-1 koji nije statistički značajan.

Tabela 25. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL kod kojih su određivani pre i posle prve terapijske linije

Bolesnici sa cHL (n=6; 9,52%)	sCD163(ng/ml)	Gal-1(ng/ml)
Pre	65,92 ± 10,45 (63,15)	28,67 ± 0,83 (28,75)
Posle	91,53 ± 7,89 ** (89,00)	27,88 ± 2,52 (27,50)

Vrednosti su date kao X ± SD (Me); ** – $p < 0,01$, pre vs posle (Studentov t-test zavisnih uzoraka)

5.16. Primena radioterapije i vrednosti sCD163 i Gal-1

Istraživanjem su ispitivane vrednosti sCD163 i Gal-1 bolesnika kod kojih je primenjena radioterapija u lečenju kako bi se pomenuti markeri potencijalno koristili u praćenju bolesnika sa ovim vidom lečenja.

Tabela 26. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na primenu radioterapije

Bolesnici sa cHL	n (%)	sCD163(ng/ml)	Gal-1(ng/ml)
Sa radioTh	17 (26,98%)	95,67 ± 38,90 (91,90)	30,75 ± 7,61 (28,50)
Bez radioTh	46 (73,02%)	91,52 ± 50,96 (71,05)	30,10 ± 4,07 (29,00)

Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me)

Tabela 26 prikazuje vrednosti serumskog Gal-1 i CD163 kod bolesnika sa cHL kod kojih je primenjena radioterapija. Vrednosti sCD163 kao i Gal-1, više su kod bolesnika kod kojih je primenjena radioterapija nego kod onih kod kojih nije, ali ne i statistički značajno.

5.17. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u zavisnosti od primenjenog lečenja

Naše istraživanje je utvrđivalo mogućnost primene markera tumorskog okruženja sCD163 i Gal-1, markera malignih HRS ćelija u stratifikaciji bolesnika sa progresijom bolesti i refraktarnosti na primenjeno lečenje, imajući u vidu da primenjeno lečenje kako je ranije utvrđeno, utiče na vrednost pomenutih parametara. U tu svrhu su najpre određene vrednosti pomenutih parametara u zavisnosti od primene jedne ili više terapijskih linija u lečenju bolesnika sa cHL.

Tabela 27 prikazuje vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL gde je primenjena jedna ili više od dve terapijske linije. Jedna terapijska linija primenjena je kod 40 (63,49%) bolesnika sa cHL. Vrednosti sCD163 i Gal-1 su viših vrednosti kod bolesnika kod kojih je primenjeno dve ili više terapijskih linija, ali ne i statistički značajno u odnosu na bolesnike sa jednom terapijskom linijom.

Tabela 27. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na broj primenjenih terapijskih linija

Način lečenja	n (%)	sCD163 (ng/ml)	Gal-1 (ng/ml)
Prva linija lečenja (ABVD ili eBEACOPP kao prva linija)	40 (63,49%)	90,13 ± 52,92 (70,60)	29,24 ± 3,72 (28,80)
Dve i više terapijskih linija lečenja (DHAP, ESHAP, ICE, BRENTUXIMAB)	23 (36,51%)	96,99 ± 37,78 (91,90)	32,08 ± 6,81 (29,50)
Salvage Th, HDT i ASCT	15	107,65 ± 39,91 ^{**} (100,7)	33,73 ± 7,83 ^{**} (31,80)
Salvage Th	48	87,94 ± 49,37 (70,60)	29,20 ± 3,52 (28,75)

Vrednosti su date kao X ± SD (Me)

^{**} – p<0,01, vs salvage Th

HDT – visoko dozna hemioterapija; ASCT – autologa transplantacija matične ćelije hematopoeze

Posle inicijalne primene ABVD protokola u lečenju, relaps je konstatovan kod četvero (10,00%), progresija u toku lečenja kod pet (12,50%) a primarna refraktarna bolest kod sedam bolesnika (17,50%). Primarna refraktarnost na eBEACOPP je zabeležena samo u dva (5,00%) bolesnika.

Protokol DHAP je primenjen kao terapija druge linije kod 13 bolesnika pri čemu je najčešće nastavljan posle ABVD-a kod četiri bolesnika sa relapsom i dvoje sa progresijom u toku ABVD-a. Protokol ESHAP je u drugoj liniji lečenja primio jedan bolesnik. Najveći broj transplattiranih bolesnika bio je iz grupe primarno refraktornih bolesnika njih 9, troje bolesnika bilo je u relapsu bolesti, a samo jedan bolesnik sa progresijom bolesti.

5.18. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika koji su transplattirani

Internacionalni prognostički skor Hasenclevera i Diehla, nalazi primenu u stratifikaciji rizika pri inicijalnoj prezentaciji odmaklih stadijuma HL, ali nije pokazan njegov značaj u predikciji prognoze refraktornih i relapsirajućih bolesnika sa HL. Zato je važno odrediti nove biomarkere koji bi omogućili stratifikaciju bolesnika u grupu koja neće odgovoriti na konvencionalno lečenje i kod kojih treba primeniti ASCT u lečenju.

Tabela 28 prikazuje vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL. Od ukupnog broja bolesnika njih 15 (23,81%) je transplantirano. Vrednosti sCD163 kao i Gal-1 više su kod bolesnika kod kojih je primenjena transplantacija nego kod onih kod kojih nije, na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$.

Tabela 28. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na primenu transplantacije

Bolesnici sa cHL	n	sCD163(ng/ml)	Gal-1(ng/ml)
Sa transplantacijom	15 (23,81%)	107,65 ± 39,91 ^{**} (100,70)	33,73 ± 7,83 ^{**} (31,80)
Bez transplantacije	48 (76,19%)	87,94 ± 49,37 (70,60)	29,20 ± 3,52 (28,75)

Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me)

^{**} – $p < 0,01$, vs bez transplantacije (Mann-Whitney U test)

5.19. Vrednosti sCD163 i Gal-1u odnosu na klinički status bolesnika

Imajući u vidu da inflamatorni odgovor ima ključnu ulogu u raznim stadijumima razvoja i progresiji tumora i da je povezan sa sistemskom inflamacijom, naše istraživanje je dalje bilo usmereno na vrednosti sCD163 i Gal-1, kao markera imunosupresije u bolesnika sa cHL u odnosu na klinički status bolesnika. Cilj je bio utvrditi potencijalnu povezanost kliničkog statusa bolesti sa vrednošću sCD163, markera antiinflamatornih M2 makrofaga, okruženja tumora i Gal-1, markera HRS ćelija.

Analiza nivoa sCD163 i Gal-1 unutar grupe obolelih od cHL je pokazala da su vrednosti oba molekula bile više kod bolesnika u relapsu i podgrupi sa progresijom bolesti, u odnosu na podgrupe bolesnika koji su novodijagnostikovani ili kod kojih je započeto lečenje (Tabela 29).

Tabela 29. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na klinički status

Klinički status	sCD163(ng/ml)	Gal-1(ng/ml)
NovoDg bez Th	98,03 ± 64,25 70,20	28,95 ± 1,53 (28,80)
NovoDg sa Th	74,60 ± 42,58 65,80	28,25 ± 1,65 (28,60)
Remisija	83,62 ± 14,87 ^{b**} 80,10	30,62 ± 7,10 (28,80)
Relaps	124,50 ± 68,19 ^{b*} 98,50	29,73 ± 1,80 (29,70)
Progresija	125,24 ± 86,43 110,60	34,34 ± 9,04 ^{b*} (30,50)
Refraktarnost	94,27 ± 30,13 98,90	31,85 ± 4,91 ^{b*} (30,50)

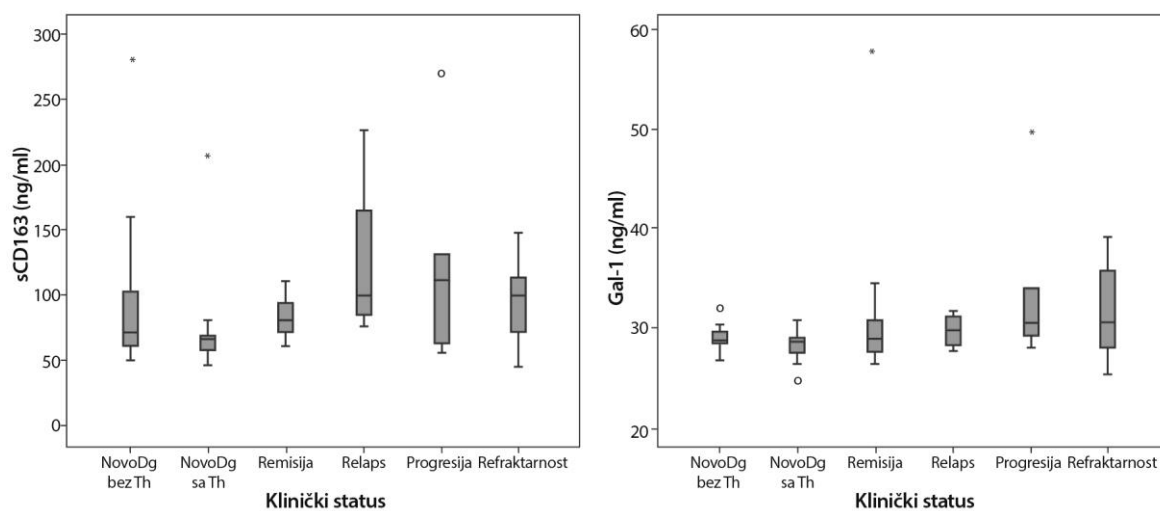
Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me)

b – vs NovoDg sa Th, * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ (Mann-Whitney U test, Studentov t test nezavisnih uzoraka)

NovoDg bez Th – novodijagnostikovani bolesnici sa cHL kod kojih nije započeto lečenje

NovoDg sa Th – novodijagnostikovani bolesnici kod kojih je započeto lečenje

Prosečne vrednosti sCD163 ($124,5 \pm 68,19$ ng/ml) su bile značajno više u podgrupi bolesnika sa relapsom cHL ($p < 0,05$) u odnosu na podgrupu bolesnika sa novodijagnostikovanim cHL i započetim lečenjem, Vrednost sCD163 je takođe bila viša u podgrupi bolesnika koji su u remisiji ($83,62 \pm 14,87$ ng/ml; $p < 0,01$) u odnosu na podgrupu novodijagnostikovanih bolesnika i započetim lečenjem (Grafikon 11).



Grafikon 11. Vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički status bolesnika sa cHL

NovoDg bez Th – novodijagnostikovani bolesnici sa cHL kod kojih nije započeto lečenje

NovoDg sa Th – novodijagnostikovani bolesnici kod kojih je započeto lečenje

Poređenjem vrednosti Gal-1 ponaosob u kliničkim statusima, najviše vrednosti Gal-1 imali su bolesnici sa progresijom ($34,34 \pm 9,04$ ng/ml), a potom oni sa refraktarnošću na primenjeno lečenje ($31,85 \pm 4,91$ ng/ml), dok su najniže vrednosti imali novodijagnostikovani bolesnici sa započetim lečenjem ($28,25 \pm 1,65$ ng/ml). Vrednosti Gal-1 u serumu subile statistički značajno više kod bolesnika sa progresijom i sa refraktarnošću na lečenje u odnosu na novodijagnostikovane sa započetim lečenjem ($p < 0,05$) (Grafikon 11).

Iako su u fazi progresije bolesti vrednosti sCD163 i Gal-1, značajno više u odnosu na podgrupe novodijagnostikovanih bolesnika kod kojih je započeto lečenje, Kruskal-Wallis test nije pokazao međuzavisnost njihovih nivoa sa kliničkim statusom cHL.

5.20. Vrednost odnosa sCD163 i Gal-1u odnosu na klinički status bolesnika

Kruskal-Wallis test nije pokazao povezanost kliničkog statusa cHL sa odnosom sCD163 / Gal-1. Međutim, pojedinačnim upoređivanjem odnosa sCD163 i Gal-1 u periodu lečenja ($2,62 \pm 1,37$) u odnosu na fazu relapsa ($4,23 \pm 2,41$) i remisije ($2,80 \pm 0,62$) nađene su statistički značajne razlike ($p < 0,05$).

Tabela 30 prikazuje vrednost odnosa sCD163 i Gal-1 u odnosu na klinički status bolesnika sa cHL.

Tabela 30. Vrednosti odnosa sCD163/Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na klinički status

Klinički status bolesnika sa cHL	sCD163 / Gal-1
NovoDg bez Th	$3,34 \pm 2,01$ (2,39)
NovoDg sa Th	$2,62 \pm 1,37$ (2,32)
Remisija	$2,80 \pm 0,62$ ^{b*} (2,63)
Relaps	$4,23 \pm 2,41$ ^{b*} (3,31)
Progresija	$3,44 \pm 1,56$ (3,25)
Refraktarnost	$2,97 \pm 0,89$ (3,04)

Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me)

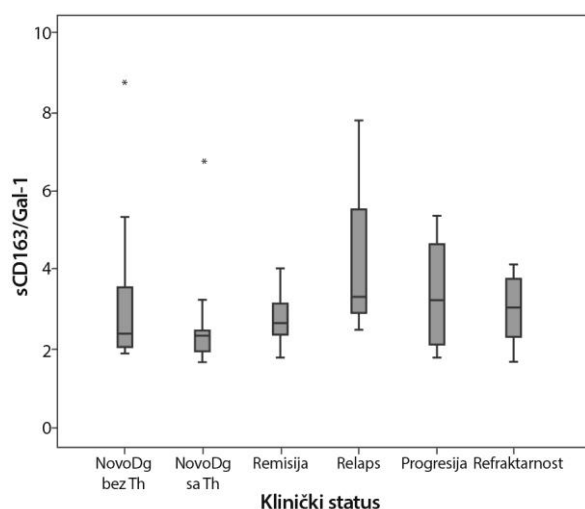
b – vs NovoDg sa Th, * – $p < 0,05$

NovoDg bez Th – novodijagnostikovani bolesnici sa cHL kod kojih nije započeto lečenje

NovoDg sa Th – novodijagnostikovani bolesnici kod kojih je započeto lečenje

Istraživanjem je registrovana najviša vrednost odnosa sCD163 / Gal-1 u relapsu bolesti a najniža kod bolesnika sa cHL kod kojih je započeto lečenje.

Grafikon 12 prikazuje odnos sCD163/Gal-1 u odnosu na klinički status bolesnika sa cHL.



Grafikon 12. Vrednosti sCD163/Gal-1 u odnosu na klinički status bolesnika sa cHL

5.21. Vrednost serumskog CD163 i Gal-1 u zavisnosti od IPS skora

Imajući u vidu da se bolesnici klasifikuju u grupe rizika u odnosu na Internacionalni prognostički skor (IPS), bilo je važno razmotriti primenu Gal-1 i sCD163 u stratifikaciji rizika bolesnika sa cHL.

Tabela 31 prikazuje vrednosti sCD163 i Gal-1 u odnosu na vrednost IPS-7 skora.

Vrednosti Gal-1 i sCD163 zavisno od IPS-7 skora kod bolesnika sa cHL, koji su novodijagnostikovani, novodijagnostikovanih i započetim lečenjem, relapsom, progresijom bolesti kao i refraktarnošću na lečenje, najviše su za vrednost IPS = 3. Vrednosti sCD163 za IPS=3 statistički je značajno veći od IPS=0, 1 i 4 ($p<0,05$), ali i od IPS = 2 ($p<0,01$). Vrednosti Gal-1 za IPS=3 statistički je značajno viši u odnosu na IPS=0 ($p<0,01$).

