

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Ljubomir R. Jaković

**KORELACIJA KLINIČKIH PARAMETARA I
BIOLOŠKIH MARKERA APOPTOZE U PROGNOZI
KLASIČNOG HOČKINOVOG LIMFOMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Ljubomir R. Jakovic

**CORRELATION OF CLINICAL PARAMETERS
WITH APOPTOTIC BIOLOGICAL MARKERS
IN PROGNOSIS OF CLASSICAL HODGKIN
LYMPHOMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

MENTOR: Akademik Vladimir Bumbaširević,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu,

KOMENTOR: Profesor dr Biljana Mihaljević,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI

KOMISIJE: Profesor dr Dušan Trpinac,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
Profesor dr Gradimir Janković,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
Docent dr Andrija Bogradnović,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
Docent dr Tatjana Terzić,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
Profesor dr Pavle Milenković,
Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____ / _____ / _____

U trenutku kada je doktorska disertacija završena čast mi je da izrazim veliku ličnu zahvalnost na bezrezervnoj kolegijalnoj i ljudskoj pomoći koju su mi tokom izrade teze, uporedo sa stručnim sugestijama, savetima i podrškom, pružali uvaženi i poštovani mentor, akademik Vladimir Bumbaširević i komentor, profesor dr Biljana Mihaljević.

Posebno se zahvaljujem kolegama iz Klinike za hematologiju, Kliničkog Centra Srbije, dr Maji Peruničić-Jovnović, docentu dr Andriji Bogdanoviću i dr Bošku Anđeliću, na dragocenoj pomoći koji su mi pružili u tehničkoj realizaciji i obradi rezultata istraživanja.

Zahvalan sam Branislavki Rakonjac i Borki Konstadinović, tehničarima iz Laboratorije za patologiju hematopoznog sistema KCS, koje su se maksimalno angažovale i nesebično mi pomogle u realizaciji ovog zahtevnog projekta.

Zahvaljujem na korisnim sugestijama i savetima cenjenim članovima komisije, profesoru dr Dušanu Trpincu, profesoru dr Gradimiru Jankoviću, docentu dr Andriji Bogdanoviću, docentu dr Tatjani Terzić i profesoru dr Pavlu Milenkoviću,.

Sa posebnim zadovoljstvom pominjem savete i komentare profesora dr Andreea Engerta i kolega iz Nemačke Studijske Grupe za Hočkinov limfom koji su doprineli projektovanju glavne ideje doktorske teze i finalizaciji istraživanja u formi koja je prezentovana.

Zahvaljujem se cenjenim kolegama iz Klinike za hematologiju Kliničkog Centra Srbije i brojnim prijateljima koji su na bilo koji način doprineli uspešnom završetku istraživanja i finalnoj izradi ove doktorske disertacije.

Zahvalan sam svojoj porodici na brizi, pomoći, razumevanju i ohrabrenjima da istrajemo tokom izrade ove teze i da se radujemo zajedno.

Ljubomir Jaković

KORELACIJA KLINIČKIH PARAMETARA I BİOLOŠKIH MARKERA APOPTOZE U PROGNOZI KLASIČNOG HOČKINOVOG LIMFOMA

SAŽETAK:

Hoćkinov limfom (HL) je izlećiv tumor, međutim savremeni pristupi lećenju ove bolesti nisu precizni. Prognozna vrednost bioloških i morfoloških parametara kontroverzna je, a modeli prognoze nisu široko prihvaćeni.

Cilj studije bio je utvrditi da li varijable zasnovane na karakteristikama tkiva mogu doprineti prognoznoj vrednosti standardnih klinićkih parametara i da li te varijable mogu poslužiiti za procenu stepena rizika kod bolesnika sa HL.

Prognozna važnost 8 parametara analizirana je u 85 bolesnika sa odmaklim stadijumom klasićnog HL.

Univarijantna analiza potvrdila je pet indikatora kraćeg ukupnog preživljavanja (engl. Overall Survival-OS): povećana ekspresija Bcl-2 (>50%Bcl-2+ tumorskih ćelija), povećani broj CD68 tumor-pridruženih makrofaga (engl. tumor associated macrophages-TAM) (>25%CD68+TAM); Internacionalni Prognozni Skor (IPS)>2; voluminozna tumorska masa (engl. Bulky Disease –BD), potpuna zahvaćenost limfnih ćvorova tumorskim tkivom (engl. Total Lymph Node Involvement-TLNI) (p=0.007, p=0.003 p=0.000, p=0.002, p=0.017, po redosledu). Nezavisno od TLNI ovi ćinioci uticali su i na kraće preživljavanja bez znakova bolesti (engl. Event Free Survival- EFS) (p=0.031, p=0.035, p=0.004, p=0.014, po redosledu).

Multivarijantna analiza utvrdila je pet nezavisnih faktora za OS: >50% Bcl-2+ tumorskih ćelija; >25% CD68+ TAM; TLNI, IPS>2; BD (p=0.025, p=0.042, p=0.003, p=0.000, p=0.003, po redosledu). Na EFS uticali su >25% CD68+TAM; IPS>2; BD (p=0.044, p=0.009, p=0.018, po redosledu).

Dizajnirali smo prognozni model sa 4 grupe rizika (niskog 0-1, srednjeg 2, visokog 3, veoma visokog 4-5 faktora rizika), svaka sa progresivno kraćim OS (100%, 78%, 45%, 0%, po redosledu, p<0.001).

Naši nalazi ukazuju da se u trenutku postavljanja dijagnoze HL kombinovanjem tkivnih varijabli i klinićkih parametara mogu otkriti bolesnici sa visokim rizikom loše prognoze.

Ključne reći: Prognozni parametri, uznapredovali stadijum Hoćkinovog limfoma

Naućna oblast: Medicina

Uća naućna oblast: Hematologija

UDK 616.151-006.44 (043.3)

CORRELATION OF CLINICAL PARAMETERS WITH APOPTOTIC BIOLOGICAL MARKERS IN PROGNOSIS OF CLASSICAL HODGKIN LYMPHOMA

ABSTRACT:

Although Hodgkin's lymphoma (HL) is a curable cancer, current treatment strategies based on risk stratification and response evaluation are not precise enough. The predictive power of biological and morphological parameters is controversial and prognostic models have not reached wide acceptance.

The aim of the study was to determine whether tissue-based variables could add prognostic value to standard clinical parameters and contribute to a better risk stratification of HL patients. We analyzed the prognostic relevance of 8 parameters in 85 advanced stage classical HL patients.

Univariate analysis confirmed five indicators of shorter OS: Bcl-2 overexpression by RS cells (>50%Bcl-2+RS), increased CD68 tumor-associated macrophages (>25%CD68+TAM); IPS>2, bulky disease, and total involvement of the lymph node by neoplastic and inflammatory cells (TLNI) ($p=0.007$, $p=0.003$, $p=0.000$, $p=0.002$, $p=0.017$, respectively). These factors also influenced lower EFS ($p=0.031$, $p=0.035$, $p=0.004$, $p=0.014$, respectively), except of TLNI.

Multivariate analysis identified five separate factors for OS: >50% Bcl-2+RS; >25% CD68+TAM; TLNI; IPS>2, and bulky disease ($p=0.025$, $p=0.042$, $p=0.003$, $p=0.000$, $p=0.003$, respectively). Furthermore, >25% CD68+TAM, IPS>2, and bulky disease affected EFS ($p=0.044$, $p=0.009$, $p=0.018$, respectively).

Utilizing the cumulative score of unfavorable prognostic factors for OS, we designed a prognostic model by stratifying patients into 4 risk groups (low 0-1, intermediate 2, high 3, very high 4-5 risk factors), each with progressively reduced OS (100%, 78%, 45%, 0% respectively, $p<0.001$).

Our findings endorse the combining the tissue based variables with clinical parameters, identifying patients who are at higher risk of poor outcome.

Keywords: Prognostic parameters, advanced Hodgkin's lymphoma

Scientific area: Medicine

Scientific field: Hematology

UDC 616.151-006.44 (043.3)

Publikovani radovi iz oblasti doktorske disertacije:

Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunicic Jovanovic MD, Bogdanovic AD, Andjelic BM, Bumbasirevic VZ. The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2011 Oct;52(10):1913-9.

Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunicic Jovanovic MD, Bogdanovic AD, Andjelic BM, Bumbasirevic VZ. Prognostic Significance of Bcl-2, Tumor-Associated Macrophages and Total Neoplastic and Inflammatory Lymph Node Involvement in Advanced Stage Classical Hodgkin's Lymphoma. *Onkologie*. 2012;35:733-739.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Hoćkinov limfom	2
1.1.1 Istorijat i definicija bolesti	2
1.1.2 Histopatološka klasifikacija i histološke karakteristike Hoćkinovog limfoma	6
1.1.3 Kliniĉke karakteristike i procena proširenosti Hoćkinovog limfoma	10
1.1.4 Prognozni faktori	12
1.1.4.1 Tipovi prognoznih faktora	13
1.1.4.1.1 Tipovi prognoznih faktora u ranom i uznapredovalom kliniĉkom stadijumu	13
1.1.4.1.2 Prognozni skorovi u uznapredovalom stadijumu Hoćkinovog limfoma	14
1.2 Apoptoza	16
1.2.1 Klasifikacija ćelijske smrti	16
1.2.1.1 Apoptoza	16
1.2.1.2 Nekroza	17
1.2.1.3 Autofagija	18
1.2.2 Morfološke i biohemijske karakteristike apoptoze	19
1.2.3 Molekularna osnova apoptoze	20
1.2.3.1 Receptori smrti i aktivacija kaspaza	20
1.2.3.2 Intracelularni signali smrti	22
1.2.4 Tehnike utvrđivanja apoptoze	26
2. Tema i predmet istraživanja	31
2.1 Obrazloženje teme	32
2.1.1 Aktuelna problematika, hipoteza i cilj istraživanja	32
3. Materijal i metode	34
3.1 Histopatološka i imunohistohemijska ispitivanja	35
3.2 Patomorfološka ispitivanja	36
3.3 Kliniĉki parametri	36
3.4 Lećenje	36
3.5 Statistiĉke metode	37

4. Rezultati	38
4.1 Osnovne karakteristike bolesnika.....	39
4.2 Univarijantna analiza	42
4.3 Multivarijantna analiza	51
4.4 Model preživljavanja	51
5. Diskusija	53
6. Zaključak	62
7. Rezultati-fotodokumentacija	64
8. Literatura	71
9. Skraćenice	95
10. Biografija kandidata	99

1. U V O D

1.1 HOČKINOV LIMFOM

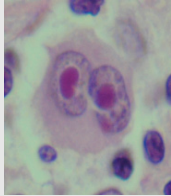
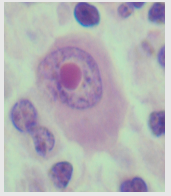
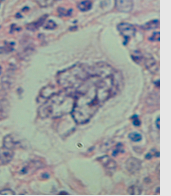
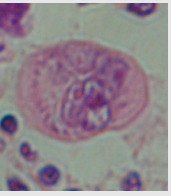
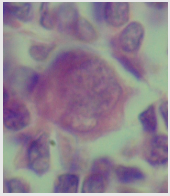
1.1.1 Istorijat i definicija bolesti

Engleski lekar Tomas Hočkin (engl. Thomas Hodgkin) je 1832. godine, u sedam bolesnika opisao do tada nepoznatu bolest, koja će tridesetak godina kasnije, njemu u čast, dobiti naziv Hočkinova bolest (engl. Hodgkin disease) (1, 2). U drugoj polovini 19. veka za Hočkinovu bolest se vezuju karakteristične džinovske ćelije čiji opis i druge patohistološke karakteristike potiču od Ridove i Šternberga (engl. Reed-Sternberg) – Rid-Šternbergove ćelije (RS) (3, 4, 5). Međutim, detaljan patohistološki opis Hočkinove bolesti nije bio dovoljan da se precizno odredi priroda same bolesti. Mišljenja u vezi sa karakterom Hočkinove bolesti bila su kontraverzna pošto se smatralo da je to forma granulomatozne inflamacije, tip hroničnog imunološkog poremećaja ili maligna neoplazma (6).

