

Regulacijski T limfociti u klasičnom Hodgkinovom limfomu

Pavlović, Antonia

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:637107>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Antonia Pavlović

**REGULACIJSKI T LIMFOCITI U KLASIČNOM HODGKINOVOM
LIMFOMU**

Doktorska disertacija

**Split
2024.**

Doktorska disertacija izrađena je na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split pod mentorstvom prof. dr. sc. Merice Glavina Durdov.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija Hodgkinovog limfoma	1
1.2. Klasifikacija Hodgkinovog limfoma	1
1.3. Morfologija i imunofenotip Hodgkinovog limfoma.....	4
1.4. Etiopatogeneza Hodgkinovog limfoma	7
1.5. Epstein-Barr virus	8
1.6. Epstein-Barr virus u Hodgkinovom limfomu i drugim zloćudnim tumorima.....	13
1.6.1 Hodgkinov limfom.....	13
1.6.2 S EBV-om povezani ne-Hodgkinovi limfomi i limfoproliferativni poremećaji.....	13
1.1.6.3 S EBV-om povezani ostali tumori	16
1.7. Klinička slika klasičnog Hodgkinovog limfoma	17
1.8. Terapija i prognoza Hodgkinovog limfoma	19
1.9. Regulacijski T limfociti	20
1.10. Regulacijski T limfociti u solidnim tumorima i Hodgkinovom limfomu	24
2. CILJEVI I HIPOTEZA	26
2.1. Ciljevi istraživanja	26
2.2. Hipoteza.....	26
3. MATERIJALI I METODE	27
3.1. Ispitanici	27
3.2. Metode	27
3.2.1. Histološka analiza	27
3.2.2. Imunohistokemijska analiza.....	27
3.2.3. Statistički postupci	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika	30
4.2. Kliničko patološki pokazatelji prema EBV statusu klasičnog Hodgkinovog limfoma .	31
4.3. Kliničko-patološki pokazatelji prema EBV statusu najčešćih podtipova klasičnog Hodgkinovog limfoma.....	33
4.4. Kliničko patološki pokazatelji u odnosu na relaps klasičnog Hodgkinovog limfoma ..	34
4.5. Kliničko patološki pokazatelji i B simptomi u klasičnom Hodgkinovom limfomu.....	36

4.6. Kliničko patološki pokazatelji prema vremenu bez progresije bolesti u klasičnom Hodgkinovom limfomu	38
4.7. Korelacija podtipova klasičnog Hodgkinovog limfoma s životnom dobi i brojem T stanica različitog fenotipa u mikrookolišu.....	42
5. RASPRAVA.....	44
6. ZAKLJUČCI.....	48
7. SAŽETAK.....	49
8. SUMMARY	50
9. POPIS LITERATURE	51
10. ŽIVOTOPIS	60

POPIS OZNAKA I KRATICA

HL – Hodgkinov limfom

kHL – klasični Hodgkinov limfom

NLPHL – nodularna limfocitna predominacija Hodgkinova limfoma

NS – nodularna skleroza

MC – miješana celularnost

LR – limfocitima bogat podtip (eng. *lymphocyte-rich*)

LD – limfocitna deplecija

LH stanica – limfocit histiocit stanica

HRS – Hodgkin/Reed-Sternbergova stanica

HLA – ljudski antigen leukocita (eng. *human leucocyte antigen*)

CD – eng. *Cluster of Differentiation*

Bcl-6 – protein 6 B staničnog limfoma (eng. *B cell lymphoma protein 6*)

EMA – epitelni membranski antigen (eng. *epithelial membrane antigen*)

ECOG = engl. Eastern Cooperative Oncology Group

Oct-2 – eng. *Octamer transcription factor 2*

BOB1 – eng. *B-lymphocyte-specific co-activator 1*

HIV – virus humane imunodeficijencije (eng. *human immunodeficiency virus*)

EBV – Epstein-Barr virus

PAX5 – eng. *Paired box protein 5*

NFkB – jezgrin faktor kapa B (eng. *nuclear factor kappa B*)

AP1 – aktivirajući protein 1 (eng. *activator protein 1*)

Notch 1 - eng. *Notch homolog 1, translocation-associated*

STAT5A, STAT5B - eng. *Signal Transducer and Activator of Transcription 5A and 5B*

c-FLIP eng. *cellular FLICE-inhibitory protein*

XIAP – X vezani inhibitor apoptoze (eng. *X-linked inhibitor of apoptosis*)

ORF - otvoreni okviri čitanja (eng. *open reading frames*)

IM – infektivna mononukleoza

EBNA - Epstein-Barr virus jezgrin antigen (eng. *Epstein-Barr Nuclear Antigen*)

LMP – latentni membranski protein (eng. *Latent Membrane Protein*)

EBER – eng. *Epstein-Barr virus-encoded small RNA*

CT – kompjuterizirana tomografija (eng. *computerized tomography*)

PET/CT – pozitronska emisijska tomografija/ kompjuterizirana tomografija (eng. *positron emission tomography/ computerized tomography*)

ABVD - doxorubicin, bleomycin, vinblastin i dacarbazine

BEACOP - bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone procarbazine

Treg – regulacijski T limfociti (eng. *regulatory T cells*)

tTreg – timusne Treg (eng. *thymus derived Treg*)

pTreg – periferne Treg (eng. *peripheraly derived Treg*)

Tef – efektorski T limfociti

MHC – glavni kompleks tkivne kompatibilnosti (eng. *major histocompatibility complex*)

IL2 – interleukin 2

IL10 – interleukin 10

IL35 – interleukin 35

TGFβ – transformirajući čimbenik rasta beta (eng. *transforming growth factor beta*)

CD25 - α lanac receptora za interleukin 2 (eng. *interleukin 2 α receptor chain*)

FOXP3 - eng. *forkhead box P3*

IPEX - Imuni poremećaji, Poliendokrinopatija, Enteropatija, X -vezani sindrom

CNS – konzervirane nekodirajuće DNA sekvence (eng. *conserved non-coding sequences*)

LAP/GARP - eng. *latency-associated peptide/ leucine-rich repeat molecule of unknown function*)

GITR - receptor za glukokortikoidima inducirani čimbenik tumorske nekroze (eng. *glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor-related protein*)

CTLA-4 - antigen-4 udružen s citotoksičnim limfocitima (eng. *cytotoxic T cell associated antigen-4*)

PD-L1 – eng. *Programed Death Ligand 1*

PD-1 – eng. *Programed cell Death protein 1*

VEGFR – eng. *vascular endothelial growth factor*

CCR –receptor za kemokine (eng. *chemokine receptor*)

TARC/CCL17 - eng. *thymus and activation-regulated chemokine/chemokine ligand 17*

MDC/CCL22 - *macrophage-derived chemokine/chemokine ligand 22*

Galectin-1 - eng. *glycan-binding protein 1*

MIP3 α - *macrophage-inflammatory protein 3 α*

1. UVOD

1.1. Epidemiologija Hodgkinovog limfoma

Hodgkinov limfom (HL) je tumor B limfocita podrijetla germinativnog centra, karakteriziran malim brojem zloćudnih stanica Hodgkin i Reed Sternberg (HRS) koje imaju defektan B- stanični program, a okružuje ih obilni reaktivni mikrookoliš. Odavno su poznati kriteriji za identificiranje HRS stanica i podtipova klasičnog HL (kHL) koji imaju različitu kliničku prezentaciju i prognozu (1). Nove znanstvene spoznaje ukazuju na ključnu ulogu tumorskog mikrookoliša u moduliranju bolesti (2-4).

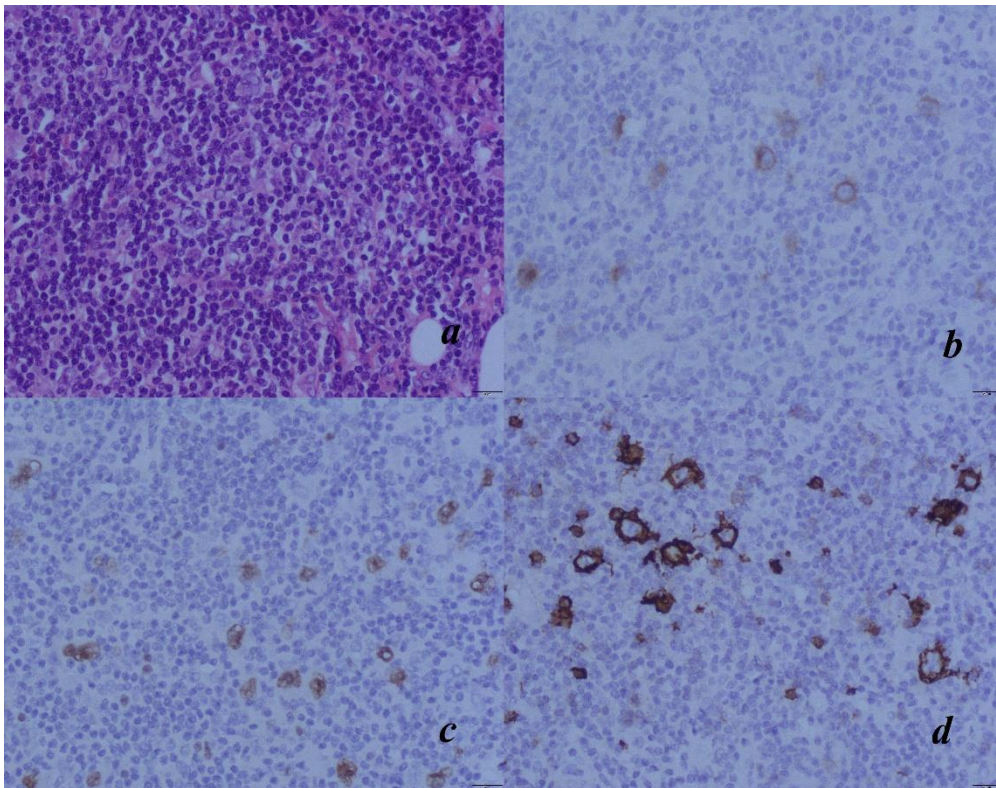
Na HL otpada 30% svih limfoma i 15% svih zloćudnih tumora u mladih odraslih ljudi (1, 5). U razvijenim europskim zemljama i Sjevernoj Americi je incidencija HL-a 2,6/100.000 i veća nego u zemljama u razvoju, a smrtnost manja, vjerojatno zbog ranije dijagnostike i dostupne terapije (6). Prema GLOBOCAN projekcijama, predviđa se da će zbog demografskih promjena broj slučajeva HL porasti 30% do 2040. godine u odnosu na 2020. godinu (7). Najveće stope incidencije zabilježene su u južnoj Europi. Među mediteranskim zemljama, Hrvatska je na trećem mjestu po incidenciji i 15. mjestu po smrtnosti (5). U odnosu na ranije godine, u Hrvatskoj incidencija HL-a u blagom porastu; podatci Hrvatskog nacionalnog registra za rak za 2020. godinu bilježe 108 novooboljelih, 71 muškarca i 37 žena, s incidencijom 2,7/100 000, što je više nego nego 2015., kad je bila 1,9/100 000, ili 2011. kad je stopa incidencije bila 2,2/100 000 i 93 novooboljelih (8). U razvijenim zemljama pojavnost HL pokazuje bimodalnu dobnu raspodjelu s prvim vrškom u kasnim 20-im godinama i drugim vrškom nakon 50-e godine, u Japanu nema prvog vrška, a u zemljama u razvoju veća je incidencija HL u dječjoj dobi. Pojavnost je svugdje obrnuto proporcionalna socioekonomskom statusu (6,9,10). Bolest je refrakтерна u 5-10 % oboljelih, a recidivira u 10-30 % oboljelih (11,12).

1.2. Klasifikacija Hodgkinovog limfoma

S obzirom na morfologiju, imunofenotip zloćudnih stanica, sastav mikrookoliša, kliničku sliku i prognozu, HL se dijeli na nodularnu limfocitnu predominaciju (NLPHL) i klasični Hodgkinov limfom (kHL) koji čini 95 % HL (1,13).

NLPHL je klasificirana kao B-stanični limfom tipa nodularne limfocitne predominacije jer su pojedinačne zloćudne tzv. limfocit/histiocit (LH) stanice koje nalikuju HRS stanicama, zadržale izražaj CD20, a okružene su nodularnom proliferacijom malih reaktivnih limfocita.

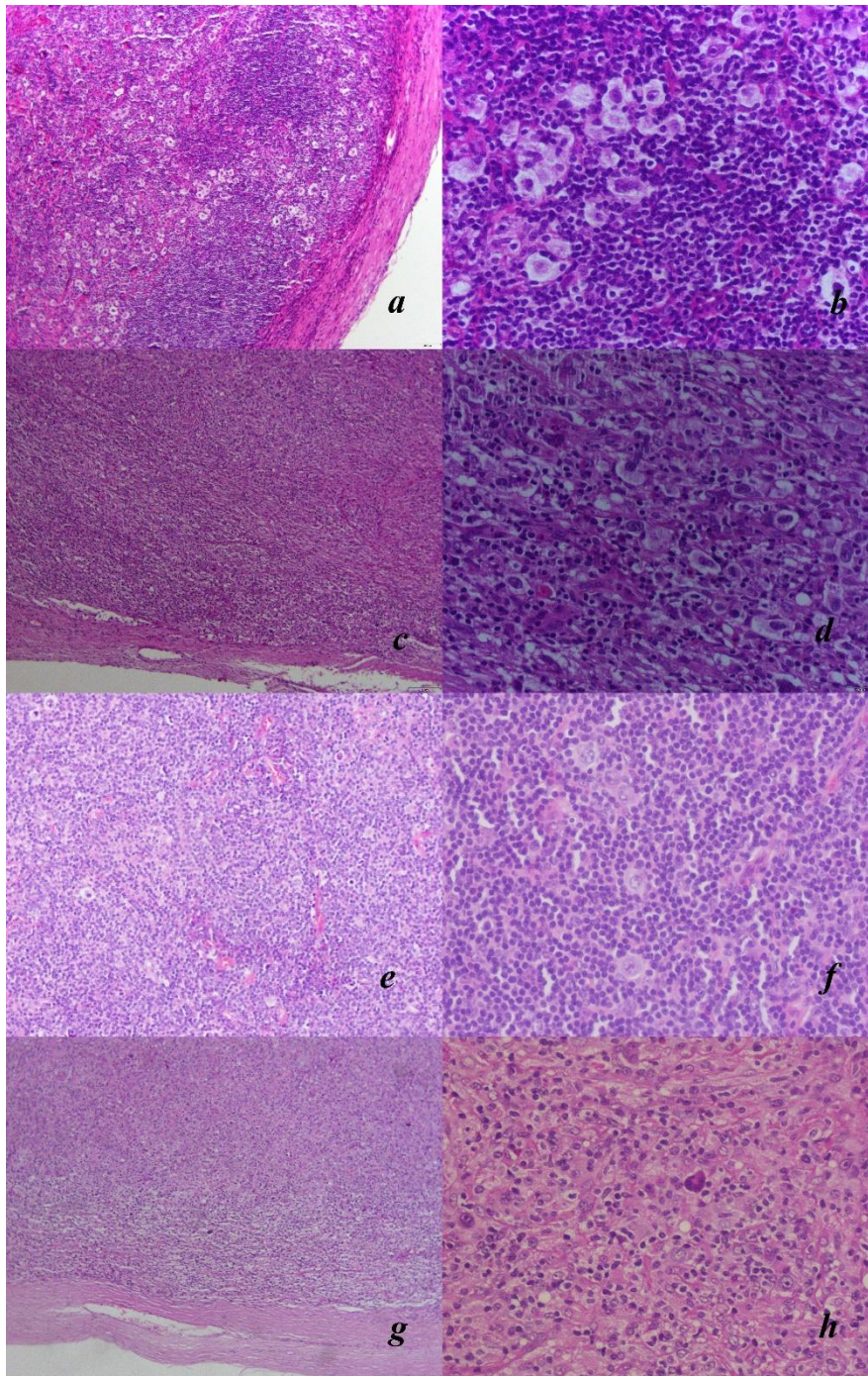
LH stanice izražavaju i druge B- stanične biljege, primjerice CD79a, CD75, bcl-6, EMA, OCT-2 i BOB 1 (Slika 1). Bolest je češća u muškaraca, javlja se obično kao lokalizirana limfadenopatija i ima dobru prognozu uz relapse.



Slika 1. Nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma. a) Pojedinačne zloćudne LH stanice okružene su brojem ne-neoplastičnim limfocitima i makrofagima, a imunohistokemijski izražavaju EMA (b), OCT2-2 (c) i CD20 (d). (HE, 200x; IHK/HRP 200x i 400x) (izvor: Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Odjel za patologiju, KBC Split)

S druge strane, kHL ima četiri podtipa koji su različiti po kliničkoj i histološkoj slici, stupnju fibroze i udruženosti s infekcijom Epstein-Barr virusom (EBV). Podtipovi su nodularna skleroza (NS), miješana celularnost (MC), limfocitima-bogat podtip (LR) i limfocitna deplecija (LD) (Slika 2). Na NS otpada 70% kHL, u razvijenim zemljama je najčešći podtip i to do 35-e godine života, obično se otkrije u lokaliziranom stadiju i prognostički je povoljniji od ostalih podtipova. Podtip MC čini 20-25% kHL, češći je u zemljama u razvoju i u HIV-pozitivnih bolesnika i udružen s EBV-om. LR je rijedak (5 %), prezentira se u lokaliziranom stadiju i prognostički je povoljan, dok je podtip LD vrlo rijedak

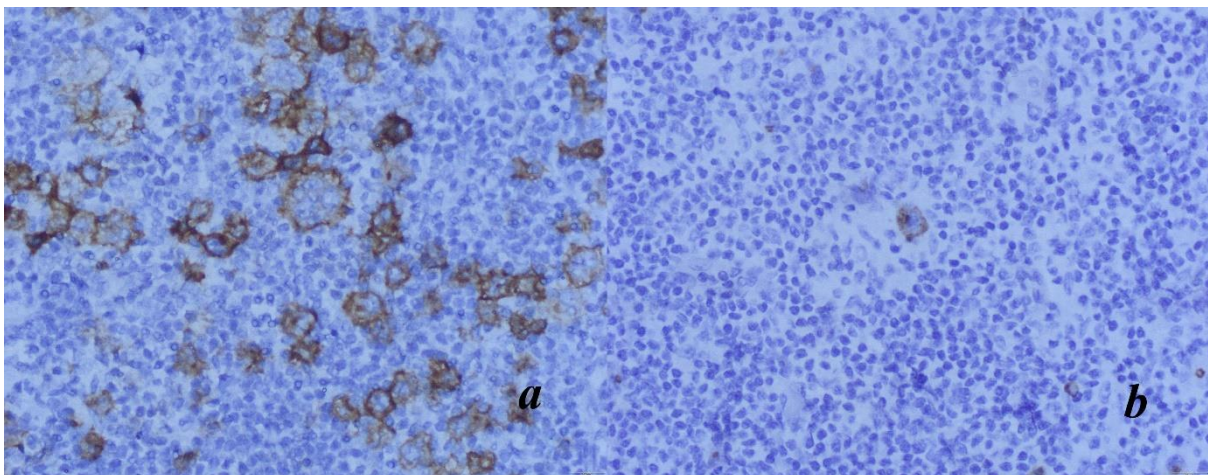
(<1%), prezentira se u uznapređovalom stadiju, u starijih ljudi i prognostički je nepovoljan (1).