Tabela 31. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kliničkim statusima u odnosu na vrednost IPS skora

IPS skor	n	(%)	sCD163(ng/ml)	Gal-1 (ng/ml)
0	8	(17,78%)	67,25 25,90 (57,53 – 83,43)	28,05 2,18 (26,82–29,00)
1	5	(11,11%)	75,80 37,10 (62,70–99,80)	28,80 4,75 (26,75–31,50)
2	17	(37,78%)	66,50 51,00 (61,90–112,90)	28,70 2,45 (27,95–30,40)
3	7	(15,56%)	158,70 ^{abd*c**} 163,70 (105,10–268,80)	30,50 ^{a**} 2,70 (29,40–32,10)
4	7	(15,56%)	77,30 65,70 (45,50–111,20)	29,50 6,00 (27,30–33,30)
5	1	(2,22%)	61,50	28,90

Vrednosti su date kao Me, IQR (25. –75. percentil)

% su računati u odnosu na broj pacijenata sa IPS-7 skorom

IPS – InternationalniPrognostičkiSkor

* – $p<0,05$, ** – $p<0,001$, a – vs IPS = 0, b – vs IPS = 1, c – vs IPS=2, d – IPS=4

(Mann-Whitney test, Studentov t test nezavisnih uzoraka)

Tabela 32 prikazuje vrednosti sCD163 i Gal-1 bolesnika sa cHL, izuzev onih u remisiji, sa IPS-7 skorom do 3 i višim od 3. Vrednosti ispitivanih parametara nisu se statistički značajno razlikovale između bolesnika koji su imali IPS 3 i manje od onih koji su imali vrednosti 4 i 5, iako je evidentno da je vrednost sCD163 uočljivo viša kod ispitanika sa IPS do 3.

Tabela 32. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL u odnosu na vrednost IPS-7 skora

IPS-7	n	sCD163(ng/ml)		Gal-1(ng/ml)	
0–3	37	98,17 ± 56,48	(75,80)	30,08 ± 4,39	(28,80)
4–5	8	87,30 ± 53,28	(69,60)	30,40 ± 4,20	(29,35)

Vrednosti su date kao $X \pm SD$ (Me)

Ako IPS-7 posmatramo kao kontinualnu, a ne kao kategorijsku varijablu (kao u prethodne sve tabele) na osnovu Spermanovog koeficijenta korelacije utvrđeno je da vrednosti sCD163 i Gal-1 pozitivno korelišu sa IPS, ali statistički značajno, prosečnim intenzitetom korelišu samo IPS-7 i Gal-1 ($\rho = 0,35$, $p < 0,05$).

Tabela 33 prikazuje Spermanov koeficijent korelacije IPS-7 skora sa sCD163 i Gal -1.

Tabela 33. Spermanovi koeficijenti korelacije IPS-7 skora sa sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kliničkim statusima

	sCD163 (ng/ml)	Gal-1 (ng/ml)
IPS-7	0,20	0,35 *

* – $p < 0,05$

Tabela 34. Vrednosti sCD163 i Gal-1 kod bolesnika sa cHL i kliničkim statusom u odnosu na vrednost IPS-3 skora

IPS-3 skor	n	sCD163(ng/ml)		Gal-1(ng/ml)	
0	21	67,00	38,10 (57,30–95,40)	28,70	2,35 (27,50–29,85)
1	15	100,70	49,20 (66,00–115,20)	30,30	3,90 (27,90–31,80)
2	9	77,30	89,60 (63,35–152,95)	29,50	^{a*} 6,70 (29,05–35,75)

Vrednosti su date kao Me, IQR (25.–75. percentil)

* – $p < 0,05$ (Mann-Whitney test)

a – vs IPS = 0

Vrednosti Gal-1 i sCD163 zavise od IPS-3 skora su najniže u za vrednost IPS = 0. Vrednost Gal-1 raste sa porastom vrednosti IPS-3, dok je vrednost CD 163 ipak veća pri vrednosti IPS-3 skora 1 u odnosu na IPS-3 skor vrednost 2. Vrednost Gal-1 statistički je značajno viša pri vrednosti IPS-3 skora 2 u odnosu na vrednost IPS-3 = 0 ($p < 0,05$).

Tabela 35. Spermanovi koeficijenti korelacije IPS-3 sa sCD163 i Gal-1 kod bolesnika studijske grupe i kliničkim statusom

	sCD163 (ng/ml)	Gal-1 (ng/ml)
IPS-3	0,26	0,32*

* – $p < 0,05$

Primenom Spermanovog koeficijenta korelacije utvrđeno je da su korelacije IPS-3 sa navedenim parametrima pozitivne, ali je statistički značajna korelacija umerenog intenziteta samo sa Gal-1 ($p < 0,05$).

6. DISKUSIJA

Postoje brojni prognostički faktori koji su važni u stratifikaciji rizika i odluci o lečenju bolesnika sa cHL. Uprošćeno, oni se mogu se podeliti u dve velike grupe: faktore koji su povezani sa bolešću i one koji potiču od bolesnika. Imajući u vidu nove terapijske modalitete i mogućnost povoljnog ishoda bolesti, važnost pojedinih prognostičkih faktora se menja i nameće potrebu primene novih biomarkera. Tako se pored već poznate prognostičke uloge PET/CT, ističe i prognostički značaj tkivnih i cirkulišućih biomarkera, broja makrofaga povezanih sa tumorom (TAM), nivoa citokina i hemokina, kao i cirkulišućih nukleinskih kiselina (DNK i mikro RNK) [183].

Uprkos brojnim istraživanjima do sada nije ustanovljen cirkulišući biomarker cHL. Važnost biomarkera krvi, ogleda se u tome da pomažu u interpretaciji nalaza PET/CT, ali se mogu takođe uključiti u razmatranje terapijskog odgovora i detekciji ranog relapsa bolesti. Smatra se da idealni biomarker treba da bude specifičan, senzitivan, jednostavan za brzu dijagnostiku i interpretaciju, visokoponovljiv i komparabilan sa drugim laboratorijama.

Tkivni markeri koji se rutinski koriste, nisu adekvatni za praćenje terapijskog odgovora i detekciju ranog relapsa bolesti. Nasuprot tome biomarkeri krvi, imaju potencijal da prenesu informaciju o terapijskom odgovoru i ranoj detekciji relapsa bolesti. Poznato je da indirektni biomarkeri biološke aktivnosti kao što su sedimentacija eritrocita, broj limfocita, vrednost hemoglobina i albumina imaju prognostičku vrednost na početku lečenja. Ipak, posle uključanja terapije gubitak specifičnosti prekriva njihov klinički značaj [184].

U osnovi ovog istraživanja bio je značaj Gal-1 i sCD163 za identifikaciju bolesnika sa cHL u odnosu na reaktivna stanja, kao i njihov značaj za procenu faze bolesti u kojoj se oboleli nalaze. Postoje nedvosmisleni dokazi o povezanosti i Gal-1 i sCD163 sa procesima imunološke supresije u cHL.

Makrofazi tipa M2, se najčešće sreću u odmaklim fazama tumora što je asocirano sa progresijom maligne bolesti i koreliše sa primarnim i sekundarnim neuspehom terapije [185,186].

Zastupljenost M2 makrofaga koreliše sa nivoima sCD163, zbog čega se ovaj protein smatra njihovim pouzdanim markerom u serumu [184]. Antiinflamatorna funkcija M2 makrofaga se ogleda u sekreciji imunosupresivnih citokina, transformišućeg faktor rasta beta (TGF- β 1) i IL-10, koji dalje indukuju Th2 diferencijaciju favorizujući razvoj Treg limfocita i promovišući razvoj tumora putem inhibicije antitumorskog imunog odgovora [187].

Imunosupresivna funkcija Gal-1 se ogleda u inhibiciji sekrecije IL-2, IFN- γ i TNF α , uz indukciju stvaranja imunosupresivnog IL-10. Galektin -1 deluje selektivno na Th17 ćelije, utiče na polarizaciju Th1 odgovora u smeru Th2 reakcije, pokretanjem apoptoze Th1 ćelija [188]. Zbog toga se Gal-1 smatra pokazateljem imunosupresije uzrokovanoj dejstvom malignih HRS i parametrom odsustva Th1 antitumorskog imunog odgovora [188]).

Klinička istraživanja su pokazala da je povišena ekspresija Gal-1 udružena sa kraćim periodom do progresije u bolesnika sa cHL [189].

Senzitivnost i specifičnost sCD163 i Gal-1 da klasifikuje obolele od cHL u odnosu na zdrave ispitanike, našeg istraživanja proveravana je ROC analizom.

ROC kriva pokazala je relativno dobre karakteristike sCD163 u pogledu senzitivnosti i specifičnosti, što omogućava solidnu pouzdanost u zaključivanju. Kada se kao presek (cut off) izabere vrednost sCD163 od 78,45ng/ ml, senzitivnost metode iznosi 49,2% a specifičnost 87,5%. Naše istraživanje je pokazalo niže cut off vrednosti sCD163 kod bolesnika sa cHL u odnosu na istraživanje Jones i saradnika koje je pokazalo više vrednosti, cut off sCD163 500 ng/ ml sa 86% senzitivnosti i 81% specifičnosti pre lečenja ali novodijagnostikovanih bolesnika sa cHL [184].

Ista metoda korišćena je i za vrednosti serumskog Gal-1, a ROC kriva je pokazala sledeće klasifikacione karakteristike Gal-1. Kada se kao cut off izabere vrednost od 28,45 ng/ml senzitivnost metode tada iznosi 63,5% a specifičnost 93,8%. Našim istraživanjem je utvrđena niža cut off vrednost Gal -1 u serumu, u odnosu na rad Ouyang i saradnika koji je utvrdio cut off vrednost od 49,9 ng/ml koja može odvojiti bolesnike sa cHL od zdravih ispitanika sa 76.5% senzitivnosti i 100% specifičnosti, ali su pomenutim istraživanjem bili obuhvaćeni samo novodijagnostikovani bolesnici za razliku od našeg koje je obuhvatilo sve, uključujući bolesnike u relapsu, progresiji i refraktarnosti na lečenje [190].

Nasuprot tome, ROC kriva je pokazala slabu pouzdanost odnosa sCD163 /Gal-1 u zaključivanju, obzirom da specifičnost značajnije opada kada senzitivnost pređe 41,3%. Kada se kao cut off izabere vrednost 2,94 ng/ml senzitivnost metode je 41,3% a specifičnost 87,5%. Dosadašnja istraživanja se nisu bavila odnosom ovih parametara kod bolesnika sa cHL, pa se zato naši rezultati ne mogu uporediti sa drugim.

Galektin- 1 je u našem istraživanju bio u kontrolnoj grupi viših vrednosti kod žena i statistički značajno viših vrednosti kod starijih od 45 godina za razliku od vrednosti sCD163 koja je bila viša vrednosti kod ispitanika muškog pola i takođe kod starijih od 45 godina. Rezultat našeg istraživanja se razlikuje od literaturnih koji govore o višoj ekspresiji Gal-1

kod muškaraca, ali to nije slučaj kod svih maligniteta. Vrednosti sCD163 i Gal-1 našeg istraživanja korelišu sa starošću na šta ukazuju i literaturni podaci [190,191].

Imajući u vidu interakciju malignih HRS ćelija, koje su predstavljene Gal-1 i tumorskog okruženja koje je predstavljeno sCD163 proučavan je odnos sCD163 i Gal-1. Uočeno je, da je odnos sCD163/ Gal-1 viših vrednosti u bolesnika sa cHL nego u kontrolnoj grupi. Ovaj odnos je takođe bio viši kod muškaraca i kod starijih od 45 godina u kontrolnoj grupi a kod bolesnika sa cHL, konstatovana je pozitivna korelacija srednjeg intenziteta koja nije statistički značajna. Na žalost naši rezultati se ne mogu uporediti sa drugim istraživanjima jer odnos ovih markera nije proučavan, ali jeste istovremeni značaj primene dva biomarkera sCD163 i TARC-a kod bolesnika sa cHL pre lečenja, pa je tako dokazano da je istovremena primena dva biomarkera informativnija u odnosu na primenu jednog a konkretno je u istraživanju Jonesa i saradnika dokazano da sCD163 bolje reflektuje tumorsku masu tokom lečenja, obzirom da koreliše sa B simptomima, kliničkim stadijumom i limfopenijom, a da TARC jeste informativniji na kraju terapije [184].

6.1. Prognošički faktori bolesnika sa cHL

Našim istraživanjem obuhvaćeno je 63 bolesnika sa cHL, od toga 29 (46,03%) bolesnika ženskog pola i 34 (53,97%) muškog pola. Literaturni podaci ukazuju da je pojava cHL češća u muškaraca, kao i u našem istraživanju [3].

Uticaj pola, odnosno lošiji ishod bolesti kod muškog pola, nije karakteristika samo bolesnika sa cHL već i onih sa dijagnozom folikularnog limfoma kao i difuznog B krupnoćelijskog limfoma [183].

Prosečna starost bolesnika bila je 33 godina, o čemu govore i literaturni podaci, da se prvi pik bolesti javlja u trećoj dekadi [4]. Godine predstavljaju najznačajniji faktor opšteg preživljavanja (OS) kao i nezavisni faktor perioda bez ponovne pojave bolesti (DFS). Njihov uticaj na prognozu bolesti ogleda se na dva načina, uticajem na biološke osobine HL a na drugoj strani, kod starijih bolesnika je češća zastupljenost komorbiditeta i manja tolerancija hemioterapijskih protokola lečenja koji se primenjuju kod mlađih bolesnika [183].

6.2. Prognošički faktori tumora

Kliničke osobine HL svakako jesu važni prognošički faktori, ali često nedovoljne u stratifikaciji bolesnika, pa ih treba razmatrati zajedno sa drugim potencijalnim prognošičkim

faktorima. Kao prognostički najznačajnije pominju se sledeće kliničke osobine cHL: prisustvo inicijalne bezbolne limfadenomegalije, koja je obično cervikalna ili supraklavikularna, kao i medijastinalne mase koja postoji kod više od 50% bolesnika, koja može biti asimptomatska ili se ispoljava otežanim disanjem, kašljem ili obstrukcijom vene kave.

Nerazjašnjena temperatura viša od 38°C, noćno znojenje i gubitak telesne težine više od 10% za 6 meseci se opisuju kao B simptomi i imaju takođe prognostički značaj. Oni postoje kod 10–25% bolesnika sa ograničenom bolešću i kod 70% bolesnika sa odmaklom bolešću. Postojanje B simptoma predstavlja faktor rizika, posebno drugog kliničkog stadijuma bolesti, pa u GHSG skoru menja status ograničene bolesti.

Zahvatanje koštane srži se posebno ističe, imajući u vidu čestu nepodudarnost nalaza biopsije ilijačne kosti i nalaza PET/CT kao i negativan prognostički značaj [192]. Ono postoji kod 5–8% bolesnika sa cHL ali je u ranim stadijumima bolesti, zahvatanje prisutno umanje od 1%. U odmaklim stadijumima bolesti zahvatanje koštane srži ne menja način lečenja, ali utiče na restaging procedure koje se primenjuju na kraju lečenja [193].

U HL kao i u NHL, rana primena PET/CT jeste prognostička i ima potencijal da odredi optimalni vid lečenja [194].

Proširenost bolesti i tumorska masa predstavljaju, najznačajnije karakteristike bolesti koje se koriste u stratifikaciji bolesnika [183]. U ograničenoj bolesti bulky bolest, detektovana radiološki ili CT-om predstavlja negativan prediktor ishoda bolesti i jedan od faktora rizika EORTC/GELA, kao i GSHG skora, za razliku od proširene bolesti, gde prisustvo bulky bolesti ne predstavlja faktor rizika IPS skora.

Najčešći klinički stadijum našeg istraživanja bio je IIB prisutan kod 17 (26, 98%) bolesnika uz gotovo podjednaku zastupljenost IIA kliničkog stadijuma bolesti kod 16 (25,40%) bolesnika, a najmanja je bio zastupljen stadijum IVB kod 9 (14,29%) bolesnika.

Diseminovani stadijumi III /IV bolesti predstavljaju negativan prognostički faktor malignih limfoma. Primenom Ann Arbor klasifikacije opisuje se anatomska distribucija i diseminacija tumorskih ćelija, koje su prognostički značajne za DFS i OS, što su pokazale i mnoge studije.

Ekstranodalno prisustvo bolesti u HL takođe utiče na loš ishod bolesti. U ograničenoj bolesti ekstranodalno zahvatanje predstavlja faktor rizika GSHG skor sistema, a u proširenoj bolesti diseminovano prisustvo bolesti predstavlja IV klinički stadijum bolesti i nezavisni faktor rizika IPS skora [183].