Danas znamo da je Hočkinova bolest maligno oboljenje (7). Poslednjih decenija učinjen je napredak u prepoznavanju karakterističnih kliničkih manifestacija Hočkinove bolesti u svim fazama njenog razvoja, tj. od ranog početka do krajnjeg ishoda. Značajan progres ostvaren je u primeni novih patohistoloških metoda i kliničkih dijagnostičkih postupaka kojima je moguće prilično precizno proceniti stadijum razvoja bolesti tj. stajding (engl. staging - stadijum razvoja) u trenutku kada se otkrije oboljenje. Rezultati lečenja ove bolesti danas su znatno bolji nego što su bili u nedavnoj prošlosti (6-9).

Interes za proučavanjem Hočkinove bolesti, koja je prema klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije (engl. World Health Organisation- WHO) označena kao Hočkinov limfom (HL), veliki je svuda u svetu i on se ne smanjuje bez obzira na značajne rezultate koji se u savremenoj medicini ostvaruju u dijagnostici i u terapiji ovog oboljenja (10,11). Poseban doprinos velikom interesovanju naučnika za ovu oblast dala su nova otkrića u vezi sa molekularnim i biološkim karakteristikama bolesti (12-14). Od velikog značaja su saznanja da maligne ćelije u Hočkinovom limfomu potiču od B ćelija germinativnog centra (12-14). Neoplastične ćelije u HL-u su RS i njihove varijante. Rid-Šternbergove ćelije su hromozomski nestabilne. Prethodni defekti u stabilnosti hromozoma mogu ukazati na Hočkinov limfom ili da se kod bolesnika sa Hočkinovim limfomom razvija sekundarni maligni proces. Nalaz RS ćelija je važan i dijagnostički značajan, ali on sam po sebi nije dovoljan da se postavi definitivna dijagnoza HL. Poznato je da su ćelije slične RS i njihovim varijantama prisutne i u drugim bolestima, kao što su infektivna mononukleoza, B i T ćelijski limfomi, karcinomi, melanomi i sarkomi (14-16). Dijagnoza HL postavlja se nalazom Rid-Šternbergovih ćelija koje su prisutne u ćelijskom okruženju jednog od specifičnih histoloških podtipova HL-a i na osnovu rezultata njihove imunofenotipske analize (17, 18).

Rid-Šternbergove ćelije ćelije nisu morfološki uniformne, a njihove ćelijske varijante prikazane su na Slici 1.1.

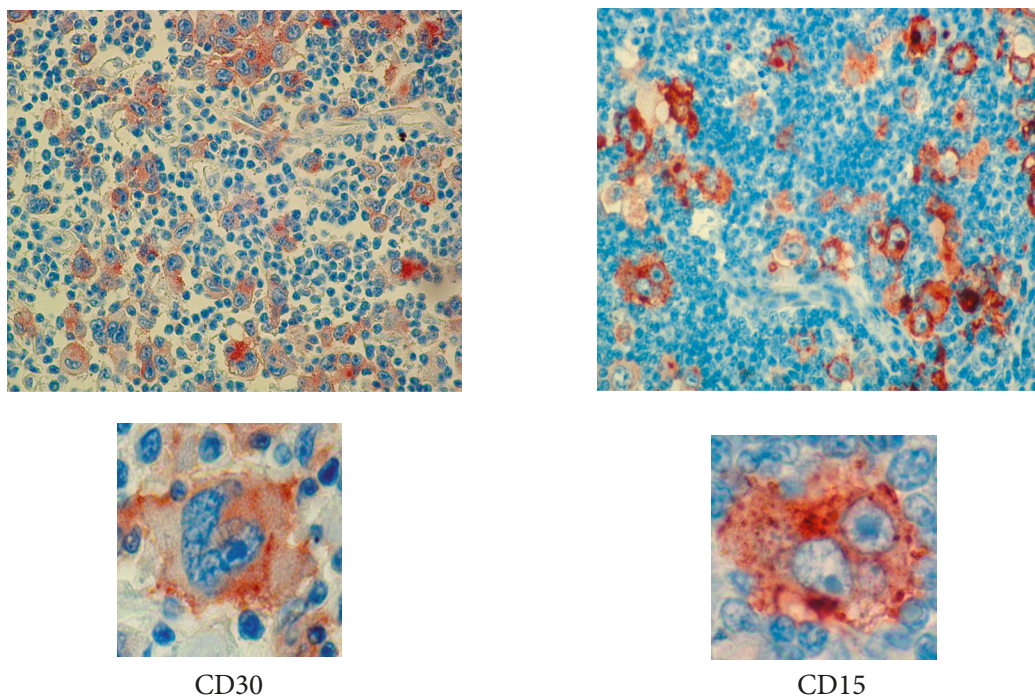
Varijante	Rid-Šternberg	Hoćkinova	Lakunarna	Pleomorfna	L&H
MORFOLOGIJA					
JEDRO	Dva ili više, multilobulirano	Pojedinačno	Pojedinačno ili multilobularno	Jedno ili više, multilobulirano	Pojedinačno lobulirano
JEDARCE	Krupno, eozinofilno	Krupno eozinofilno	Različito, eozinofilno	Upadljivo različito eozinofilno	Sitna brojna tačkasta bazofilna
CITOPLAZMA	Obilna, eozinofilna	Osrednja, svetla ili eozinofilna	Obilna svetla, artefakt fiksacije u formalinu	Osrednja do obilna eozinofilna	Oskudna bazofilna
FENOTIP	CD30+, CD15+	CD30+, CD15+	CD30+, CD15+	CD30+, CD15+	CD30-, CD15-, CD20+
TIP HL	Svi podtipovi klasičnog HL	Svi podtipovi klasičnog HL	Nodulska skleroza podtip kHL	Svi podtipovi klasičnog HL	Nodulska limfocitna predominacija

Slika 1.1: Varijante Rid-Šternbergovih ćelija.

Poreklo malignih ćelija u HL bilo je dugo enigma. U ranim imunohistohemijskim analizama pokazano je da RS ćelije ne poseduju tipične B ćelijske markere (19-22). Međutim, kada su obavljena genetska ispitivanja, u RS ćelijama je otkriveno prisustvo klonskih rearanžmana gena za teške lance imunoglobulina čime je potvrđena njihova B ćelijska pripadnost (23).

Danas se zna da RS vode poreklo od zrelih B ćelija germinativnog centra kod kojih je zbog epigenetskog utišavanja i stečenih genskih lezija nastalo oštećenje B ćelijskog transkripcionog programa (24). Usled nastalih promena ove ćelije izgubile su tipični B će-

lijski fenotip i ispoljavaju abnormalne membranske markere i promenjene transkripcione regulatore brojnih limfo-hematopoetskih ćelijskih tipova. Imunofenotipski profil RS ćelija pokazuje sledeće karakteristike: konzistentna ekspresija CD30 i CD15 postoji u većini slučajeva (membranski tip pozitivnosti i u Goldži zoni u citoplazmi) (Slike 1.2-1.5); tumorske ćelije su LCA negativne; CD20 može biti prisutan u približno 30% slučajeva (različitog intenziteta i u manjem broju tumorskih ćelija), a CD79a (B-ćelijski pridruženi antigen) još ređe, dok je PAX5/BSAP (B-ćelijski specifični aktivacioni protein) ekspimiran u gotovo svim ćelijama; plazma ćelijski specifični transkripcioni faktor MUM-1/IRF4 (engl. Multiple Myeloma-1/interferon regulatory factor-4) konstantno je pozitivan; ekspresija epitelnog membranskog antigena (EMA) retka je, a kada je prisutna, slabog je intenziteta; transkripcioni factor OCT-2 odsutan je u većini slučajeva, kao i njegov koaktivator BOB.1; većina ćelija ekspimirira proliferaciji-pridruženi nuklearni antigen Ki-67 (25-32).