Slika 2. Histološki podtipovi klasičnog Hodgkinovog limfoma: (a,b) nodularna skleroza, (c,d) miješana celularnost, (e, f) limfocitima-bogati tip i (g, h) limfocitna deplecija (HE, 100x/200x) (izvor: Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Odjel za patologiju, KBC Split)

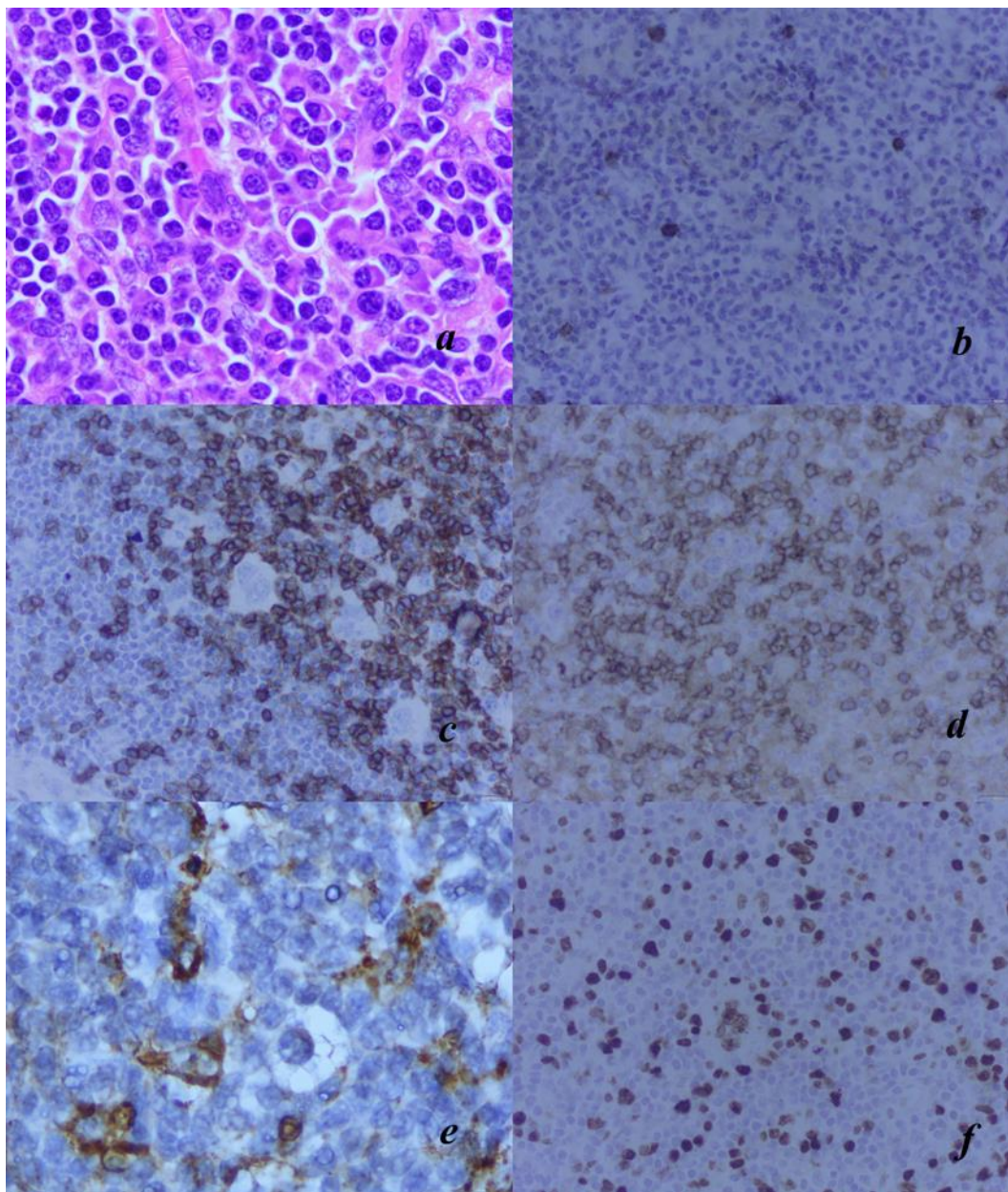
1.3. Morfologija i imunofenotip Hodgkinovog limfoma

Zloćudne stanice u kHL-u su mononuklearna Hodgkinova stanica i bi/multinuklearna Reed-Sternbergova stanica i njene varijante, zajedno nazvane HRS stanice (slika 3). Multinuklearne stanice nastaju dijeljenjem pa re-fuzijom mononuklearnih progenitora, odnosno nepotpunom citokinezom (13). HRS stanice čine svega 1-10% tumora, dok ostatak čine upalne stanice tumorskog mikrookoliša (13,14). Iako je HRS stanica podrijetla zrelih B limfocita germinativnog centra, zbog aberantne aktivacije signalnih puteva i izražaja proteina, gotovo je posve izgubila B stanični fenotip i pokazuje neobičnu kombinaciju fenotipskih biljega poput CD30 (T limfocitni i makrofagni biljeg), CD15 (mijelomonocitni biljeg), PAX5 (B stanični biljeg), IRF4/MUM1 (plazma stanični biljeg), TARC i fascin (dendritički biljezi), MHC II molekule, CD80, CD40, Notch 1 (T stanični biljeg), PD-L1 i brojnih drugih biljega (1,13-19). U 5% slučajeva HRS stanice izražavaju i neke biljege T limfocita, a u 1% može se dokazati T stanični genotip (20-22).



Slika 3. Imunobiljezi zloćudnih stanica u klasičnom Hodgkinovom limfomu. (HRP x400) (a) CD30 i (b) CD15 (izvor: Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Odjel za patologiju, KBC Split)

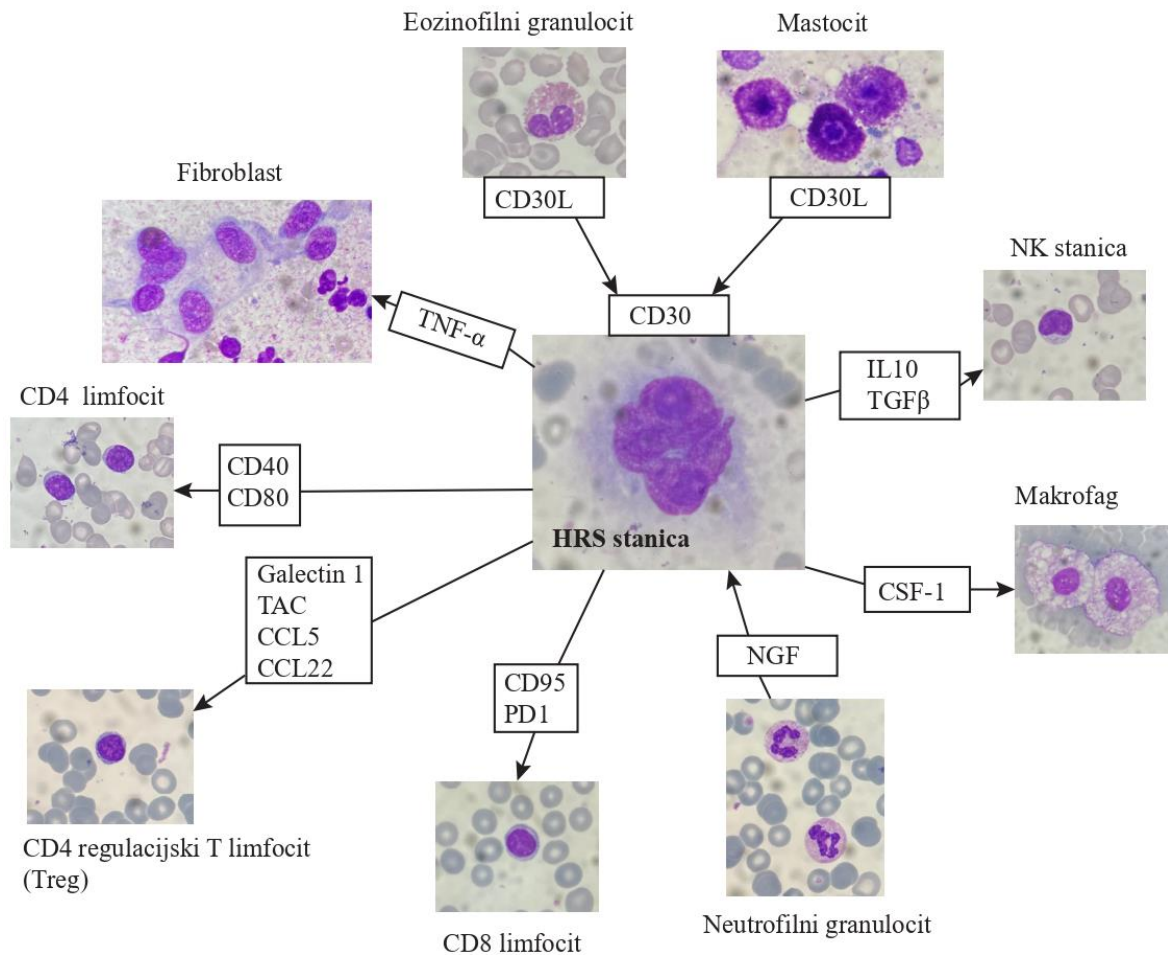
U mikrookolišu HL-a nalazi se dinamična populacija stanica i njihovih citokina koja ima interaktivni utjecaj na „ponašanje“ tumora (23). Tumorski mikrookoliš sačinjavaju fibroblasti, B limfociti, pomoćnički i citotoksični T limfociti, makrofagi, plazma stanice, eozinofili i neutrofilni. Neke od tih stanice karakteristično pridonose slici određenog podtipa, poput brojnih eozinofila u MC ili fibroblasta u NS koji uzrokuju vezivno pregrađivanje tumora (2, 13, 24, 25) (slika 4).



Slika 4. Mikrookoliš klasičnog Hodgkinovog limfoma: (a) miješani stanični infiltrat sadržava b) malo CD20+ B stanica c) brojne CD3+ T stanice od kojih su d) većina pomoćnički CD4+ limfociti, i e) dosta CD68+ makrofaga; (f) proliferacijski biljeg Ki-67 izražen je u HRS stanicama i stanicama tumorskog mikrookoliša (HE 1000x; HRP 400x). (izvor: Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Odjel za patologiju, KBC Split)

HRS stanice luče kemokine, citokine i čimbenike rasta kojima privlače T stanice i regulatorne stanice, mijeloidne i stromalne stanice (2,15, 22, 23). Pomoćnički T limfociti oko HRS stanica stvaraju rozete (26). U manjem broju su prisutni citotoksični T limfociti, B limfociti, NK stanice i makrofagi (2, 27). U mikrookolišu HL su brojni regulacijski T

limfociti koji moduliraju imuni odgovor u tumoru. Stanično i citokinsko okruženje doprinosi proliferaciji HRS-a i inhibira učinkovitost domaćinogovog specifičnog imunog odgovora na tumor (2, 23, 28). Interakcija HRS i stanica tumorskog mikrookoliša prikazana je na slici 5.



Slika 5. Interakcije između HRS i reaktivnog mikrookoliša. Izražajem brojnih molekula i citokina HRS reguliraju sastav i aktivaciju različitih stanica u tumorskom mikrookolišu.

Izvor: uradak autora

1.4. Etiopatogeneza Hodgkinovog limfoma

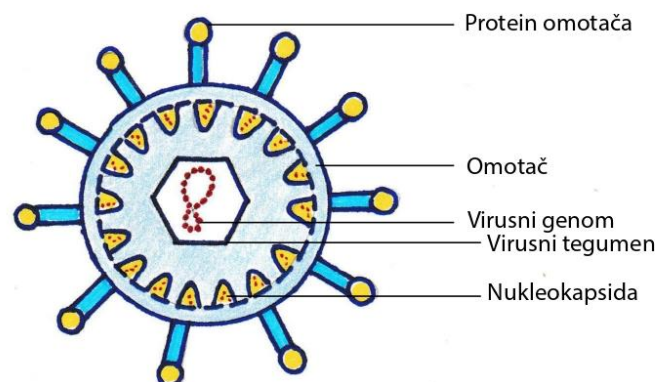
Etiopatogeneza kHL je multifaktorijalna. Kombinacija genetskih čimbenika, socioekonomskog statusa i vanjskih čimbenika, ponajprije virusnih infekcija povezana je s povećanom incidencijom HL (12). Procjenjuje se da se oko 4.5% slučajeva kHL javlja obiteljski (29). Kumulativni rizik za kHL kod prvih srodnika oboljelih je tri do devet puta veći nego u normalnoj populaciji, a u blizanca istog spola višestruko veći, prema nekim autorima čak do 100 puta (5,9,10,12,30-32). Infekcija Epstein-Barr virusom (EBV) ima posebno mjesto u etiopatogenezi kHL budući da se EBV može naći u 45% slučajeva u odraslih, a u djece u zemljama s niskim socioekonomskim statusom u 90-100% slučajeva (13,33-35). U mladih ljudi s EBV-pozitivnim kHL-om latentna virusna infekcija povezana sa zloćudnom pretvorbom B stanica i nastankom limfoma trajala je pet do dvadeset godina nakon akutne infekcije (9,36). U zemljama s niskim socioekonomskim statusom EBV-pozitivni kHL se javlja u djetinjstvu, a u razvijenim zemljama pokazuje bimodalnu dobnu distribuciju s pojavom u adolescenciji i kod starijih ljudi zbog poremećaja imunosti u starosti (9,33,37). EBV-pozitivni kHL je povezan s alelom HLA-A*01 koji ne može prezentirati virusne antigene i izazvati imuni odgovor (32). EBV-negativni HL je češći u srednjoj dobi i obično NS podtipa (1).

Patogeneza kHL-a obuhvaća genomsku alteraciju HRS stanice, njenu interakciju s tumorskim mikrookolišem i latentno djelovanje EBV-a (1). Genomske alteracije uključuju kromosomske abnormalnosti te abnormalno aktivirane transkripcijske čimbenike i signalne puteve. Među kromosomskim abnormalnostima prisutne su aneuploidija, hipertetraploidija, delecije, disfunkcija telomera i povećani broj kopija gena, posebno gena lociranih na kromosomu 9p24.1 koji kodiraju PDL-1 i PDL-2 (*eng. programmed death receptor ligand 1 i 2*) (11, 12, 38). Inaktivirajuće mutacije zahvaćaju gene uključene u komplekse MHC I i MHC II (1). Preživljenje i proliferaciju HRS stanica sinergistički osiguravaju abnormalno aktivirani transkripcijski čimbenici, signalni putevi i antiapoptotski mehanizmi, od kojih su transkripcijski čimbenik NFκB (*eng. nuclear factor kappa B*), signalni put JAK/STAT, geni *TP53*, *ATM* (*eng. ataxia-telangiectasia mutated*) i *ATR* (*eng. Rad3-related kinase*) te transkripcijski čimbenik FOXP3 najbolje istraženi (11). U fiziološkim uvjetima transkripcijski čimbenik NFκB regulira staničnu proliferaciju i apoptozu, a kontrolira ga inhibitor IκBα (*eng. inhibitor of kappa B*). Somatski mutirane HRS stanice izražavaju NFκB. Trajno aktivirani signalni put JAK/STAT povezan je s izbjegavanjem imunog odgovora. Transkripcijski

čimbenici STAT5A i STAT5B (eng. *Signal Transducer and Activator of Transcription 5A i 5B*) odgovorni su za tipični fenotip HRS stanica - izražaj aktivacijskog biljega CD30 i gubitak B staničnog fenotipa. Drugi signalni putovi važni u patogenezi kHL-a su AP-1(eng. *activator protein 1*), NOTCH-1 (eng. *Notch homolog 1, translocation-associated*) i PI3K/AKT(eng. *phosphoinositide 3-kinase/ serine/threonine kinase*). AP1 je transkripcijski čimbenik koji regulira staničnu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu. U HRS stanici je AP1 trajno aktivan zbog aktiviranog NFkB i signaliziranja preko CD30. NOTCH- 1 je T stanični transkripcijski čimbenik i negativni regulator razvoja B stanica, a stimulira ga ligand Jagged1 iz staničnog mikrookoliša. Signalni putovi PI3K/AKT su uključeni u proliferaciju i inhibiciju apoptoze. U HRS stanici može biti mutiran Fas (CD95), član obitelji TNF receptora koji inducira apoptozu (13,14,19).

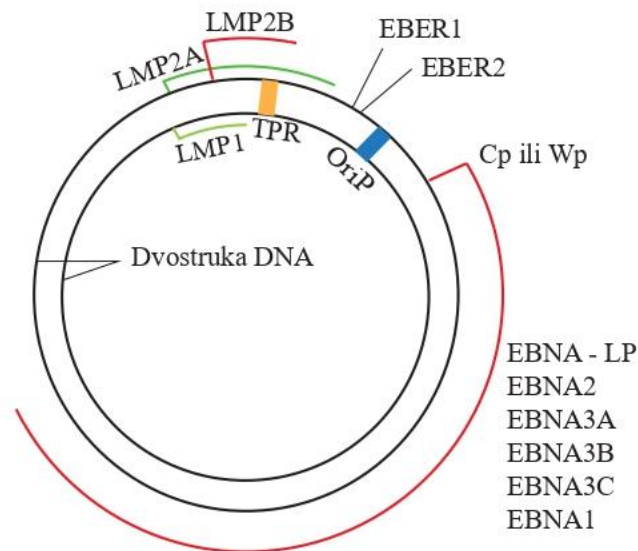
1.5. Epstein-Barr virus

Epstein-Barr virus (Humani Herpes virus 4, HHV4) je limfotropni virus, član obitelji *gama Herpesvirusa*, koljena *Limfokriptovirusa*, kojim je ubikvitarno zaražena humana populacija (39). Genom EBV-a je dvolančana linearna DNA duljine 172 kb omotana nukleokapsidom oko koje je tegumen i ovojnica s lipidima i glikoproteinima, važnima za interakciju sa stanicama domaćina (40) (Slika 6).



Slika 6. Struktura EBV viriona. Izvor: uradak autora

Virusni genom sadrži preko 100 otvorenih okvira za čitanje (eng. *open reading frames, ORF*) s kojih započinje prepisivanje njegovih litičkih i/ili latentnih gena (39) (Slika 7).



Slika 7. EBV genom: lokacija i transkripcija EBV latentnih gena. Šest nuklearnih antigena (EBNA 1,2,3A,3B,3C i EBNA-LP) prepisuju se od Cp ili Wp promotora, dok se latentni membranski proteini (LMP1, LMP2A i LMP2B) prepisuju sa svake strane terminalne ponavljajuće regije, TPR (narančasto) koja nastaje formiranjem cirkularne dvostruke DNA. OriP (plavo) označava mjesto plazmidne replikacije. Transkripcija EBER 1 i 2 je karakteristika latentne EBV infekcije. Izvor: uradak autora

EBV se prenosi slinom, a primoinfekcija obično nastupi u prve dvije godine života i serokonverzija prođe bez simptoma (41). Primoinfekcija u adolescenciji i odrasloj dobi u polovine zaraženih dovodi do akutne samoograničene bolesti, infektivne mononukleoze (IM) (37, 40, 41). EBV inficira B limfocite pomoću svog glikoproteina gp350 koji reagira s CD21 na B limfocitima, pokrovnom epitelu orofarinksa i rijeđe na T limfocitima i NK stanicama (20, 34, 42, 43). U zaraženim stanicama EBV uspostavlja litičku i latentnu infekciju. Primarna orofaringealna infekcija rezultira produktivnom infekcijom u kojoj se u slinu otpuštaju infektivni virusi u visokom titru (43). U imunom odgovoru specifičnih citotoksičnih T

limfocita, zaraženi B limfociti budu brzo uklonjeni. Tijekom litičke infekcije, EBV također inficira naivne B limfocite u tonzilarnom tkivu orofarinksa i u njima uspostavlja latentnu infekciju. Virusna DNA se zaokruži u episom u kojem se prepisuje ograničeni set latentnih proteina: šest jezgrinih antigena (EBNA -eng. *Epstein Barr Nuclear Antigen*), tri membranska antigena (LMP – eng. *Latent Membrane Protein*) i dvije male nekodirajuće RNA (EBER – eng. *Epstein-Barr virus-encoded small RNA*). Na taj način Epstein-Barr virus ostaje trajno prisutan u zaraženoj naivnoj B stanici, a imuni sustav ga ne može prepoznati. U određenim slučajevima virusni latentni proteini doprinose zloćudnoj transformaciji stanica (31). EBNA1 se nalazi u svim zaraženim stanicama, povezuje virusnu sa staničnom DNA i odgovorna je za održavanje, replikaciju i prijenos EBV u stanice kćeri. U interakciji s virusnim promotorima utječe na transkripciju virusnih jezgrinih i membranskih latentnih proteina. EBNA1 ima brojne Gly-Ala ponavljajuće sekvence zbog kojih se ne može razgraditi i prezentirati citotoksičnim limfocitima u sklopu kompleksa MHC I pa je imunološki sustav za nju „slijep“. EBNA2 i EBNA LP (eng. *Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein*) imaju transformacijska svojstva jer aktiviraju virusne i stanične promotore. EBNA LP kao koaktivator pojačava transaktivirajuća svojstva EBNA2. Transkripcijski regulatori EBNA 3A, EBNA3B i EBNA3C mogu transformirati B stanice.