Pojedine primarne lokalizacije HL su prognostički značajne poput, koštane srži, pleure i slezine. Tako na primer zahvatanje koštane srži ima loš prognostički značaj kod bolesnika sa odmaklom bolešću HL lečenih kombinovanom terapijom. Pleura je u bolesnika sa HL zahvaćena retko, kako primarno tako i kod relapsa bolesti i ima neznatan prognostički značaj. Zahvatanje slezine i druge ekстранodalne lokalizacije jesu sastavni deo Ann Arbor klasifikacije ali je takođe uticaj na prognozu bolesti neznatan [195].

Bolesnici drugog B kliničkog stadijuma (CSIIB) HL ne čine uniformnu grupu bolesnika, pa su oni posebno proučavani u istraživanju. Prezentacija ovog stadijuma varira počev od malih lezija, pojedinačnih B simptoma i normalnih laboratorijskih parametara do velike tumorske mase, ekстранodalne bolesti, ekstenzivnih B simptoma i multipnih laboratorijskih abnormalnosti. Pomenuti stadijum, ne karakteriše samo različita prezentacija već i prognoza ishoda bolesti.

Amini i saradnici su pokazali da bolesnici u drugom kliničkom stadijumu, CSIIB imaju najlošiju prognozu, izuzev stadijuma IVB [196]. Takođe je uočeno da i bolesnici u relapsu HL u CSIIB, sa bulky masom imaju najlošiji ishod bolesti [197].

Bulky bolest nije prognostički faktor Internacionalnog prognostičkog indeksa (IPS) skora, koji se primenjuje za odmakle stadijume bolesti.

Poznato je da je bulky bolest faktor rizika za bolesnike ranog stadijuma HL, posebno za one koje se leče samo radioterapijom. Manji značaj bulky tumorske mase u odmaklom stadijumu bolesti jeste povezan sa drugim prognostičkim faktorima ili je kompenzovan agresivnijim lečenjem, primenom radio nakon hemioterapije.

U istraživanju je bilo 12 (19,04%) bolesnika sa patohistološkom dijagnozom nodularne skleroze, u drugom B kliničkom stadijumu i sa zahvatanjem medijastinuma. Ova grupa bolesnika je posebno razmatrana, imajući u vidu da je kod bolesnika sa nodularnom sklerozom bulky bolest najčešće prisutna. Studija Glimeliusa i saradnika izučavala je bolesnike sa dijagnozom HL mlađe od 60 godina u drugom IIB kliničkom stadijumu i pokazala da jedino bulky bolest ima negativan prognostički značaj, a da ostali poput IPS, broja zahvaćenih limfnih nodusa, ekстранodalne proširenosti i broja leukocita $>15 \times 10^9/L$ takođe negativno utiču ali ne značajno [198].

Za bolesnike sa ograničenom bolešću prognostički faktori imaju malu važnost, a izlečenje se postiže u 95%, za razliku od odmaklih stadijuma HL koji su definisani kao CSIII ili CSIV, stadijum CS I ili CSII sa B simptomima ili bulky bolešću $> 10\text{cm}$ prognostički indeksi mogu pomoći u klasifikaciji bolesnika u grupe malog i visokog rizika i izboru terapije [199].

Vrednosti sCD163 i Gal-1 našeg istraživanja bile su najviše kod bolesnika trećeg kliničkog stadijuma (CS IIIA). Utvrđena je statistički značajna povezanost kliničkog stadijuma i vrednosti sCD163 ali ne i za vrednost Gal-1. Naš rezultat je delom u suprotnosti sa radom Ouyanga i saradnika koji su dokazali povezanost nivoa Gal-1 i Ann Arbor stadijuma, kao i povećanje vrednosti nivoa Gal-1 sa višim kliničkim stadijumom bolesti ali novodijagnostikovanih bolesnika kod kojih nije započeto lečenje, dok su našim istraživanjem bili uključeni svi bolesnici sa cHL [200].

Smolewski i saradnici su u svojoj studiji istakli prognostički značaj abdominalne limfadenomegalije u HL a Rueffer i saradnici su konstatovali da inicijalne kliničke karakteristike jesu prediktori okultnog abdominalnog zahvatanja u ranim stadijumima HL [201, 202, 203]. Prognostički faktori pozitivnog laparotomijskog nalaza jesu zahvatanje levih cervikalnih nodusa, odsustvo zahvatanja medijastinuma, Karnofski indeks i histopatološki nalaz mešovite celularnosti i limfocitne deplecije [202]. U našem istraživanju bila su tri bolesnika sa abdominalnom limfadenomegalijom kod kojih su konstатовane više vrednosti sCD163 (99,20 ng /ml) u odnosu na bolesnike sa zahvatanjem medijastinuma u CSIIB(67,00 ng /ml) ali se vrednosti Gal- 1 nisu značajno razlikovale.

6.3. Prognostički faktori interakcije tumora i bolesnika

Prisustvo B simptoma konstатовano je kod 39 (61,90%) bolesnika. Ovi bolesnici imali su nešto više vrednosti sCD163 a nešto niže vrednosti Gal-1 nego bolesnici bez simptoma.

Ranija istraživanja dokazala su da vrednosti sCD163 jesu povezane sa prisustvom B simptoma, kliničkim stadijumom bolesti i niskim brojem limfocita [197]. Već pomenuti Ouyang i saradnici utvrdili su da je nivo Gal-1 povezan sa prisustvom B simptoma novodijagnostikovanih bolesnika sa cHL [200]. Prethodno je opisan klinički značaj prisustva B simptoma koji su uključeni u Ann Arbor klasifikaciju i koji korelišu sa drugim parametrima koji su prognostički, kao što su klinički stadijum bolesti, sedimentacija eritrocita, vrednost serum albumina kao i hemoglobina [198]. Pojedini prognostički faktori, kao vrednost albumina, hemoglobina, prisustvo leukocitoze i limfocitopenije, opisuju efekte citokina koji su sekretovani od strane malignih i nemalignih reaktivnih ćelija. Inflamatorna reakcija bolesnika sa HL može biti predstavljena i drugim faktorima poput serum feritina, ceruloplazmina, serumskog bakra, nivoa $\beta 2$ mikroglobulina i timidin kinaze [198].

Anemija je prisutna kod oko 40% bolesnika pri dijagnozi HL. Ima karakteristike anemije inflamacije, a presek vrednosti hemoglobina koja je prognostička i nalazi se u IPS-7

skoru je 10.5 g/dl i nezavisna je od pola bolesnika. Dokazano je da povišen nivo IL-6 koreliše sa nivom hemoglobina, a takođe i sa nivom hepcidina, reaktanta akutne faze i glavnog regulatora metabolizma gvožđa. Zato se smatra da je anemija spona sa inflamatornom aktivnošću tumorskog okruženja HL i time se može objasniti njen prognostički značaj [131]. U istraživanju je zapažena negativna korelacija malog intenziteta između sCD163 i vrednosti hemoglobina čime se potvrđuje prethodno navedeno da je anemija prognostički značajna u bolesnika sa cHL. Hohaus i saradnici u svom radu ističu značaj sCD163 receptora hemoglobin-haptoglobin kompleksa uz već istaknut značaj markera makrofaga koji su uključeni u metabolizam gvožđa. Naime, M2 makrofazi utiču na oslobađanje gvožđa i promovišu rast tumora, za razliku od M1 makrofaga koji podstiču sekvestraciju gvožđa [204].

U pomenutom skoruu su takođe i leukocitoza, broj leukocita veći ili manji od 15000/microL, limfocitopenija <600/ microL, a od nedavno se pominje i broj monocita. Studije su ukazale da broj monocita veći od 900/ microL, utiče na opšte preživljavanje i periode bez progresije bolesti. Uticaj broja monocita na prognozu bolesnika sa HL je evidentan kada je odnos limfocita i monocita manji od 1,1 [182].

Brzina sedimentacije eritrocita (SE) je jedan od najstarijih prognostičkih faktora HL. Još uvek se koristi za definisanje ranih stadijuma HL u povoljni i nepovoljni rizik. Kao prognostička vrednost EORTC i GSHG skora koristi se vrednost SE od 30 mm/h za bolesnike sa B simptomima i 50 mm/h za bolesnike bez B simptoma. U istraživanju nije utvrđena korelacija vrednosti SE sa vrednošću sCD163 i Gal-1 ali jeste pozitivna i to srednjeg intenziteta između Gal-1 i CRP ($p < 0,01$). Naši rezultati takođe nisu pokazali korelaciju sCD163 i CRP za razliku od istraživanja Moller i saradnika [205].

Niske vrednosti serum albumina su često povezane sa lošom prognozom u mnogim hematološkim malignitetima uključujući HL. Pomenuti IPS-7 skor uključuje vrednost serum albumina od 40 g/L kao prognostičku. Istraživanjem je pokazana negativna korelacija, malog intenziteta Gal-1 sa vrednošću serum albumina ($p < 0,05$), što govori u prilog negativnog prognostičkog uticaja na ishod bolesti u cHL.

Limfociti se smatraju najodgovornijim za produkciju beta 2 mikroglobulina ($\beta 2M$), a inflamatorni citokini stimulišu stvaranje $\beta 2M$, koji predstavlja prognostički marker mnogih limfoma uključujući HL. Povišene vrednosti postoje kod oko 5–30% bolesnika pri dijagnozi zavisno od stadijuma bolesti i prisutne su pri pojavu relapsa.

Makrofazi povezani sa tumorom (TAM) i neplastične ćelije, stvaraju različite faktore uključujući IL-10, TGF β , TNF α , PGE2, IL-1, koji promovišu progresiju tumora, indukuju

regulatorne T ćelije, supresiju citotoksičnih T kao i NK ćelija, utiču na sazrevanje dendritičnih ćelija, kao i polarizaciju makrofaga. U perifernoj krvi bolesnika sa HL postoji povišen nivo velikog broja citokina, produkovanih kako od strane HRS ćelija tako i od tumorskog okruženja. Prognostički značaj citokina izučavan je tokom 20 i više godina, a najviše proučavani citokini su IL-10, IL-6, TNF α i njihovi solubilni receptori, a od nedavno i hemokin TARC. Pored već pomenutih treba istaći i značaj cirkulišućeg CD30 antigena (sCD30), kao tumor markera neoplastičnih ćelija.

U našem istraživanju nije utvrđeno da postoji korelacija vrednosti sCD163 i Gal- 1 sa brojem limfocita periferne krvi, a ranija istraživanja ukazala su na postojanje inverzne korelacije, to jest da sCD163 koreliše sa niskim brojem limfocita [122]. U istraživanju prethodno citiranog autora je takođe konstatovano da kod bolesnika sa cHL ne postoji korelacija sCD163 sa procentom cirkulišućih monocita, već da postoji veći procenat cirkulišućih CD163+CD14+ monocita, što ukazuje da nisu svi poreklom iz tumora. Isti autor konstatuje da smanjen broj cirkulišućih monocita u cHL poboljšava proliferaciju CD4+ i CD8+ T limfocita, ističući značaj imunosupresije T ćelija, uzrokovanoj monocitima u bolesnika sa cHL.

Pojedini autori poput Marri i saradnika ukazali su na prognostički značaj pojedinih citokina u lečenju cHL, pa tako vrednost serumskog IL-6 i receptora IL-2 pre lečenja može da ukaže na grupu bolesnika sa cHL koja pripada visokom riziku pojave relapsa bolesti [205].

Nedavne studije su pokazale da ranije pomenuti TARC reflektuje terapijski odgovor kako u ranom tako i u odmaklom stadijumu cHL i relapsu bolesti, da koreliše sa stadijumom bolesti, metaboličkim volumenom tumora, prezentovanim PET /CT kao i prisustvom B simptoma [206].

6.4. Prognostički značaj osobina HRS ćelija

Broj tumorskih ćelija kao i raširenost bolesti, može se odrediti različitim merljivim parametrima, pa tako bulky medijastinalna bolest opisuje broj tumorskih ćelija u medijastinumu, a povišen nivo serumske LDH može da reflektuje ukupan broj tumorskih ćelija HL kao i tumorsku masu NHL, pa ima prognostički značaj. Tokom poslednje decenije, studije su ukazale da solubilni CD30 koreliše sa stadijumom bolesti i tumorskom masom, a može korelisati i sa brojem HRS ćelija i na taj način biti prediktor ishoda bolesti [198].

Pojedine studije ukazale su na negativan prognostički značaj BCL 2 ekspresije HRS ćelija, ali kontraverze i dalje postoje. Slično se može reći za ekspresiju p53 i ishod bolesti HL [183].

Već pomenuta, visoka aktivnost serumske laktat dehidrogenaze, ne reflektuje samo ukupan broj tumorskih ćelija već koreliše i sa lošim odgovorom na prvu terapijsku liniju lečenja ali ne utiče na preživljavanje. Imunohistohemijski prognostički faktori poput već pomenutih, visoke ekspresije proliferativnog nuklearnog antigena Ki67, p53 i BCL2 takođe korelišu sa lošim odgovorom na lečenje, ali imaju uticaj i na kraće preživljavanje [201].

Važnost neoplastičnih ćelija istaknuta je i u klasifikaciji nodularne skleroze. Naime, British National Lymphoma Investigation (BNLI) grupa je gradirala podtip nodularne skleroze u gradus I i II, u zavisnosti od celularnosti nodula, kvantiteta skleroze, odnosa i atipije neoplastičnih ćelija, pa tako gradus II postoji u slučaju prisustva jedne od tri osobine i ima lošiju prognozu [206].

Pomenuti prognostički faktori takođe, nisu omogućili bolju stratifikaciju bolesnika u grupe rizika, pa se nametnula potreba primene drugih prognostičkih faktora, koji potiču od neoplastičnih HRS ćelija. U našem istraživanju je to bio Gal-1, koji predstavlja jedan od najvažnijih lektina i pripada proteinima ali i glikoptoteinima, koji prepoznaju i vezuju specifične ugljenohidratne epitope bez njihove modifikacije [160]. Većina animalnih lektina može se klasifikovati u 4 različite familije: C tip lektina, uključujući selektine, P tip lektina, pentraxini i galektine, prvobitno nazivane S- tip ili S- Lac lektini [207].

Animalni lektini imaju različitu tkivnu distribuciju i mogu biti lokalizivani unutar ćelije, na površini kao i u vanćelijskom prostoru. Dokazano je prisustvo Gal -1 u mnogim tkivima i organima sisara: placenti, plućima, mozgu, srcu, slezini, limfnim nodusima, prostati i drugim. Poznato je da se Gal-1 eksprimira na različitim tipovima ćelija, poput fibroblasta, epitelnim ćelijama timusa, endotelnim ćelijama, makrofazima, T i B ćelijama, stromalnim ćelijama koštane srži kao i drugim [160].

Ekspresija Gal-1 se menja u brojnim fiziološkim i patološkim stanjima, kao što su infekcija, malignitet kao i pojava metastaza.

Ono što Gal-1 čini jednim od najvažnijih lektina, jeste činjenica da učestvuje u razvoju tumora. Prvi put je opisan 1980. godine, a više proučavan devedesetih godina. Njegovo prvo učešće u genezi tumora povezano je sa ćelijskom adhezijom. Kasnije je dokazano da indukuje apoptozu aktivisanih T ćelija, kao i da se tumorske ćelije ekspresijom Gal-1 štite od imunog odgovora, a poslednje otkriće bilo je da Gal-1 učestvuje u angiogenezi kao angiogeni faktor [208].

Galektin- 1 je multifunkcionalni protein koji učestvuje u lektin glikan i protein protein interakcijama a može biti lokalizivan u jedru, citoplazmi, kao i na površini ćelije i /ili u van-

ćelijskom matriksu. Vanćelijske reakcije Gal-1 povezane su sa lektinskim vezivanjem dime-
ra, dok su za unutrašnje interakcije karakteristične ne-lektinske interakcije [160].