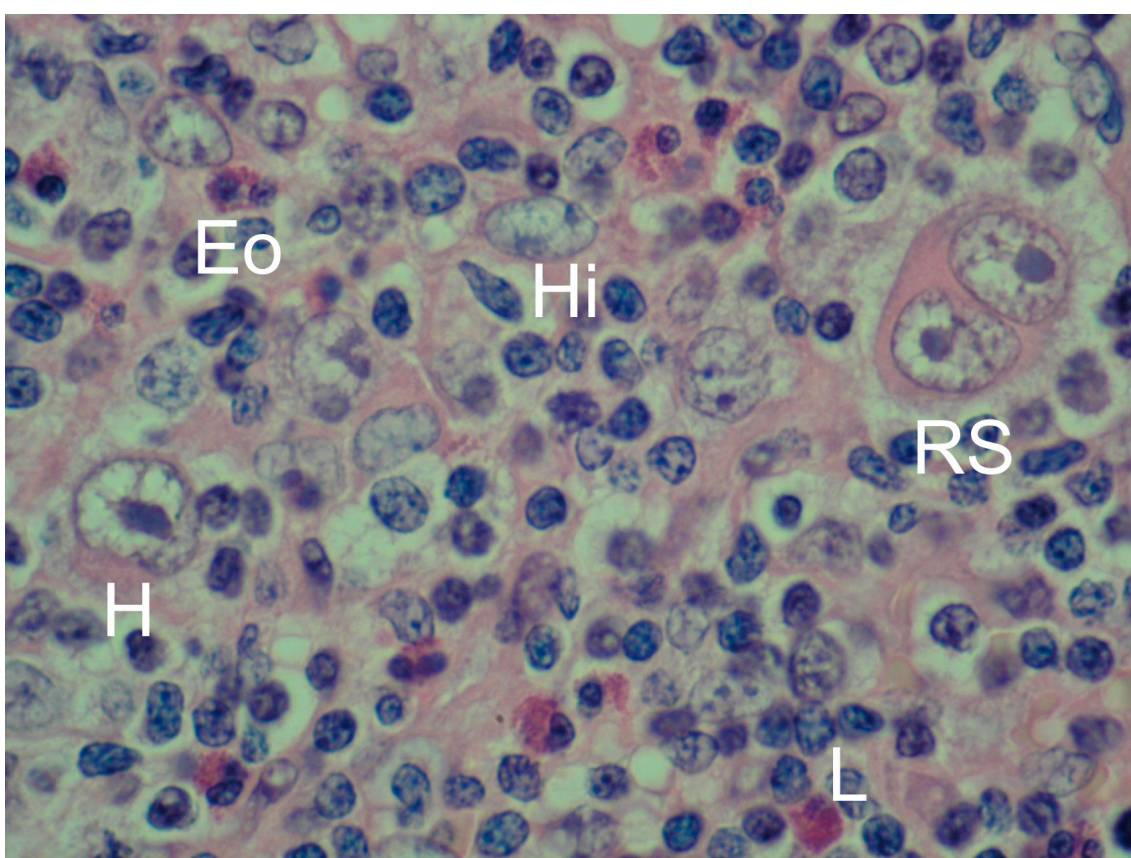
Slike 1.2-1.5: Imunohistohemijski Rid-Šternbergove ćelije ekspimiraju membranski CD30 i membranski i u Goldži zoni citoplazme CD15.

Hoćkinov limfom jedinstven je u grupi humanih B ćelijskih limfoma i po broju aktiviranih signalnih puteva i transkripcionih faktora koji se smatraju odgovornim za preživljavanje i proliferaciju RS (33).

Smatra se da su za preživljavanje RS ćelija ključni aktivacija transkripcionog nuklearnog faktora NF- κ B (engl. Nuclear factor-kappa B) i aktivacija (PI3K)/AKT puta (engl. phosphatidylinositol-3-kinase/; JAK/STAT (engl. Janus Kinase/ Signaling Transducer and

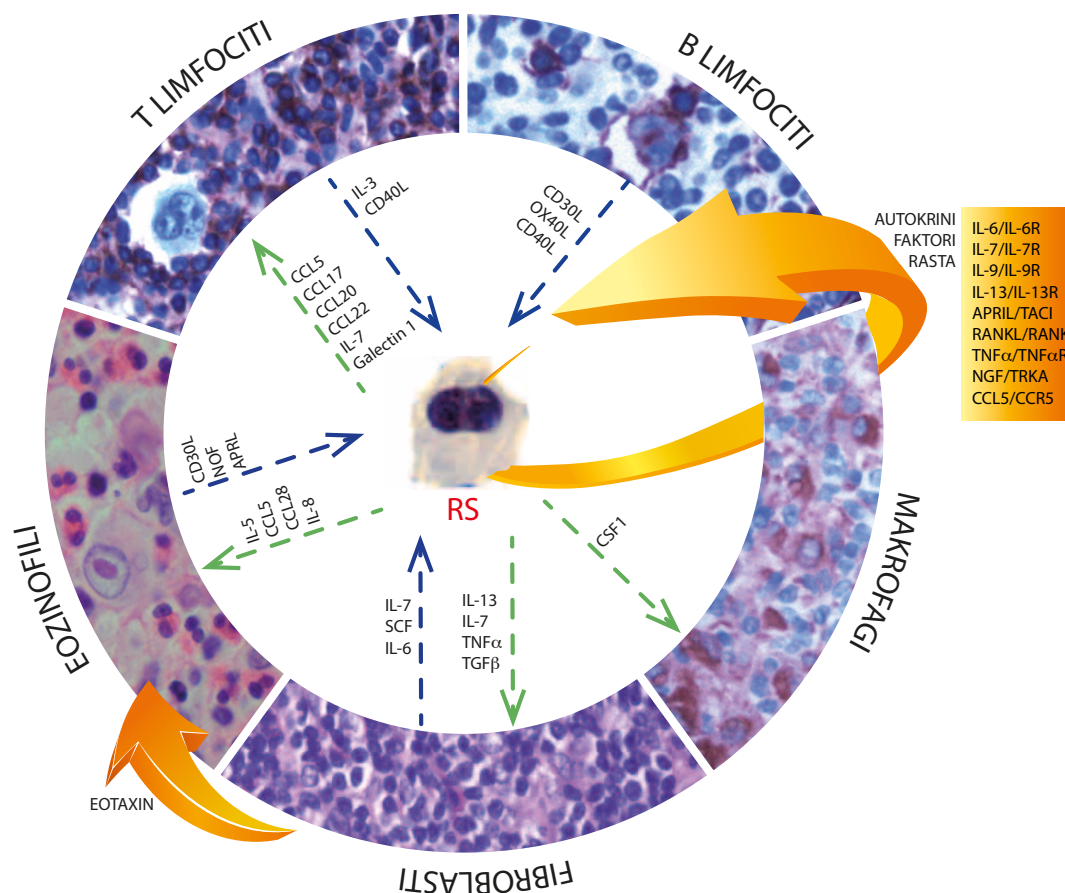
Activator of Transcription) je glavni signalni put za citokine (STAT3, STAT5, STAT6 aktivirani u RS); dok je transkripcioni faktor AP-1 (c-Jun i Jun-B aktivirani u RS) onaj koji pokreće proliferaciju RS ćelija i njihove imunomodulatorne funkcije (34-42).

Maligne ćelije u HL zavise i od signala koji potiču od normalnih ćelija u njihovom, okruženju (24, 43, 44). Rid-Šternbergove ćelije luče abnormalne citokine i hemokine koji privlače ne-neoplastične inflamatorne i druge ćelije i/ili indukuju njihovu proliferaciju i na taj način učestvuju u formiranju tumorske mikrosredine (Slika 1.6). Zauzvrat, ove ćelije proizvode solubilne ili membranski vezane faktore koji direktno utiču na rast, preživljavanje tumorskih ćelija i ekspanzivan rast tumora (43, 45-51).



Slika 1.6: Mikrosredina u klasičnom Hočkinovom limfomu, podtip mešovita celularnost. Hočkinova (H) i Rid-Šternbergova (RS) ćelija u okruženju koga čine mali limfociti (L), histiociti (Hi) i eozinofili (Eo). (HE, x400)

Smatra se da su citokini i faktori rasta odgovorni, pored morfoloških parametara, i za brojne specifične kliničke karakteristike samog oboljenja, npr.: eozinofiliju (IL-5 i eotaksin), mijeloidnu hiperplaziju (granulocitno-makrofagna kolonija stimulirajućeg faktora), nodulsku sklerozu (TGF- β 1 i faktor rasta bazičnog fibroblasta), imunsku supresiju (TGF- β 1) i sistemsko ispoljavanje B simptoma (IL-6) (52-62) (Slika 1.7).



Slika 1.7: Formiranje mikrosredine: Molekuli uključeni u privlačenje i/ili proliferaciju ćelija koje čine mikrosredinu klasičnog Hočkinovog limfoma.

Definicija Hočkinovog limfoma objedinjava različite histološke tipove ove bolesti i ističe osnovne kliničke karakteristike ovog oboljenja kao i dijagnostični značaj otkrivanja Rid-Šternbergovih ćelija u odgovarajućoj ćelijskoj populaciji. Hočkinov limfom ima sledeće osobine: 1.) uglavnom se javlja u limfnim čvorovima, naročito vratne regije; 2.) većina bolesnika su mlade odrasle osobe; 3.) tumorsko tkivo uglavnom sadrži mali broj krupnih mononuklearnih i multinuklearnih malignih ćelija (manje od 1% ukupne tumorske mase) tj. RS ćelija koje se nalaze u okruženju ne-neoplastičnih inflamatornih i pridruženih ćelija (malih limfocita, eozinofila, neutrofila, histiocita, plazma ćelija, fibroblasta i kolagenih vlakana); 4.) tumorske ćelije su okružene T limfocitima po tipu rozete (25).

1.1.2 Histološka klasifikacija i histološke karakteristike Hočkinovog limfoma

Histopatološka klasifikacija: Klasična klasifikacija Lukesa i Batlera (engl. Lukes, Butler) je poslužila kao osnova za savremenu klasifikaciju Hočkinovog limfoma (63, 64).

Danas je u upotrebi klasifikacija Svetske Zdravstvene Organizacije koja umesto naziva Hočkinova bolest uvodi termin Hočkinov limfom, sa idejom da se istakne da je u pitanju maligna bolest (65). U ovoj klasifikaciji kategorije nodulska skleroza, mešovita celularnost, limfocitima bogat i limfocitna deplecija su svrstane pod zajednički imenitelj klasičan Hočkinov limfom (engl. classical Hodgkin Lymphoma -cHL). To je učinjeno da bi se ukazalo na značaj bliske povezanosti između ovih histoloških podtipova i da bi se oni izdvojili od kategorije nodulske limfocitne predominacije (engl. Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma – NLPHL) (25) (Tabela 1).

Tabela 1: Histološke klasifikacije Hočkinovog limfoma (66).

Jackson i Parker	Lukes i Butler	Rye	REAL	WHO 2001/2008
Paragranulom	Limfocitni i/ili histiocitni, nodulski	Limfocitna predominacija	Nodulska limfocitna predominacija nodulski/difuzni	Nodulska limfocitna predominacija HL
Granulom	Limfocitni i/ili histiocitni, difuzni	Nodulska skleroza	Klasičan HL	Klasičan HL
Sarkom	Nodulska skleroza	Mešovita celularnost	Nodulska skleroza	Nodulska skleroza (Gradus I i II)
	Mešovita celularnost	Limfocitna deplecija	Mešovita celularnost	Mešovita celularnost
	Difuzna fiboza		Limfocitna deplecija	Limfocitima-bogat
	Retikularni		Limfocitima bogat klasičan HL difuzni	Limfocitna-deplecija

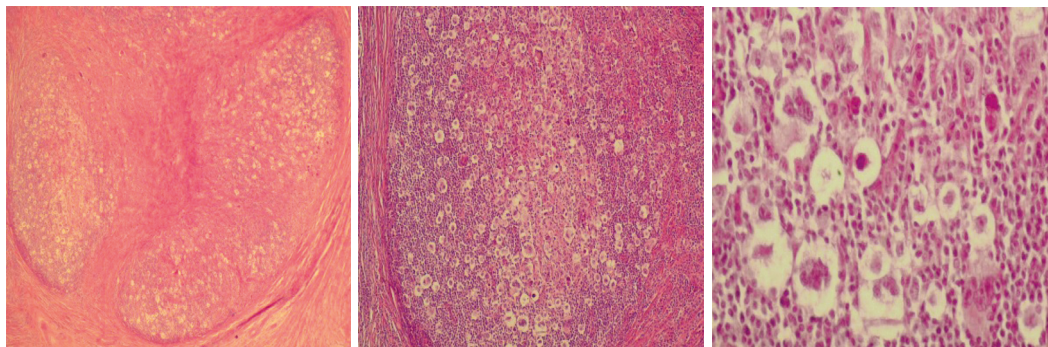
Skraćenice: REAL, Revised European-American Lymphoma (REAL) classification; WHO, World Health Organisation scheme.