Od svih proteina EBV-a najizraženiji je LMP-1, transmembranski protein odgovoran za EBV-om posredovanu zloćudnu transformaciju B limfocita. LMP-1 inhibira apoptozu jer potiče izražaj BCL2 i A20 i trajno aktivira NFκB, čime osigurava preživljenje i proliferaciju zaraženih stanica. LMP -1 povećava izražaj PD-L1 i PD-L2 preko signalnih putova AP-1 i JAK-STAT, neovisno o amplifikaciji gena na kromosomskoj regiji 9p24.1. LMP-2 djeluje poput lažnog, trajno aktiviranog B- staničnog receptora koji zaraženoj B stanici šalje stimulacijske signale.

EBER1 i EBER2 su izraženi u svim tipovima latencije. Ne sudjeluju u transformaciji B limfocita, ali mogu stimulirati lučenje interleukina 10 (IL-10) i suprimirati odgovor citotoksičnih T limfocita. EBERs su brojne u jezgri zaraženih stanica pa se koriste kao cilj u *in situ* hibridizaciji za dokaz EBV-a (9, 19, 20, 34, 39). Latentni proteini izraženi su u različitim kombinacijama u tri tipa EBV latencije i prikazani su u Tablici 1 (20,37).

Tablica 1. Tipovi Epstein-Barr virusne latentne infekcije

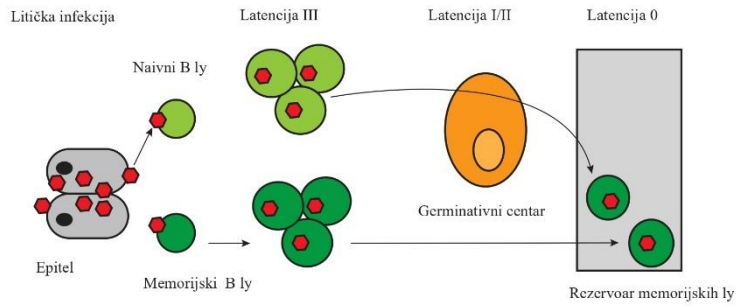
Tip latencije	Izražaj latentnih EBV gena					
	EBERs	EBNA1	LMP-1	LMP-2A	EBNA2	EBNA3 i EBNA LP
I	+	+	-	-	-	-
II	+	+	+	+	-	-
III	+	+	+	+	+	+

Preuzeto i modificirano iz: Kuppers, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. Nat Rev Immunol 2003: 801-812.(32)

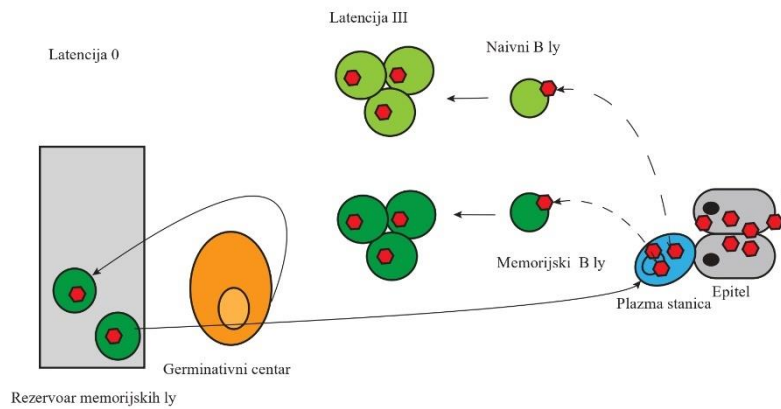
Tip III EBV latencije („program rasta“) označava izražaj svih latentnih gena i prisutan je u novoinficiranim naivnim B limfocitima u orofarinksu, a manjim dijelom u memorijskim limfocitima. Naivni B limfociti inficirani EBV-om ulaze u germinativni centar, proliferiraju i povećavaju rezervoar inficiranih limfocita. U germinativnom centru B limfociti izražavaju tip II EBV latencije, a izlaskom iz germinativnog centra i diferenciranjem u memorijske B limfocite, izražavaju tip I EBV latencije i postaju rezervoar EBV-a (20, 37).

U imunokompetentnih zdravih seropozitivnih osoba nalazi se u perifernoj krvi malo EBV-om zaraženih B limfocita, 1-50 na 10^5 B limfocita (44). Povremena reaktivacija latentno inficiranih memorijskih B limfocita i transformacija u plazma stanice dovodi do prelaska iz tipa I EBV latencije u litičku fazu. Posljedica je otpuštanje virusa u slinu kod asimptomatskih osoba i obnavljanje rezervoara virusa (34). Interakcija virusa i domaćina u primoinfekciji i latentnoj infekciji s reaktivacijom prikazana je na Slici 8.

a Primarna infekcija



b Perzistentna infekcija



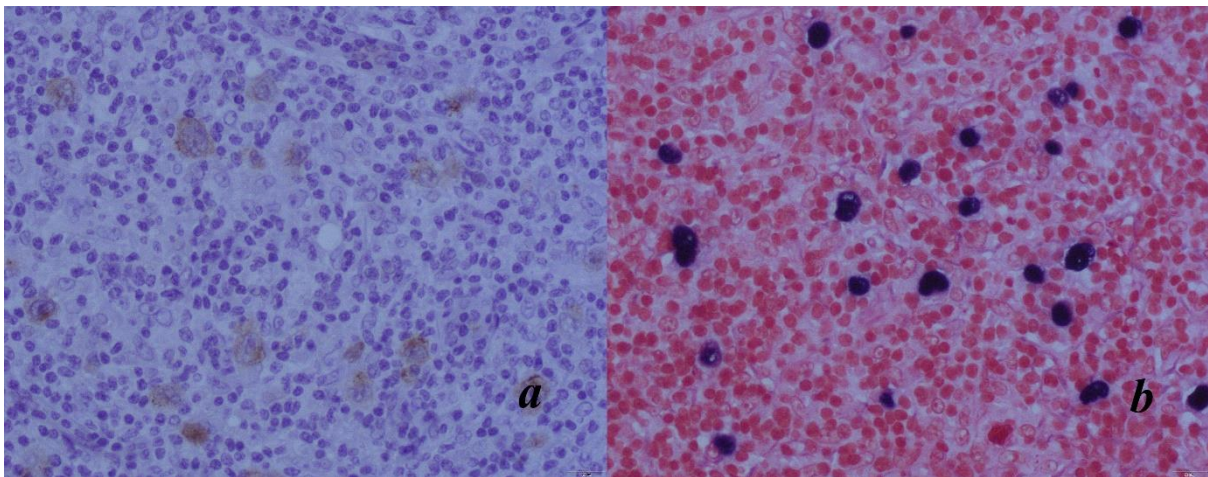
Slika 8. Prikaz interakcije EBV-a (označen crveno), epitelnih stanica i B limfocita tijekom primarne (a) i latentne infekcije (b). Izvor: uradak autora

U većini slučajeva infekcija EBV-om izaziva doživotnu asimptomatsku infekciju. U određenim uvjetima EBV može doprinijeti nastanku zloćudnih tumora (34).

1.6. Epstein-Barr virus u Hodgkinovom limfomu i drugim zloćudnim tumorima

1.6.1 Hodgkinov limfom

U EBV-pozitivnom kHL su u HRS stanicama izraženi EBERs, EBNA1, LMP-1 i LMP-2A (tip II EBV latencije) (slika 9). Latentni membranski proteini djeluju kao onkoproteini jer nadomještaju glavne signale za preživljenje B stanica germinativnog centra tako što LMP-1 imitira aktivni CD40, a LMP-2 signal B- staničnog receptora (39). EBV je utvrđen u različitom postotku KHL-a, povezano sa socio-ekonomskim statusom, podtipom i imunokompetencijom. U razvijenim zemljama se EBV nalazi u 30-40% slučajeva, a u Indiji, Latinskoj Americi i Africi u preko 90% slučajeva. U HIV-pozitivnih bolesnika s kHL-om, EBV je gotovo uvijek pozitivan (10,13).



Slika 9. Epstein-Barr virus u HRS stanicama klasičnog Hodgkinovog limfoma (a) LMP EBV (DABx400), (b) EBERs (ISH, 400x) (izvor: Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Odjel za patologiju, KBC Split)

EBV-pozitivni kHL je češći u djece mlađe od 10 godina, starijih od 45 godina i u podtipu MC Osobe s preboljelom IM imaju 3-4 puta veći rizik nastanka HL, a medijan je četiri godine nakon IM (5,9).

1.6.2 S EBV-om povezani ne-Hodgkinovi limfomi i limfoproliferativni poremećaji

Burkittov limfom (BL) je zreli agresivni B- stanični limfom koji se obično javlja ektranodalno. Srednje velike monomorfne limfoidne stanice sa sitnim jezgricama i bazofilnom citoplazmom imaju fenotip B stanica germinativnog centra (pozitivne na CD20,

CD10 i negativne na BCL-2). Translokacija IG::MYC zbog t(8:14) jukstaponira MYC u IGH lokus i dovodi do konstitucionalnog izražaja MYC i posljedično velikog proliferacijskog indeksa. Danas se BL dijeli na EBV-povezani i EBV-nepovezani podtip. Tri tradicionalna podtipa su endemski u subsaharskoj Africi i Papua Novoj Gvineji u kojem je EBV prisutan u >90 % slučajeva, sporadični u kojem je u EBV prisutan u 30-50% slučajeva i s imunodeficijencijom-povezani podtip u kojem je EBV prisutan u 25-40 % slučajeva (1). U BL je izražena samo EBNA1 (tip I EBV latencije) koja sprječava apoptozu zaraženih stanica i ima ranu ulogu u limfomagenezi (39).

EBV-pozitivni difuzni velikostanični limfom B-stanica je opisan u bolesnika bez prethodnog limfoma ili podležće imunodeficijencije. U bolesnika do 45 godina života uglavnom zahvaća limfne čvorove, dok je kod starijih češća ektranodalna lokalizacija. Učestaliji je u slabije razvijenim zemljama nego na Zapadu. Prognostički nepovoljni pokazatelji su tip III EBV latencije i hemofagocitna limfocitocitoza u trenutku dijagnoze ili tijekom terapije (37, 39).

Limfomatoidna granulomatoza je angiocentrični, angiodestruktivni B-stanični limfoproliferativni poremećaj koji zahvaća pluća, mozak, kožu ili druga ektranodalna mjesta i povezan je s tipom III EBV latencije. Bolesnici nemaju povijest limfoma ni imunodeficijencije. Histološki, tumor je građen od razbacanih EBV-pozitivnih polimorfnih B stanica pomiješanih s brojnim reaktivnim T stanicama, a karakteristične su angiocentrične/angiodestruktivne lezije s koagulacijskom geografskom nekrozom (slika 10b) (45).

Difuzni limfom velikih B stanica povezan s kroničnom upalom je EBV-pozitivni tumor koji nastaje tijekom dugotrajne kronične upale u ograničenoj prirodnoj ili stečenoj tjelesnoj šupljini (pitoraks, kronični osteomijelitis). Kronična upala stvaranjem IL-10 inducira lokalnu imunodeficijenciju koja pogoduje preživljenju EBV-transformiranih B-stanica s tipom III EBV latencije. U 70% slučajeva nalazi se mutacija TP53. Brojni regulacijski limfociti pridonose „bijegu“ limfomskih stanica od imunosnog prepoznavanja (1, 39).

EBV-pozitivni mukokutani ulkus je dobro ograničeni bolni vried kože ili sluznice koji se javlja nakon lokalne traume, obično u starijih bolesnika. Histološki je građen od EBV-pozitivnih atipičnih velikih B-stanica i/ili stanica nalik HRS stanicama u okruženju histiocita,

eozinofila i plazma stanica. Obično je udružen sa nekim oblikom primarne ili sekundarne imunodeficijencije. Regredira spontano ili nakon mogućeg oporavka imuniteta (46).

EBV-pozitivni nodalni T- i NK-stanični limfom je agresivni limfom citotoksičnih limfocita ili NK stanica koji se manifestira kao nodalni tumor u odraslih. Češći je u Istočnoj Aziji. Radi se o tipu II latencije bez izražaja EBNA2. PD-L1 je pojačano izražen i povezan s IFN- γ , a broj kopija PD-L1 nije povećan (37).

Ekstranodalni NK/T-stanični limfom povezan s EBV-om najčešće zahvaća nosnu šupljinu u obliku destruktivne, brzo rastuće mase (stari naziv „smrtonosni granulom središnje linije“). Histološki je građen od atipičnih citotoksičnih T limfocita sa zarezanom jezgrom i svijetlom citoplazmom. Nalaze se žarišta fibrinoidne nekroze i angiodestruktivni rast. Radi se o tipu II latencije s nedostatkom EBNA2 i izražajem skraćenog LMP-1. Izbjegavanje imunološkog sustava posljedica je izražaja PD-L1 zbog poticaja EBV-om ili STAT-3. Prediktori terapijskog odgovora na inhibitore imunoloških kontrolnih točaka su izražaj PD-L1 na tumorskim stanicama i makrofagima, prisutnost FOXP3 regulacijskih limfocita i somatsko preslagivanje PD-L1 (47).

Preosjetljivost na ubod komarca (*eng: HMB – hypersensitivity to mosquito bite*) je karakterizirana jakom kožnom reakcijom po tipu preosjetljivosti na mjestu uboda komarca uz pojavu sistemskih reakcija. Iako je klinički slična alergijskim reakcijama, HMB spada u EBV-udružene kronične aktivne limfoproliferativne bolesti koje mogu progredirati do hemofagocitne limfohistiocitoze i agresivnih limfoma. Dijagnostički trijas uključuje povišene vrijednosti IgE, limfocitozu (NK) u perifernoj krvi i prisutnost EBV DNA u perifernoj krvi (48).

Hydroa vacciniforme limfoproliferativna bolest (*eng. hydroa vacciniforme-lymphoproliferative disorder*) je kronična bolest iz skupine fotodermatoza koja se klinički manifestira papulovezikularnim promjenama na suncu izloženoj koži koje cijele ožiljkom. Rijetka je na Zapadu, a češća u Aziji i Južnoj Americi. To je bolest mladih ljudi, sklona relapsima i praćena sistemskim manifestacijama. U koži se perivaskularno i periadneksalno nalazi infiltrat atipičnih T limfocita koji su EBER pozitivni.

Sistemska kronična aktivna EBV bolest je karakterizirana sustavnom proliferacijom poliklonalnih, oligoklonalnih ili (često) monoklonalnih EBV-pozitivnih T stanica ili NK stanica, sa simptomima koji traju više od tri mjeseca. Bolest prati vrućica, limfadenopatija,

hepatosplenomegalija, anemija, trombocitopenija, proljev, uveitis, intersticijska pneumonija, zahvaćenost CNS-a, miokarditis i aneurizma koronarne arterije. Moguće je hemofagocitna limfohistiocitoza i multiorgansko zatajenje. EBV genom nosi često intragenske delecije koje su možda odgovorne za razvoj bolesti (49).

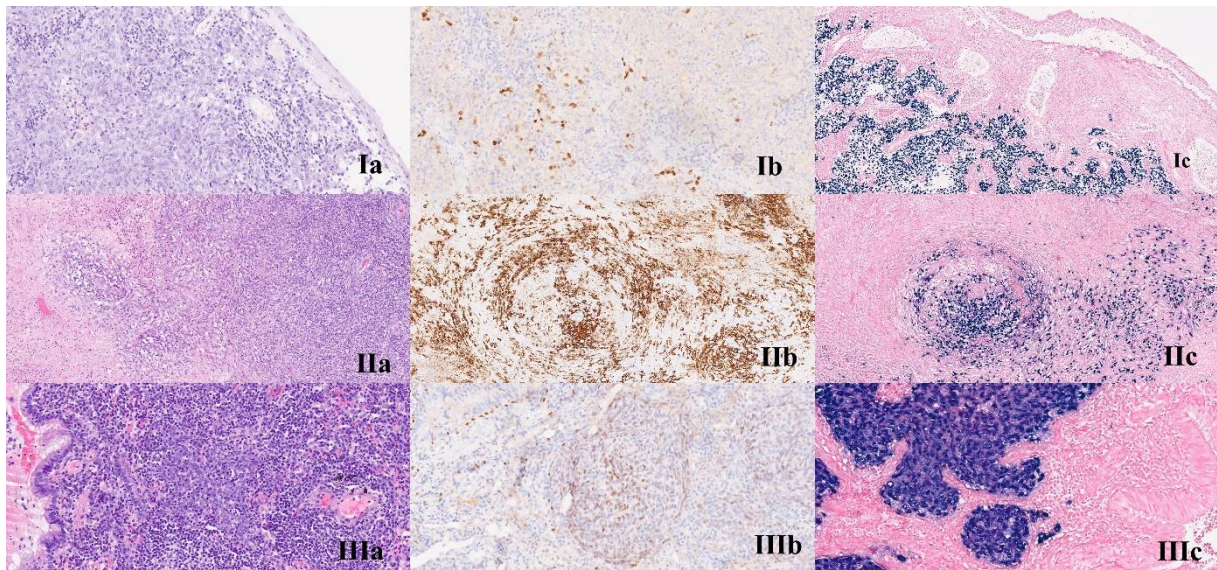
Sistemska EBV-pozitivna T-stanična limfoma u djetinjstvu je klonalna proliferacija EBV-om zaraženih citotoksičnih T-stanica kod imunokompetentne djece i mladih odraslih osoba nakon primarne EBV infekcije. Često je povezan s hemofagocitnom limfohistiocitozom, sistemskim simptomima, zahvaćenošću više organa i brzim fatalnim tijekom. Radi se o defektnom imunom odgovoru na EBV. U zahvaćenim limfnim čvorovima su parakortikalna područja proširena infiltracijom atipičnih limfoidnih stanica i histiocitozom sinusa uz eritrofagocitozu (1).

1.1.6.3 S EBV-om povezani ostali tumori

Nazofaringealni karcinom je čest u jugoistočnoj Aziji, a rijedak i sporadičan na Zapadu. Etiopatogenetski čimbenici uključuju genetsku predispoziciju, okolišne uvjete kao što je prehrana usoljenom ribom i infekciju EBV-om po tipu II EBV latentne infekcije. Manifestira se obično kao lokalno uznapredovala bolest. Tumorsko tkivo je građeno od nediferenciranih epitelnih stanica uloženi u obilnu limfoidnu stromu (Slika 10 a). U zloćudnim stanicama je pozitivan EBER i LMP-1, a u serumu bolesnika može se otkriti EBNA (1, 34).

Limfoepitelni karcinom pluća je rijedak tumor, građen od nakupina nediferenciranih epitelnih stanica okruženih obilnom limfoidnom stromom. U tumorskim stanicama je pozitivan EBER dokaz prisutnosti EBV-a (slika 10 c).

S EBV-povezani mišićni tumor (EBV-MT) nastaje u imunosuprimiranih bolesnika, najčešće zbog transplantacije solidnog organa ili kod zaraženih HIV-om. EBV-MT je multifokalni visceralni tumor, građen od vretenastih stanica i primitivnih okrugastih stanica okruženih oskudnom stromom u kojoj ima T limfocita. Tumorske stanice su EBER pozitivne (50, 51).



Slika 10. Tumori povezani s EBV: nazogaringealni karcinom (Ia) s p63+ nediferenciranim epitelnim stanicama (Ib); limfoidna granulomatoza (IIa) s CD20+ B limfocitima (IIb) i karcinom pluća nalik na limfoepiteliom pluća (IIIa) s p40+ nediferenciranim epitelnim stanicama (IIIb). In situ hibridizacijom s EBV dokazano je prisustvo EBV (Ic, IIc, IIIc) (HEx200, IHKx200, ISHx200, arhiva Odjela za patologiju KBC Split).