Galektin-1 učestvuje u T-ćelijskim reakcijama (apoptozi i ćelijskom ciklusu), imuno-
regulaciji i izbegavanju imunog nadzora u karcinomima, kao i u ne- T ćelijski posredovanim
reakcijama (ćelijskoj adheziji, B ćelijskom razvoju, mRNK, angiogenezi, nervno muskularnoj
diferencijaciji/homeostazi) [149]. Galektin-1 je u istraživanjima bio eksprimiran u sledećim
linijama HL L540, L1236, HDLM2, L428, 26 cHL, za razliku od nodularno limfocitno pre-
dominantnog kod koga nije utvrđena ekspresija Gal-1.

Visoka ekspresija Gal-1 bila je povezana sa muškim polom, starošću, smanjenim
brojem CD8+ T limfocita u infiltrisanom tkivu tumora i abnormalnim LMP-1 i 2 specifičnim
CD8+ T ćelijskim odgovorom [208].

Galektin-1 je selektivno eksprimiran u više od 90% primarnog cHL, dok difuzno
krupnoćelijski B limfom, primarno medijastinalni krupnoćelijski B limfom i nodularno limfo-
citno predominantni Hočkinov limfoma ne eksprimiraju galektin-1. Pored već pomenutog
cHL, Gal-1 se eksprimirau ALCL [208].

6.5. Prognostički značaj tumorskog okruženja

Nedavne studije ukazale su da postojeći histopatološki entiteti cHL, jesu biološki
različiti u pogledu genomskih alteracija, ekspresije gena, miljea citokina, kao i kliničkih oso-
bina. Epidemiologija, klinička prezentacija i prognoza ovih histopatoloških subtipova je razli-
čita.

Brojne studije ukazale su na postojanje i važnost kliničkih prognostičkih faktora, a
studija Smolewskog i saradnika ukazala je i na negativnu ulogu morfoloških prognostičkih
faktora kao što je histološki tip mešovite celularnosti/limfocitne deplecije [201].

Za razliku od literaturnih podataka koji govore o češćoj zastupljenosti nodularne skle-
roze kod mlađih žena, naše istraživanje je pokazalo da nema statistički značajnih razlika u za-
stupljenosti polova u okviru patohistoloških dijagnoza bolesnika sa cHL [4].

Klasični Hočkinov limfom inače čine 4 histološka subtipa. Najčešći je podtip nodular-
ne skleroze koji čini 80- 90% svih slučajeva, potompodtip mešovite celularnosti koja čini 10 -
15% svih slučajeva, limfocitima bogat klasični Hočkinov limfom 2–5% i najmanje zastupljen
podtip limfocitne deplecije koji je ekstremno redak [209]. Najzastupljenija patohistološka
dijagnoza bolesnika sa cHL našeg istraživanja bila je nodularna skleroza prisutna kod 49 (77,

78%) bolesnika, o čemu govore i literaturni podaci, ali u većem procentu za razliku od našeg istraživanja [202].

Frekvencija pojave podtipa mešovite celularnosti raste sa godinama, dok podtip nodularne skleroze postiže plato u grupi > 30 godina [4].

Podtip nodularne skleroze se posebno opisuje obzirom da ga karakterišu osobine različite u odnosu na ostale subtipove cHL. Najpre, bolest se javlja u mlađih odraslih osoba, češće kod žena, retko opisuje udruženost sa EBV infekcijom, karakterišu ga drugi faktori rizika poput visokog socioekonomskog statusa, odsustvo HIV infekcije, kao i posebne kliničke osobine, u 80% je udružen sa zahvatanjem medijastinuma, a u 50% je to bulky bolest. Zahvatanje ekstralimfatičnih organa ili koštane srži je retko. Prisustvo B simptoma se opisuje kod oko 40% svih bolesnika. U vreme dijagnoze više od 50% bolesnika ima drugi klinički stadijum bolesti [206].

Istraživanjem je dokazana statistički značajno veća starost bolesnika sa patohistološkom dijagnozom mešovite celularnosti u odnosu na bolesnike sa dijagnozom nodularne skleroze, o čemu govore i literaturni podaci kako je ranije navedeno.

Novije studije ističu važnost sastava tumorskog okruženja bolesnika sa cHL kako za prognozu bolesti tako i za lečenje, imajući u vidu da kod bolesnika koji ne odgovore na lečenje postoji prekomerna ekspresija gena TAM, monocita, ćelija angiogeneze, adipocita kao i HRS ćelija, a smanjena ekspresija gena B ćelija germinativnog centra.

Poznato je da veliki broj T ćelija sa citotoksičnim fenotipom i mali broj FOXP3 Treg ćelija tumorskog okruženja bolesnika sa cHL utiče na loš ishod bolesti. Nedavne studije ukazale su da broj tumor infiltrišućih makrofaga (TAM), utvrđenih tkivnim biomarkerom CD68 jeste prognostički značajan, kao i da se njegovim određivanjem može identifikovati grupa bolesnika visokog rizika za pojavu relapsa i progresije bolesti, ali i bolesnici ranog stadijuma koji imaju odličnu prognozu a koji su trenutno prekomerno lečeni postojećim protokolima [178]. Razlike u tumačenju uticaja TAM na preživljavanje bolesnika sa cHL proizilaze iz činjenice da TAM mogu imati intermedijarni fenotip sa proinflamatornim/antitumorskim funkcijama kao i antiinflamatorni/protumorski, čime se objašnjavaju pomenuta tumačenja.

Visok nivo TAM-a je često prisutan, a nedavne studije su ukazale na vezu između njihovog povišenog prisustva i pojave metastaza [210]. Infiltracija makrofazima inače počinje rano tokom preinvasivne faze bolesti i raste progresivno [211]. U progresiji HL makrofazi predstavljaju sve samo ne nevine posmatračke, jer ekspresija CD68 (markera M1 i M2 tipa makrofaga), jeste najbolji prediktivni biomarker za stratifikaciju rizika i preživljavanje ovog tipa

malignog limfoma [212]. Visok broj CD68 pozitivnih ćelija koreliše sa primarnim i sekundarnim neuspehom terapije.

Osim uticaja na neuspeh terapije, dokazana je i negativna uloga pomenutih CD68 makrofaga kao i mast ćelija u bolesnika sa HL na preživljavanje kao i sposobnost oba tipa ćelija da indukuju i održavaju navedeno proinflamatorno okruženje [128,129].

Za razliku od CD68 antitela, koje predstavlja marker oba tipa makrofaga, M1 i M2, solubilni protein (sCD163), jeste marker samo antiinflamatornih M2 makrofaga, koji stvaraju citokine kao što su transformišući faktor rasta beta (TGF- β 1) i IL-10, koji indukuju Th2 diferencijaciju favorizujući razvoj Treg i promovišući razvoj tumora putem inhibicije anti-tumorskog imunog odgovora [186].

Pored već pomenute uloge markera M2 makrofaga, poznato je da je sCD163 veoma koristan biomarker aktivacije makrofaga u različitim inflamatornim bolestima, kao što su sindrom aktivacije makrofaga, sepsa i bolest jetre. Pojedini radovi opisuju da koncentracija sCD163 može biti povišena i u drugim bolestima koje vode aktivaciji monocita i makrofaga poput hemofagocitnog sindroma, Gaucherove bolesti, kao i koronarne bolesti. Štaviše, sCD163 predstavlja opšti marker rizika komorbiditeta i mortaliteta u nekoliko hroničnih inflamatornih bolesti. Nedavno je dokazano da je sCD163 snažno povezan sa kasnijim razvojem dijabetesa tipa 2, zahvaljujući infiltraciji adipoznog tkiva i jetre makrofazima [205].

Solubilni CD163 koreliše sa tradicionalnim markerima inflamacije poput visokog senzitivnog C reaktivnog proteina (hsCRP). On predstavlja biomarker inflamacije i novi dijagnostički parametar rane pojave sepse [205,213].

U istraživanju je proučavana uloga sCD163 i Gal-1 kao potencijalnih biomarkera klasičnog Hočkinovog limfoma.

Svakako da se mnoge interakcije tumora i bolesnika, kao i odgovor na lečenje mogu objasniti genetskim osobinama cHL. Dobar ishod bolesti postoji u slučaju prekomerne ekspresije gena uključenih u indukciju apoptoze i signale ćelija uključujući citokine, dok loš ishod bolesti jeste posledica povećane regulacije gena uključenih u aktivaciju fibroblasta, angiogenezu, remodelovanje ekstracelularnog matriksa, ćelijsku proliferaciju i nishodnu regulaciju tumor supresor gena.

Genetska istraživanja su identifikovala lokus na hromozomu 6 HLA regiona kao značajnog faktora rizika za pojavu HL, ali su i drugi HLA regioni i geni citokina uključeni u rizik nastanka HL, poput IL-13. Svakako da je većina analiziranih gena bila uključena u metabolizam citotoksičnih lekova, kao i imunomodulaciju [183].

6.6. Prognostički skorovi u lečenju bolesnika sa cHL

Opisani klinički i laboratorijski parametri inkorporirani su u različite scoring sisteme. Bolesnici sa ograničenom bolešću jesu podeljeni u grupu povoljnog i nepovoljnog rizika na osnovu prisustva faktora rizika oba skor sistema EORTC i GSHG.

Bolesnici odmaklog stadijuma bolesti su klasifikovani u dve grupe rizika na osnovu Hasencleverovog skora, pa tako razlikujemo grupu rizika sa IPS 0-2 nasuprot grupi sa IPS 3-5 [183].

Iako primena IPS-7 skora ima i dalje prognostički značaj, stratifikacija rizika ovim skorom je mnogo uža u odnosu na raniju primenu ovog skora. Naime, ishod bolesti u bolesnika sa visokim IPS-7 skorom je znatno poboljšano, pa je petogodišnje preživljavanje za bolesnike sa 5 ili više faktora poboljšano od 42% na 62% ali je procenat bolesnika sa niskim IPS skorom IPS do 3; 81%, a sa visokim rizikom $IPS \geq 4$; svega 19% bolesnika identičan kao i u ranijim opisima. Nemogućnost IPS-7 prognostičkog indeksa da identifikuje grupu bolesnika sa lošim terapijskim ishodom i primenu agresivnijeg lečenja ograničava njegov klinički značaj [198].

Imajući u vidu interakciju malignih, HRS ćelija i tumorskog okruženja u našem istraživanju observirani su drugi solubilni markeri koji ističu značaj imunosupresije u cHL, kao što su pomenuti sCD163 i Gal-1 [4].

Vrednosti sCD163 i Gal-1 našeg istraživanja bile su najviše za bolesnike sa cHL i IPS-7 skorom 3. Istraživanje je takođe pokazalo da vrednosti sCD163 i Gal-1 korelišu sa IPS-7 skorom a statistički značajno vrednosti Gal-1 sa IPS-7. Najviše vrednosti sCD163 i Gal-1 u bolesnika sa IPS skorom 3 nameću pitanje, prognostičkog značaja pomenutog skora, imajući u vidu da bolesnici sa ovim skorom pripadaju grupi visokog rizika i da bi shodno tome kod ove grupe bolesnika bila razumna primena agresivnijeg oblika lečenja [199].

Primenom novijeg IPS-3 skora potvrđeno je da vrednosti sCD163 i Gal-1 korelišu sa IPS, ali statistički značajno takođe samo Gal-1. Novijim IPS-3 skorom je konstatovano postojanje tri grupe rizika u našem istraživanju, $IPS = 0$ do $IPS = 2$, a nije bilo bolesnika sa $IPS = 3$.

Primenom postojećih prognostičkih skorova u stratifikacija rizika bolesnika sa cHL, primenjeni su odgovarajući vidovi lečenja ograničene i odmakle faze bolesti. Svakako da se nameće pitanje koje su vrednosti parametara našeg istraživanja pratile pojedine modalitete lečenja.

U istraživanju je radioterapija primenjena kod 17 (26,9 %) bolesnika a vrednosti serumskog CD163 i Gal-1 bile su više u odnosu na one kod kojih ona nije primenjena u lečenju

cHL. Povišene vrednosti sCD163 i Gal-1 mogu se objasniti agresivnošću tumora u ovih bolesnika kako i navode Kuo i saradnici [214].

Radioterapija je primenjena kod jednog bolesnika u CSI, a u mnogo većem broju bolesnika u CSII, kod 12 (19,04%) bolesnika sa cHL, uz primenu hemioterapije (ABVD ili 2 eBEACOPP i 2 ABVD).

Ovi rezultati mogu se objasniti time da je Gal-1 visoko eksprimiran u tumorima koji su radiorezistentni uključujući karcinom prostate, gliom i melanom koji zahtevaju velike doze radijacije da bi postigli efekat. Nasuprot tome Gal-1 nije detektovan u nodularnom limfocitno predominantnom Hočkinovom limfomu, koji pripada radiosenzitivnim tumorima sa boljom prognozom. Prekliničke i kliničke studije ukazuju da ekspresija Gal-1 u mnogim ćelijama kancera može biti povećana hipoksijom koja vodi radiorezistenciji i agresivnosti tumora. Zna se da Gal-1 utiče na vaskulaturu tumora, popravku oštećenja DNK i antitumorsku aktivnost, koji su uključeni u radijacijom indukovano ćelijsku smrt i rast tumora [214].

Jedna terapijska linija primenjena u lečenju 40 (63,49%) bolesnika a dve i više kod kod 23 (36,5%) bolesnika sa cHL. Vrednosti sCD163 i Gal-1 bile su više u bolesnika gde je primenjeno dve i više terapijskih linija u lečenju. Protokol DHAP je primenjen kao terapija druge linije kod 13 bolesnika pri čemu je najčešće nastavljan posle ABVD-a u četiri bolesnika sa relapsom i dvoje sa progresijom u toku ABVD-a. Protokol ESHAP je u drugoj liniji lečenja primio jedan bolesnik. Dostupni literaturni podaci ne ukazuju na rezultate drugih istraživača za vrednosti sCD163 i Gal-1 za bolesnike sa cHL i primenu više terapijskih linija u lečenju.

Primenom dosadašnjih terapijskih protokola lečenja nismo u mogućnosti da postignemo izlečenje određenog procenta bolesnika sa cHL, pa se nameće i potreba primene novih terapijskih modaliteta u lečenju ove grupe bolesnika sa cHL.

Transplatacija je kao modalitet lečenja, primenjena kod 15 (23,81%) bolesnika a kod tih bolesnika su konstatovane više vrednosti sCD163 i Gal-1 na nivou statističke značajnosti u odnosu na one koji nisu transplatirani.

Nažalost nema literaturnih podataka sa kojima bi uporedili naš rezultat ali je istraživanje Petruskevicius i saradnika ukazalo da niske vrednosti Gal-1 jesu povezane sa povećanim rizikom hroničnog graft-versus-host- oboljenja (cGVHD) kod bolesnika sa hematološkim malignitetima lečenih ne-mijeloablativnom transplatacijom matične ćelije hematopoeze [215]. Najveći broj transplatiranih bolesnika bio je iz grupe primarno refraktornih bolesnika njih 9, troje bolesnika bilo je u relapsu bolesti, a samo jedan bolesnik sa progresijom bolesti.

Rezultati istraživanja ukazuju na potrebu praćenja efekta terapije, ranu derekciju refraktornosti na lečenje i pojavu relapsa kao i blagovremenu promenu modaliteta lečenja bolesnika sa cHL.

Primarno refraktorna bolest definisana je progresijom bilo kada tokom hemioterapije ili radio terapije, ili do tri meseca nakon završetka lečenja i/ ili perzistiranjem PET pozitivne residualne mase upotrebom kvantitativnog Deauville skora (DS), pa tako ukoliko je skor pozitivan DS 4 ili 5 posle 3–4 ciklusa terapije ABVD za supradijafragmalni HL i posle 4 ciklusa eBEACOPP ili ABVD za odmakli stadijum HL potvrđuje se primarno refraktorni HL, ukoliko koreliše sa uvećanim limfnim nodusima na CT snimku. Kod bolesnika sa metabolički aktivnom masom neodređenog značaja neophodna je biopsija da dokaže refraktarnost.