Histološke karakteristike: Histološke karakteristike Hočkinovog limfoma zasnivaju se na saznanjima stečenim u biološkim i kliničkim studijama koje su pokazale da Hočkinov limfom obuhvata dva oblika bolesti: a) Nodulsku limfocitnu predominaciju i b) Klasičan Hočkinov limfom (25).

Nodulska limfocitna predominacija - NLPHL i cHL razlikuju se po kliničkim karakteristikama bolesti, sastavu ćelijskog infiltrata i morfologiji, imunofenotipu i očuvanosti ili gubitku ekspresije gena B-ćelijskog programa (67, 68).

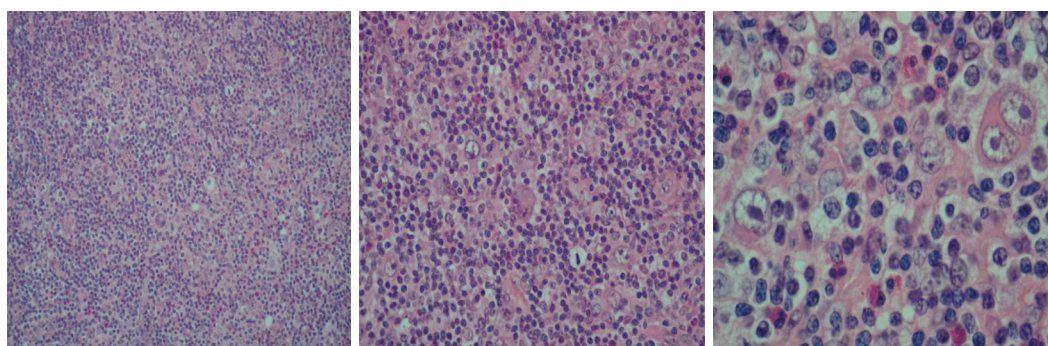
U okviru cHL na osnovu karakteristika reaktivnog infiltrata i varijanti RS ćelija, razlikuju se četiri histološka podtipa: Nodulska skleroza, Mešovita celularnost, Limfocitima bogat limfom i Limfocitna deplecija. Zajedničke su im imunofenotipske i genetske karakteristike, ali postoji razlika u kliničkim osobinama, kao i u udruženosti sa infekcijom Epštajn-Bar-ovim virusom (engl. Epstein-Barr virus -EBV) (25).

Nodulska skleroza je najčešći podtip cHL (približno 70%). Morfološki se karakteriše nodulskim tipom rasta, sa prisustvom najmanje jednog nodusa koji je okružen trakama kolagena (nodulska skleroza). Proces fibroze je uglavnom udružen sa zadebljanjem kapsule zahvaćenog limfnog čvora (69). Broj RS ćelija varira, čest je nalaz ćelija sa lakunarnim morfološkim tipom (retrakcija citoplazmatske membrane kao posledica formalinske fiksacije), koje se nalaze u okruženju malih limfocita, eozinofila, histiocita, kao i drugih ne-neoplastičnih ćelija zapaljenja (69). Lakunarne ćelije mogu da formiraju ćelijske agregate koji su označeni kao sincicijalna varijanta u slučaju da prominiraju (69) (Slika 1.8).



Slika 1.8: Nodulska skleroza klasičan HL. A, B Fibrozna kolagena vlakna dele limfni čvor u nodule. C Nekoliko lakunarnih ćelija.

Mešovita celularnost se javlja u približno 20% slučajeva cHL (70). Morfološka karakteristika ovog podtipa cHL limfoma je difuzni način rasta, mada se može javiti i kao interfolikularni tip. Intersticijalna fibroza može biti prisutna, ali za razliku od nodulske skleroze, u ovom slučaju ne postoji zadebljanje kapsule zahvaćenog limfnog čvora i nedostaju trake kolagena (70). Rid - Šternbergove ćelije imaju tipične morfološke karakteristike i okružene su mešovitim zapaljenskim infiltratom u kome dominiraju eozinofili, neutrofil, histiociti i plazma ćelije (70) (Slika 1.9).

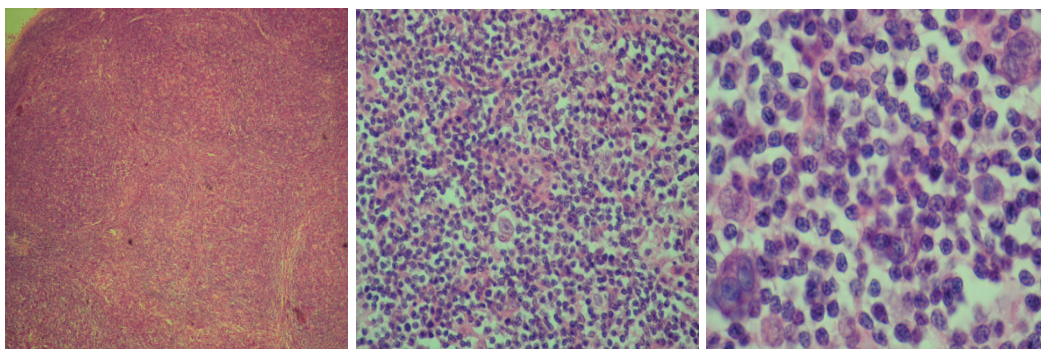


Slika 1.9: Mešovita celularnost, podtip klasičnog HL. A, B Difuzni mešoviti ćelijski infiltrat bez fibrotičnih vlakana. C Tipična mononuklearna Hočkinova i binuklearna Rid-Šternbergova ćelija u mešovitom celularnom infiltratu.

Često predomminira samo jedan od ovih ćelijskih tipova; npr. u slučajevima udruženim sa EBV, histiociti često pokazuju izražene epiteloidne karakteristike i formiraju agregate (70).

Limfocitima bogat podtip cHL se sreće kod oko 5% obolelih (71). Glavna morfološka karakteristika ovog podtipa cHL su nodulski ili ređe difuzni tip rasta. Noduli se sastoje od malih limfocita sa često atenuisanom T zonom. Oni mogu da imaju germinativne centre koji su relativno mali (zbog regresije) i ekcentrično postavljeni (71).

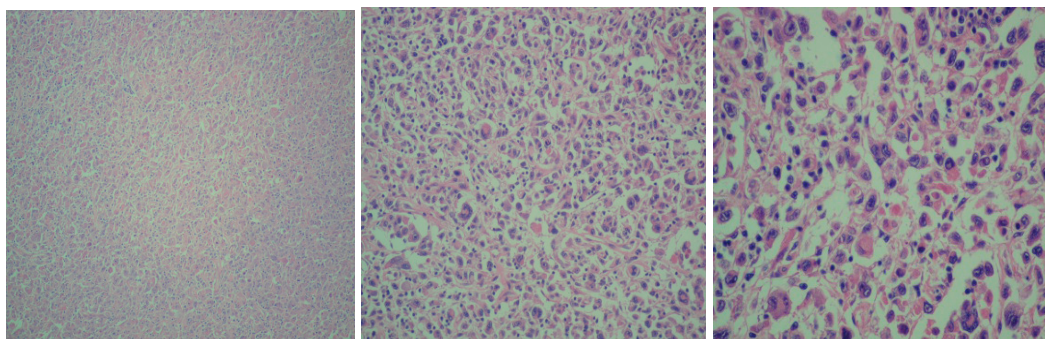
Hočkinove i Rid-Štembergove ćelije se dominantno nalaze unutar nodula, ali uvek izvan germinativnih centara. Tipično je da su eozinofili i neutrofilni odsutni u nodulima, a kada su prisutni nalaze se u malom broju u interfolikularnoj zoni (71) (Slika 1.10).



Slika 1.10: Limfocitima bogat podtip klasičnog HL, nodulska varijanta. A Nodulski tip rasta. B, C Tipična mononuklearna Hočkinova i binuklearne Rid-Štembergove ćelije u celularnom infiltratu koga čine mali limfociti, bez prisutnih neutrofila i eozinofila.

Limfocitna deplecija je najređi podtip cHL (manje od 1% slučajeva) (72). Iako je morfološki veoma raznolik, ovaj podtip karakteriše prisustvo brojnih RS, koje dominiraju u odnosu na ne-neoplastične male limfocite koji se nalaze u njihovom okruženju (limfocitna deplecija) (72).

U pojedinim slučajevima pleomorfne RS ćelije mogu dominirati, i u tom slučaju imaju sarkomatozan izgled. Takođe, opisani su i slučajevi koje karakteriše difuzna fibroza sa ili bez proliferacije fibroblasta i prisutnim pojedinačnim RS ćelijama (72) (Slika 1.11).



Slika 1.11: Limfocitna deplecija podtip klasičnog Hočkinovog limfoma. A Difuzni tip rasta. B, C Brojne bizarne krupne i male RS ćelije okružene bogatim fibrilarnim matriksom.

1.1.3 Kliničke karakteristike i procena proširenosti HL

Kliničke karakteristike: Značajne su opšte kliničke karakteristike Hočkinovog limfoma. Bolest ima karakterističnu bimodalnu epidemiološku krivulju dobne strukture obolelih. Ona je najčešća u dobnim grupama između 15. i 35. godine i kod starijih od 50 godina (73). Bolest ima sezonski karakter, a češće se javlja u proleće i u jesen nego u leto ili u zimu (73,74). Distribucija obolelih kod mladih je podjednaka među polovima, a dominira histološki tip nodulske skleroze. U starijoj populaciji bolest je češća u muškaraca nego u žena, a dominantan histološki tip je mešovita celularnost. Klinički tok bolesti u starijih je agresivniji nego u mladih (75).