1.7. Klinička slika klasičnog Hodgkinovog limfoma

Najčešće se kHL manifestira kao bezbolno povećanje jednog ili više limfnih čvorova, obično na vratu ili supraklavikularno. Oko 20% bolesnika ima lokaliziranu bolest. U polovine oboljelih prisutno je povećanje medijastinanih limfnih čvorova, dok su abdominalna limfadenopatija, hepatosplenomegalija i infiltracija koštane srži rijetke, uglavnom prisutne u starijih bolesnika i u uznapredovalom stadiju bolesti. Sistemski tzv. „B simptomi“ prisutni su u trećine oboljelih, većinom u bolesnika s uznapredovalim stadijem, a uključuju vrućicu $>38^{\circ}\text{C}$ tri dana zaredom, noćno znojenje, gubitak $>10\%$ tjelesne mase i svrbež. Od paraneoplastičkih sindroma spominju se neuropatija, ihtioza, autoimuna hemoliza i cerebelarna degeneracija. Rijedak i karakterističan simptom je alkoholom izazvana bol u zahvaćenom limfnom čvoru (52). Dijagnostička obrada bolesnika s HL uključuje: anamnezu, fizikalni pregled, laboratorijske pretrage u kojima se može naći anemija, leukocitoza s neutrofilijom i limfocitopenijom, povišeni C-reaktivni protein i ubrzana sedimentacija eritrocita. Za određivanje stadija bolesti neophodna je kompjutorizirana tomografija (CT) toraksa i gornjeg abdomena, CT s pozitronskom emisijskom tomografijom (PET/CT) i

biopsija koštane srži. Na temelju tih nalaza određuje se stadij i terapija te procjenjuje prognoza bolesti (1, 12). Za određivanje kliničkog stadija HL-a i danas služi Cotswoldska modifikacija Ann Arbor klasifikacije limfoma (Tablica 2) (52).

Tablica 2. Cotswoldska modifikacija Ann Arbor klasifikacije Hodgkinova limfoma

Stadij	Definicija
I	Zahvaćeni limfni čvorovi jedne regije (I) ili jedan ekstralimfatički organ (IE).
II	Zahvaćeno više regija limfnih čvorova s jedne strane ošita (II) primarno ili <i>per continuitatem</i> ili zahvaćen ekstralimfatički organ i limfni čvorovi s jedne strane ošita (IIE). Broj zahvaćenih anatomskih regija naznačiti brojem.
III	Zahvaćeno više regija limfnih čvorova s obje strane ošita (III), sa zahvaćanjem slezene (IIIS) ili lokaliziranim zahvaćanjem ekstralimfatičnog organa (IIIE) ili oboje (IIISE)
IV	Difuzno zahvaćanje ekstralimfatičkih organa sa ili bez zahvaćanja limfnih čvorova. Lokalizirano zahvaćanje jetre ili koštane srži smatra se stadijem IV.
Sufiksi	
A	Bez B simptoma
B	Prisutan najmanje jedan B simptom
X	„ <i>Bulky disease</i> “ - tumorske mase (palpabilne ili nepalpabilne) ≥ 10 cm u promjeru. Mediastinalne mase se definiraju kao glomazne (engl. „ <i>bulky</i> “) ako je na rendgenskim snimkama maksimalna širina tumorske mase $\geq 1/3$ promjera prsnog koša u razini T5-T6 kralježaka.
E	Zahvaćanje ekstralimfatičnog organa izravnim širenjem iz zahvaćenog limfnog čvora. Zahvaćeni organ se označava slovom.

Preuzeto i modificirano iz: Gobbi, P. G. et al. Hodgkin lymphoma. Crit Rev Oncol Hematol 2013: 216-237 (48).

Međunarodni prognostički indeks (IPI) je zbroj bodova koji označavaju nepovoljne čimbenike, a svaki čimbenik pridonosi jednim bodom. To su dob > 60 godina, klinički stadij III ili IV, LDH >240 U/L i ECOG ljestvica ≥ 2 , broj zahvaćenih ekстранodalnih sjela >1. Po IPI zbroju 0-1-2 boda označavaju niski rizik, 3 srednji, a 4-5 visoki rizik.

Lokalizirana bolest dijeli se na povoljnu i nepovoljnu, ovisno o prisutnosti rizičnih čimbenika kao što su dob, kombinacija ubrzane sedimentacije eritrocita i B simptoma, velika mediјastinalna masa, zahvaćenost limfnih čvorova i ekстранodalno širenje. U uznapredovalom stadiju bolesti (stadij III i IV po Ann Arboru) prema IPS-u (engl. *International Prognostic Factor*) i Hasancleverovom indeksu istaknuto je sedam neovisnih čimbenika koji smanjuju petogodišnje preživljenje. U razvijenim zemljama 75% novooboljelih prezentira se u lokaliziranom stadiju, a u zemljama u razvoju preko polovine novooboljelih ima uznapredovalu bolest (10, 12, 53).

1.8. Terapija i prognoza Hodgkinovog limfoma

Terapijski protokoli za liječenje HL-a ovise o stadiju bolesti i prisutnosti nepovoljnih prognostičkih čimbenika. Liječenje lokaliziranog HL-a uključuje kombinaciju kemoterapije i radioterapije zahvaćenog područja. Kemoterapijski protokol izbora za lokalizirani HL su četiri ciklusa ABVD (*doxorubicin, bleomycin, vinblastin i dacarbazine*) u kombinaciji sa 30 Gy zračenja i može se primjeniti u svih bolesnika, bez obzira na prognostičke čimbenike. Pojedini terapijski protokoli predlažu modificirane, slabije terapijske doze za lokalizirani, prognostički povoljni kHL: dva ciklusa ABVD u kombinaciji s 20 Gy zračenja radi smanjenja postterapijskih komplikacija kao što su iradijacijski pneumonitis ili nastanak multiplih solidnih tumora (52). Liječenje uznapredovalog kHL-a uključuje kemoterapiju po ABVD protokolu ili šest do osam ciklusa po BEACOP protokolu (*bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone i procarbazine*). Brentuximab (brentuximab vedotin), konjugat protutijela na CD30 i kemoterapeutika, daje dobre rezultate. U refraktornim slučajevima i kod relapsa primjenjuje se autologna/alogenična transplatacija hematopoetskih matičnih stanica ili inhibitori kontrolne točke pembrolizumab i nivolumab. Zahvaljujući terapiji, danas je stopa izlječenja kHL-a 70-80% (54).

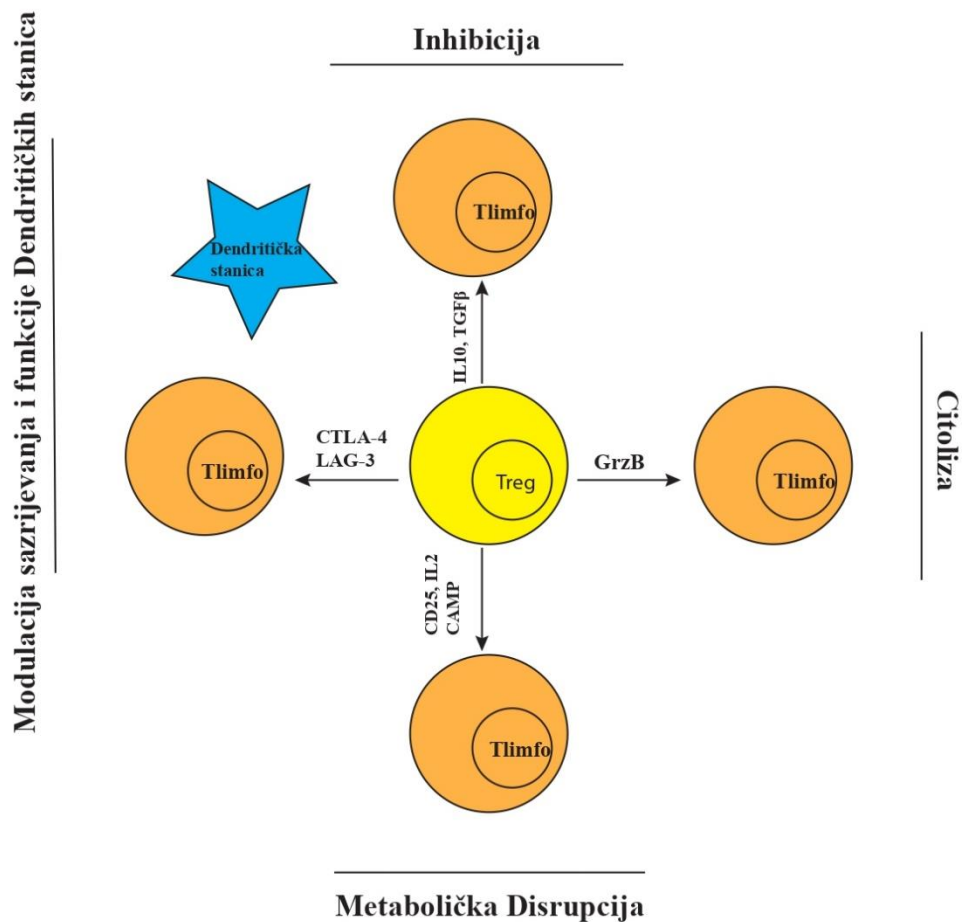
1.9. Regulacijski T limfociti

Regulacijski T limfociti (Treg) su razvojno i funkcionalno posebna subpopulacija T limfocita odgovorna za održavanje imunotolerancije i homeostaze (55). Od 70-ih godina se zna da timus proizvodi stanice važne za prevenciju autoimunih bolesti, ali su Treg stanice pobliže karakterizirane tek prije 20-ak godina kao imunosupresivne i anergične stanice (56,57). Ovisno o mjestu nastanka, dijele se na timusne Treg limfocite (tTreg) koji nastaju u timusu i reguliraju toleranciju na vlastite antigene prevenirajući autoimune bolesti i periferne Treg stanice (pTreg) koje nastaju na periferiji i reguliraju imunološki odgovor na alergijske, infektivne i tumorske antigene (56). U početku se mislilo da samo CD4 limfociti mogu biti Treg stanice, dok se danas zna da i CD8 limfociti, NK stanice i B limfociti mogu imati regulacijsko djelovanje (58-61). U zdravom organizmu broj Treg stanica varira: u krvi pupkovine su najbrojnije, što ukazuje na njihovu važnost u fetu-maternalnoj toleranciji. U prve tri godine života broj Treg limfocita postupno opada i konačno bude stabiliziran u mladih i odraslih ljudi na 5-10% svih timocita, 10% perifernih CD4 limfocita i <1% CD8 limfocita (59, 62-64). Starenje utječe na broj i funkciju Treg limfocita; proizvodnja tTreg postupno opada zbog involucije timusa i fiziološkog imunološkog starenja, a funkcija timusnih Treg limfocita slabi. Navedene promjene objašnjavaju veću učestalost infekcija i zloćudnih tumora u starijih ljudi (63, 65-67). Stvaranje Treg limfocita je složen proces bez obzira nastaju li u timusu ili na periferiji, a ovisi o jačini prepoznavanja antigena, kostimulaciji od strane drugih stanica, citokinima i epigenetskim DNA modifikacijama (68, 69). U timusu tTreg nastaju zbog umjerenog/visoko afinitetnog prepoznavanja vlastitog antigena u sklopu kompleksa MHC II u citokinskom miljeu IL-2 i djelovanjem kostimulatorne molekule CD28. S druge strane, u perifernim limfatičkim organima pTreg nastaju iz naivnih T limfocita u uvjetima subotimalne prezentacije ili niske koncentracije antigena, subotimalne aktivacije dendritičkih stanica i u citokinskom miljeu IL-2, IL-10 i TGF β . Epigenetske modifikacije kao što su DNA metilacija, histonska acetilacija i određene miRNA omogućavaju remodeliranje kromatina i dostupnost staničnih gena djelovanju transkripcijskih čimbenika, čime se konačno limfatična stanica usmjerava u Treg limfocit. Za nastanak regulacijskih stanica je potrebna interakcija brojnih stanica, međudjelovanje više gena i specifična kostimulacija (61,64,69). CD25, α lanac receptora za interleukin 2 je bio prvi identificirani fenotipski biljeg kojeg jako izražavaju Treg stanice (57). Kad su aktivirani, naivni, memorijski i efektorski T limfociti (Tef) također izražavaju CD25, no slabije od Treg limfocita i pri tom ne stječu regulacijska svojstva. Neki autori navode da je u populaciji CD25

pozitivnih stanica samo 2-5% Treg stanica (57,69). Transkripcijski čimbenik FOXP3 (eng. *forkhead box P3*), je glavni regulator razvoja i funkcije Treg limfocita, posebice tTreg. FOXP3 je prvi put istražen 2001. godine u mišjem soju *Scruffy*. FOXP3 gen u ljudi nalazi se na kratkom kraku X kromosoma (Xp) i njegova mutacija u osoba muškog spola dovodi do letalnog IPEX sindroma (Imuni poremećaji, Poliendokrinopatija, Enteropatija, X -vezani sindrom) (62,64,70,71). Izražaj FOXP3 je različit u tTreg i pTreg limfocitima. Transkripciju FOXP3 kontroliraju četiri konzervirane nekodirajuće DNA sekvence, a uz to je potrebna epigenetska modifikacija kromatina, prisutnost citokina i kostimulatornih molekula (69). Razvoj tTreg u timusu je složen proces. Visoko afinitetno prepoznavanje antigena uz kostimulaciju CD28/CD80 potiče jaki izražaj CD25. Nastale tTreg stanice koriste IL-2 iz timusnog mikrookoliša, a interakcija između CD25 i IL-2 aktivira signalne puteve i Jak-Stat kinazu da „pozitivno“ regulira promotorsku regiju FOXP3. Promotor preuzima transkripcijsku „mašineriju“ i usmjerava stanicu prema regulacijskom, a ne efektorskom fenotipu (64, 69). S druge strane, na periferiji iz naivnih T limfocita nastaju pTreg koje se razlikuju od tTreg po mehanizmu nastanka, djelovanju i supresivskoj stabilnosti. Izražaj FOXP3 u naivnim T limfocitima je induciran antigenskom stimulacijom uz prisustvo citokina IL-2 i TGFβ i uz odgovarajuću epigenetsku modifikaciju DNA, kao što su metilacija i histonska acetilacija. Izražaj FOXP3 u pTreg je stoga nestabilan i promijenjiv pa je moguće stanično reprogramiranje s posljedičnim gubitkom regulacijskog i stjecanjem efektorskog svojstva, što upućuje na „plastičnost pTreg“. Populacija pTreg sadrži i FOXP3 negativne stanice s regulacijskim djelovanjem, poput CD4 T stanica koje proizvode IL-10 (Tr1 regulacijske stanice), CD4 T stanica koje proizvode TGFβ (Th3 regulacijske stanice), CD4 T stanica koje proizvode IL-35 i dijela CD8 T stanica. Prema tome, populacija pTreg je izrazito heterogena i sadržava FOXP3 pozitivne i FOXP3 negativne stanice (64,69). Osim toga, manji dio aktiviranih T limfocita može prolazno izražavati FOXP3 bez stjecanja regulacijske funkcije (57,70). Iako je uloga FOXP3 u razvoju regulatorne funkcije stanica nezamjenjiva i potvrđena time što transdukcija FOXP3 u naivne limfocite dovodi do razvoja stanica s regulacijskim djelovanjem i sprečavanja autoimunih i upalnih bolesti, FOXP3 ipak nije u potpunosti specifičan biljeg, posebno za razlikovanje tTreg i pTreg (61,64). Helios je transkripcijski čimbenik izražen uglavnom u tTreg stanicama. Helios izražava preko 95% tTreg i oko 70% Treg u krvi i perifernim limfatičnim organima. Helios inhibira proizvodnju IL-2 u Treg stanicama putem epigenetskog utišavanja gena za IL-2. Međutim, Helios nije u potpunosti specifičan biljeg tTreg jer ga stanica tijekom svog života može „izgubiti“ (61)

LAP/GARP kompleks je sastavljen od citokina Lap (eng. *latency-associated peptide*) i površinske molekule Garp (ili LRRC32, eng. *leucine-rich repeat molecule of unknown function*) čija je funkcija olakšavanje izražaja TGF β u Treg limfocitima. Kompleks je uključen u izražaj FOXP3 u Treg limfocitima s posljedičnim supresivnim djelovanjem, ali nije potpuno specifičan u razlikovanju tTreg i pTreg (61,72). Neuropilin-1 (CD304) je površinski biljeg Treg koji pojačava interakciju između Treg i dendritičkih stanica u procesu prepoznavanja antigena i mobiliziranje Treg stanica u tumorski mikrokoliš. Većina studija izražaja Neuropilina-1 je na mišjim modelima, dok je u humanim Treg limfocitima njegov izražaj nedovoljno definiran. Ostali fenotipski biljezi Treg su receptor za glukokortikoidima inducirani čimbenik tumorske nekroze (GITR od eng. *glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor-related protein*), antigen-4 udružen s citotoksičnim limfocitima (CTLA-4 od eng. *cytotoxic T cell associated antigen-4*), CD28, CCR8, PD-1, CCR7, CCR4, CCR6, CXCR4, CXCR5, CD103 i CD62L. Ni jedan od navedenih biljega nije potpuno specifičan za Treg stanice, niti za razlikovanje tTreg od pTreg stanica (61).

Mehanizmi djelovanja Treg uključuju supresiju naivnih T stanica i njihovo diferenciranje u elektorske T stanice, supresiju aktivnosti diferenciranih pomoćničkih i citotoksičnih limfocita, NK stanica, B limfocita, makrofaga, osteoklasta i dendritičkih stanica (slika 11).



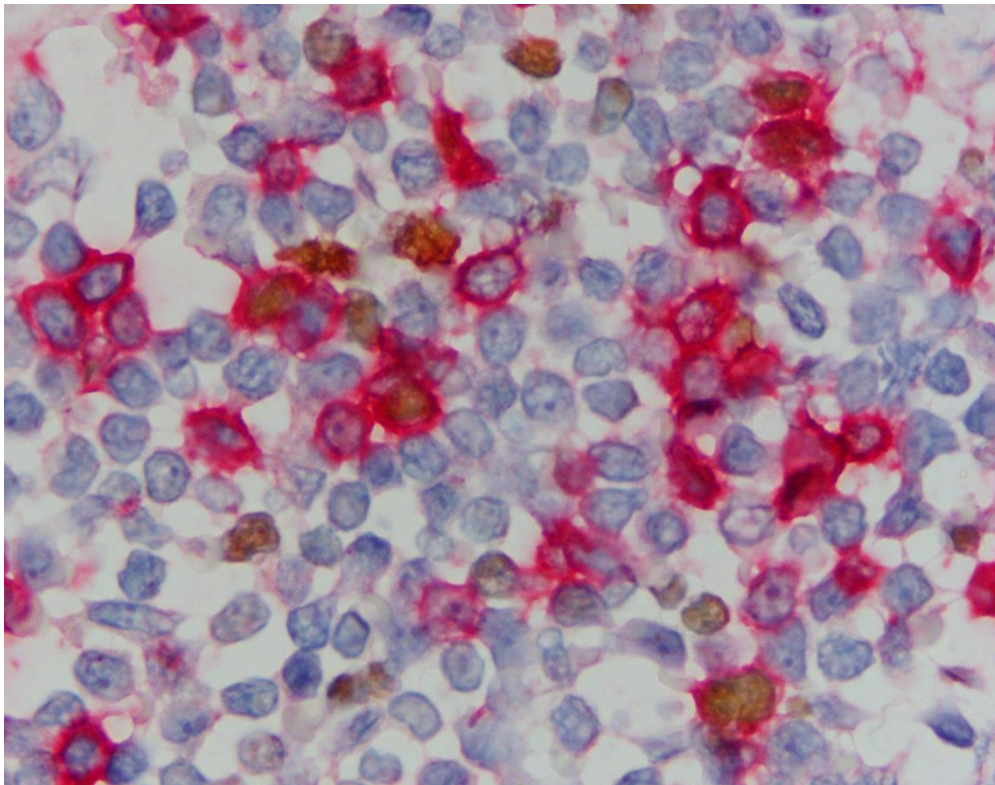
Slika 11. Mehanizmi supresivnog djelovanja Treg na periferiji uključuju lučenje citokina koji inhibiraju T stanice, citolizu T stanica pomoću granzima i perforina, uskraćivanje stimulatornih citokina T stanicama i modulaciju funkcije dendritičnih stanica. Izvor: uradak autora

Treg stanice luče immunosupresivne citokine IL-10, IL-35 i TGF β i induciraju apoptozu efektorskih stanica kompetitivnom inhibicijom IL-2. Kontaktnim mehanizmom pomoću granzima B i perforina ubijaju efektorske stanice, indukcijom „negativnih” signala povisuju cAMP u stanicama čime se inhibira sinteza IL-2 i stanična proliferacija, induciraju sintezu toksičnih metabolita u dendritičkim stanicama poput 2,3 indoleamin dioksigenaze koji štete efektorskim stanicama, smanjuju izražaj CD80/86 na antigen-prezentirajućim stanicama i tako onemogućuju aktivaciju efektorskih T stanica (64,68,69,73-77).