U našem istraživanju bilo je 4 (5,06%) bolesnika u relapsu, kod 5 (6,33%) je konstatovana progresija bolesti a refraktarnost na lečenje kod 11 (13,92%) bolesnika sa dijagnozom cHL.

Procenat pojave relapsa je manji u odnosu na literaturne podatke koji govore o višem procentu pojave relapsa u 20 % do 30% bolesnika sa cHL [156]. Pojava relapsa konstatovana je kod bolesnika ženskog pola, za razliku od pojave progresije bolesti i refraktornosti na lečenje koje su konstatovane kod bolesnika oba pola ali više kod bolesnika muškog pola. Nije uočena statistički značajna razlika između polova. Prosečna starost bolesnika u relapsu bolesti bila je 36,50 godina.

Internacionalni prognostički skor Hasenclevera i Diehla, pored već istaknute uloge u stratifikaciji rizika pri inicijalnoj prezentaciji odmaklih stadijuma HL i nemogućnosti da identifikuje bolesnike koji neće odgovoriti na terapiju, nema takođe značaj u predikciji prognoze refraktornih i relapsirajućih bolesnika sa HL.

Druge retrospektivne i prospektivne studijesu definisale prognostičke faktore relapsa i primarno refraktornog HL. Grupa eksperata preporučila je klasifikovanje bolesnike sa relapsom ili refraktornim HL u grupe rizika na osnovu tri prognostička faktora. Tako razlikujemo grupu visokog rizika koja uključuje bolesnike sa primarno refraktornom bolešću i bolesnike sa relapsom sa dva faktora rizika (rani relaps i klinički stadijum CSIII i CSIV), zatim grupu intermedijarnog rizika gde su bolesnici sa relapsom i jednim faktorom rizika (rani relaps ili CSIII/ CSIV) i poslednju grupu čine bolesnici standarnog rizika koja uključuje bolesnike sa relapsom bez faktora rizika [216].

Ranije pomenuta GHSG je svojim istraživanjem utvrdila da su vreme pojave relapsa, klinički stadijum bolesti i anemija u vreme relapsa relevantni faktori koji se mogu koristiti u prognostičkom skorbu bolesnika sa HL i relapsom.

Možemo reći da za sada ne postoji jedinstven prognostički sistem za relapsirajuće HL a kao najvažniji faktori pominju se kratko trajanje inicijalne remisije i odmakli klinički stadijum pri pojavi relapsa [26,30,217].

Istraživanjem su utvrđene statistički značajno više vrednosti Gal-1 kod bolesnika sa progresijom bolesti i rezistencijom na lečenje u odnosu na bolesnike koji su novodijagnostikovani i koji su započeli terapiju. Naš rezultat se može objasniti radom Plattel i saradnika koji su izučavali nivo Gal-1, TARC, serum CD30 i sCD163 novodijagnostikovanih bolesnika sa cHL i utvrdili da je njihov nivo pre primene terapije značajno povišen u odnosu na kontrolnu grupu. Pomenuti istraživači su takođe dokazali da nivo Gal-1 i sCD30 značajno opada, a nivo sCD163 značajno raste nakon primene terapije [218].

Nizak nivo Gal-1 u grupi bolesnika sa započetom hemioterapijom našeg istraživanja, je najverovatnije posledica smanjenja broja HRS ćelija pod uticajem terapije.

Vrednosti sCD163 su takođe bile najviše kod bolesnika sa progresijom bolesti, a najniže takođe kod bolesnika koji su novodijagnostikovani i kod kojih je započeto lečenje, a kod bolesnika sa relapsom bolesti su utvrđene statistički značajno više vrednosti sCD163 u odnosu na bolesnike koji su novodijagnostikovani i kod kojih je započeto lečenje.

Naši rezultati nasuprot istraživanju Jones i saradnika, ukazuju da veći broj bolesnika sa relapsom i refraktarnom bolesti ima povišene vrednosti sCD163 [184].

Navedeni rezultati potkrepljuju značaj imunosupresije na pogoršanje kliničkog toka bolesti u cHL, što se uočava kroz visok nivo sCD163 kod bolesnika koji su lečeni većim brojem hemioterapijskih linija i u podgrupi bolesnika koji su transplantirani.

Najniže vrednosti sCD163 među ispitivanim slučajevima zabeležene su u podgrupi novodijagnostikovanih bolesnika kod kojih je započeta hemioterapija. Moguće objašnjenje ovog nalaza leži u činjenici da hemioterapija istovremeno sa eliminacijom malignih ćelija, modifikuje populacije infiltrišućih ćelija u HL smanjući broj Treg limfocita i monocita tipa M2, čime smanjuje i tumorsku imunosupresiju [186].

Odnos sCD163 /Gal-1 bio je najviši u grupi bolesnika sa relapsom cHL a najniži kod bolesnika koji su novodijagnostikovani i kod kojih je započeto lečenje. Najviše vrednosti pomenutog odnosa sCD163 i Gal-1 imali su bolesnici sa patohistološkom dijagnozom mešovite celularnosti a najniže sa neutvrđenom patohistološkom dijagnozom cHL. Obzirom da dostupni literaturni podaci ne ukazuju na značaj odnosa sCD163/ Gal-1 kod bolesnika sa cHL u

pogledu kliničkog statusa bolesti, pa ga ne možemo porediti sa našim rezultatom, ali je pomenuti odnos značajan za interpretaciju stanja imunosupresije kod bolesnika sa cHL. Već je istaknuto da vrednosti sCD163 karakterišu prisustvo M2 makrofaga, koji utiču na prisustvo Treg limfocita i postojanje Th2 imunog odgovora. Istraživanje Kelley i saradnika je ukazalo na značaj tumorskog mikrokruženja predstavljenog odnosom FOXP3+ regulatornih T ćelija i Granzim B+ citotoksičnih T/NK ćelija (odnos FOXP3/GrB) i osobina HRS ćelija predstavljenih biološkim markerima (MAL i bcl-2). Bolesnici sa cHL sa malim brojem FOXP3 ali odnosom FOXP3/GrB višim od 1 imaju prognozu kao i bolesnici sa visokim brojem FOXP3 limfocita. Ovaj odnos označava efektivnu funkciju Treg ćelija u odnosu na aktivisane CTL, ali i tumorske ćelije.

Opisano istraživanje Kelley i saradnika ukazuje na loš FFS bolesnika sa cHL koji imaju FOXP3/GrB odnos niži od 1 i prisustvo MAL i bcl-2 markera, čime je istaknut značaj tumorskog okruženja u stratifikaciji bolesnika sa cHL u grupu niskog, intermedijarnog i visokog rizika. Primenom više biomarkera, naročito biomarkera tumorskog okruženja i malignih ćelija omogućavamo bolju stratifikaciju rizika bolesnika sa cHL i ističemo značaj imunosupresije kod ovih bolesnika [219].

6.7. Primena prognostičkih biomarkera u lečenju bolesnika sa cHL

Primena prognostičkih skorova ima različit značaj u stratifikaciji rizika bolesnika ranih i odmaklih stadijuma cHL.

Definicija ranog stadijuma HL varira u različitim studijskim grupama kao i u regionima sveta. Tako se na primer u Severnoj Americi definiše kao stadijum I ili II bez bulky bolesti i bez B simptoma. Nasuprot tome bolesnici sa bulky bolešću se grupišu u bolesnike sa odmaklom bolešću. Definicija ranog stadijuma GHLSG uključuje bulky bolest u stadijumu I ili II bez B simptoma. Pomenuta grupa klasifikuje bolesnike ranog stadijuma u grupu povoljnog rizika, stadijum I/II bolesti bez faktora rizika kao što su bulky masa, ubrzana sedimentacija eritrocita, ekstra nodalna bolest, više od dva zahvaćena regiona ili grupu nepovoljnog rizika stadijum I ili II sa bilo kojim od pomenutih faktora rizika. Bolesnici ranog stadijuma iz grupe povoljnog rizika imaju odličnu prognozu.

Preporuke GHLSG za rani povoljni stadijum uključuju primenu dva ciklusa ABVD protokola kao i primenu radioterapije 20Gy IF, a rezultati HD14 studije za bolesnike ranim nepovoljnim stadijumom uključuju primenu dva ciklusa eskaliranog BEACOPP sa dva ciklusa ABVD uz radioterapiju sa 30 Gy IF, čime se postiže petogodišnje preživljavanje bez

progresije bolesti (PFS)u 95,4% za razliku od 89,1% za one koji su lečeni standardnom terapijom sa 4 ABVD protokola praćenom istom dozom radioterapije. Za razliku od pomenute studije, preporuke Severne Amerike za bolesnike sa medijastinalnom masom I/II stadijuma podrazumevaju primenu šest do osam ciklusa ABVD sa 36 Gy IF terapije [203].

U našem istraživanju je bilo najmanje, svega 2 (3,17%) bolesnika u CSIA, sa prosečnim vrednostima sCD163 ($62,15 \pm 17,47$ ng/ml) i Gal -1 ($28,05 \pm 1,91$ ng/ml) koje su bile najniže u odnosu na vrednosti pomenutih parametara ostalih kliničkih stadijuma. Kod bolesnika drugog kliničkog stadijuma konstatovane su više vrednosti u CS IIA ($80,56 \pm 17,97$ ng/ml) i Gal-1 ($30,91 \pm 7,44$ ng/ml), za oba parametra u odnosu na CS IIB ($79,98 \pm 41,22$ ng/ml) i Gal-1 ($28,20 \pm 1,60$ ng/ml). Prisustvo viših vrednosti oba parametra za drugi klinički stadijum i odsustvo B simptoma našeg istraživanja se razlikuje od literaturnih podataka koji govore o višim vrednostima parametara za prisustvo B simptoma, ali se literaturni podaci odnose na novodijagnostikovane bolesnike sa cHL [203,198].

Pored već navedenih preporuka, na odluku o lečenju bolesnika sa ograničenom bolešću utiču i sledeća tri faktora: mogućnost potpune kontrole bolesti kod većine bolesnika, starosna dob bolesnika obzirom da je medijana starosti bolesnika u većini trajala je 35 do 38 godina i treće, lečenje ove grupe bolesnika, posebno primena radioterapije nosi rizik pojave sekundarnih maligniteta i kardiovaskularnih bolesti [220].

Rizik pojave neželjenih efekata radioterapije u ovoj grupi bolesnika, nameće pitanje da li je primena samo hemioterapije bolja terapijska opcija. Ovim pitanjem bavile su se mnoge studije a jedna od njih je i RAPID koja je istraživala značaj primene ^{18}F -FDG-PET u lečenju bolesnika sa ograničenom bolešću. Pomenuta studija, Nacionalnog onkološkog instituta Engleske (RAPID) pokazala je značaj FDG-PET u kliničkim stadijumima CSI i CSII bez bulky bolesti za dalje lečenje bolesnika. Studija HD10, GHSG, pokazala je, da je primena dva ciklusa ABVD i 20 Gy involved field zračne terapije kod bolesnika sa ranim povoljnim stadijumom, isto tako efikasna kao i četiri ABVD i 30 Gy zračne terapije, a da ima manje toksičnih efekata. Za grupu ranog stadijuma nepovoljnog rizika rezultati HD14 trajala preporučuju primenu intenziviranog protokola 2 + 2, dva ciklusa eskaliranog BEACOPP i dva ciklusa ABVD protokola, nasuprot ranijoj primeni četiri ciklusa ABVD protokola. Druge dve studije GHSG, HD16 i HD17 trajali su takođe bile osmišljene da redukuju lečenje, imajući u vidu neželjene efekte primene radioterapije [165].

Svakako, da treba istaći i rezultat NCIC CTG /ECOG HD6 trajala koja se takođe bavila lečenjem bolesnika CSI i CSII bez bulky bolesti samo hemioterapijom. Period bez pojave bolesti u periodu praćenja od 12 godina bio je lošiji 86% nasuprot 94%, ali je opšte

preživljavanje u ovoj grupi lečenih samo hemioterapijom bilo bolje 92% nasuprot 81%. Za razliku od prethodno pomenute studije, Hay i saradnici su pokazali da kod bolesnika sa CSI ili CSII bez bulky bolesti kombinovana terapija bolje kontroliše bolest u odnosu na primenu ABVD, posebno kod onih bolesnika koji nisu postigli kompletan odgovor posle dva ciklusa ABVD protokola [165].

Sumirajući rezultate trajala HD10, RAPID, GHSG HD16 i HD17 možemo bolje da razumemo ulogu radioterapije u različitim grupa bolesnika i potrebu da nalaz FDG – PET inkorporiramo u plan lečenja i odredimo optimalni broj ciklusa terapije. Rezultati HD10 i RAPID trajala sugerišu da primena PET tokom lečenja omogućava da najmanje 75% bolesnika može biti svrstano u povoljnu grupu kod koje bi primena radioterapije bila korisna u najviše 5% [221].

Imajući u vidu sve navedene studije o primeni različitog broja ciklusa, kao i potrebi primene radioterapije u lečenju bolesnika, možemo da konstatujemo da su postojeći faktori rizika izgubili specifičnost, što može dovesti do prekomernog lečenja bolesnika [222].

Postojeće nedoumice u lečenju bolesnika ranih stadijuma sa cHL, kao i neuspeh lečenja koji postoji kod oko 10% bolesnika mogu se prevazići uključivanjem statusa imunosupresije, imajući u vidu da su vrednosti Gal-1, markera HRS ćelija našeg istraživanja bile povišene u bolesnika kod kojih je primenjena radioterapija u lečenju, što ukazuje na radiorezistenciju cHL.

Lečenje odmaklih stadijuma cHL, karakteriše nemogućnost klasifikacije većeg broja bolesnika u grupu visokog rizika, imajući u vidu da u odmaklom stadijumu više od 10% bolesnika ne postigne kompletnu remisiju (CR), a 20% do 30% bolesnika sa odgovorom relapsira nakon lečenja. Primena prognostičkog skora koji uključuje status imunosupresije odmaklih stadijuma cHL, mogli bi definisati grupu bolesnika sa povišenim vrednostima sCD163 i Gal-1, koji bolje definišu bolesnike za primenu agresivnijeg načina lečenja, refraktarne bolesti i rane detekcije relapsa.

Visokodozna hemioterapija (HDT) praćena autologom transplatacijom koštane srži (ASCT) jeste definisana kao standard lečenja u bolesnika sa relapsom u dve velike randomizovane studije koje su pokazale uspeh u preživljavanju u poređenju sa primenom standardne hemioterapije. Nerandomizovane studije su takođe pokazale da je HDT razumna opcija, možda najprihvatljivija za bolesnike sa primarno refraktornim HL.

Pojava primarno refraktorne bolesti kao i relapsa, nameće potrebu razmatranja novih terapijskih modaliteta u lečenju, posebno u odnosu na biomarkere imunosupresije koji se uključuju u stratifikaciju rizika bolesnika sa cHL.

Napredak u razumevanju patologije, biologije i imunologije HL uticao je na identifikaciju nekoliko terapijskih targeta koji su u predmet prekliničkih kao i kliničkih istraživanja.

Nedavne studije su se fokusirale na razvoj agenasa za target terapiju HL putem receptora molekula koji su visoko eksprimirani na površini HRS ćelija, regulatornih intracelularnih proteina za signalne puteve koji regulišu preživljavanje i proliferaciju HRS ćelija i reaktivnih ćelija, kao i citokina tumorskog okruženja.

Najizučavanija target terapija HL uključuje CD30 receptor, koji je član familije receptora tumor nekrosis faktora (TNF) uključen u signalne puteve koji regulišu proliferaciju HRS ćelija. Osim CD30, pominju se i drugi receptori ove familije koji utiču na preživljavanje poput CD40, TACI, BCMA i RANK ali i receptori apoptoze Fas, TRAIL, PD1 i PD2. Pomenuti receptori preživljavanja imaju iste biološke funkcije uključujući indukciju i sekreciju citokina, aktivaciju signalnih puteva poput NF- κ B, ERK/ MAPK kao i PI3/ Akt /mTOR

Najpoznatiji predstavnik ove grupe lekova je Brentuximab vedotin (BV), koji je 2011. godine odobren od strane FDA za pacijente sa R/R HL posle neuspele ASCT, zatim za one koji nisu kandidati za ASCT ili kod onih gde nije postignut uspeh posle najmanje dve terapijske linije. Drugi agensi koji se pominju jesu oni koji su usmereni na CD40, protein smrti (TRAIL) i kostimulatorne molekule B7 familije kao što je CD80 i druge poput CD25, IL-13.