Postoji nekoliko važnih faktora rizika za pojavu HL-a. Među njima dominiraju EBV (kod približno 75% bolesnika sa mešovitom celularnošću i 10-40% sa nodulskom sklerozom prisutan u RS ćelijama), humani Herpes virus-6 (HHV-6), HIV (engl. Human Immunodeficiency virus-HIV), genetska predispozicija (kod 1% bolesnika postoji porodična HLA), tonzilektomija i hormonski faktori (trudnoća) (73,74).

Inicijalna klinička procena i stejdžing bolesnika sa Hočkinovim limfomom su veoma važni jer je potrebno da se odredi stepen proširenosti i distribucija bolesti, proceni stanje organizma bolesnika za primenu standardne terapije i pruže informacije u vezi sa prognozom (76).

Za kliničku procenu HL-a najvažniji su konstitucionalni simptomi, životno doba i histopatološki tip (6). U vreme kada se postavlja dijagnoza, uznapredovalu bolest sa znatnom diseminacijom treba očekivati u bolesnika sa noćnim znojenjem, subfebrilnim temperaturama ili značajnim gubitkom telesne mase (više od 10% za poslednjih šest meseci). Bolesnici mlađeg životnog doba, u odnosu na bolesnike starijeg životnog doba (stariji od 50 godina), imaju u vreme postavljanja dijagnoze bolest koja je u nepovoljnijem kliničkom stadijumu (77). Grubo posmatrajući, u velikom broju slučajeva, limfocitima bogat podtip klasičnog HL ima "nemi" klinički tok, a HL tipa limfocitne deplecije odlikuje se konstitucionalnim simptomima, diseminacijom i brzom progresijom bolesti (6, 78-80). U odnosu na prethodno spomenute tipove, nodulska skleroza i mešoviti celularni tip HL-a nemaju predominantan način ispoljavanja, te klinički tok može biti i vrlo agresivan, ali i indolentan. Uzimajući u obzir mogućnosti savremene terapije HL-a može se zaključiti da histološki tip bolesti, kliničke manifestacije i životna dob obolelog nisu prognozni parametri koji odlučuju o krajnjoj sudbini bolesnika (8, 78, 81, 82).

Procena proširenosti bolesti i stejdžing sistemi: Danas su terapijske mogućnosti u lečenju HL-a znatno veće nego u prošlosti. Značajan napredak u rezultatima lečenja i u izboru terapijskih protokola ostvaren je zahvaljujući razvoju dijagnostičkih metoda koje se primenjuju sa ciljem da se utvrdi stepen proširenja HL-a. Zadovoljavajući nivo pouzdanosti

postiže se primenom različitih neinvazivnih tzv. imidžing (engl. imaging) i invazivnih dijagnostičkih metoda. Među metodama koje se više ne primenjuju su limfangiografija, stejdžing laparatomija sa splenektomijom i selektivnim biopsijama. Ultrazvuk (posebno koristan prilikom otkrivanja solidnih lezija), nativna radiografija grudnog koša (PA-posteroanteriorna i lateralna-profilna), kompjuterizovana tomografija (CT) i magnetna rezonanca (MR), pored ostalih pogodnosti, omogućavaju dobru eksploraciju stanja u retroperitoneumu i u slezini (6-8,78,81-83). Za otkrivanje patoloških lezija koje se na CT-u ne mogu sa sigurnošću definisati, od koristi je primeniti FDG-PET-CT (engl. Fluorine-18-Deoxyglucose Positron Emission Tomography with CT). To je novija imidžing metoda koja objedinjeno registruje anatomske (CT) i funkcionalne dijagnostičke karakteristike (FDG-PET), koje se u konkretnom slučaju zasnivaju na pojačanoj glikolizi tumorskih ćelija, odnosno na povećanom vezivanju radiofarmaka u tumorskom tkivu (radioaktivni glukozni analog nakon fosforilacije biva zarobljen u tumorskim ćelijama) (84-86).

Prilikom procene proširenosti HL-a potrebno je analizirati odvojeno svaki prostor u kome se bolest može pojaviti. Limfni čvorovi vrata, supraklavikularni limfni čvorovi i niski limfni čvorovi vrata ispituju se sa posebnom pažnjom, kao i limfni čvorovi aksilarne i ingvinalne regije. U obavezan deo pregleda spada procena stanja limfnih čvorova medijastinuma, kao i plućnog parenhima (87-89). Neophodno je pažljivo sagledati stanje abdominalnog i retroperitonealnog prostora i posebno, grupe limfnih čvorova oko velikih krvnih sudova, slezine i jetre. Invazija vaskulnih struktura relativno je česta kod obolelih sa limfocitnom deplecijom. Ona može da se javi i u bolesnika sa invazijom slezine nodulskom sklerozom i u podtipu mešovite celularnosti (90-92).

Stejdžing sistem omogućava procenu anatomske proširenosti bolesti i izbor odgovarajućeg terapijskog pristupa. Isto tako, stejdžing sistem pruža mogućnost da se utvrde pojedini prognostički parametri koji ukazuju na povećani rizik od pojave recidiva bolesti ili su indikator niske stope preživljavanja (93).

Do sada je, u skladu sa novim saznanjima, tehnološkim dostignućima i novim terapijskim pristupima, razvijeno i modifikovano nekoliko stejdžing sistema (93).

En Arbor stejdžing sistem Hočkinovog limfoma razvijen je 1971. godine (engl. Ann Arbor staging classification) kada je radioterapija bila metoda izbora u lečenju ovih bolesnika. Ova vrsta terapije bazirala se na tendenciji HL da se širi u okolne limfne čvorove (94).

Danas se za klinički stejdžing bolesti, koji je osnova za lečenje HL-a, koristi Kotsvoldova modifikacija (engl. Cotswolds modification) En Arbor stejdžing sistema iz 1989. godine kojom je ozvaničena upotreba CT-a u detekciji intra-abdominalne bolesti, uveden pojam voluminozne tumorske mase, i dati vodiči za praćenje odgovora na primenjenu terapiju (89). Ova stejdžing klasifikacija pružila je, takođe, osnovu za odabir inicijalnog terapijskog pristupa, kao i za prepoznavanje dodatnih faktora (voluminozna tumorska masa, broj mesta zahvaćenih tumorom) koji nepovoljno utiču na prognozu (89) (Tabela 2).

Tabela 2: Kotsvoldova modifikacija En Arbor stejdžing sistema

Kotsvoldova modifikacija En Arbor stejdžing klasifikacije	
Stadijum	Definicija
I	Zahvatanje samo jednog limfnog čvora ili limfoidne strukture (npr. slezina, timus, Valdejerov (engl. Waldeyer) prsten-tonzile),
II	Zahvatanje dva ili više regiona limfnih čvorova sa iste strane dijafragme (medijastinum se računa kao pojedinačna lokalizacija; hilarna limfadenopatija se razmatra bilateralno); potrebno je naglasiti broj anatomskih mesta i obeležiti ih sufiksom (na primer: II ₃),
III	Zahvatanje limfnih čvorova ili struktura sa obe strane dijafragme;
III₁	Sa ili bez zahvatanja slezine i spleničnih, hilarnih, celijačnih, ili portalnih čvorova,
III₂	Sa zahvatanjem paraaortnih, ilijačnih i/ili mezenteričnih čvorova,
IV	Zahvatanje ekstranodalnih lokalizacija osim onih koje su navedene ispod tačke E.

Obeležja koja su primenljiva u bilo kom stadijumu bolesti:

- A - Bez B simptoma
- B - Temperatura viša od 38°C, noćno znojenje, neobjašnjiv gubitak za više od 10% u telesnoj težini za proteklih 6 meseci,
- X - Voluminozna tumorska masa (tumor u medijastinumu veći od 1/3 širine medijastinuma u nivou Th5-Th6, ili prisustvo nodalne mase maksimalnog dijametra većeg od 10 cm)
- E - Zahvatanje pojedinačnog ekstranodalnog mesta, u blizini ili proksimalno postojećoj nodalnoj lokaciji,
- CS - Klinički stadijum bolesti,
- PS - Patološki stadijum bolesti.

Međutim, ova modifikacija nije u potpunosti prihvaćena pošto se u mnogim centrima koriste i brojni drugi prognozni faktori za različite En Arbor stadijume, prezentaciju bolesti, izbor terapijskog pristupa, ishod lečenja kao i za različite kombinacije ovih faktora (93).

1.1.4 Prognozni faktori

Prognozni faktori su varijable koje se određuju za svakog bolesnika posebno, a njihov značaj je u tome što mogu delimično objasniti razliku u ishodu bolesti (95). U kliničkoj praksi varijable su važne pošto se na osnovu njihovih vrednosti mogu otkriti bolesnici koji pripadaju različitim rizičnim grupama, a posebno, jer imaju uticaj na izbor terapijskog pristupa i na vrstu saveta koji su neophodni kao poseban vid pružanja pomoći bolesniku. Ipak, značajno je pomenuti da je individualna procena na nivou svakog bolesnika veoma neizvesna, odnosno, određena procena verovatnoće koja se pravi može biti dovoljno precizna samo na nivou grupe (96, 97).

1.1.4.1 Tipovi prognoznih faktora

Teorijski, prognozni faktori mogu se podeliti na faktore koji su u vezi sa bolesnikom (npr. imunokompetencija, performans status) i na faktore koji se odnose na osobine tumora (npr. broj tumorskih ćelija, proliferacija tumorskih ćelija, širenje tumorskih ćelija, rezistencija na apoptozu). Moglo bi se reći da prognoza kod bolesnika zavisi od uzajamnog odnosa između ove dve grupe parametara (98).

1.1.4.1.1 Prognozni faktori u ranom i uznapredovalom kliničkom stadijumu Hočkinovog limfoma

Evropska organizacija za ispitivanje i lečenje karcinoma (engl. European Organisation for Research and Treatment of Cancer – EORTC) i Nemačka studijska grupa za Hočkinov limfom (engl. German Hodgkin's Lymphoma Study Group-GHSG) su na osnovu utvrđenih prognoznih faktora kod bolesnika obolelih od Hočkinovog limfoma definisale tri prognozne podgrupe, Rani povoljan stadijum (engl. Early-stage favourable), Rani nepovoljan stadijum (engl. Early-stage unfavourable) i Uznapredovali stadijum (engl. Advanced Stage).

Svrstavanje bolesnika u prognozne grupe je od koristi jer se na osnovu toga određuje stepen terapijske agresivnosti koji će se primeniti u lečenju (99) (Tabela 3).