1.10. Regulacijski T limfociti u solidnim tumorima i Hodgkinovom limfomu

U imunom mikrookolišu različitih tumora nalaze se Treg stanice na koje prosječno otpada 20-50% svih intratumorskih CD4 limfocita (78,79). Te stanice suprimiraju antitumorski odgovor posredovan Tef stanicama i pospješuju angiogenezu lučenjem VEGF (eng. *vascular endothelial growth factor* (75,79). Intratumorske Treg su većinom timusnog podrijetla i izražavaju FOXP3, Helios i Neuropilin-1, ali ima i perifernih Treg koje su dijelom FOXP3 negativne (74,75,80). Tumorski imuni mikrookoliš se obogaćuje Treg stanicama na više načina. Treg stanice se zadržavaju u tumoru pomoću citokina i „*homing*“ molekula jer izražavaju kemokinske receptore i adhezijske molekule čiji su ligandi na tumorskim i stromalnim stanicama. Od kemokinskih receptora najvažniji su CCR4, CCR5, CXCR3 i CCR10. Treg stanice stimulirane s CCR4 luče VEGF i potiču angiogenezu u tumoru. U tumorskom mikrookolišu IL-10 i TGFβ dovode do lokalne pretvorbe naivnih T limfocita u Treg stanice. U tumorima je povećan broj Treg stanica koje izražavaju proliferacijski biljeg Ki-67 (75,79). Treg stanice su otpornije od Tef stanica u nepovoljnom tumorskom mikrookolišu punom kisikovih radikala (75). Iako dominiraju tTef stanice, moguća je *de novo* konverzija naivnih T limfocita u pTreg stanice, što povećava ukupnu intratumorsku Treg populaciju (80). Povećani broj Treg u tumorima je povezan s lošijom prognozom u raku dojke, želuca, jajnika, pluća, jetre i gušterače. Nasuprot tome, u zloćudnim tumorima glave i vrata i nekim limfomima je povećani broj intratumorskih Treg stanica povezan s boljom prognozom (74,75,79). Nekoć su se različiti učinci pripisivali funkcionalnoj heterogenosti Treg stanica i mogućnosti da čak tumorske stanice mogu biti Treg, odnosno da Treg stanice mogu djelovati na tumorske stanice umjesto na Tef stanice (75,81). Danas se zna da PD1/PD-L1 osovina ima ulogu u imunomoduliranju tumorske stanice i izbjegavanju prepoznavanja u imunom mikrookolišu (19,82).

Hodgkinov limfom, neobičan od početka, i ovdje se razlikuje od ne-Hodgkinovih limfoma i solidnih tumora. Tumorski imuni mikrookoliš kHL-a je bogat Treg stanicama, na koje otpada do 50% svih intratumorskih CD4 limfocita (83) (Slika 12).



Slika 12. Mikrookoliš Hodgkinovog limfoma je bogat FOXP3 regulacijskim limfocitima. (smeđe nuklearno bojenje FOXP3, crveno citoplazmatsko bojenje CD8, 200x, HRP/AP) (iz rada)

HRS stanica izražava ligande poput TARC/CCL17 (eng. *thymus and activation-regulated chemokine/chemokine ligand 17*) i MDC/CCL22 (eng. *macrophage-derived chemokine/chemokine ligand 22*), Galectin-1 (eng. *glycan-binding protein 1*) i MIP3 α (eng. *macrophage-inflammatory protein 3 α*) kojima selektivno privlači Treg stanice u tumorski mikrookoliš (84-86). U EBV- pozitivnom HL-u latentni proteini poput EBNA1 potiču izražaj liganda za Treg na HRS stanici poput CCL20. EBV utječe na izražaj gena u HRS stanici kojima se selektivno privlače Tr1 Treg stanice koje su FOXP3 negativne. Stoga je populacija Treg stanica u HL heterogena jer sadržava FOXP3 pozitivne i FOXP3 negativne Treg limfocite (87,88). Analize utjecaja Treg stanica na prognozu HL pokazale su da je veći broj intratumorskih Treg prognostički povoljan (3,21,89-91).

2. CILJEVI I HIPOTEZA

2.1. Ciljevi istraživanja

Primjenom *in situ* hibridizacije EBER ustanoviti EBV status klasičnog Hodgkinova limfoma, a metodom dvostrukog imunohistokemijskog bojenja analizirati broj T stanica s fenotipom FOXP3, FOXP3/CD4, FOXP3/CD8, CD4 i CD8 te istražiti postoji li

- razlika u broju pojedinih analiziranih fenotipova u tumorskom mikrookolišu s obzirom na EBV status kHL-a
- razlika u broju pojedinih analiziranih fenotipova u tumorskom mikrookolišu s obzirom na podtip kHL
- razlika u broju pojedinih analiziranih fenotipova u tumorskom mikrookolišu s obzirom na životnu dob ispitanika
- razlika u broju pojedinih analiziranih fenotipova s obzirom na stadij bolesti i B simptome
- povezanost pojedinih analiziranih fenotipova s intervalom bez progresije i općim preživljenjem.

2.2. Hipoteza

EBV status ima utjecaj na imuni sastav tumorskog mikrookoliša u klasičnom Hodgkinovom limfomu. Brojnost regulacijskih limfocita se razlikuje u podtipovima kHL s obzirom na EBV status i životnu dob i povezana je s mjerama ishoda.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U studiju su uključena 182 ispitanika s kHL, koji je dijagnosticiran na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split (u daljnjem tekstu Zavod) od 1. siječnja 1997. do 31. prosinca 2018. godine. Iz arhive i pismohrane Zavoda prikupljeni su parafinski blokovi tumorskog tkiva, odnosno podatci o spolu, životnoj dobi i podtipu HL a podatci o kliničkom tijeku bolesti prikupljeni su iz pismohrane Klinike za interne bolesti i Klinike za dječje bolesti. Podaci o smrti dobiveni su iz mrtvozorstva KBC Split i registra umrlih osoba u Matičnom uredu Splitsko-dalmatinske županije. Iz istudije su isključeni pacijenti bez parafinskog bloka tumorskog tkiva ili bez/ s nepotpunim kliničkim podatcima. Ispitanici su praćeni od datuma patohistološke dijagnoze do datuma posljednje kliničke kontrole ili datuma smrti, zaključno do 5. lipnja 2023. godine kad je određen status preživljenja kao živ ili mrtav. Medijan praćenja ispitanika bio je 132 mjeseca. (min-max 1-285 mj). Vrijeme do relapsa bolesti (engl. *progression free survival, PFS*) i opće preživljenje (engl. *overall survival, OS*) izračunati su u mjesecima. Ulazni parametri bili su dob, spol i podtip kHL, a izlazni parametri PFS i OS kao mjere ishoda i srednja vrijednost CD4, CD8, FOXP3, FOXP3/CD4, odnosno FOXP3/CD8 pozitivnih stanica u tumorskom imunom mikrookolišu.

3.2. Metode

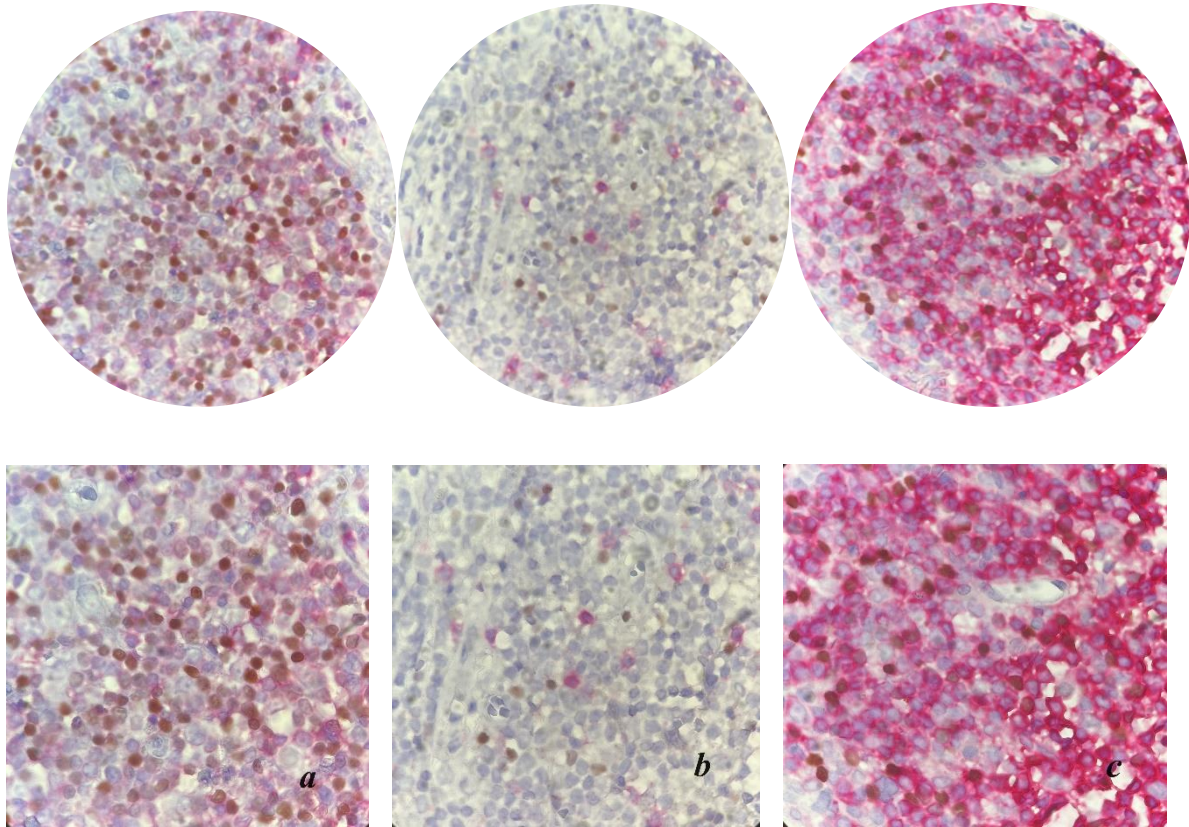
3.2.1. Histološka analiza

Histološki preparati tumorskog tkiva kHL obojeni hemalaun eozinom su mikroskopski pregledani te je određen podtip kHL prema Klasifikaciji hematoloških neoplazmi Svjetske zdravstvene organizacije iz 2017. godine (Slike 8-11).

3.2.2. Imunohistokemijska analiza

Rezovi debljine 3 μ m izrezani su iz parafinskih blokova tumorskog tkiva i postavljeni na silanizirane predmetnice. Dvostruko imunohistokemijsko bojanje provedeno je automatski na uređaju Ventana Ultra Benchmark (Ventana Roche, Tucson, AZ, SAD). Mišje monoklonsko protutijelo FOXP3 (klon 236A/E7, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) razrijeđeno u omjeru 1:50 inkubirano je preko noći u kombinaciji s anti-CD4 zečjim monoklonskim protutijelom (klon SP35, Ventana Roche, Tucson, AZ, SAD) odnosno anti-CD8 zečjim monoklonskim protutijelom (klon SP57, Ventana Roche, Tucson, AZ, SAD). Za detekciju su

korišteni Ultraview DAB detection kit i UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (oba Ventana Roche, Tucson, AZ, SAD).



Slika 13. Analiza različitih fenotipova T stanica u vidnom polju povećanja 1000x. a) i b) citoplazmatsko bojenje CD8 i nuklearno bojenje FOXP3, c) citoplazmatsko bojenje CD4 i nuklearno bojenje FOXP3.

Pozitivna reakcija bila je smeđe bojenje jezgre za FOXP3 i crveno membransko/citoplazmatsko bojenje za CD4 odnosno CD8 (Slika 13). Preparati su analizirani na mikroskopu Olympus BX46 (Olympus, Tokyo, Japan) u 10 nasumično odabranih nepreklapajućih vidnih polja velikog povećanja (1000x) (širina polja 0,1 mm), što je jednako površini tumora od 1 mm². Analizirana su samo polja s prisutnošću HRS stanica u tumorskom mikrookolišu, dok su periferni dijelovi limfnog čvora zanemareni. Istovremeno su analizirani različiti fenotipovi stanica mikrookoliša gledanjem u vidno polje mikroskopa i brojanjem pomoću diferencijalnog brojača krvnih stanica (Diffcount III, Modulus Data Systems, inc., New York, NY, SAD). Tako je za svakog ispitanika dobiven ukupni zbroj svakog analiziranog fenotipa u 1 mm². Preparati su i fotografirani digitalnim fotoaparatom Olympus

DP26 (Olympus, Tokyo, Japan) u deset nasumično odabranih polja bez preklapanja pri povećanju od 1000x za dokumentaciju.

EBER *in situ* hibridizacija urađena je automatski na stroju Ventana Ultra Benchmark uporabom EBER oligoprobe (INFORM EBER Probe, Ventana Roche, Tucson, AZ, SAD) i sustava za detekciju (ISH iView Blue Detection Kit, Ventana Roche, Tucson, AZ, SAD). Pozitivna reakcija bila je crno-plavo nuklearno bojenje HRS stanica, uz EBV-pozitivan nazofaringealni karcinom kao pozitivnu kontrolu, dok je negativna kontrola bio preparat u kojem je u procesu bojenja izostavljena EBER proba. Pozitivni nuklearni EBER signal u jednoj ili više HRS stanica smatran je dokazom prisutnosti EBV-a i tumor određen kao EBV-pozitivni KHL.

3.2.3. Statistički postupci

Za statističku analizu primijenjen je softver Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (verzija 19 za Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, SAD). Kvalitativne varijable opisane su kao apsolutni brojevi i postoci. Za opis distribucije kvantitativnih varijabli korišteni su medijani, donji i gornji kvartil te min–max vrijednosti. Za normalno distribuirane kontinuirane varijable primijenjen je t-test, a za nenormalno distribuirane kontinuirane varijable korišten je neparametarski Mann–Whitney U test i Kruskal–Walls s *pairwise post hoc*. Za usporedbu kategoriziranih varijabli korišten je χ^2 test. Korelacija je procijenjena Pearsonovim koeficijentom korelacije. Za analizu PFS-a i OS-a korišteni su Kaplan-Meierova krivulja i log-rank test, kao i Coxova univarijatna i multivarijatna regresijska analiza i ROC analiza. Razina značajnosti razlike bila je $p \leq 0,05$.

Etičko odobrenje

Ova studija zadovoljila je etičke standarde Institucionalnog i nacionalnog istraživačkog odbora i Helsinšku deklaraciju iz 1964. i njezine naknadne izmjene ili usporedive etičke standarde. Zavodsko vijeće KBC-a Split odobrilo je studiju (500-03/19-01/77; datum odobrenja: 30. rujna 2019.).

4. REZULTATI

4.1. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika

Studija je provedena na 182 ispitanika s kHL, 86 (47%) žena i 96 (53%) muškaraca, u dobi od 5 do 87 godina, prosječne dobi 39 ± 19.16 godina, medijan 35, raspon 5-87 godina. Kliničko-patološke kvalitativne varijable su prikazane na tablici 3.

Tablica 3. Vrijednost praćenih kvalitativnih varijabli u ispitanika s klasičnim Hodgkinovim limfomom.

VARIJABLA		N (%)
Spol	ženski	86 (47)
	muški	96 (53)
Podtip	nodularna skleroza	124 (68,1)
	miješana celularnost	44 (24,2)
	limfocitima-bogat	8 (4,4)
	limfocitna deplecija	6 (3,3)
EBV	pozitivni	51 (28)
	negativni	130 (72)
Stadij	I	21 (13,8)
	II	70 (46,1)
	III	37 (24,3)
	IV	24 (15,8)
B simptomi	ne	72 (46,7)
	da	82 (53,2)
Relaps	ne	96 (52,7)
	da	28 (15,4)
	nepoznat	58 (31,9)
Status	živ	116 (63,7)
	mrtav	36 (19,8)
	nepoznat	30 (16,6)

Najčešći podtipovi bili su NS i MC (68% i 24%). 51 ispitanik (28%) je imao EBV-pozitivan kHL. Tijekom razdoblja praćenja, 28 (15,4%) ispitanika je imalo relaps, a 36 (19,8%) ih je umrlo.

U tablici 4. prikazane su vrijednosti fenotipova analiziranih stanica u mikrookolišu kHL na 10 vidnih polja velikog povećanja (1000x).

Tablica 4. Fenotipovi T stanica u mikrookolišu klasičnog Hodgkinovog limfoma

VARIJABLA	Srednja vrijednost (SD)	Medijan(Q1-Q3)min-max
FOXP3	468±428	327(Q1-Q3) 153-707 min-max 17-2368
CD8	555±434	435(Q1-Q3) 266-707 min-max 33-2899
FOXP3/CD8	23.9±51	8(Q1-Q3) 2-24 min-max 0-431
CD4	2037±1141	1898(Q1-Q3) 995-2962 min- max 4-5318
FOXP3/CD4	404±402	263(Q1-Q3) 110-599 min-max 16-2355

4.2. Kliničko patološki pokazatelji prema EBV statusu klasičnog Hodgkinovog limfoma

Ispitanici s EBV-pozitivnim kHL-om bili su 20,5 (95% CI 12,5-35) godina stariji od ispitanika s EBV-negativnim kHL-om ($Z = 4,8$; $p < 0,001$) (Tablica 5). Distribucija prema podtipovima također je bila različita u odnosu na EBV status kHL-a ($\chi^2 = 42$; $p < 0,001$). U skupini s EBV-pozitivnim kHL-om nije bilo ispitanika s podtipom LR. Među ispitanicima s NS bilo je dva puta više EBV negativnih slučajeva u odnosu na EBV pozitivnu NS.

Distribucija ispitanika prema stadiju bolesti razlikovala se u odnosu na EBV status kHL-a na razini značajnosti od 91% ($\chi^2 = 6,5$; $p = 0,089$). Kako je stadij I bolesti analiziran u odnosu na ostale (II, III i IV), potvrđena je statistički značajna povezanost stadija I s EBV-pozitivnim statusom ($\chi^2 = 4,5$; $p = 0,033$). Distribucija ispitanika prema preživljenju (živ/mrtav) bila je različita u odnosu na EBV status ($\chi^2 = 6,5$; $p = 0,038$). Udio umrlih u EBV-pozitivnom kHL-u

bio je dvostruko veći nego u EBV-negativnom kHL-u. Medijan FOXP3 stanica bio je 268 (95% CI 38-471), viši u EBV-pozitivnom kHL-u nego u EBV-negativnom kHL-u ($Z = 1,95$; $p = 0,049$). Medijan CD8 T stanica bio je 257 (95% CI 69-372), viši u EBV-pozitivnom kHL-u nego u EBV-negativnom kHL-u ($Z = 3,33$; $p = 0,001$). EBV status kHL-a nije bio povezan s FOXP3/CD8 T stanicama ($Z = 1,30$; $p = 0,193$), CD4 T stanicama ($Z = 0,158$; $p = 0,875$) ili FOXP3CD4+ stanicama ($Z = 1,64$; $p = 0,100$).

Tablica 5. Broj (%) ispitanika prema kvalitativnim varijablama i medijan (Q1–Q3; min–max) kvantitativnih varijabli prema EBV statusu klasičnog Hodgkinovog limfoma.