Za razliku od CD30 i CD20 receptora, CD40 receptor je široko eksprimiran, kako fiziološki na hematopoetskom ćelijama B ćelijama, monocitima, dendritičnim ćelijama i nehematopoetskim ćelijama, epitelne i endotelalne ćelije ali je ekspresija prisutna i na malignim ćelijama B ćelijskih limfoma, HRS ćelijama HL i karcinoma dojke. Imajući u vidu da HRS ćelije ne eksprimiraju CD40 ligand već da primaju signale CD40L od okružujućih reaktivnih ćelija uključujući B ćelije, T ćelije i eosinofile. Zato je target terapija CD40 mnogo kompleksnija u odnosu na CD30 i CD20. Nekoliko studija ukazalo je na sinergijski efekat anti CD40 antitela i različitih hemioterapijskih lekova.

Maligne, HRS ćelije aberantno eksprimiraju različite proteine preživljavanja poput NF- κ B, Jak/STAT, Akt/mTOR, Notch-1 kao i ERK koji mogu predstavljati target u lečenju Hočkinovog limfoma. Primenom selektivnih, malih molekula poput Jak2, mTOR i Bcl2 familije inhibitora ili opštih inhibitora koji modulišu nekoliko molekula poput HDAC, proteasome i protein toplotnog stresa HSP 90 inhibitore.

Postojeće strategije lečenja imaju za cilj da naruše okruženje tumora putem selektivnog dejstva na celularnu komponentu, T i NK ćelije i da indukuju antitumorski odgovor. CD20 je retko eksprimiran na HRS ćelijama ali se u okruženju nalaze B ćelije. Smatra se da B ćelije

okruženja sprovode signal preživljavanja na HRS ćelije uključujući ligande CD30 i CD40 i suprimiraju T ćelijski imuni odgovor putem produkcije IL-10. Iako CD20 target terapija selektivno smanjuje celularnu komponentu mikrookruženja, imunomodulatori kao što je lenalidomid imaju za cilj da aktivišu citotoksične T i NK ćelije da direktno deluju na HRS ćelije.

CD52 je drugi target koji je jako eksprimiran na reaktivnim B ćelijama okruženja, T ćelijama i monocitima ali ne na HRS ćelijama. Alemtuzumab je humano monoklonsko antitelo usmereno na CD25 koje rezultuje u lizi ćelija putem antitelima posredovane ćelijske citotoksičnosti (ADCC).

PD-1 je jako eksprimiran na limfocitima tumorskog okruženja, a HRS ćelije ekspimiraju PD-L1 ukazujući na interakciju PD-1/PDL-1 između HRS ćelija i limfocita u okruženju što doprinosi imunoj disfunkciji i toleranciji tumora u okruženju. Antitela na PD-1 i PD-L1 jesu u fazi istraživanja u sklopu kliničkih trajala.

Cilj imunoterapije je da pomoću monoklonskih antitela blokira aktivnost inhibitornih molekula antigena 4 povezanog sa aktivnošću citotoksičnih T limfocita (CTLA-4) i receptora programirane ćelijske smrti-1 (PD1) koji su izraženi na površini T ćelija. Poznato je da je primarna uloga CTLA-4 u sprečavanju aktivnosti T ćelija i klonalnom umnožavanju T ćelija, dakle u ranoj indukciji imune tolerancije a primarna uloga PD1 je ograničavanje aktivacije efektorskih T ćelija u perifernim tkivima dakle u kasnijem održavanju imune tolerancije.

Napredak u imunoterapiji karcinoma ogleđa se u primeni blokade imunološke kontrolne tačke posebno CTLA-4 kao i receptora programirane ćelijske smrti PD1 koja postaje paradigma u lečenju solidnih tumora. Klinički su ispitana dva monoklonska antitela ipilimumab i tremelimumab. Anti CTLA-4 inhibitor je prvi pokazao napredak u pogledu opšteg preživljavanja bolesnika sa odmaklim stadijumom malignim melanomom. Nedavno je ukazano da inhibitori PD1 takođe utiču na opšte preživljavanje i period bez progresije bolesti bolesnika sa metastaskim malignim melanomom kao i metastaskim skvamoznim i neskvamoznim nemi-kroceluranim karcinomom pluća ali i karcinomom bubrega. Terapijski odgovor u primeni inhibitora je bolji za PD1 u odnosu na primenu CTLA-4 inhibitora.

Obzirom da inhibitori kontrolne tačke deluju na podsticanje efektivnog antitumorskog imunog odgovora osobine postignutog odgovora na lečenje se razlikuju u odnosu na one koje postoje u primeni hemioterapije kao i target terapije. Primena oba inhibitora anti CTLA-4 i anti PD 1 i anti PDL1 ima sinergistički efekat i ogleđa se u ranom povećanju broja T limfocita, oporavku narušenog imunog odgovora aktivisanih T limfocita i redukciji imunosupresije uzrokovanoj Treg limfocitima. Do danas je odobrena primena tri imunološka inhibitora u le-

čenju malignog melanoma a dva u lečenju karcinoma pluća. Pomenuti inhibitori su u fazi istraživanja za mnoge druge indikacije [12].

Već je rečeno da cHL karakteriše mali broj malignih HRS ćelija i neefektivni inflamatorni i imuni ćelijski infiltrat. Postojanje prekomerne ekspresije PD1 liganda u HL ukazuje na mogućnost primene PD1 inhibitora u ovih bolesnika. Imajući u vidu da postoji koamplifikacija PDL1 i PDL2 na hromozomu 9p24.1 smatra se da target inhibicije u lečenju jeste receptor a ne selektivni ligand. Iz tog razloga je HL bio uključen u studiju sa nivolumabom ljudskim monoklonskim antitelom IgG4 usmerenog na PD1 receptor bolesnika sa relapsom ili refraktornom bolešću. Studija je pokazala da nivolumabom posredovana blokada PD1 jeste jako efikasan način lečenja bolesnika sa genetski baziranom prekomernom ekspresijom PD1 liganda i značajnim neefektivnim inflamatornim i imunim infiltratom. Istraživanja su pokazala da je primena nivolumaba ograničena na bolesnike sa progresijom bolesti posle autologe transplatacije koštane srži i kod onih sa kratkim odgovorom posle lečenja relapsa brentuksimab vedotinom [223].

Svakako da se postavlja pitanje da li su galektini i sCD163 mogući targeti terapije cHL. Poznato je da galektini imaju važnu ulogu u biološkim procesima poput ćelijske proliferacije, migracije i smrti. Galektin-1 ima i snažan proangiogeni efekat. On participira u rezistenciji ćelija na hemio i radioterapiju i uključen je u aktivaciju Ras onkogenog signalnog puta. Svakako da treba istaći njegovu ulogu u izbegavanju imunog nadzora. Target terapija Gal-1specifičnim antitelima ili malim selektivnim molekulima ne samo da može da naruši izbegavanje imunog nadzora, migraciju kancerskih ćelija kao i tumor neoangigenezu, već takođe narušava određen nivo senzitivnosti metastaskih tumora na hemio i radioterapiju. Oligodeoksinukleotidi (ODNs) mali interferirajući RNKs ili selektivni mali molekuli mogu da naruše protumorske intracelularne funkcije Gal-1, pa Zato Gal-1 predstavlja novi target u borbi protiv mnogih karcinoma [224].

Makrofazi su prisutni u okruženju svih tipova tumora i stvaraju različite faktore rasta, citokine i hemokine koji promovišu rast tumora, angiogenezu, invaziju i/ili metastaze, pa takođe predstavljaju potencijalne targete u lečenju cHL. Povišen broj CD68 pozitivnih ćelija značajno utiče na smanjeno PFS posle ABVD protokola nezavisno od drugih loših kliničkih i laboratorijskih parametara. To opravdava mnogobrojne studije za proučavanje multi target tirozin inhibitora fosforilacije stem cell factor receptora (KIT), kolono stimulišućeg faktora 1 receptora (CSF1R) i FMS slične tirozin kinaze 3 (FLT3) koji rezultuju u inhibiciji proliferacije tumorskih ćelija i nishodnoj modulaciji makrofaga, osteoklasta i mast ćelija. Na žalost, rezultati studija nisu ohrabrujući uprkos uspešnoj inhibiciji CSF1R i KIT [225].

Imajući u vidu, da se lečenjem utiče na vrednosti Gal-1 i sCD163, oni se mogu shvatiti kao novi targeti u lečenju cHL.

Činjenica da se na vrednosti Gal-1 i sCD163 može uticati lečenjem omogućava njihovu primenu u pravilnoj interpretaciji nalaza PET/CT pri proceni bolesti, a takođe može doprineti primeni radioterapije u ranim stadijumima HL, kao i u stratifikaciji rizika odmaklih stadijuma bolesnika sa cHL, pojavi relapsa bolesti i refraktarnosti na lečenje.

Istovremena primena Gal-1 i sCD163 ističe značaj, kako malignih HRS ćelija tako i tumorskog okruženja u odgovoru bolesnika na primenjeno lečenje i omogućava da i stanje imunopresije bude deo prognostičkih skorova cHL.

Istraživanje je pokazalo da se primenom Gal-1 i sCD163 kliničke i patološke osobine cHL mogu tumačiti kao odraz imunološkog odgovora bolesnika, pa se u skladu sa tim može planirati način lečenja. Postojanje statistički značajne korelacije IPS-3 skora sa Gal-1 potencijalno značaj malobrojnih malignih HRS ćelija, nasuprot okruženju tumora. Nepostojanje jedinstvenog genskog defekta HRS ćelija nameće potrebu primene kombinovanih modaliteta lečenja obzirom na složenost interakcija malignih HRS ćelija i tumorskog okruženja.

Iako je HL bio prvi u pogledu razumevanja kliničkih karakteristika, on još uvek predstavlja neizlečivu bolest za jedan određen procenat bolesnika. Urađeno istraživanje je pokazalo da noviji IPS-3 skor, koji sadrži manje varijabli u odnosu na IPS-7 skor, statistički značajno koreliše sa Gal-1 pa se nameće potreba daljih istraživanja kako bi i način lečenja ovih bolesnika bio efikasniji.

7. ZAKLJUČAK

- Istraživanjem je utvrđena veća senzibilnost i specifičnost metode za određivanje Gal-1 u odnosu na vrednost sCD163 u serumu obolelih od cHL. Primenom ROC analize, utvrđene su vrednosti sCD163 i Gal-1 koje diskriminišu obolele od cHL u odnosu na zdrave ispitanike. Vrednosti Gal-1 više od 28,45 ng/ml i nivoi sCD163 viši od 78.45 ng/ml klasifikuju obolele od cHL u odnosu na reaktivna stanja. Odnos sCD163 /Gal-1 nije pokazao pouzdanost u klasifikaciji bolesnika sa cHL.
- Istraživanjem je utvrđeno da postoji negativna korelacija vrednosti sCD163 i nivoa hemoglobina, a takođe i vrednosti Gal-1 i albumina, kao i pozitivna korelacija vrednosti Gal-1 i CRP.
- Najviše vrednosti odnosa sCD163/Gal-1 imali su bolesnici sa patohistološkim podtipom mešovite celularnosti cHL.
- Najviše vrednosti sCD163 i Gal-1 utvrđene su kod bolesnika trećeg kliničkog stadijuma (CS III A). Utvrđena je statistički značajna povezanost kliničkog stadijuma i vrednosti sCD163 ali ne i za vrednost Gal-1.
- Spermanovom koeficijentom korelacije utvrđeno je da sCD163 i Gal-1 pozitivno korelišu sa IPS-7, ali statistički značajno, prosečnim intenzitetom korelišu samo IPS-7 i Gal-1.
- Primenom novijeg IPS-3 skora, nije utvrđeno prisustvo bolesnika sa sva tri faktora rizika, a Spermanovim koeficijentom utvrđena je pozitivna korelacija IPS -3 sa Gal-1 i sCD163 ali statistički značajna korelacija umerenog intenziteta samo sa Gal-1.
- Najviše vrednosti Gal-1 i sCD163 utvrđene su kod bolesnika sa progresijom bolesti, a nalazi visokih vrednosti sCD163 i Gal-1 bili su odlika bolesnika sa relapsirajućom i/ili refraktarnom varijantom cHL koje su zahtevale dve ili više terapijskih linija i/ili transplantaciju matične ćelije hematopoeze, dok su serumske koncentracije ovih proteina bile najniže tokom hemioterapije u novodijagnostikovanih bolesnika.

- Istovremena primena sCD163 i Gal-1 kao biomarkera tumorskog okruženja i malignih ćelija cHL omogućava uključivanje statusa imunosupresije, koji reprezentuje kliničke i patohistološke osobine bolesnika sa cHL čime doprinosi identifikaciji pojave relapsa, progresije i refraktarnosti na lečenje.

8. LITERATURA

1. Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, Sabattini E, Zinzani PL, Piccaluga PP, et al. Hodgkin lymphoma the pathologist viewpoint. *J Clin Pathol* 2002; 55(3):161-76.
2. Fedele R, Martino M, Recchia GA, Irrera G, Gentile M, Morabito F. Clinical options in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: An update review. *J Immunol Res* 2015; 2015; 968212.
3. Harris NL. Hodgkin disease: classification and differential diagnosis. *Mod Pathol* 1999; 12(2): 159-75.
4. Thomas RK, Re D, Zander T, Wolf J, Diehl V. Epidemiology and etiology of Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* 2002; 13 (Suppl 4): 147-52.
5. Fraga M, Forteza J. Diagnosis of Hodgkin's disease an update on histopathological and immunophenotypical features. *Histol Histopathol* 2007; 22: 923-35.
6. Nogova L, Reineke T, Brillant C, Sieniawski M, Rudiger T, Josting A et al. Lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma A comprehensive analysis from the German Hodgkin study group. *J Clin Oncol* 2008; 26(3): 434-39.
7. Re D, Thomas RK, Behringer K, Diehl V. From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma biologic insights and therapeutic potential. *Blood* 2005; 105(12): 4553-60.
8. Thomas RK, Re D, Wolf J, Diehl V. Part 1: Hodgkin lymphoma- molecular biology of Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Lancet Oncol* 2004; 5(1): 11-8.
9. Sathiyam M, Muthuchelian K. Significance of immunological markers in the diagnosis of lymphoma. *Academic Journal of Cancer Research* 2009; 2(1): 40-50.
10. Kadin ME, Rathore B. Hodgkin's lymphoma therapy: Past, present and future. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11(17): 2891-906.
11. Alinari L, Blum KA. How I treat relapsed classical Hodgkin lymphoma after autologous stem cell transplant. *Blood* 2016; 127: 287-95.
12. Armand P. Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. *Blood* 2015; 125(22): 3393-400.
13. Advani R. Optimal therapy of advanced Hodgkin lymphoma. *ASH Education Book* 2011; 2011(1): 310-6.
14. Ansell MS. Hodgkin lymphoma 2016 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2016; 91(4): 434-42.