Tabela 3. Definisane terapijske grupe prema EORTC i GHSG

	EORTC		GHSG	
FAKTORI RIZIKA	A	velika medijastinalna masa	A	velika medijastinalna masa
	B	starost ≥ 50 godina	B	ekstranodalna bolest
	C*	ubrzana sedimentacija eritrocita	C*	ubrzana sedimentacija eritrocita
	D	≥ 4 zahvaćena regiona	D	≥ 3 zahvaćena regiona
Rani povoljan stadijum	Klinički stadijum I i II bez faktora rizika (Supradijafragmalno)		Klinički stadijum I i II bez faktora rizika	
Rani nepovoljan stadijum	Klinički stadijum I i II sa ≥ 1 faktora rizika (Supradijafragmalno)		Klinički stadijum I, IIA sa ≥ 1 faktora rizika Klinički stadijum IIB sa C/D, ali bez A/B	
Uznapredovali stadijum	Klinički stadijum III i IV		Klinički stadijum IIB sa A/B Klinički stadijum III i IV	

Skraćenice: EORTC, European Organisation for Research and Treatment of Cancer; GHSG German Hodgkin's Lymphoma Study Group; *ubrzana sedimentacija eritrocita ≥ 50 bez B simptoma ili ≥ 30 sa B simptomima.

1.1.4.1.2 *Prognozni skorovi u uznapredovalom kliničkom stadijumu Hoćkinovog limfoma*

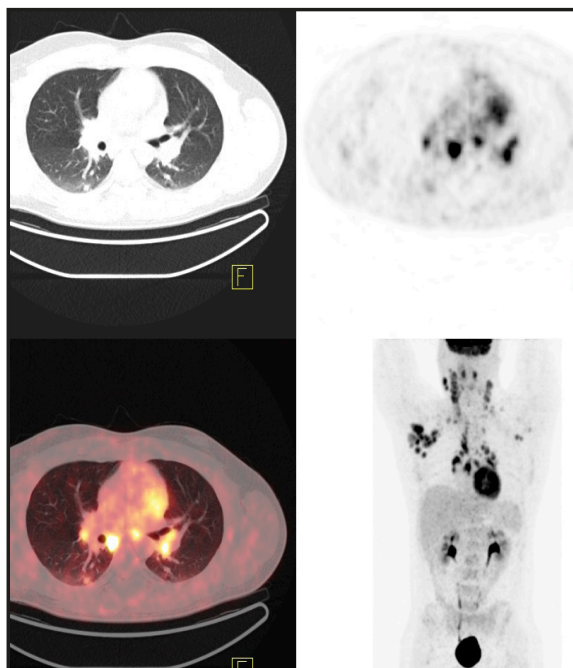
Prognozni skorovi za uznapredovali stadijum HL su kliniĉki vaŹni da bi se mogao obaviti izbor terapijskog pristupa koji je prilagoĊen potrebama bolesnika. U tom smislu potrebno je odrediti grupu bolesnika kod kojih:

- postoji mogućnost primene prekomerne terapije, odnosno, koja bi mogla imati korist od redukcije terapije ili
- primena standardne terapije najverovatnije neće dovesti do izlećenja i kod kojih je indikovana primena drugih terapijskih pristupa (93).

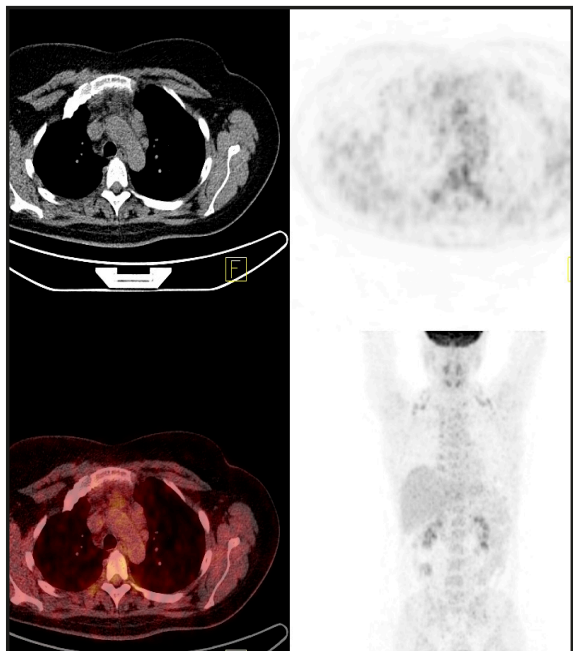
Za bolesnike u odmaklom stadijumu bolesti primenjuje se Internacionalni Prognozni Skor (engl. International Prognostic Score - IPS) koji je nastao kao rezultat studije MeĊunarodnog Projekta o Prognoznim Faktorima (engl. International Prognostic Factors Project) na 5141 bolesnika lećenih hemioterapijom koja sadrŹi *doxorubicin* (MOPP/ABVD, ABVD), sa ili bez radioterapije a u skladu sa definisanim protokolom (100). Internacionalni Prognozni Skor je sistem koji se sastoji od sedam parametara na osnovu kojih se moŹe proceniti stopa petogodišnje remisije, odnosno, odsustva znakova progresije bolesti u rasponu od 45-80% (100). Faktori koji redukuju stopu intervala bez znakova oboljenja pojedinaĉno za oko 8% su: nivo serumskog albumina ispod 4g/dl, nivo hemoglobina ispod 10,5g/dl, muški pol, starost iznad 45 godina, IV stadijum bolesti, broj leukocita iznad 15.000/mm³, broj limfocita ispod 600/mm³ ili manje od 8% u odnosu na ukupan broj belih krvnih zrnaca ili oba ova parametra (100). Ovaj model pruŹa mogućnost da se napravi jasna razlika jedino izmeĊu grupe bolesnika sa relativno malim rizikom i grupe sa relativno visokim rizikom (IPS≤2 vs IPS>2) (101).

Internationalni Prognozni Skor će ostati metod izbora za intezivniji terapijski pristup u visoko riziĉnih bolesnika sa uznapredovalim stadijumom bolesti sve dok se ne definišu novi, pouzdani, biološki specifiĉni prognozni markeri (93).

Danas se za stejdŹing i evaluaciju odgovora na primenjenu terapiju koriste CT i FDG PET CT (Slike 1.12 i 1.13). U bolesnika sa uznapredovalim stadijumom HL se pokazalo da je rana evaluacija FDG-PET-om posle završenog jednog ili dva ciklusa hemioterapije metoda koja ima visoku prognoznou vrednost prilikom procene krajnjeg ishoda lećenja (102-105). U prilogu ove tvrdnje su rezultati ispitivanja dobijenih u velikoj studiji bolesnika lećenih ABVD protokolom, kada se pokazalo da je prognozna vrednost ranog skeniranja PET-om znaĉajnija od uloge IPS-a (106).



Slika 1.12: Povišeni metabolizam glukoze u prome-
nama u plućnom parenhimu i uvećanim hilarnim
limfnim čvorovima.



Slika 1.13: Uvećani limfni čvorovi paraaortalno, uz
luk aorte ne vezuju ^{18}F -FDG. Nisu prisutni znaci
metabolički aktivne bolesti.

1.2 APOPTOZA

1.2.1 Klasifikacija ćelijske smrti

Pedesetih godina prošlog veka Glikzman i Saunders (engl. Gluksman, Saunders) opisali su ćelijsku smrt kao pojavu koja ima ulogu u normalnom razvoju beskičmenjaka i kičmenjaka. Dokaz da postoje dva morfološki različita tipa ćelijske smrti pruža Ker (engl. Kerr) 1965. godine, koji potom 1972. godine zajedno sa Vilijemom i Karijem (engl. William, Curry) u naučnu terminologiju uvodi naziv apoptoza kojim je označio fiziološko tj. "prirodno" umiranje ćelije (107,108). Oni su istovremeno uveli i novu dihotomnu klasifikaciju ćelijske smrti na apoptozu i nekrozu. Danas je kao treći oblik ćelijske smrti predložena autofagija (109).

1.2.1.1 Apoptoza

Apoptoza (naziv poreklom od grčke reči *apoptos* koja označava jesenje opadanje lišća sa drveta) je aktivan proces ćelijske autodestrukcije koji je genski regulisan (110,111). Programirana ćelijska smrt neophodan je mehanizam koji je komplementaran procesima proliferacije i očuvanju homeostaze svih tkiva. U toku jedne godine svaka osoba pojedinačno stvori i uništi ćelijsku masu koja je ekvivalentna težini sopstvenog tela.

Apoptoza je opisana u normalnim fiziološkim uslovima (tokom procesa embriogeneze, diferencijacije i u procesima razvoja i regulacije imunog sistema) i kod brojnih patoloških stanja (112,113).

Apoptoza je odgovorna za odvijanje brojnih fizioloških, adaptivnih i patoloških zbivanja, kao što su:

- Programirano smanjenje broja ćelija tokom embriogeneze i metamorfoze,
- Hormon zavisna redukcija broja ćelija kod odraslih osoba (npr. kontrola ćelija endometrijuma u menstrualnom ciklusu),
- Uklanjanje ćelija u ćelijskim populacijama koje karakteriše visok nivo proliferacije (npr. epitelne ćelije crevnih kripti gastrointestinalnog trakta),
- Eliminacija viška ćelija i održavanja stalnog broja ćelija-tkivna homeostaza,
- Imunski tokom regulisane eliminacije specifičnih ćelijskih populacija,
- Uklanjanje transformisanih ćelija u sprečavanju neoplastične transformacije (112-114).

Poremećaj procesa apoptoze otkriven je u brojnim patološkim stanjima organizma tj. čitavom nizu oboljenja. Tu su, pre svega, različita maligna oboljenja, gde je poremećeno

odvijanje apoptoze uključeno u proces kancerogeneze. Inhibicija procesa apoptoze registrovana je i u brojnim autoimunim oboljenjima i tokom virusnih infekcija.

Kod pojedinih bolesti proces apoptoze je stimulisan, kao na primer kod neurodegenerativnih bolesti (Parkinsonova bolest, Alchajmerova bolest i amiotrofična lateralna skleroza-ALS). Takođe, u uzorcima periferne krvi bolesnika inficiranih HIV virusom otkriveno je da procesom apoptoze progresivno umiru CD4+ T limfociti.

Toksična i ishemična oštećenja tkiva stimulišu apoptozu.

Hašimotov tireoiditis i eritematozni sistemski lupus karakteriše povećani broj ćelija koje umiru procesom apoptoze (115-117).

Na apoptozu utiču stimulatorno i inhibitorno brojni faktori (84-86, Tabela 4).