VARIJABLA		EBV-pozitivan (N=51)	EBV-negativan (N=131)	p
spol	ženski	22 (43)	64(49)	0,631
	muški	29 (57)	67(51)	
dob	godine	54.5 (37-68;6-87)	31(21-46;5-86)	<0,001
podtip	NS	20 (39,3)	104 (80)	<0,001
	MC	27 (52,9)	16 (12,3)	
	LR+LD	4 (7,8)	10 (10,7)	
B simptomi	ne	21 (55)	50 (43)	0,282
	da	17 (44)	65 (57)	
Stadij	I	9 (24,3)	12 (10,4)	0,089
	II	13 (35,1)	57 (49,6)	
	III	11(29,7)	26 (22,6)	
	IV	4 (10,8)	20 (17,4)	
Status	živ	26 (51)	89 (68,5)	0.038
	mrtav	16 (31,4)	20 (15,4)	
	nepoznat	9 (17,6)	21 (16,2)	
FOXP3	***	560(183-902;22-1413)	292(150-536;17-2368)	0,049
CD8	***	620(386-893;33-2899)	363(246-603;55-1509)	0,001

FOXP3/CD8	***	12(2,7-37;0-280)	7(2-20;0-431)	0,193
CD4	***	2009(968-2919;587-4221)	1802(995-3053;4-5318)	0,875
FOXP3/CD4	***	348.5(115-772;16-1347)	223(109-480;16-2355)	0,1

* χ^2 test, ** Mann–Whitneyev U test.

Legenda: EBV Epstein–Barr virus; ***(Q1 donji kvartil; Q3, gornji kvartil; min-max) NS, nodularna skleroza; MC, miješana celularnost; LR, bogat limfocitima; LD, limfocitna deplecija.

4.3. Kliničko-patološki pokazatelji prema EBV statusu najčešćih podtipova klasičnog Hodgkinovog limfoma

Usporedbom NS i MC kao najčešćih podtipova kHL nađeno je da se broj CD8+ T limfocita razlikuje ovisno o EBV statusu ($\chi^2 = 19,1$; $p < 0,001$) (Tablica 6).

Tablica 6. Vrijednosti (medijan i raspon) analiziranih fenotipova T stanica u mikrookolišu NS i MC u odnosu na EBV status

FENOTIP	EBV- pozitivni kHL		EBV-negativni kHL		p*
	NS	MC	NS	MC	
CD8	70 (160-2899)	500 (33-2600)	336 (55-1509)	558 (142-1433)	0,001
CD4	1893 (587-4221)	1994 (859-4100)	1727 (4-5318)	1402 (779-4946)	0,908
FOXP3	329 (22-412)	573 (39-1324)	316 (19-368)	163 (17-982)	0,035
FOXP3/CD8	13 (0-218)	10 (0-117)	7 (0-431)	13 (0-57)	0,607
FOXP3/CD4	270 (16-1347)	558 (35-1144)	273 (18-2355)	143 (16-878)	0,041

* Kruskal-Wallisov test. Legenda: EBV Epstein-Barr virus NS nodularna skleroza MC miješana celularnost.

U EBV-negativnoj NS bilo je manje CD8 T limfocita nego u EBV-pozitivnoj NS ($p < 0,01$), EBV-negativnoj MC ($p = 0,035$) i EBV-pozitivnoj MC ($p = 0,026$). Također, broj FOXP3 stanica razlikovao se u NS i MC s obzirom na EBV status ($\chi^2 = 8,6$; $p = 0,035$). U EBV-negativnoj MC bilo je značajno manje FOXP3 stanica nego u EBV-pozitivnoj MC ($p = 0,004$), EBV-negativnoj NS ($p = 0,034$) ili EBV-pozitivnoj NS ($p = 0,039$). Broj FOXP3/CD4 T stanica je bio značajno različit u NS i MC s obzirom na EBV status ($\chi^2 = 8,2$; $p = 0,041$); u EBV-negativnoj MC broj FOXP3/CD4 T stanica je bio manji nego u EBV-pozitivnoj MC ($p = 0,004$), EBV-negativnoj NS ($p = 0,034$) i EBV-pozitivnoj NS ($p = 0,073$). S obzirom na EBV status, između NS i MC nije bilo značajne razlike u broju CD4 T limfocita ($\chi^2 = 0,551$; $p = 0,908$) i FOXP3/CD8 T limfocita ($\chi^2 = 1,8$; $p = 0,607$). U EBV-pozitivnom kHL bio je značajno veći broj FOXP3 stanica, CD8 i FOXP3/CD4 stanica u odnosu na EBV-negativni kHL.

4.4. Kliničko patološki pokazatelji u odnosu na relaps klasičnog Hodgkinovog limfoma

28 ispitanika imalo je relaps bolesti (Tablica 7). Nađena je značajna povezanost relapsa bolesti s B simptomima ($\chi^2 = 5,8$; $p = 0,016$) i statusom preživljenja ($\chi^2 = 17,7$; $p < 0,001$). Rizik od smrti bio je 3,4 puta veći (95% CI 1,3-8,8; $p = 0,011$) u skupini ispitanika sa B simptomima u odnosu na ispitanike bez B simptoma i 10,3 puta veći (95% CI: 3,2-32; $p < 0,001$) u ispitanika sa relapsom nego u ispitanika bez relapsa. Nije nađena povezanost relapsa sa spolom ($\chi^2 = 0,038$; $p = 0,846$), podtipom ($\chi^2 = 1,76$; $p = 0,416$), EBV statusom ($\chi^2 = 0,001$; $p = 0,978$) i stadijem ($\chi^2 = 5,6$; $p = 0,134$). Analizirani fenotipovi T stanica nisu bili povezani s relapsom: FOXP3 ($Z = 1,1$; $p = 0,268$), CD8 ($Z = 0,266$; $p = 0,790$), FOXP3/CD8 ($Z = 0,329$; $p = 0,742$), CD4 ($Z = 1,68$; $p = 0,94$) i FOXP3/CD4 ($Z = 0,628$; $p = 0,530$).

Tablica 7. Broj (%) ispitanika s klasičnim Hodgkinovim limfomom prema kvalitativnim i kvantitativnim varijablama (medijan (Q1–Q3; min–max) u odnosu na relaps.

RELAPS				
VARIJABLA	ne (N=96)	da (N=28)	p	OR (95% CI); p***
Spol			0,846*	
ženski	46 (48)	14 (50)		
muški	50 (52)	14 (50)		
Dob	32(22-50;10-83)	33(20-49;13-86)	0,894**	
Podtip			0,416*	
NS	67(69,8)	23(82,1)		
MC	25(26)	4(14,3)		
LR+LD	4(4,2)	1(3,6)		
EBV status			0,978*	
pozitivan	24(25)	7(25)		
negativan	71(75)	21(75)		
Stadij			0,134*	
I	15(16)	0		
II	44(46,8)	15(53,6)		
III	18(19,1)	8(28,6)		
IV	7(18,1)	5(17,9)		
B simptomi			0,016*	3,4(95%CI 1,3-8,8; p=0,011)
ne	50(53,2)	7(25)		
da	44(46,8)	21(75)		
Status			<0,01*	10,3(95% CI:3,2-32); p<0,001
živ	84(87,5)	15(53,6)		
mrtav	6(6,2)	11(39,3)		
nepoznat	6	2		
FOXP3	299(124-627; 17-1960)	263(82-379; 40-1560)	0,268**	
CD8	362(246-542; 33-2899)	342(245-531; 167-1509)	0,790**	

FOXP3/CD8	12(5-27; 0-431)	10(14-23; 1-92)	0,742**
CD4	1385(946-2381; 4-4946)	1006(871-1399; 377-3691)	0,94**
FOXP3/CD4	202(84-494; 16-1514)	188(72-331; 19-1564)	0,530**

* χ^2 test, ** Mann–Whitney U test, *** logistička regresija. Legenda: NS, nodularna skleroza; MC, miješana celularnost; LR, bogat limfocitima; LD, smanjen broj limfocita; Q1, donji kvartil; Q3, gornji kvartil; CI, interval pouzdanosti.

Multipla Coxova regresijska analiza, u koju su uključeni FOXP3 i CD4, potvrdila je povezanost između broja CD4 T stanica u tumorskom mikrokolišu i pojave relapsa (Tablica 8).

Tablica 8. Rezultati multiple regresijske analize

VARIJABLA	HR (95% CI); p*
CD4	4,8(1,7-13); 0,002
FOXP3	1,5(0,7-3,5); 0,312

* multipla regresijska analiza Legenda: HR, omjer rizika; CI, interval pouzdanosti.

4.5. Kliničko patološki pokazatelji i B simptomi u klasičnom Hodgkinovom limfomu.

Povezanost analiziranih varijabli s B simptomima prikazana je u tablici 9. B simptomi su povezani s podtipom ($\chi^2 = 6,6$; $p = 0,037$), stadijem ($\chi^2 = 22$; $p < 0,037$), statusom preživljenja ($\chi^2 = 4,1$; $p = 0,043$) i brojem CD4 stanica ($Z = 2,4$; $p = 0,017$). Nije nađena povezanost s dobi ($Z = 0,046$; $p = 0,963$), EBV statusom ($\chi^2 = 1,15$; $p = 0,282$), brojem FOXP3 ($Z = 0,322$; $p = 0,747$), CD8 ($Z = 1,84$; $p = 0,066$), FOXP3/CD8 ($Z = 0,116$; $p = 0,246$), odnosno FOXP3/CD4 stanica ($Z = 0,020$; $p = 0,984$). Udio umrlih bolesnika bio je 2,3 puta veći u skupini ispitanika s B simptomima nego u skupini bez B simptoma. Udio bolesnika s I stadijem bolesti bio je 7 puta veći u skupini bez B simptoma nego u skupini s B simptomima. U skupini bez B simptoma bilo je 2,2 puta više ispitanika s MC nego u skupini s B

simptomima. Udio ispitanika sa stadijem III bio je 2,3 puta veći u skupini s B simptomima nego u skupini bez B simptoma. Udio ispitanika sa stadijem IV bio je 2,1 puta veći u skupini s B simptomima nego u skupini bez B simptoma. Medijan CD4 stanica bio je 553 viši u skupini bez B simptoma nego u skupini s B simptomima.

Tablica 9. Broj (%) bolesnika s klasičnim Hodgkinovim limfomom prema kvalitativnim i kvantitativnim varijablama (medijan (Q1–Q3; min–max) u odnosu na B simptome.

VARIJABLA	B simptomi		
	ne (N=72)	da (N=82)	p
Spol			0,258*
ženski	40(56)	37(45)	
muški	32(44)	45(55)	
Dob (godine)	35(24-51;5-78)	35(22-50;13-86)	0,963**
Podtip			0,037*
NS	45(62,5)	65(79,3)	
MC	23(31,9)	12(14,6)	
EBV			0,282*
pozitivan	21(30)	17(21)	
negativan	50(70)	65(79)	
Stadij			<0,001*
1	18(25,4)	3(3,7)	
2	36(25,7)	35(42,7)	
3	10(14,1)	27(32,9)	
4	7(9,9)	17(20,7)	
Status			0,043*
živ	57(88)	49(72)	
mrtav	8(12)	19(28)	
FOXP3	310(138-795; 17-1960)	327(137-548; 22-1560)	0,747**

CD8	459(277-687;55- *** 2899)	346(243- 593;33-1722)	0,066**
FOXP3/CD8	12,5(3-28;0-431) ***	8(2-22;0- 126)	0,246**
CD4	1899(1099- *** 3048;581-5318)	1346(867- 2510;4-4241)	0,017**
FOXP3/CD4	209(101-599;16- *** 1514)	274(108- 528;16-1564)	0,984**

* χ^2 test, ** Mann Whitney U test,

Legenda: cHL, klasični Hodgkinov limfom; NS, nodularna skleroza; MC, miješana celularnost; *** (medijan, donji kvartil, gornji kvartil; minimum - maksimum).

4.6. Kliničko patološki pokazatelji prema vremenu bez progresije bolesti u klasičnom Hodgkinovom limfomu

Medijan praćenja ispitanika bio je 132 (min-max 1-285 mj). Tijekom razdoblja praćenja, 155 ispitanika nije imalo relaps, a 28 ispitanika je doživjelo relaps, s medijanom PFS-a od 8 (min-max, 1–63) mjeseci. Analizirane su varijable prema PFS-u svih ispitanika (Tablica 10).

Tablica 10. Preživljenje bez progresije bolesti ispitanika s klasičnim Hodgkinovim limfomom u odnosu na analizirane varijable.

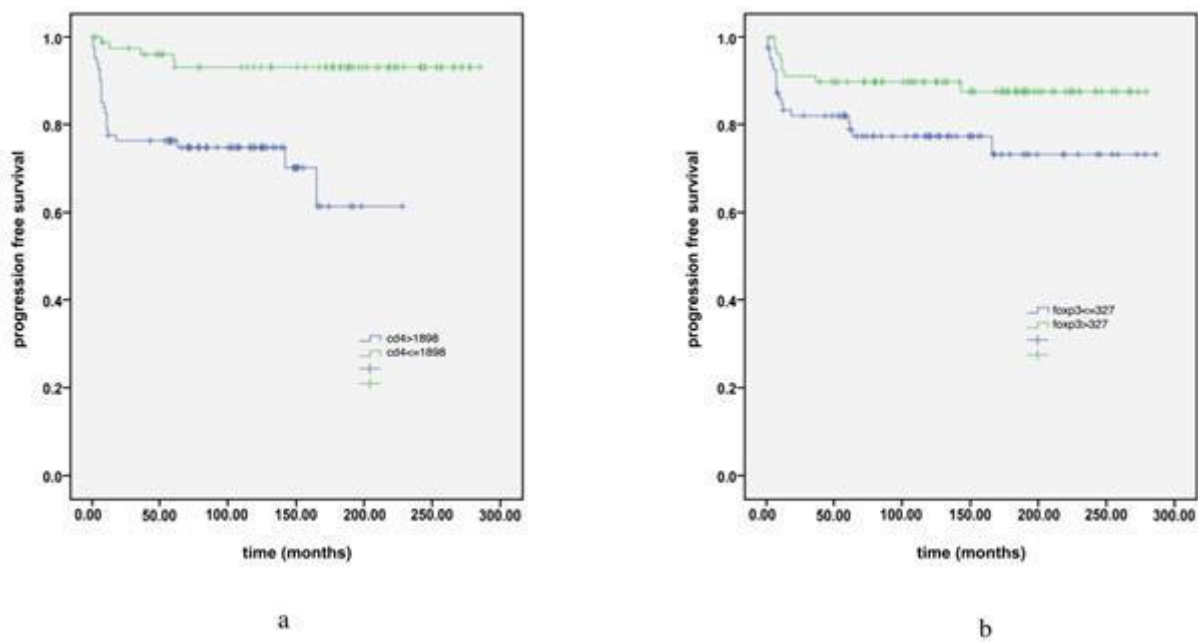
VARIJABLA	PFS (mjesec)		p*	HR(95% CI); p
	Medijan (SE;	95%CI)		
Spol			0,998	
	ženski	237(11;1;215- 260)		
	muški	232(12(;209- 255)		
Dob			0,734	
	≤35 godina	236(11;213-258)		

	>35 godina	230(11;208-252)		
Podtip			0,182	
	NS	223(10;202-243)		
	MC	244(13;218-269)		
Epstein-Barr virus-			0,994	
	pozitivni	227(15;197-257)		
	negativni	236(9;217-256)		
Stadij			0,875	
	I*	/		
	II	217(14;190-245)		
	III	198(20;158-238)		
	IV	175(17;141-209)		
FOXP3			0,039	2,3(1-5); 0,046
	≤327	219(13;193-246)		
	>327†	247(9;229-246)		
CD8			0,214	
	≤435	217(12;194-240)		
	>435	248(11;227-269)		
FOXP3/CD8			0,750	
	≤8	235(12;211-258)		
	>8	228(11;27-250)		
CD4			<0,001	5,5(2-14,7);0,001
	≤1898	163(12;140-187)		
	>1898†	267(7;253-272)		
FOXP3/CD4			0,104	
	≤263	223(13;196-249)		
	>263	244(10;224-264)		

* LR, Log rank test. Legenda: PFS vrijeme do progresije bolesti HR, omjer rizika; CI, interval pouzdanosti; † referentni nivo, ** ni jedan relaps

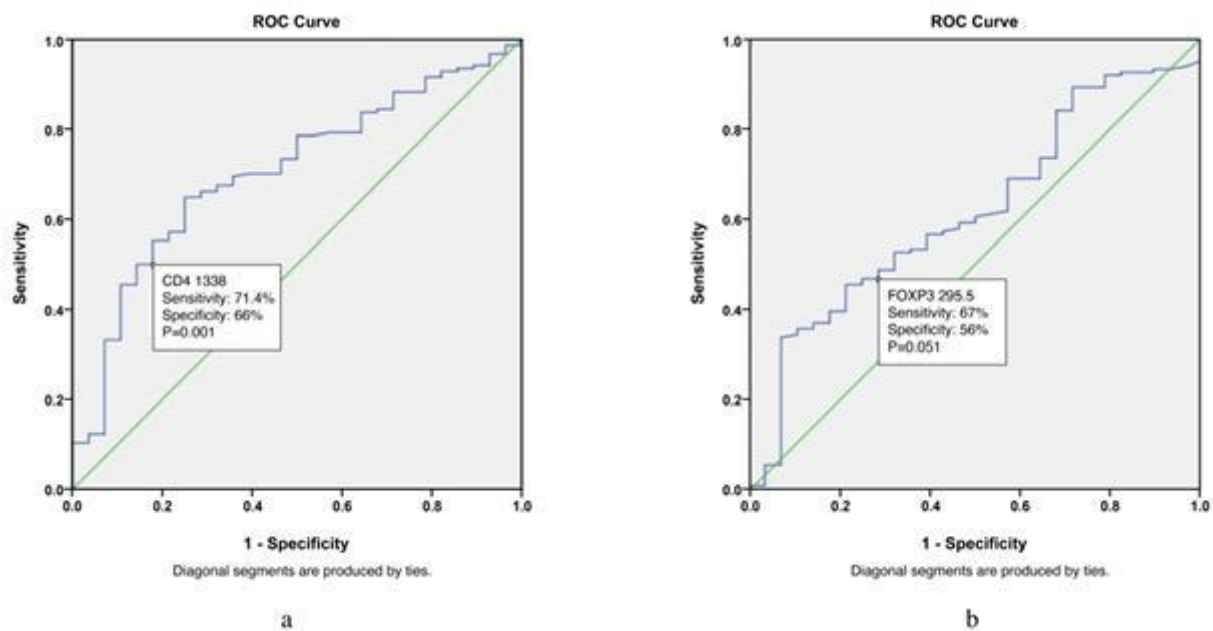
Nađena je značajna povezanost između broja CD4 i FOXP3 stanica i preživljenja bez progresije bolesti. Omjer rizika bio je 5,5 puta manji u ispitanika s brojem CD4 ≤ 1899 nego u ispitanika s CD4 >1899 (LR 14,1; $p = 0,001$). Također, omjer rizika za progresiju bolesti je bio 2,3 puta niži u ispitanika s FOXP3 ≤ 327 nego u ispitanika s FOXP3 >327 (LR 4,3; $p = 0,046$). Nije utvrđena povezanost PFS-a sa spolom (LR 0; $p=0,998$), dobi (LR 1,8; $p= 0,182$), podtipom (LR 1,8; $p=0,182$) i stadijem (LR 0.267; $p=0.875$), kao i medijanom CD8 (LR 1,5; $p=0,214$), FOXP3/CD8 (LR 0,101; $p=0,750$) i FOXP3/CD4 (LR 2,6; $p=0,104$).

Na Slici 13. prikazana je povezanost fenotipova CD4 i FOXP3 s PFS. U ispitanika s ≤ 1899 CD4 stanica u 1 mm² je PFS iznosio 163,5 mjeseci (140,4–186,7), a u ispitanika s >1899 CD4 stanica 267,4 mjeseci (252,6–282,3) (logaritamski rang 14 079; $p > 0,001$).



Slika 14. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja bez progresije bolesti u najčešćih podtipova klasičnog Hodgkinovog limfoma prema vrijednostima nižim i višim od medijana CD4 (a) i FOXP3 (b).