15. Gobbi PG, Ghirardelli ML, Solcia M, Di Giulio G, Merli F, Tavecchia L, et al. Image-aided estimate of tumor burden in Hodgkin's disease: evidence of its primary prognostic importance. *J Clin Oncol* 2001; 19(5): 1388-94.
16. Richardson E, Wagner T, Mcnamara M. The role of functional imaging in lymphoma: current controversies and future directions. *Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemias* 2014; 4: 21–9.
17. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25(5): 579-86.
18. Gallamini A, Kostakoglu L. Interim FDG-PET in Hodgkin lymphoma: a compass for a safe navigation in clinical trials? *Blood* 2012; 120: 4913-20.
19. Gallamini A. Positron emission tomography scanning: a new paradigm for the management of Hodgkin's lymphoma. *Haemathologica* 2010; 95(7): 1046-8.
20. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol* 2014; 32(27): 3059-67.
21. Hasenclever D. The disappearance of prognostic factors in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002; 13(Suppl 1): 75-8.
22. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin disease. International prognostic factors project on advanced Hodgkin disease. *N Engl J Med* 1998; 339(21): 1506-14.
23. Gobbi PG, Zinzani PL, Broglia C, Comelli M, Magagnoli M, Federico M, et al. Comparison of prognostic models in patients with advanced Hodgkin disease. Promising results from integration of the best three systems. *Cancer* 2001; 91(8): 1467-78.
24. Sanchez-Espiridon B, Montalban C, Lopez A, Menarguez J, Sabin P, Ruiz- Marcellan C, et al. A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2010; 116(8): e12-7.
25. Diefenbach CS, Li H, Hong F, Gordon LI, Fisher RI, Barlett NL, et al. Evaluation of the International Prognostic Score (IPS-7) and a Simpler Prognostic Score (IPS-3) for advanced Hodgkin lymphoma in the modern era. *Brit J Haemathol* 2015; 171(4): 530-8.
26. Colpo A, Hochberg E, Chen YB. Current status of autologous stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Oncologist* 2012; 17(1): 80-90.

27. Brice P. Managing relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141(1): 3-13.
28. Akhtar S, Weshi AEI, Abdelsalam M, Hussaini H, Janabi I, Rahal M, et al. Primary refractory Hodgkin lymphoma: outcome after high dose chemotherapy and autologous SCT and impact of various prognostic factors on overall and event free survival. A single institution result of 66 patients. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40(7): 651-8.
29. Van den Neste E, Casasnovas O, Andre M, Touati M, Senecal D, Edeline V, et al. Classical Hodgkin's lymphoma: the Lymphoma Study Association guidelines for relapsed and refractory adult patients eligible for transplant. *Haematologica* 2013; 98(8): 1185-95.
30. Brusamolino E, Carella AM. Treatment of refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma: facts and perspectives. *Haematologica* 2007; 92: 6-10.
31. Venkataraman G, Mirza MK, Eichenauer DA, Diehl V. Current status in of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. *Brit J Haematol* 2014; 165: 287-99.
32. Kuppers R, Rajewsky K. The origin of Hodgkin and Reed /Sternberg cells in Hodgkin disease. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 471-93.
33. Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fisher R, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangments and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(23): 10962-6.
34. Küppers R, Hansmann ML. The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(3): 511-7.
35. Yurchenko M, Sidorenko SP. Hodgkin's lymphoma: the role of cell surface receptors in regulation of tumor cell fate. *Exp Oncol* 2010; 32(4): 14-3.
36. Bai M, Papoudou-Bai A, Kitsoulis P, Horianopoulos N, Kamina S, Agnantis NJ, et al. Cell cycle and apoptosis deregulation in classical Hodgkin lymphomas. *In Vivo* 2005; 19(2): 439-53.
37. Flavell KJ, Murray PG. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. *Mol Pathol* 2000; 53(5): 262-9.
38. Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, Stein H. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 1989; 74(2): 810-6.
39. Küppers R, Schmitz R, Distler V, Renne C, Bräuninger A, Hansmann ML. Pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol Suppl* 2005; (66): 26-33.

40. Chaganti S, Bell AI, Pastor NB, Milner AE, Drayson M, Gordon J, et al. Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal centre B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood* 2005; 106(13): 4249-52.
41. Janz M, Mathas S. The pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma: what can we learn from analyses of genomic alterations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells? *Haematologica* 2008; 93(9): 1292-5.
42. Karin M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogen* 1999; 18(49): 6867-74.
43. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997; 100(12): 2961-9.
44. Bai M, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, Grepì C, Agnantis JN, Kanavaros P. Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin lymphomas. *Hum Pathol* 2007; 38(1): 103-13.
45. Liu Y, Sattarzadeh A, Diepstra A, Visser L, van der Berg A. The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: An actively shaped and essential tumor component. *Semin Cancer Biol* 2014; 24: 15-22.
46. Devergne O, Hatzivassiliou E, Izumi KM, Kaye RM, Kleininen MF, Kieff E, et al. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 1996; 16(12): 7098-108.
47. Graham B, Gibson SB. The two faces of NF kappa B in cell survival responses. *Cell Cycle* 2005; 4(10): 1342-5.
48. Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Leitz A, Jundt F, et al. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J* 2002; 21(15): 4104-13.
49. Jundt F, Anagnostopoulos I, Forster R, Mathas S, Stein H, Dörken B. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 2002; 99(9): 3398-403.
50. Pavlović D, Kocić G, Đorđević V. Ćelijska signalizacija u kontroli ćelijskog ciklusa, apoptoze i maligne transformacije. *Acta Fac Med Naiss* 2002; 19(1): 12-8.
51. Zheng B, Fiumara P, Li YV, Georgakis G, Snell V, Younes M, et al. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood* 2003; 102(3): 1019-27.

52. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(8): 1263–84.
53. Yamamoto R, Nishikori M, Tashima M, Sakai T, Ichinohe T, Takaori-Kondo A, et al. B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer Sci* 2009; 100(11): 2093-100.
54. Swerev TM, Wirth T, Usmorov A. Activation of oncogenic pathways in classical Hodgkin lymphoma by decitabine: A rationale for combination with small molecular weight inhibitors. *Int J Oncol* 2016; 50(2): 555-66.
55. Rodig SJ, Ouyang J, Juszczynski P, Currie T, Law K, Neuberg DS, et al. AP1-dependent galectin-1 expression delineates classical hodgkin and anaplastic large cell lymphomas from other lymphoid malignancies with shared molecular features. *Clin Cancer Res* 2008; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4709.
56. Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nature Rev Cancer* 2009; 9(1): 15-27.
57. Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 491-6.
58. Piris MA. The use of molecular profiling for diagnosis and research in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Rep* 2011; 3(3 Suppl): e2.
59. Hnatkova M, Mocikova H, Trneny M, Živny J. The biological environment of Hodgkin lymphoma and the role of the chemokine CCL17/TARC. *Prague Med Rep* 2009; 110(1): 35-41.
60. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014; 2014: 149185
61. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow. *Lancet* 2001; 357(9255): 539-45.
62. Rochet NM, Marković NS, Porrata LF. The role of complete blood cell count in prognosis watch this space. *Oncology Hematology Review* 2012; 8(1): 76-82.
63. Koh YW, Kang HJ, Park C, Yoon DH, Kim S, Suh C, et al. Prognostic significance of the ratio of absolute neutrophil count to absolute lymphocyte count in classic Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2012; 138(6): 846-54.
64. Cyriac S, Sagar TG, Rajendranath R, Rathnam K. Hypereosinophilia in Hodgkin lymphoma. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2008; 24(2): 67-8.

65. Pinto A, Aldinucci D, Gioghini A, Zagonel V, Degan M, Perin V, et al. The role of eosinophils in the pathobiology of Hodgkin disease. *Ann Oncol* 1997; 8(Suppl 2): 89-96.
66. Von Wasielewski R, Seth S, Franklin J, Fisher R, Hubner K, Hansmann ML, et al. Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease allowing for known prognostic factors. *Blood* 2000; 95(4): 1207-13.
67. Ohshima K, Sugihara M, Suzumiya J, Haraoka S, Kanda M, Schmazaki K, et al. Basic fibroblast growth factor and fibrosis in Hodgkin's disease. *Pathol Res Pract* 1999; 195(3): 149-55.
68. Khnykin D, Troen G, Berner JM, Delabie J. The expression of fibroblast growth factors and their receptors in Hodgkin lymphoma. *J Pathol* 2006; 208(3): 431-8.
69. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, Emmerich F, Muller G, Foss HD, et al. Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood* 1999; 94(6): 2065-71.
70. Gimelius I, Edasron A, Fisher M, Nilsson G, Sundstrom C, Molin D, et al. Angiogenesis and mast cells in Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2005; 19: 2360-2.
71. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor associated macrophages (TAM) as major players of the cancer related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009; 86(5): 1065-73.
72. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F100Prime Rep* 2014;6:13: doi: 10.12703/P6-13. eCollection 2014.
73. Mallmann MR, Schmidt SV, Schultze JL. Macrophages in human cancer: Current and future aspects. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 2012; 16(10): 765-74.
74. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; 122(3): 787-95.
75. Barros M, Segges P, Vera-Lozada G, Hassan R, Niedobitek G. M2 macrophages but not M1 macrophages are associated with worst outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Klin Padiatr* 2014; 226: P_09.
76. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro versus anti tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29(2): 309-16.
77. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1167-74.

78. Wilenbrock K, Roers A, Blohbaum B, Rajewsky K, Hansmann ML. CD8⁺ T cells in Hodgkin's disease tumor tissue are a polyclonal population with limited clonal expansion but little evidence of selection by antigen. *Am J Pathol* 2000; 157(1): 171-5.
79. Wein F, Kuppers R. The role of T cells in the microenvironment of Hodgkin lymphoma. *J Leukocit Biol* 2016; 99(1); 45-50.
80. Vojvodić S, Popović S. Natural killer cells—biology, functions and clinical relevance. *Med Pregl* 2010; 63(1-2): 91-7.
81. Reiners KS, Kessler J, Sauer M, Roche A, Hansen HP, Reusch U, et al. Rescue of impaired NK cell activity in Hodgkin lymphoma with bispecific antibodies in vitro and in patients open. *Mol Ther* 2013; 21(4): 895-903.
82. Xu C, De Vries R, Visser L, Diepstra A, Gadola SD, Poppema S, et al. Expression of CD1d and presence of invariant NKT cells in classical Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol* 2010; 85(7): 539-41.
83. Toro JR, Liewehr DJ, Pabby N, Sorbara L, Raffeld M, Steinberg SM, Jaffe ES. Gamma-delta T-cell phenotype is associated with significantly decreased survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101(9): 3407-12.
84. Yang ZH, Ansell SM. The role of Treg cells in the cancer immunological response. *Am J Immunol* 2009; 5(1): 17-28.
85. Song N, Li T, Xue-Min Zhang. Immune cells in tumor microenvironment. *Prog Biochem Biophys* 2014; 41(10): 1075-84.
86. Penna DAM, Silva PB, Silva JM, Sales MM, Chaves EM, Rezende Jr JC, et al. Impact of treatment on regulatory CD4⁺ T lymphocytes, Th17, and cytokines in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Blood* 2013; 122(12): 1756.
87. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192(7): 1027-34.
88. Rabinovich GA, Gabilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25(1): 267-96.
89. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997; 73: 309-16.
90. Nestle FO, Burg G, Fah J, Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Human sun light induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell costimulatory

- molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 1997; 150(2): 641–51.
91. Yang M, Ma C, Liu S, X Qu, Gao W, Song B, et al. HIF-dependent induction of adenosine receptor A2b skews human dendritic cells to a Th2-stimulating phenotype under hypoxia. *Immunol Cell Biol* 2010; 88(2): 165-71.
 92. Juszczynski P, Quyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J, et al. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(32): 13134-9.
 93. Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, Castelli C, Novellino L, Dalerba P, et al. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev* 2002; 188: 97-113.
 94. Wang Z, Cao Y, Albino AP, Zeff RA, Houghton A, Ferrone S. Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frame shift in beta 2-microglobulin messenger RNA. *J Clin Invest* 1993; 91: 684-92.
 95. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; 74: 181-273.
 96. Töpfer K, Kempe S, Müller N, Schmitz M, Bachmann M, Cartellieri M, et al. Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 918471.
 97. Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, Ochoa AC. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 1992; 258: 1795-8.
 98. Koneru M, Schaer D, Monu N, Ayala A, Frey AB. Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *J Immunol* 2005; 174(4): 1830-40.
 99. Baitsch L, Fuertes-Marraco SA, Legat A, Meyer C, Speiser DE. The three main stumbling blocks for anticancer T cells. *Trends Immunol* 2012; 33: 364-72.
 100. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 2013; 25: 214-21.
 101. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011; 12: 492-99.
 102. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439: 682-7.

103. Vardhana S, Younes A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica* 2016; 101(7): 794-802.
104. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 2003; 22: 4212-22.
105. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 2009; 11(8): 973-9.
106. Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat Rev Immunol* 2011; 11(4): 289-95.
107. Pawelec G, Solana R. Immunoageing - the cause or effect of morbidity. *Trends Immunol* 2001; 22: 348-9.
108. Fearon DT, Manders P, Wagner SD. Arrested differentiation, the self-renewing memory lymphocyte, and vaccination. *Science* 2001; 293: 248-50.
109. Hunter M, Wang Y, Eubank T, Baran C, Nana-Sinkam P, Marsh C. Survival of monocytes and macrophages and their role in health and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009; 14: 4079-102.
110. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 958-69.
111. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010; 32(9): 593-604.
112. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 2009; 16: 91-102.
113. Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* 2009; 206: 1327-37.
114. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C high monocytes. *Cancer Res* 2010; 70(14): 5728-39.
115. Sánchez-Espiridión B, Martín-Moreno AM, Montalbán C, Medeiros LJ, Vega F, Younes A, et al. Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2012; 97(7): 1080-4.

116. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 2017; 14(7): 399-416.
117. Vojvodic S, Popovic S. Klinički značaj imunoglobulinu sličnih receptora ćelija u transplataciji matičnih ćelija hematopoeze. *Med Pregl* 2010; 63(3-4): 215-9.
118. Bottino C, Moretta L, Moretta A. NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 298: 175-82.
119. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 2008; 27(45): 5932-43.
120. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional life style of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 557-68.
121. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 2000; 1: 515-20.
122. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 12-26.
123. Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes RJ. Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* 1993; 262: 905-7.
124. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. Pillars article: T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87(13): 5031-5.
125. Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1994; 1(9): 793-801.
126. Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 2002; 16: 23-35.
127. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011; 332(6029): 600-3.
128. De la Cruz- Morino L, Lejeune M, Fernandez EN, Carrasco FH, Lopez AG, Vacas AI, et al. Role of immune escape mechanisms in hodgkin lymphomas developments and progression a whole new world with therapeutic implications. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 756353.

129. Carbone A, Spina M, Gloghini A, Tirelli U. Classical Hodgkin lymphoma arising in different host conditions pathobiology parameters, therapeutic options and outcome. *Am J Hemathol* 2011; 86(2): 170-9.
130. Yamaguchi T, Sakaguchi S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(2): 115-23.
131. Tanchot C, Terme M, Pere H, Tran T, Benhamouda N, Strioga M, et al. Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. *Cancer Microenviron* 2013; 6(2) 147-57.
132. Banerjee A, Vasanthakumar A, Grigoriadis G. Modulating T regulatory cells in cancer: how close are we? *Immunol Cell Biol* 2013; 91: 340-9.
133. Rudra D, deRoos P, Chaudhry A, Niec RE, Arvey A, Samstein RM, et al. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat Immunol* 2012; 13: 1010-19.
134. Rudensky AY, Gavin M, Zheng Y. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. *Cell* 2006; 126(2): 253-6.
135. Hossain DM, Panda AK, Manna A, Mohanty S, Bhattacharjee P, Bhattacharyya S, et al. FoxP3 acts as a cotranscription factor with STAT3 in tumor-induced regulatory T cells. *Immunity* 2013; 39(6): 1057-69.
136. Bhattacharyya S, Md Sakib Hossain D, Mohanty S, Sankar Sen G, Chattopadhyay S, Banerjee S, et al. Curcumin reverses T cell-mediated adaptive immune dysfunctions in tumor-bearing hosts. *Cell Mol Immunol* 2010; 7: 306-15.
137. Alvaro T, Lejuene M, Salvado T, Piris MA. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4): 1467-73.
138. Li Y, Yuan S, Deng J. Harnessing B cells for cancer immunotherapy. *J Med Oncol Ther* 2016; 1(1): 8-13.
139. Tan TT, Coussens LM. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(2): 209-16.
140. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 99-146.
141. Thomas DA, Massagué J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cel* 2005; 8: 369-80.