Tabela 4: Inhibitori i aktivatori apoptoze

FAKTORI	INHIBITORI APOPTOZE	AKTIVATORI APOPTOZE
FIZIOLOŠKI	Faktori rasta	Familija TNF i TGF
	Ekstraćelijski matriks	Neurotransmiteri
	Cink	Kalcijum
	Estrogeni i androgeni	Glukokortikoidi
NEFIZIOLOŠKI	Adenovirusi E1B	Toplotni šok
	Bacilovirus p-35 i IAP	Virusna infekcija
	Cowpox virus crmA	Bakterijski toksini
	Epstein-Barr virus,	Slobodni radikali
	BHFR1	Citotoksični T limfociti
	LMW5-HL	UV i Y zračenje
FARMAKOLOŠKI	Inhibitori kaspaza	Antineoplastični
	Tumorski promotori	Agensi-citostatici
	Inhibitori kalpaina	Razni toksini

1.2.1.2 Nekroza

Nekroza (naziv poreklom od grčke reči *nekros*-leš) je pasivan proces čiju prirodu određuju brojni spoljni i unutrašnji ćelijski procesi (112, 118, 119). Najuočljivija razlika između nekroze i apoptoze je u tome što nekroza obuhvata veliki broj ćelija u jednoj ćelijskoj populaciji, dok su procesom apoptoze obuhvaćene samo pojedinačne ćelije (112, 120). U toku procesa nekroze otkazuju homeostazni mehanizmi, ćelije gube sposobnost transporta

jona, osmoregulacije, produkcije ATP-a i održavanja *pH* ravnoteže. Ovo je praćeno povećanjem koncentracije kalcijumovih jona u citosolu i ulaskom vode u ćeliju, te nastaje edem organela i čitave ćelije. Ove promene su inicijalno reverzibilne, ali dalje napredovanje procesa prati razgradnja citoskeleta i aktivacija destruktivnih fosfolipaza i proteaza, ruptura membrana organela i plazma membrane, ondostno liza ćelije sa oslobađanjem ćelijskih sastojaka u okolinu. Sve nabrojano za rezultat ima nastanak zapaljenjske reakcije koja dodatno može da ošteti tkivo.

S druge strane, kod apoptoze se smanjuje zapremina ćelije, a integritet plazma membrane, ćelijskih organela i ćelijska energija su očuvani do poslednje faze procesa ćelijske smrti što ukazuje na to da je proces aktivan. Intaktnost spoljne ćelijske membrane omogućava da se apoptoza završi bez štetnih posledica na susedne ćelije i bez izazivanja zapaljenjske reakcije (112,120).

Nekroza je pojava koja u ekstremno nefiziološkim uslovima zahvata veći broj ćelija i kao krajnji efekat, na mestu njenog dešavanja, nastaje ožiljak dok je arhitektonika oštećenog tkiva trajno izmenjena. Apoptoza je diskretan proces koji zahvata određene ćelije jedne populacije, pa se na mestu njenog dešavanja ne formira ožiljak. Između nekroze i apoptoze postoji razlika i u ćelijskoj morfologiji. Kod nekroze hromatin nikada nije marginalno kondenzovan već je u manjim grupama koje su nepravilne i slabo definisane. Pored toga, kod nekroze ne postoji nuklearna fragmentacija, skupljanje ćelija ili formiranje apoptotskih tela (112,120).

Pojedine morfološke karakteristike procesa nekroze (značajna razgradnja citoskeleta i "pupljenje" plazma membrane) su slične karakteristikama kasne faze procesa apoptoze.

1.2.1.3 Autofagija

Autofagija (naziv potiče od grčkih reči *phagy*-jesti i *auto*-sebe) je proces u kome ćelija reciklira sopstvene nepotrebne resurse, ili oštećene organele, kao i makromolekule (121-123). Drugim rečima, ona označava proces u kome ćelija digestijom sopstvenih organela i makromolekula generiše energiju i metabolite (121-124). Taj proces je adaptivni odgovor na subletalni stres, kao što je nedostatak hranljivih materija, koje su izvor energije. Zahvaljujući autofagiji može da preživi ćelija koja gladuje ili ona koja je ostala bez faktora rasta. Ćelije koje su u dužem vremenskom intervalu bez dovoljno hranljivih materija, ipak, na kraju iskoriste i potroše sve raspoložive supstrate i konačno umiru (autofagija-udružena ćelijska smrt) (121-124).

Autofagija, takođe, ima ulogu u supresiji tumorskog rasta, uklanjanju proteina oštećenih toksinima, eliminaciji intracelularnih mikroorganizama kao i u antigenoj presenta-

ciji (121-123).

Na osnovu načina na koji lizozomi primaju materijal za degradaciju definisana su tri oblika autofagije (121):

1. makroautofagija - struktura sa duplom membranom (autofagozom) okružuje „tvar“ i fuzioniše se sa lizozomom;
2. mikroautofagija - invaginacija lizozomalne membrane okružuje „tvar“;
3. autofagija posredovana šaperonima - proteini toplotnog stresa koji donose supstance u lizosome.

Uloga autofagije u ćelijskoj smrti je kontroverzna. Pored stava da je autofagija adaptivni odgovor, još uvek nije razjašnjeno da li tokom autofagije može ćelija da umre bez aktiviranja kaspaza i bez morfoloških znakova apoptoze (125,126).

Razlika između apoptoze, nekroze i autofagije obuhvata razlike u načinu nastanka smrti i razlike u morfološkim, biohemijskim i molekularnim karakteristikama (119,125,126). Programirana ćelijska smrt je važan koncept. Ćelijska smrt je programirana kada je genski kontrolisana. Apoptoza i autofagija su dva fundamentalna tipa programirane ćelijske smrti (125,127). Činjenica da se ćelijska smrt može javiti kao genski kontrolisani proces omogućila je otkrivanje mehanizama nastanka mnogih bolesti. Na taj način ova saznanja doprinela su razvoju farmakoloških agenasa koji iniciraju ili inhibišu programiranu ćelijsku smrt (128-131). Štaviše, nova otkrića u vezi sa nekrozom, koja je tradicionalno smatrana slučajnim oblikom ćelijske smrti, pokazala su da pod određenim okolnostima i ona može biti inicirana ili da je pod kontrolom mehanizama koji su programirani (132-137).

1.2.2 Morfološke i biohemijske karakteristike apoptoze

Apoptoza je asinhrona pojava koja zahvata pojedinačne ćelije tkiva (138). Proces se odvija brzo tako da se ćelija iz jedne ćelijske populacije može ukloniti za četiri sata. Tokom apoptoze se ispoljavaju morfološke promene u karakterističnom obliku i redosledu, ali to ne zavisi od vrste tkiva ili od okolnosti pod kojima se apoptoza izaziva. Glavne morfološke karakteristike apoptoze su otkrivene transmisijom elektronskom mikroskopijom (118, 139).

Morfološke promene koje nastaju tokom apoptoze mogu se podeliti na promene rane i kasne faze procesa apoptoze.

Prvi morfološki znak apoptoze je kondenzacija hromatina i on se odvija najčešće u marginalnim oblastima nukleusa. Na delovima nukleusne ovojnice, u čijoj okolini nije nastala akumulacija kondenzovanog heterohromatina uočava se uvećanje nukleusnih pora (140, 141).

U ovoj, ranoj, fazi apoptoze, pored kondenzacije hromatina, odvija se i kondenzacija citoplazme, pa se ona označava kao "**kondenzacijska faza**". Kondenzacija nukleusa i citoplazme izaziva smanjenje volumena ćelije, povećanje gustine citoplazme, sabijanje intaktnih organela, razgradnju citoskeleta i separaciju od okolnih ćelija u tkivu i ekstracelularnih veza u matriksu (140,141).

Morfološki uočljiva kondenzacija hromatina nastaje usled karakteristične internukleozomske razgradnje DNK na fragmente veličine umnožaka od 180-200 parova baza. Za ovu fragmentaciju odgovoran je enzim CAD (kaspazama aktivisana DNKaza) koji se normalno nalazi u inaktivnom stanju vezan za inhibitor (ICAD). Aktivisanje nastaje posle razgradnje inhibitora, a izazvana je dejstvom kaspaza (141-143).

U sledećoj fazi nastaje proces "**fragmentacije**" jedra i citoplazme na manje okruglaste fragmente koji su ograničeni intaktnom membranom i koji predstavljaju apoptozna tela (108, 140, 141). U ovim telima nalaze se delovi citoplazme sa morfološki očuvanim organelama, sa ili bez fragmenata jedra. Očuvanost membrana sprečava "prosipanje" ćelijskih sastojaka u okolinu, te za razliku od nekroze nema prateće zapaljenjske reakcije (108). Ceo proces, od nastanka prvih morfološki vidljivih promena do fragmentacije ćelija, odvija se veoma brzo i može se meriti minutima (140,141).

Terminalnu fazu apoptoze karakteriše pojava **apoptotskih tela** (membranama ograničeni ćelijski fragmenti). Apoptotska tela sadrže citoplazmu i zbijene organele sa ili bez nuklearnih fragmenata. Okolne ćelije ili makrofagi brzo fagocituju apoptotska tela. Proces fagocitoze odlikuje i tipično odsustvo zapaljenjske reakcije. To je finalna faza apoptoze - faza "**fagocitoze i intracelularne degradacije**" (114,141). Apoptotska tela formirana u eksperimentalnim uslovima, *in vivo*, se ne fagocituju. Ona nestaju spontano, tokom nekoliko sati, procesom koji se naziva **sekundarna nekroza** (141,144).

1.2.3 Molekularna osnova apoptoze

1.2.3.1 Receptori smrti i aktivisanje kaspaza

Apoptozu mogu indukovati brojni ekstracelularni i intracelularni signali (induktori apoptoze), a u izvršnoj fazi se aktiviraju kaspaze (efektori apoptoze). Bez obzira na vrstu stimulusa (ekstra ili intracelularni) koji u početnoj fazi indukuju proces apoptoze i transdukcije signala smrti, ključni proces je kaskadna reakcija proteolizne aktivacije proteinske familije enzima cisteinproteaza – kaspaza (cistein aspartat specifične proteaze). Kaskadna aktivacija kaspaza je glavna karakteristika tzv. izvršne faze procesa apoptoze. U novije vreme je postignut napredak u razumevanju molekularnih mehanizama izvršne faze apop-

toze i dokazano je učešće proteaza, posebno kaspaza (145).

Rezultati studija rađenih na nematodi *Caenorhabditis elegans* dokazuju ulogu proteaze i same proteolize u procesu apoptoze. Tokom embriogeneze nematoda proteinski produkti *Ced 3* i *Ced 4* gena imaju ključnu ulogu u strogo kontrolisanom genskom procesu ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. *Ced 3* gen pokazuje visok nivo homologije sa genom za humanu cistein proteazu, interleukin 1 β konvertazu (*ICE*) (146). Otkriveno je 14 humanih homologa *ICE/Ced 3* gena čiji proteinski produkti se aktiviraju tokom procesa apoptoze (145).