Za određivanje praga vrijednosti CD4 i FOXP3 u ispitanika sa i bez relapsa korištena je ROC analiza (Slika 15).



Slika 15. Granične vrijednosti od 1338 za CD4 (a) i 295,5 za FOXP3 (b) razlikuju ispitanike sa i bez relapsa klasičnog Hodgkinovog limfoma.

Granična vrijednost CD4 za određivanje ispitanika sa i bez relapsa bila je 1338, s osjetljivošću od 71,4% i specifičnošću od 66% (područje: 0,705; SE: 0,049; 95% CI 0,608–0,802; $p = 0,001$). Granična vrijednost FOXP3 za određivanje ispitanika sa i bez relapsa bila je 295,5 s osjetljivošću od 60,7% i specifičnošću od 56% (područje: 0,616; SE 0,054; 95% CI 0,509–0,722; $p = 0,051$).

OS je bio 158 (5,6); 147-169 mjeseci. Umrlo je 36 ispitanika. PFS u skupini živih ispitanika bio je 95 mjeseci duži nego u skupini umrlih (LR 10,2; $p = 0,006$). Živi ispitanici bez B simptoma imali su 64 mjeseca dulje PFS od ispitanika bez B simptoma (LR 6,8; $p = 0,009$). Povezanost relapsa s OS-om prikazana je u tablici 11.

Tablica 11. Povezanost relapsa s ukupnim preživljenjem ispitanika s klasičnim Hodgkinovim limfomom

RELAPS	PREŽIVLJENJE (mjeseci)				UMRLI
	N	Srednja vrijednost (SE)	95% CI	LR; p	
				26,6; <0,001	
ne	90	241 (6,4)	22,8-253		6
da	25	119 (16)	87-151		10
nepoznato	40	198 (16,5)	165-230		18

* LR, Log rang; SE, standardna pogreška; CI, interval pouzdanosti.

Ispitanici sa relapsom imali su kraći OS (LR 26,6; $p > 0,001$).

4.7. Korelacija podtipova klasičnog Hodgkinovog limfoma s životnom dobi i brojem T stanica različitog fenotipa u mikrookolišu

U 102 ispitanika istražena je povezanost dobnih skupina s brojem analiziranih fenotipova T limfocita po kvartilima (Tablica 12). Utvrđeno je da su ispitanici mlađi od 26,5 godina imali u tumorskom imunom mikrookolišu veći broj CD4 stanica nego ispitanici u dobi od 26,5-36 godina ($\chi^2=21,890$, $p=0,009$). Razlika po dobi nije utvrđena za FOXP3 ($\chi^2 =9,650$; $p=0,380$), CD8 ($\chi^2 =11,148$; $p=0,266$) i FOXP3/CD8 ($\chi^2 =1,117$; $p=0,773$).

Tablica 12. Povezanost analiziranih T staničnih fenotipova u mikrookolišu KHL sa životnom dobi

T stanice	N	DOB (godine)				<i>p</i> *
		<26,5 N=25(%)	26,5-36 N=27(%)	36,1-54 N=26(%)	>54 N=24(%)	
	<227,75	7 (28)	3 (11)	10 (39)	5 (21)	

FOXP3	227,75-	8 (32)	6 (22)	7 (27)	5 (21)	0,380
	536,5	5 (20)	8 (30)	6 (23)	7 (29)	
	536,55-	5 (20)	10 (37)	3 (11)	7 (29)	
	902 >902,1					
CD8	<293	8 (32)	10 (37)	4 (15)	3 (12)	0,266
	293,1-	6 (24)	7 (26)	8 (31)	5 (21)	
	656,5	3 (12)	5 (18,5)	8 (31)	10 (42)	
	656,5-	8 (32)	5 (18,5)	6 (23)	6 (25)	
	1056,5 >1056,5					
FOX/CD8	0	1 (4)	27(100)	1 (4)	1 (4)	0,773
	0,0001-4	24 (96)		25 (96)	23(96)	
	4001-					
	30,75 >30,75					
CD4	<2363	6 (24)	7 (26)	4 (15)	8 (33)	0,009
	2363,1-	9 (36)	13 (48)	8 (31)	5 (21)	
	2920,5	10 (40)	4 (15)	6 (23)	7 (29)	
	2920,5-		3 (11)	8 (31)	4 (17)	
	3464 >3464,1					
FOX/CD4	<188,75	6 (24)	4 (15)	9 (35)	6 (25)	0,407
	188,75-	9 (36)	5 (18)	8 (31)	4 (17)	
	414,5	5 (20)	8 (30)	6 (23)	7 (29)	
	414.5-	5 (20)	10 (37)	3 (11)	7 (29)	
	811,75 >811,75					

* χ^2 test

5. RASPRAVA

HL je relativno čest, specifičan i prognostički obično povoljan zloćudni tumor. Od Hodgkinova opisa „upalne granulomatoze“ pred skoro dva stoljeća pa do danas, nisu riješene sve enigme vezane uz HL (1,13). Podrijetlo HRS utvrđeno je 90-ih godina prošlog stoljeća izolacijom i genetskom analizom pojedinačnih HRS stanica, kad je dokazano da se radi o zloćudno transformiranim B limfocitima iz germinativnog centra (16). Stanice mikrokoliša osiguravaju HRS stanicama signale za preživljenje (2,27). Među njima su brojne Treg stanice koje su dijelom odgovorne za protutumorsku anergiju kao specifičnost HL-a (83).

U našem uzorku od 182 ispitanika, 51 (28%) ispitanik imao je EBV- pozitivni cHL dokazan *in situ* hibridizacijom EBER. Značajno češće su EBV- pozitivni HL imali stariji ispitanici ($p < 0,001$) i ispitanici s podtipom MC ($p < 0,001$), što je u skladu s dosadašnjim studijama (1,5). EBV- pozitivni kHL je bio značajno češći u skupini umrlih ispitanika ($p = 0,038$), a postoji granična povezanost sa stadijem bolesti na razini značajnosti $p = 0,089$. Medijan FOXP3 stanica od 268 (95% CI 38-471) je veći kod EBV- pozitivnih kHL nego kod EBV- negativnih kHL ($p = 0,051$). Medijan CD8 je veći u skupini EBV- pozitivnih kHL nego u EBV- negativnih kHL ($p = 0,001$). Nije dokazana statistički značajna povezanost EBV statusa s CD4 ni FOXP3/CD4. Distribucija FOXP3/CD8 limfocita među ispitanicima je bila varijabilna i nije pronađena statistički značajna povezanost.

U istraživanju smo kao biljeg Treg stanica koristili FOXP3 jer su prema literaturi intratumorske Treg uglavnom timusnog podrijetla i izražavaju FOXP3, Helios i Neuropilin, a rjeđe su prisutne pTreg stanice koje, uostalom, mogu biti FOXP3 negativne (74,75). Međutim, ne smije se zanemariti doprinos pTreg u tumorima pa tako i u kHL. Morales sa suradnicima je dokazao da su u mikrokolišu EBV- pozitivnog kHL brojnije pTreg i to Tr1 podvrsta FOXP3 negativnih Treg koje proizvode IL10 zbog djelovanja proteina EBV na transkripciju gena (88). FOXP3 pozitivne Treg u kHL-u su „vrh ledene sante“ u populaciji regulacijskih stanica. Stoga bi vrijedilo susljedno analizirati sve podvrste Treg stanica u mikrokolišu kHL i njihov doprinos imunosupresiji jer se radi o staničnim populacijama s različitim biljezima i mehanizmom djelovanja, a kHL ne slijedi dinamiku većine tumora.

Mikrokoliš kHL je bogat Treg stanicama, što može dijelom objasniti neuspjeh imunološke eliminacije malobrojnih HRS u obilnom limfocitnom okruženju (3,4,21,83,89). HRS izražava biljege CCL17, CCL22, Galectin 1 i MIP3 α kojima selektivno privlači Treg u mikrokoliš (2,84,86). U EBV- pozitivnom kHL, EBNA1 dovodi do izražaja CCL20 na HRS i povećane

migracije FOXP3- pozitivnih Treg u mikrookoliš (87). Mnogi autori nisu našli povezanost između FOXP3 stanica i EBV statusa HL (3,21,83,87). U našem prethodnom istraživanju utvrdili smo povezanost EBV statusa s brojem CD4/FOXP3 stanica u mikrookolišu kHL, a u ovom istraživanju graničnu povezanost između EBV statusa kHL i brojnosti FOXP3 pozitivnih stanica (92). U studiji Assisa i sur. na 130 ispitanika s kHL analizirane su Treg stanice u tumorskom mikrookolišu i utvrđeno da pozitivni EBV status korelira s povećanim brojem FOXP3 Treg stanica (CD4+CD25+FOXP3+), čiji broj nije povezan s kliničkim pokazateljima i preživljenjem (4). Baumforth i suradnici su dokazali izravni utjecaj EBV na brojnost FOXP3 Treg stanica u kHL, ali za razliku od nas nisu našli razliku u broju Treg između EBV- pozitivnih i EBV- negativnih slučajeva, moguće zbog malog uzorka koji je uključio 23 ispitanika i 3 stanične linije (87). U našem uzorku, u EBV- negativnom kHL našli smo manje neregulacijskih CD4 limfocita, iako razlika nije bila statistički značajna. To se, prema radu Poppema i suradnika, može objasniti izostankom djelovanja EBNA1 na migraciju Treg (FOXP3+CD4+) u mikrookoliš kHL (27). Citotoksični CD8 limfociti su općenito slabije zastupljeni u mikrookolišu kHL u odnosu na CD4 limfocite (12). Naši rezultati pokazali su da mikrookoliš EBV- pozitivnog kHL sadrži više CD8 limfocita u odnosu na EBV- negativni kHL, što je posljedica antigenog stimulansa proteina EBV-a. Proteini rane litičke EBV infekcije su najjači stimulatori za citotoksični T stanični odgovor. U latentnim infekcijama i EBV- pozitivnim tumorima je slabiji specifični citotoksični odgovor na LMP1 (20% slučajeva) i LMP 2 (50% slučajeva) (43,93-95). U kHL je citotoksični odgovor na HRS nedovoljno učinkovit zbog slijedećih razloga. EBNA1 je slabo imunogena jer se samo njeni djelovi mogu biti prezenirani u sklopu MHC II (34,95). HRS smanjuju izražaj MHC I molekule potrebne za prezentaciju virusnih antigena CD8 T limfocitima. Mikrookoliš bogat Th2 pomoćničkim limfocitima luči citokine koji suprimiraju CD8 T stanični odgovor. IL-10 i TGFβ koje luče HRS stanice i Treg limfociti djeluju supresivno na CD8 T stanice. HRS stanica razvija mehanizme otpornosti na uništenje CD8 limfocitima koje je posredovano granzimom i perforinom (93,97). Kyasu i suradnici analizirali su HIV- pozitivne imunosuprimirane ispitanike s EBV-pozitivnim kHL. Ispitanici su imali manje FOXP3 Treg pozitivnih stanica i više CD8 limfocita nego kontrola u kojoj su bili imunokompetentni HIV- negativni ispitanici s kHL. Slično našim rezultatima, u kontroli su ispitanici s EBV- pozitivnim HL imali veći broj FOXP3 Treg stanica i CD8 stanica nego EBV- negativni kHL. Autori smatraju da CD8 T odgovor ne predstavlja CD8 T limfocite specifične za LMP1 nego anergične T stanice (98). Povećani broj CD8 stanica u EBV- pozitivnom kHL moguće nije

antiviralni odgovor, nego populacija regulacijskih stanica (FOXP3 negativnih?) koje ne proizvode granzim ni perforin pa su neučinkovite (58).

U našem istraživanju pokazali smo da FOXP3 može biti izražen i u CD8 limfocitima, ali je distribucija tih stanica vrlo varijabilna i nije nađena statistički značajna povezanost s drugim praćenim varijablama. Populacija CD8 regulacijskih limfocita je sigurno „podcjenjena“ uporabom FOXP3 kao jedinog biljega i potrebno je više biljega za određivanje njihova udjela u mikrookolišu kHL (69,99). U kHL-u CD8 Treg limfociti ne proizvode granzim i perforin pa su funkcionalno anergični kao i CD4 Treg limfociti (58,59). U prethodnom istraživanju utvrdili smo da broj CD4 limfocita opada nakon 26. godine života, što se može objasniti normalnim procesom imunološkog starenja, dok broj Treg ostaje nepromijenjen. Timusna proizvodnja Tef i Treg smanjuje se tijekom starenja (65). Unatoč tome, broj Treg stanica se ne mijenja tijekom života, što se objašnjava perifernom pretvorbom naivnih limfocita u Treg. Međutim je njihova učinkovitost upitna unatoč konstantno održanom broju jer proizvode manje imunosupresivnih citokina (63,67). Time bi se mogla objasniti povećana učestalost upalnih bolesti i tumora u starijih ljudi. S druge strane, Raynor i suradnici smatraju da se tijekom starenja povećava broj Treg stanica i da zbog toga dolazi do autoimunih bolesti i tumora (66). Naši rezultati bliži su hipotezama Dejaca i Fesslera jer nismo pronašli razlike u broju Treg stanica među različitim dobnim skupinama. Budući da je naša prethodna studija pokazala da mlađi bolesnici (<35 godina) s EBV pozitivnim kHL imaju dulji DFS, očekivali smo da ćemo u toj populaciji naći veći broj FOXP3 Treg u mikrookolišu; međutim takva korelacija nije nađena. Populacija Treg stanica u kHL je heterogena, sastavljena od FOXP3 pozitivnih i FOXP3 negativnih stanica, a pTreg su funkcionalno „plastične“ ovisno o mikrookolišu. Moguće je da dodatni i za sad nepoznati mehanizmi, osiguravaju bolju prognozu u mlađih ispitanika s EBV- pozitivnim kHL.

Uz FOXP3 regulacijske limfocite, danas se zna da u uspješnom izbjegavanju imunološkog odgovora u kHL ulogu ima i PD-L1/PD-1 osovina. PD-L1 je prekomjerno izražen na HRS stanicama, zbog amplifikacije ili posredovano onkoproteinom LMP-1 u EBV- pozitivnom kHL. Interakcija PD-L1 izraženog na HRS s PD-1 na limfocitima mikrookoliša posljedično „iscrpljuje“ T limfocit i dovodi do poremećenog imunološkog odgovora na tumorsku stanicu. Ovim mehanizmom značajan broj tumora progredira. Zadnjih desetljeća je PD-L1/PD-1 osovina u fokusu kliničkih studija u mnogim tumorima pa i kHL-u.

HRS putem različitih molekularnih mehanizama osigurava imunosupresivni okoliš i uspješno izbjegava antitumorski odgovor, a FOXP3 Treg predstavljaju samo dio kompleksne slagalice tog specifičnog tumora (19,82).

Na temelju ovog istraživanja možemo zaključiti da EBV ima utjecaj na sastav populacije T stanica u kHL-u, koju karakterizira više CD8, FOXP3 i FOXP3/CD4 T stanica. Vrijednosti iznad medijana FOXP3 i CD4 povezane su s dužim preživljenjem bez progresije bolesti. Vrijednost praga od 1338 za CD4 i 295,5 za FOXP3 mogla bi se koristiti za razgraničenje bolesnika s/bez relapsa.

6. ZAKLJUČCI

28% ispitanika imalo je EBV pozitivan kHL, koji je statistički povezan sa starijom dobi ($p < 0,001$), podtipom MC ($p < 0,001$) i češćim smrtnim ishodom ($p = 0,038$).

U podtipovima NS i MC s obzirom na EBV status postoji razlika u broju FOXP3 stanica ($p = 0,035$), CD8 stanica ($p = 0,001$) i FOXP3/CD4 stanica ($p = 0,041$).

Ispitanici mlađi od 26,5 godina imali su značajno više CD4 T limfocita u tumorskom mikrookolišu nego ispitanici u dobi od 26,5-36 godina ($\chi^2 = 21,890$, $p = 0,009$).

Nije nađena povezanost analiziranih fenotipova T limfocita sa stadijem bolesti i B simptomima.

Vrijednost veća od medijana FOXP3 i CD4 limfocita povezana je s dužim vremenom bez progresije bolesti ($p = 0,001$, odnosno $p = 0,046$).

Granične vrijednosti od 1338 za CD4 i 295,5 za FOXP3 razlikuju ispitanike sa i bez relapsa kHL ($p = 0,001$, odnosno $p = 0,051$).

Opće preživljenje povezano je s relapsom ($p = 0,001$) i postojanjem B simptoma ($p = 0,009$).

7. SAŽETAK

UVOD: U klasičnom Hodgkinovom limfomu (kHL) Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) stanice su okružene obilnim neučinkovitim tumorskim imunim mikrookolišem (TIM). U TIM-u ima regulacijskih T limfocita (Treg) odgovornih za toleranciju, od kojih tTreg podrijetla timusa izražavaju biljeg FOXP3. HRS često sadržavaju monoklonalni genom Epstein-Barr virusa (EBV) čiji latentni proteini utječu na sastav TIM-a. Analizirali smo broj i vrstu T limfocita koji izražavaju regulatorni biljeg FOXP3 s obzirom na EBV status kHL, podtip i mjere ishoda.

MATERIJALI I METODE: U uzorku su 182 ispitanika s kHL dijagnosticiranim 1997.-2018. i liječenih u KBC Split. Iz parafinskih blokova tumorskog tkiva izrezani su preparati i obojeni in situ hibridizacijom na EBER za dokaz EBV te dvostrukim imunohistokemijskim bojanjem na FOXP3 i CD4 odnosno CD8 za mikroskopsku analizu T staničnih fenotipova u 1 mm². Odabrana statistički značajna razlika je $p < 0.05$.

REZULTATI: 124 (68,1%) ispitanika imali su nodularnu sklerozu (NS) i 44 (24,2%) miješanu celularnost, dok su ostali podtipovi bili rijetki. EBV-pozitivan kHL je dokazan u 28% slučajeva, a povezan je sa starijom dobi ($p < 0,001$), MC ($p < 0.001$) i smrtnim ishodom ($p = 0,038$). U NS i MC s obzirom na EBV status postoji razlika u broju FOXP3 stanica ($p = 0,035$), CD8 stanica ($p = 0,001$) i FOXP3/CD4 stanica ($p = 0,041$). Ispitanici < 26,5 godina imaju više CD4 T limfocita u TIM-u nego ispitanici u dobi od 26,5-36 godina ($p = 0,009$). Vrijednost veća od medijana FOXP3 i CD4 limfocita povezana je s dužim vremenom bez progresije bolesti (PFS) ($p = 0,001$, odnosno $p = 0,046$).

ZAKLJUČAK: EBV-status kHL povezan je sa sastavom T stanica u TIM-u, među kojima broj T regulacijskih FOXP3+ stanica i CD4 T stanica utječe na PFS.

8. SUMMARY

Regulatory T lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma

INTRODUCTION: In classical Hodgkin lymphoma (cHL), Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) cells are surrounded by an abundant, ineffective tumor immune microenvironment (TIM). In the TIM there are regulatory T lymphocytes (Treg) responsible for tolerance, of which tTreg originating from the thymus express FOXP3. HRS often contain the Epstein-Barr virus (EBV) monoclonal genome, whose latent proteins affect the composition of TIM. We analyzed the number and type of T lymphocytes expressing the regulatory marker FOXP3 with respect to EBV status, subtype, and outcome measures.

MATERIALS AND METHODS: The sample includes 182 patients with cHL diagnosed in the period 1997-2018. and was treated at University Hospital Split. Slides were cut from paraffin blocks of tumor tissue and stained by in situ hybridization for EBER for evidence of EBV and double immunohistochemical staining for FOXP3 and CD4 or CD8 for microscopic analysis of T cell phenotypes in 1 mm². The statistically significant difference was $p < 0.05$.

RESULTS: Most patients, 124 (68.1%) had nodular sclerosis (NS) or mixed cellularity (MC), 4422 (24.2%). EBV-positive cHL was confirmed in 28% of cases and was associated with older age ($p < 0.001$), MC ($p < 0.001$) and death ($p = 0.038$). There is a difference in the number of FOXP3 cells ($p = 0.035$), CD8 cells ($p = 0.001$) and FOXP3/CD4 cells ($p = 0.041$) in NS and MC with regard to EBV status. Patients younger than 26.5 years had more CD4 T lymphocytes in TIM than patients aged 26.5-36 years ($p = 0.009$). Higher-than-median values of FOXP3 and CD4 lymphocytes were associated with longer progression-free time (PFS) ($p = 0.001$ and $p = 0.046$, respectively).