142. España L, Fernández Y, Rubio N, Torregrosa A, Blanco J, Sierra A. Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 87(1): 33-44.
143. Jung YJ, Kim JY, Park JH. TGF-beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis by regulating surface Fas and cFLIPL expression in human leukaemia/lymphoma cells. *Int J Mol Med* 2004; 13: 99-104.
144. Yang M, Ma C, Liu S, X Qu, Gao W, Song B, et al. HIF-dependent induction of adenosine receptor A2b skews human dendritic cells to a Th2-stimulating phenotype under hypoxia. *Immunol Cell Biol* 2010; 88(2): 165-71.
145. O'Connell J, Houston A, Bennett MW, O'Sullivan GC, Shanahan F. Immuneprivilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nature Med* 2001; 7(3): 271-4.
146. Diehl V. Are macrophages the bad guys in Hodgkin lymphoma? *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7; 301-2.
147. Rabinovich GA, Toscano MA, Ilarregui JM, Rubinstein N. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: Novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj J* 2004; 19: 565-73.
148. St Pierre Y. Galectins in hematological malignancies. *Am J Blood Res* 2011; 1(2): 119-29.
149. Than NG, Romero R, Kim CJ, McGowen MR, Papp Z, Wildman DE. Galectins: guardians of eutherian pregnancy at the maternal fetal interface. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(1): 23-31.
150. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Quian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J* 2004; 19(7-9): 433-40.
151. Rabinovich GA, Rubinstein N, Toscano M. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572(2-3): 274-84.
152. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(1): 29-41.
153. Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572(2-3): 263-73.
154. Rabinovich GA, Gruppi A. Galectins as immunoregulators during infectious processes from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol* 2005; 27: 103-14.

155. Kadoya T, Horie H. Structural and functional studies of galectin-1: a novel axonal regeneration-promoting activity for oxidized galectin-1. *Curr Drug Targets* 2005; 6(4): 375-83.
156. Cho M, Cummings RD. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. *J Biol Chem* 1995; 270(10): 5207-12.
157. Camby I, Mercier ML, Lefrenc F, Kiss R. Galectin-1 a small protein with major functions. *Glycobiology* 2006; 16(11): 137-57.
158. Van Kooyk Y, Rabinovich GA. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2008; 9: 593-601.
159. Qutenreath RL, Jones AL. Influence of an endogenous lectin substrate on cultured dorsal root ganglion cells. *J Neurocytol* 1992; 21(11): 788-95.
160. Elola MT, Chiesa ME, Alberti FA, Mordoh J, Fink NE. Galectin-1 receptors in different cell types. *J Biomed Sci* 2005; 12(1): 13-29.
161. Seve AP, Felin M, Doyennette Moyene MA, Sahraoui T, Aubery M, Hubert J, et al. Evidence for a lactose mediated association between two nuclear carbohydrate binding proteins. *Glycobiology* 1993; 3(1): 23-30.
162. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99(12): 4283-97.
163. Chiang N, Schwab JM, Fredman G, Kasuga K, Gelman S, Serhan CN. Anesthetics impact the resolution of inflammation. *Plos One* 2008; 3(4): e1879.
164. Fichtner-Feigi S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 2006; 12(1): 99-106.
165. Norling LV, Perretti M, Cooper D. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. *J Endocrinol* 2009; 201(2): 169-84.
166. Vladoiu MC, Labrie M, Pierre YS. Intracellular galectins in cancer cells. Potential new targets for therapy. *Int J Oncol* 2014; 44(4): 1001-14.
167. Anginot A, Espeli M, Chasson L, Mancini SJ, Schiff C. Galectin-1 modulates plasma cell homeostasis and regulates the humoral immune response. *J Immunol* 2013; 190(11): 5526-33.
168. Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Aflibercept Traps galectin-1 an angiogenic factor associated with diabetic retinopathy. *Sci Rep* 2015; 5: 17946.

169. Gauthier L, Rossi B, Roux F, Termine E, Schiff C. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(20): 13014-9.
170. Rabinovich GA. Galectin-1 as a potential cancer target. *Br J Cancer* 2005; 92(7): 1188-92.
171. Kimball AS, Webb TJ. The Roles of Radiotherapy and Immunotherapy for the Treatment of Lymphoma. *Mol Cell Pharmacol* 2013; 5(1): 27-38.
172. Draube A, Behringer K, Diehl V. German Hodgkin lymphoma study group trials. Lessons from the past and current strategies. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006; 6(6): 458-68.
173. Klimm B, Engert A, Diehl V. First-line treatment of Hodgkin's lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep* 2005; 4(1): 15-22.
174. Bröckelmann PJ, Engert A. The GHSG approach to treating Hodgkin's lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep* 2015; 10(3): 256-65.
175. Engert A, Plutschow A, Eich HT, Lohri A, Dorken B, Borchmann P, et al. Reduced treatment intensity in patients with early stage Hodgkin lymphoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 640-52.
176. Sasse S, Diehl V, Engert A. Combined modality treatment for early stage Hodgkin's lymphoma. The GHSG experience. *Haematologica Reports* 2006; 2(7): 19-22.
177. Engert A. Treatment of advanced stage Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 2015; 33: 87-9.
178. Glimelius I, Molin D, Amini RM. Bulky disease is the most important prognostic factor in Hodgkin lymphoma stage IIB. *Eur J Haemathol* 2003; 71(5): 327-33.
179. Song MK, Chung JS, Lee JJ, Jeong SY, Lee SM, Hong JS, et al. Metabolic tumor volume by positron emission tomography/computed tomography as a clinical parameter to determine therapeutic modality for early stage Hodgkin's lymphoma. *Cancer Sci* 2013; 104(12): 1656-61.
180. Remer M, Johnson PW. Risk- and response-adapted strategies for the management of Hodgkin lymphoma. *Chin Clin Oncol* 2015; 4(1): 13.
181. Cuccaro A, Annunziata S, Cupelli E, Martini M, Calcagni ML, Rufini V, et al. CD68+ cell count, early evaluation with PET and plasma TARC levels predict response in Hodgkin lymphoma. *Cancer Med* 2016; 5(3): 398-406.

182. Eichenauer DA, Engert A, Andre M, Federico M, Illidge T, Hutchings M, et al. Hodgkin's lymphoma ESMO Clinical Practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25(Suppl 3): 70-5.
183. Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, Galli E, Giachelia M, Hohaus S. Prognostic factors in Hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6(1): e2014053
184. Jones K, Vari F, Keane C, Crooks P, Nourse JP, Seymour LA, et al. Serum CD163 and TARC as disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 2012; 19(3): 731-42.
185. Zhang B, Yao G, Zhang Y, Gao J, Yang B, Rao Z. M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66(11): 1879-86.
186. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23(11): 549-55.
187. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 13. doi: 10.12703/P6-13.
188. Romano A, Vetro C, Caocci G, Greco M, Parrinello NL, Raimondo FD, et al. Immunological deregulation in classic Hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6(1): e2014039.
189. Kamper P, Ludvigsen M, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Rabinovich GA, Moller MB, et al. Proteomic analysis identifies galectin-1 as a predictive biomarker for relapsed/refractory disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2011; 117(24): 6638-49.
190. Ouyang J, Plutschow A, Von Strandmann EP, Reiners KS, Ponader S, et al. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2013; 121(17): 3431-3.
191. Verschuere T, Van Woensel M, Fieuws S, Lefrenc F, Mathieu V, Kiss R et al. Altered galectin -1 serum levels in patients diagnosed with high grade glioma. *J Neurooncol* 2013; 115(1):9-17.
192. Cheson BD. New response criteria for lymphomas in clinical trials. *Ann Oncol* 2008; 19(Suppl 4): 35-8
193. Townsend W, Linch D. Hodgkin lymphoma in adults. *Lancet* 2012; 380(9844): 836-47.
194. Kasamon YI. Prognostication and risk. Adapted therapy of Hodgkin's lymphoma using positron emission tomography. *Adv Hematol* 2011; 2011: 271595

195. Zander T, Wiedenmann S, Wolf J. Prognostic factors in Hodgkin lymphoma *Ann Oncol* 2002; 13(Suppl 1): 67-74.
196. Amini RM, Enblad G, Gustavsson A, Ekman T, Erlanson M, Haapaniemi E, et al. Treatment outcome in patients younger than 60 years with advanced stages (IIB-IV) of Hodgkin's disease: the Swedish National Health Care Programme experience. *Eur J Haematol* 2000; 65(6): 379-89.
197. Amini RM, Glimelius B, Gustavsson A, Ekman T, Erlanson M, Haapaniemi E, et al. A population based study of the outcome for patients with first relapse of Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol* 2002; 68(4): 225-32.
198. Glimelius I, Molin D, Amini RM, Gustavsson A, Glimelius B, Enblad G. Bulky disease is the most important prognostic factor in Hodgkin lymphoma stage IIB. *Eur J Haematol* 2003; 71(5): 327-33.
199. Moccia AA, Donaldson J, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ, et al. International Prognostic score in advanced stage Hodgkin lymphoma altered utility in the modern era. *J Clin Oncol* 2012; 30(27): 3383-8.
200. Ouyang J, Plütschow A, Von Strandmann EP, Reiners KS, Ponader S, et al. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2013; 121(17): 3431-3.
201. Smolewski P, Robak T, Krykowski E, Blasinska-Morawiec M, Niewiadomska H, Pluzanska A, et al. Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single institution. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1150-60.
202. Rueffer U, Sieber M, Josting A, Breuer K, Grotenhermen FJ, Bredenfeld H, et al. Prognostic factors for subdiaphragmatic involvement in clinical stage I-II supradiaphragmatic Hodgkin's disease: a retrospective analysis of the GHSG. *Ann Oncol* 1999; 10(11): 1343-8.
203. Younes A. Early-stage Hodgkin lymphoma: in pursuit of perfection. *J Clin Oncol* 2012; 30(9): 895-6.
204. Hohaus S, Giachelia M, Cuccaro A, Voso MT, Leone G. Iron in Hodgkin's Lymphoma. *Critical Reviews™ in Oncogenesis* 2013; 18(5): 463-9.
205. Moller HJ, Frikke-Schmidt R, Moestrup SK, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clin Chem* 2011; 57(2): 291-7.

206. Marri PR, Hodge LS, Maurer MJ, Ziesmer SC, Siager SI, Habermann TM, et al. Prognostic significance of pretreatment serum cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Clin Canc Res* 2013; 19(24): 6812-9.
207. Plattel WJ, Van den Berg A, Visser L, Van der Graaf AM, Pruim J, Vos H, et al. Plasma thymus and activation- regulated chemokine as an early response marker in classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica* 2012; 97: 410-5.
208. Eberle CF, Mani H, Jaffe ES. Histopathology of Hodgkin lymphoma. *J Cancer* 2009; 15(2): 129-37.
209. Barondes SH, Douglas N, Cooper W, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269(33): 20807-10.
210. Demydenko D, Berest I. Expression of galectin-1 in malignant tumors. *Exp Oncol* 2009; 31(2): 74-9.
211. Raemaekers JMM, van der Maazen RWM. Hodgkin lymphoma news from an old disease. *Neth J Med* 2008; 66(11): 457-66.
212. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumor-associated macrophages in tumor progression implication for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; 196(3): 254-65.
213. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Chan WC, Fisher RI, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004; 351(21): 2159-69.
214. Kuo P, Le QT. Galectin-1 links tumor hypoxia and radiotherapy. *Glycobiology* 2014; 24(10): 921-5.
215. Petruskevicius I, Ludvigsen M, Hjortebjerg R, Sørensen BS, Kamper R, Vase M, et al. Clinical relevance of galectin-1 in hematologic malignancies treated with non-myeloablative hemopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51(10): 1387-90.
216. Moskowitz CH, Nimer SD, Zelenetz AD, Trippet T, Hedrick EE, Filippa DA, et al. A 2-step comprehensive high-dose chemoradiotherapy second-line program for relapsed and refractory Hodgkin disease: analysis by intent to treat and development of a prognostic model. *Blood* 2001; 97(3): 616-23.
217. Josting A, Franklin J, May M, Koch P, Beykirich MK, Heinz J, et al. New prognostic score based on treatment outcome of patients with relapsed Hodgkin's lymphoma registered in the database of the German Hodgkin's lymphoma study group. *J Clin Oncol* 2002; 20(1): 221-30.

218. Plattel WJ, Alsada ZN, van Imhoff GW, Diepstra A, van den Berg A, Visser L. Biomarkers for evaluation of treatment response in classical Hodgkin lymphoma: comparison of Galectin-1, sCD163 and sCD30 with TARC. *Br J Haematol* 2016; 175(5): 868-75.
219. Kelley TW, Brad Pohlman B, Elson P, Hsi ED. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *J Clin Pathol* 2007; 128(6): 958-65.
220. Meyer RM. Limited stage Hodgkin lymphoma managing uncertainty. *J Clin Oncol* 2014; 32(12): 1180-2.
221. Hay AE, Klimm B, Chen BE, Goergen H, Sheperd LE, Fuchs M, et al. An individual patient-data comparison of combined modality therapy and ABVD alone for patients with limited-stage Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* 2013; 24(12): 3065-9
222. Klimm B, Goergen H, Fuchs M, von Tresckow B, Böll B, Meissner J, et al. Impact of risk factors on outcomes in early-stage Hodgkin lymphoma: an analysis of international staging definitions. *Ann Oncol* 2013; 24(12): 3070-6.
223. Anseli SA, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 Blockade with Nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *N Engl J Med* 2015; 372(4): 311-9.
224. Camby I, Le Mercier M, Mathieu V, Kiss R. Galectin-1 as a potential therapeutic target for cancer progression. *Drugs Fut* 2008; 33(12): 1057-69.
225. Montanari F, Diefenbach CS. Hodgkin lymphoma targeting the tumor microenvironment as a therapeutic strategy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2015; 13(8): 518-24.

BIOGRAFIJA AUTORA

Olivera Simonović rođena je 12.07. 1971. godine u Nišu, gde je završila osnovnu školu „Vožd Karadorđe” kao đak generacije, a potom gimnaziju „Svetozar Marković“ takođe u Nišu.

Medicinski fakultet završila je 1998. godine, a na Klinici za hematologiju i kliničku imunologiju u Nišu radi od 2000. godine. Završila je specijalizaciju iz interne medicine na istom fakultetu i stekla zvanje specijaliste interne medicine. Magistarsku tezu „Promene u plućima i grudnom košu bolesnika sa malignim hemopatijama“ odbranila je 2010 godine na Medicinskom fakultetu u Nišu, a potom je na istom fakultetu upisala i zavrila subspecijalizaciju iz hematologije odbranom subspecijalističkog rada „Lečenje obolelih od folikularnog limfoma na osnovu pognostičkih faktora“, čime je stekla zvanje specijaliste hematologije.

Od 2012. godine učestvuje u radu flowcitometrije. Autor je i koautor mnogih radova prezentovanih na domaćim i međunarodnim kongresima.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ЗНАЧАЈ ГАЛЕКТИНА-1 КАО ПРОГНОСТИЧКОГ ФАКТОРА
У ЛЕЧЕЊУ КЛАСИЧНОГ ХОЧКИНОВОГ ЛИМФОМА

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 29 11 2017

Потпис аутора дисертације:

OLIVERA SIMONOVIC
(Оливера Б. Симоновић)

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

ЗНАЧАЈ ГАЛЕКТИНА-1 КАО ПРОГНОСТИЧКОГ ФАКТОРА
У ЛЕЧЕЊУ КЛАСИЧНОГ ХОЧКИНОВОГ ЛИМФОМА

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 29. 11. 2017

Потпис аутора дисертације:

OLIVERA SIMONOVIC
(Оливера Б. Симоновић)

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**ЗНАЧАЈ ГАЛЕКТИНА-1 КАО ПРОГНОСТИЧКОГ ФАКТОРА
У ЛЕЧЕЊУ КЛАСИЧНОГ ХОЧКИНОВОГ ЛИМФОМА**

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 29. 11. 2017

Потпис аутора дисертације:

OLIVERA SIMONOVIC
(Оливера Б. Симоновић)