CONCLUSION: EBV-positive status of cHL affects the composition of T cell phenotypes in TIM, among which CD4 and FOXP3 counts are prognostically valuable.

9. POPIS LITERATURE

1. Jaffe ES, Stein H, Swerlow SH. Classic Hodgkin lymphoma. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele, J. 5. izd., WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Lyon: Lyon, France, 2024. str. 579-590.
2. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol.* 2010 Jul;221(3):248-63.
3. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, Bosch R, García JF, Jaén J i sur. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 15;11(4):1467-73.
4. Assis MC, Campos AH, Oliveira JS, Soares FA, Silva JM, Silva PB i sur. Increased expression of CD4+CD25 +FOXP3+ regulatory T cells correlates with Epstein-Barr virus and has no impact on survival in patients with classical Hodgkin lymphoma in Brazil. *Med Oncol.* 2012 Dec;29(5):3614-9.
5. Salati M, Cesaretti M, Macchia M, Mistiri ME, Federico M. Epidemiological Overview of Hodgkin Lymphoma across the Mediterranean Basin. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014 Jul 1;6(1).
6. Huang J, Pang WS, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE 3rd, Xu W i sur. Incidence, mortality, risk factors, and trends for Hodgkin lymphoma: a global data analysis. *J Hematol Oncol.* 2022 May 11;15(1):57.
7. Singh D, Vaccarella S, Gini A, De Paula Silva N, Steliarova-Foucher E, Bray F. Global patterns of Hodgkin lymphoma incidence and mortality in 2020 and a prediction of the future burden in 2040. *Int J Cancer.* 2022 Jun 15;150(12):1941-1947.
8. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2020., Bilten 45, Zagreb, 2022. Dostupno na: [Hrvatski zavod za javno zdravstvo \(hzjz.hr\)](https://www.hzjz.hr/)
9. Gandhi MK, Tellam JT, Khanna R. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.* 2004 May;125(3):267-81.
10. Dinand V, Arya LS. Epidemiology of childhood Hodgkins disease: is it different in developing countries? *Indian Pediatr.* 2006 Feb;43(2):141-7.

11. Cuceu C, Hempel WM, Sabatier L, Bosq J, Carde P, M'kacher R. Chromosomal Instability in Hodgkin Lymphoma: An In-Depth Review and Perspectives. *Cancers*. 2018 Mar 26;10(4):91.
12. Momotow J, Borchmann S, Eichenauer DA, Engert A, Sasse S. Hodgkin Lymphoma- Review on Pathogenesis, Diagnosis, Current and Future Treatment Approaches for Adult Patients. *J Clin Med*. 2021 Mar 8;10(5):1125.
13. Weniger MA, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2021 Apr;35(4):968-981.
14. Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann ML, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 2006 Apr 15;118(8):1853-61.
15. Haluska FG, Brufsky AM, Canellos GP. The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. *Blood*. 1994 Aug 15;84(4):1005-19.
16. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R i sur. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):10962-6.
17. Küppers R, Hansmann ML. The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Mar;37(3):511-7.
18. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I i sur. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*. 2000 Feb 15;95(4):1443-50.
19. Cellini A, Scarmozzino F, Angotzi F, Ruggeri E, Dei Tos AP, Trentin L i sur. Tackling the dysregulated immune-checkpoints in classical Hodgkin lymphoma: bidirectional regulations between the microenvironment and Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Front Oncol*. 2023 May 24;13:1203470.
20. Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*. 2003 Oct;3(10):801-12.
21. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in

- germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008 Feb;93(2):193-200.
22. Küppers R, Engert A, Hansmann ML. Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*. 2012 Oct;122(10):3439-47.
 23. Herreros B, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Lymphoma microenvironment: culprit or innocent? *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):49-58.
 24. Pinto A, Aldinucci D, Gloghini A, Zagonel V, Degan M, Perin V i sur. The role of eosinophils in the pathobiology of Hodgkin's disease. *Ann Oncol*. 1997;8 Suppl 2:89-96.
 25. Bankov K, Döring C, Ustaszewski A, Giefing M, Herling M, Cencioni C i sur. Fibroblasts in Nodular Sclerosing Classical Hodgkin Lymphoma Are Defined by a Specific Phenotype and Protect Tumor Cells from Brentuximab-Vedotin Induced Injury. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 30;(11):1687.
 26. Morris CS, Stuart AE. Reed-Sternberg/lymphocyte rosette: lymphocyte subpopulations as defined by monoclonal antibodies. *J Clin Pathol*. 1984 Jul;37(7):767-71.
 27. Poppema S, van den Berg A. Interaction between host T cells and Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Semin Cancer Biol*. 2000 Oct;10(5):345-50.
 28. Li J, Qian CN, Zeng YX. Regulatory T cells and EBV associated malignancies. *Int Immunopharmacol*. 2009 May;9(5):590-2.
 29. Kennedy-Nasser AA, Hanley P, Bollard CM. Hodgkin disease and the role of the immune system. *Pediatr Hematol Oncol*. 2011 Apr;28(3):176-86.
 30. Szmyd B, Mlynarski W, Pastorczak A. Genetic predisposition to lymphomas: Overview of rare syndromes and inherited familial variants. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2021 Jul-Dec;788:108386.
 31. Mack TM, Cozen W, Shibata DK, Weiss LM, Nathwani BN, Hernandez AM i sur. Concordance for Hodgkin's disease in identical twins suggesting genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. *N Engl J Med*. 1995 Feb 16;332(7):413-8.
 32. Vrzalikova K, Sunmonu T, Reynolds G, Murray P. Contribution of Epstein-Barr Virus Latent Proteins to the Pathogenesis of Classical Hodgkin Lymphoma. *Pathogens*. 2018 Jun 27;7(3):59.

33. Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet*. 1991 Feb 9;(8737):320-2.
34. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):757-68.
35. Ambinder RF. Epstein-barr virus and hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:204-9.
36. Hjalgrim H, Askling J, Sørensen P, Madsen M, Rosdahl N, Storm HH i sur. Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Sep 20;92(18):1522-8.
37. Rezk SA, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol*. 2007 Sep;38(9):1293-304.
38. Hurwitz SN, Bagg A. A 2020 Vision Into Hodgkin Lymphoma Biology. *Adv Anat Pathol*. 2020 Sep;27(5):269-277.
39. Niedobitek G, Meru N, Delecluse HJ. Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol*. 2001 Jun;82(3):149-70.
40. Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002 Dec;44(3):203-15.
41. Chan KH, Tam JS, Peiris JS, Seto WH, Ng MH. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infancy. *J Clin Virol*. 2001 Apr;21(1):57-62.
42. Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, Cooper NR. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol*. 1987 May;61(5):1416-20.
43. Landais E, Saulquin X, Houssaint E. The human T cell immune response to Epstein-Barr virus. *Int J Dev Biol*. 2005;49(2-3):285-92.
44. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol*. 2018 Jun 13;8:211.
45. Dunleavy K, Roschewski M, Wilson WH. Lymphomatoid granulomatosis and other Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative processes. *Curr Hematol Malig Rep*. 2012 Sep;7(3):208-15.

46. Ikeda T, Gion Y, Nishimura Y, Nishimura MF, Yoshino T, Sato Y. Epstein-Barr Virus-Positive Mucocutaneous Ulcer: A Unique and Curious Disease Entity. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 21;22(3):1053.
47. Kimura H, de Leval L, Cai Q, Kim WS. EBV-associated NK and T-cell lymphoid neoplasms. *Curr Opin Oncol.* 2022 Sep 1;34(5):422-431.
48. Yamada M, Ishikawa Y, Imadome KI. Hypersensitivity to mosquito bites: A versatile Epstein-Barr virus disease with allergy, inflammation, and malignancy. *Allergol Int.* 2021 Oct;70(4):430-438.
49. Cohen JI, Manoli I, Dowdell K, Krogmann TA, Tamura D, Radecki P i sur. Hydroa vacciniforme-like lymphoproliferative disorder: an EBV disease with a low risk of systemic illness in whites. *Blood.* 2019 Jun 27;133(26):2753-2764.
50. Magg T, Schober T, Walz C, Ley-Zaporozhan J, Facchetti F, Klein C i sur. Epstein-Barr Virus⁺ Smooth Muscle Tumors as Manifestation of Primary Immunodeficiency Disorders. *Front Immunol.* 2018 Feb 27;9:368.
51. Khaba MC, Ramdial PK, Pillay B, Steyn AJ, Nargan K. Epstein-Barr Virus-Associated Myoid tumors in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *J AIDS Clin Res.* 2016; 7:10
52. Gobbi PG, Ferreri AJ, Ponzoni M, Levis A. Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013 Feb;85(2):216-37.
53. Nagai H. Recent advances in Hodgkin lymphoma: interim PET and molecular-targeted therapy. *Jpn J Clin Oncol.* 2015 Feb;45(2):137-45.
54. Zhang S, Liu X, Li L, Qiu L, Qian Z, Zhou S, Wang X, Zhang H. Hodgkin's lymphoma: 2023 update on treatment. *Cancer Biol Med.* 2023 Dec 29;21(4):269–73.
55. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity.* 2013 Mar 21;38(3):414-23.
56. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 1970 May;18(5):723-37.
57. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M i sur. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001 Aug;182:18-32.

58. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B *in situ*. Human CD8⁺CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):4107-14.
59. Liotta F, Cosmi L, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Functional features of human CD25⁺ regulatory thymocytes. *Microbes Infect*. 2005 Jun;7(7-8):1017-22.
60. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev*. 2005 Nov;4(8):579-86.
61. Dhamne C, Chung Y, Alousi AM, Cooper LJ, Tran DQ. Peripheral and thymic foxp3(+) regulatory T cells in search of origin, distinction, and function. *Front Immunol*. 2013 Aug 27;4:253.
62. Sakaguchi S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nat Immunol*. 2003 Jan;4(1):10-1.
63. DeJaco C, Duftner C, Schirmer M. Are regulatory T-cells linked with aging? *Exp Gerontol*. 2006 Apr;41(4):339-45.
64. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87.
65. Hakim FT, Gress RE. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. *Tissue Antigens*. 2007 Sep;70(3):179-89.
66. Raynor J, Lages CS, Shehata H, Hildeman DA, Chougnet CA. Homeostasis and function of regulatory T cells in aging. *Curr Opin Immunol*. 2012 Aug;24(4):482-7.
67. Fessler J, Ficjan A, Duftner C, DeJaco C. The impact of aging on regulatory T-cells. *Front Immunol*. 2013 Aug 6;4:231.
68. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar;3(3):253-7.
69. Povoleri GA, Scottà C, Nova-Lamperti EA, John S, Lombardi G, Afzali B. Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators? *Front Immunol*. 2013 Jun 27;4:169.
70. Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*. 2007 May;8(5):457-62.
71. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.

72. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 11;106(32):13445-50.
73. Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(9):1310-2.
74. Oleinika K, Nibbs RJ, Graham GJ, Fraser AR. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clin Exp Immunol*. 2013 Jan;171(1):36-45.
75. Tanchot C, Terme M, Pere H, Tran T, Benhamouda N, Strioga M i sur. Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. *Cancer Microenviron*. 2013 Aug;6(2):147-57.
76. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Aug;66(16):2603-22.
77. Liberal R, Grant CR, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Regulatory T cells: Mechanisms of suppression and impairment in autoimmune liver disease. *IUBMB Life*. 2015 Feb;67(2):88-97.
78. Needham DJ, Lee JX, Beilharz MW. Intra-tumoural regulatory T cells: a potential new target in cancer immunotherapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 May 12;343(3):684-91.
79. Facciabene A, Motz GT, Coukos G. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res*. 2012 May 1;72(9):2162-71.
80. Ondondo B, Jones E, Godkin A, Gallimore A. Home sweet home: the tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells. *Front Immunol*. 2013 Jul 16;4:197.
81. Wang J, Ke XY. The four types of Tregs in malignant lymphomas. *J Hematol Oncol*. 2011 Dec 9;4:50.
82. Moy RH, Younes A. Immune Checkpoint Inhibition in Hodgkin Lymphoma. *Hemasphere*. 2018 Feb 16;2(1):e20.
83. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN i sur. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1755-62.

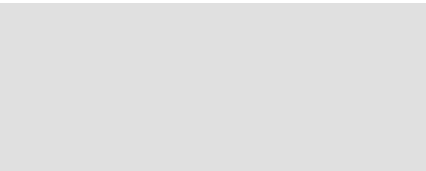
84. Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, Iida S i sur. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res.* 2006 Jun 1;66(11):5716-22.
85. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J i sur. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Aug 7;104(32):13134-9.
86. Lamprecht B, Kreher S, Anagnostopoulos I, Jöhrens K, Monteleone G, Jundt F i sur. Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. *Blood.* 2008 Oct 15;112(8):3339-47.
87. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, Flavell JR i sur. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1):195-204.
88. Morales O, Mrizak D, François V, Mustapha R, Miroux C, Depil S i sur. Epstein-Barr virus infection induces an increase of T regulatory type 1 cells in Hodgkin lymphoma patients. *Br J Haematol.* 2014 Sep;166(6):875-90.
89. Kelley TW, 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. *Am J Clin Pathol.* 2007 Dec;128(6):958-65.
90. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM i sur. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood.* 2009 Mar 19;113(12):2765-3775.
91. Koreishi AF, Saenz AJ, Persky DO, Cui H, Moskowitz A, Moskowitz CH i sur. The role of cytotoxic and regulatory T cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010 May;18(3):206-11.
92. Pavlovic A, Glavina Durdov M, Capkun V, Jakelic Pitesa J, Bozic Sakic M. Classical Hodgkin Lymphoma with Positive Epstein-Barr Virus Status is Associated with More FOXP3 Regulatory T Cells. *Med Sci Monit.* 2016 Jul 5;22:2340-6.

93. Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, Horstman A, Vos W, Baak JP i sur. Analysis of major histocompatibility complex class I expression on Reed-Sternberg cells in relation to the cytotoxic T-cell response in Epstein-Barr virus-positive and -negative Hodgkin's disease. *Blood*. 1996 May 1;87(9):3844-51.
94. Chapman AL, Rickinson AB, Thomas WA, Jarrett RF, Crocker J, Lee SP. Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in the blood and tumor site of Hodgkin's disease patients: implications for a T-cell-based therapy. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6219-26.
95. Meij P, Leen A, Rickinson AB, Verkoeijen S, Vervoort MB, Bloemena E i sur. Identification and prevalence of CD8(+) T-cell responses directed against Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 and latent membrane protein 2. *Int J Cancer*. 2002 May 1;99(1):93-9.
96. Poppema S, Visser L. Absence of HLA class I expression by Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol*. 1994 Jul;145(1):37-41.
97. Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, Ossenkuppele GJ, van Heerde P, Baars JW i sur. Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease. *Blood*. 1997 Feb 15;89(4):1376-82.
98. Kiyasu J, Aoki R, Tanaka PY, Pracchia LF, Calore EE, Perez NM i sur. FOXP3(+) regulatory and TIA-1(+) cytotoxic T lymphocytes in HIV-associated Hodgkin lymphoma. *Pathol Int*. 2012 Feb;62(2):77-83.
99. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol*. 2006 Jan;126(1):15-24.

10. ŽIVOTOPIS

Antonia Pavlović

rođ.15.05.1981



RADNO ISKUSTVO

- Od 2014 Klinički zavod za patologiju sudsku medicinu i citologiju, KBC Split
 Specijalist kliničke citologije na Odjelu za citologiju
- 2009-2104 KBC Split, specijalizacija iz kliničke citologije
- 2007-2009 Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet
 Znanstveni novak na projektu: „Utjecaj Epstein Barr virusa na izražaj staničnih
 gena i ishod Hodgkinovog limfoma“ pri Zavodu za patologiju, sudsku
 medicinu i citologiju

OBRAZOVANJE

- 2014 Položen specijalistički ispit iz kliničke citologije
- 2008 Završen poslijediplomski studij „Biologija novotvorina“
- 2005 Diploma Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, smjer doktor medicine
- 1999 Zdravstvena škola Split, smjer zdravstveno-laboratorijski tehničar

OBJAVLJENI ZNANSTVENI RADOVI

- **Pavlović A**, Miljak A, Brzica K, Glavina Durdov M. The Abundance of FOXP3, FOXP3/CD4 and CD8 Cells in the Microenvironment of Nodular Sclerosis and Mixed

Cellularity Subtypes is Associated with the EBV Status of Classic Hodgkin Lymphoma. *Biomedicines* 2024, 12(8),1680.

- Petricevic SJ, **Pavlovic A**, Capkun V, Becic K, Durdov MG. Cathepsin K expression in melanoma is associated with metastases. *Histol Histopathol.* 2017 Jul;32(7):711-716.
- **Pavlovic A**, Glavina Durdov M, Capkun V, Jakelic Pitesa J, Bozic Sakic M. Classical Hodgkin Lymphoma with Positive Epstein-Barr Virus Status is Associated with More FOXP3 Regulatory T Cells. *Med Sci Monit.* 2016 Jul 5;22:2340-6.
- **Pavlovic A**, Glavina Durdov M, Lozic D, Skare Librenjak L, Alfirevic D. Primary ovarian lymphoma and benign Brenner tumor. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2016 Feb;55(1):138-9.
- Beljan Perak R, Durdov MG, Capkun V, Ivcevic V, **Pavlovic A**, Soljic V, Peric M. IMP3 can predict aggressive behaviour of lung adenocarcinoma. *Diagn Pathol.* 2012 Nov 28;7:165.
- **Pavlovic A**, Ostojic Kolonic S, Radic Kristo D, Jelic Puskaric B, Kardum Skelin I. Atypical blast morphology of primary plasma cell leukemia with renal involvement and plasmablasts in urine. *Diagn Cytopathol.* 2015 Feb;43(2):158-62.
- Beljan Perak R, **Pavlovic A**, Lozic B, Sundov D, Piljic Burazer M, Soljic V. Soft Tissue B-Cell Lymphoma, Unclassifiable, with Features Intermediate between Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Burkitt's Lymphoma Diagnosed by Fine Needle Aspiration Cytology. *Acta Cytol.* 2015;59(4):355-7.
- Beljan Perak R, Karaman I, Sundov D, Jakelic Pitesa J, Novak A, **Pavlovic A**. Anaplastic Variant of Plasma Cell Myeloma: A Pitfall of Morphological Identification. *Acta Cytol.* 2016;60(3):275-6.
- **Bendic A**, Glavina Durdov M, Stipic R, Karaman I. Melanoma in the ampulla of Vater. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2013 Feb;12(1):106-8.
- **Bendic A**, Bozic M, Durdov MG. Metaplastic breast carcinoma with melanocytic differentiation. *Pathol Int.* 2009 Sep;59(9):676-80.

- Mrklič I, Pogorelič Z, **Bendić A**, Tomić S. Post-cholecystectomy amputation neuroma mimicking common bile duct carcinoma. *Acta Gastroenterol Belg.* 2011 Jun;74(2):363-5.
- Mrklic I, **Bendic A**, Pogorelic Z, Karaman I, Glavina Durdov M, Druzijanic N, Tomic S. Squamous metaplasia of the peritoneum: report of a case. *Int J Surg Pathol.* 2013 Feb;21(1):82-4.
- Saratlija Novakovic Z, Glavina Durdov M, Puljak L, Saraga M, Ljutic D, Filipovic T, Pastar Z, **Bendic A**, Vukojevic K. The interstitial expression of alpha-smooth muscle actin in glomerulonephritis is associated with renal function. *Med Sci Monit.* 2012 Apr;18(4):CR235-40.
- Mrklic I, **Bendic A**, Kunac N, Bezic J, Forempoher G, Durdov MG, Karaman I, Prusac IK, Pisac VP, Vilovic K, Tomic S. Her-2/neu assessment for gastric carcinoma: validation of scoring system. *Hepatogastroenterology.* 2012 Jan-Feb;59(113):300-3.