Fas ligand je 40kD transmitterski protein tipa II koji vezivanjem za Fas receptor indukuje proces apoptoze. Fas receptor (Fas-Rc, APO-1, CD95) je transmembranski receptor tipa I, mase od 45kD, koji pripada TNF/NGF (engl. nerve growth factor-NGF) familiji receptora (147). Ovaj receptor je otkriven na plazma membranama različitih tipova ćelija uključujući i aktivirane humane T i B limfocite (148).

Receptori smrti, kao što je Fas-Rc poseduju citoplazmatske domene veličine od ~80 aminokiselinskih ostataka, koji se zbog svog značaja u prevođenju signala nazivaju "domeni smrti". Aktivacija Rc indukuje homofilnu interakciju receptornih domena smrti sa homologim domenima smrti intracelularnih proteina koji se nazivaju adapteri. Ovaj kompleks naziva se DISC (engl. death inducing signaling complex-DISC) (149).

Domeni smrti Fas-Rc interaguju sa homologim domenima proteinskog adaptera koji se naziva domen smrti udružen sa proteinom FAAD/MORT1 (engl. Fas-associated death domain-FAAD). Proteini adapteri sadrže i tzv. "efektorne domene smrti" - DED (engl. death effector domains-DED). Ovi domeni reaguju sa sebi homologim efektornim domenima smrti enzima prokaspaze 8 (FLICE). Prokaspaza 8 se autoaktivše na DISC-u i procesira u aktivni enzim kaspazu 8. Kaspaza 8 je prvi enzim koji se tokom prevođenja ekstraćelijskog signala smrti aktivirše u ćeliji i indukuje kaskadnu reakciju aktivisanja drugih apoptotskih enzima - kaspaza. Zbog ove biološke uloge dobila je naziv inicijatorna kaspaza (107,150,151).

Putem istog mehanizma TNFR1 aktivirše kaspazu 8, ali je za formiranje veze između TNFR1 i FADD neophodno prisustvo dodatnog adaptornog proteina TRADD. TNFR1 može aktivirati i transkripcioni faktor NF- κ B koji izaziva ekspresiju antiapoptoznih molekula i inflamatornih citokina (152).

Aktivnost NF- κ B neophodna je za indukciju više od sto pedeset gena uključenih u ćelijski rast, diferenciranje, razvoj, apoptozu i adaptivne odgovore na promene u ćelijskom redoks balansu (153,154).

NF- κ B vrši transaktivaciju gena sa antiapoptotskom funkcijom, kao što su IAP familija proteina – inhibitora kaspaza (engl. inhibitors of apoptosis proteins- IAP), TRAF 1

i TRAF 2, antiapoptotskih Bcl-2 homologa - Bfl/1 i Bcl-Xl i ekspresiju gena koji učestvuju u sintezi NO čiji su metaboliti uključeni u inhibiciju apoptoze (155-157).

NF- κ B može indukovati apoptozu aktivacijom promotera gena receptora smrti i liganda smrti (CD95, CD95-L i TRAIL receptora DR4 i DR5) (158, 159).

Antiapoptotski proteini koji sadrže efektorne domene smrti - DED (BAR, BAP31, FLIP_{Long,Short}) mogu blokirati proces apoptoze indukovane vezivanjem ekstraćelijskog signala za receptor smrti. FLIP_{L,S} (engl. FADD like interleukin-1 β converting enzyme like protease inhibitory protein-FLIP) imaju homologu strukturu sa prokaspazom 8 ali sa nedostatkom kataliznog dela. Ova struktura omogućava vezivanje za adapterski protein (npr. FADD) na DISC-u inhibišući aktivaciju inicijatorne kaspaze 8 (160-162).

Apoptoza indukovana preko receptora smrti može biti antagonizovana i vezivanjem liganda za receptore koji ne poseduju citoplazmatske domene smrti. Ovi receptori nazivaju se receptori mamci (engl. decoy receptors-DCR) i u njih spadaju: DCR1 (TRAIL-R3), DCR2 (TRAIL-R4), DCR3 (CD95) (163, 164).

1.2.3.2 Intracelularni signali smrti

Intracelularni signali smrti aktiviraju se najčešće kao odgovor ćelije na prisustvo stresa različite prirode koji je narušio intracelularnu homeostazu. Najčešći uzročnici aktivacije intracelularnih signala smrti su lekovi i druge toksične nokse, toplotni stres, radijacija, hipoksija i virusna infekcija. Mehanizmi kojima različite vrste stresa aktiviraju biohemizam apoptoze nisu poznati u potpunosti. Smatra se da intenzitet i dužina trajanja stresa predstavljaju ključne faktore u "odluci" ćelije da aktivira program sopstvenog suicida (114,150).

Mitohondrija ima važnu ulogu u mnogim formama apoptoze (165). Pod uticajem stresa iz intermembranskih prostora mitohondrija oslobađaju se u citoplazmu apoptogeni faktori koji potom započinju izvršnu fazu apoptoze (166,167). Mitohondrijalne promene u živim ćelijama su predominantno pod kontrolom antiapoptotskih članova Bcl-2 familije proteina.

Proteinski produkti *Bcl-2* familije gena ključni su intracelularni modulatori (regulatori) procesa apoptoze (168). Najpoznatiji regulator sa inhibitornim efektom na proces apoptoze je proteinski produkt *Bcl-2* (engl. B cell lymphoma 2 - Bcl-2) gena. Gen je otkriven 1985. godine kao protoonkogen, a najčešće se aktivira hromozomskom translokacijom (t14;18) koja se detektuje u oko 85% folikularnih (non-Hodgkin) limfoma i 25% difuznih B ćelijskih limfoma (169,170). Ovom translokacijom *Bcl-2* gen se prebacuje u lokus teškog lanca imunoglobulina što izaziva visok nivo ekspresije gena, tj. uvećanje količine njegovog proteinskog produkta. Proteinski produkt *Bcl-2* gena je intracelularni, 26kDa, membranski protein lokalizovan u membranama mitohondrija, endoplazmatskom retikulumu i u spo-

ljašnjoj membrani nukleusne ovojnice (171).

Bcl-2 gen samo je jedan član familije gena čiji proteinski produkti, takođe, predstavljaju modulatore apoptoze. Pojedini imaju stimulatorni a drugi inhibitorni efekat na proces apoptoze (172). Kod čoveka je otkriveno više od dvadeset članova *Bcl-2* familije proteina koji poseduju barem jedan od četiri postojeća *Bcl-2* homologa domena (BH1-BH4). *Bcl-2* familija proteina je podeljena u tri kategorije:

1. Proteini koji suprimišu apoptozu (antiapoptotski) i čine ćeliju manje osetljivom na različite apoptogene stresne faktore (*Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *Bcl-W*, *Bcl-G*, *Blf-1* (A1), *MCL1*, *BOO/DIVA*, *NR-B*),
2. Proteini koji promovišu apoptozu (proapoptotski) dimerizacijom sa *Bcl-2/Bcl-X_L* antagonizuju antiapoptotski efekat (*Bax*, *Bak*, *Bok*) i
3. Proapoptotski proteini koji poseduju samo BH-3 (*BID*, *BAD*, *BIM*, *BIK*, *NOXA*, *PUMA*) (173,174).

Osetljivost ćelija na induktore apoptoze (signal smrti) zavisi od odnosa proapoptotskih i antiapoptotskih članova proteinskih produkata *Bcl-2* familije gena. Proteini ove familije ispoljavaju biološko dejstvo u formi homo i heterodimera (172). Identifikacija brojnih *Bcl-2* homologa koji se mogu za njega vezati pomoću tzv. dimerizacionih domena ukazuje da u osnovi njihovog biološkog delovanja leže protein-protein interakcije. Kao koimunoprecipitat *Bcl-2* proteina prvi je otkriven proapoptotski homolog *Bax* (engl. *Bcl-2-associated X-Bax*) protein (172). *Bax* je protein od 21kDa koji slično drugim članovima *Bcl-2* familije gena sadrži visoko konzervirane homologne domene BH1 – BH3. Ovi domeni su odgovorni za procese homodimerizacije ili heterodimerizacije sa proteinskim produktima drugih članova ove familije gena (175).

Slično *Bcl-2* proteinu i *Bax* ima hidrofobni karboksilni kraj koji mu omogućava vezivanje za membrane ćelijskih organela. *Bcl-2* i *Bax* proteini mogu formirati homodimere *Bcl-2/Bcl-2*, *Bax/Bax* i heterodimere *Bcl-2/Bax*.

Sudbina ćelije zavisi od međusobnog odnosa homo i heterodimera. Predominantno prisustvo *Bcl-2/Bcl-2* homodimera i/ili *Bcl-2/Bax* heterodimera u ćeliji uzrokuje inhibiciju procesa apoptoze. Suprotno tome, prisustvo *Bax/Bax* homodimera “u višku” indukuje proces apoptoze. Odnos ovih dimera je veoma značajan i smatra se vrstom autoimunog “ćelijskog reostata” koji opredeljuje vrstu ćelijskog odgovora na apoptotski stimulus (175). Prema tome, glavna biološka uloga proteinskog produkta *Bcl-2* gena je njegova sposobnost vezivanja za *Bax* protein i neutralizacija njegovog proapoptotskog dejstva (175).

Proteinski dimeri *Bcl-2* familije gena su uključeni u biohemijske mehanizme aktivacije kaspaza (176,177). Proteini familije *Bcl-2* gena svoju biološku ulogu u regulaciji pro-

cesa apoptoze ostvaruju formiranjem kanala na membranama mitohondrija (177). Tokom indukcije apoptoze aktivirani Bax proteini se u formi homodimera translociraju na membranu mitohondrija i omogućavaju formiranje membranskih kanala. Preko ovih kanala se oslobađaju proapoptotski proteini (citohrom C, SMAC/DIABLO, HtrP2) i efektori smrti AIF (engl. apoptosis inducing factor-AIF) i ENDO G (engl. mitochondrion specific nuclease) iz intermembranskog prostora mitohondrija u citosol (178).

AIF i ENDO G predstavljaju DNK degradacioni kaspaznezavisni put koji vodi poreklo iz mitohondrija (179, 180). Smatra se da su mehanizmi i enzimi ovog degradacionog puta odgovorni za perifernu hromatinsku kondenzaciju i DNK degradaciju na fragmente visoke molekulske mase (50 kbp i više). Ovi fragmenti su značajni jer se kod pojedinih tumorskih ćelija bez internukleozomalne DNK fragmentacije javljaju kao ireverzibilni signal morfološki tipične apoptoze (181,182).

Oslobađanje citohroma C je posledica aktivacije modulatora apoptoze dejstvom intracelularnih signala smrti. Citohrom C je zbog svog pozitivnog dejstva na aktivaciju kaspaze 3 dobio naziv Apaf 2 (engl. apoptotic protease activating factor-aktivirajući faktor apoptotske proteaze). U citosolu citohrom C interaguje sa adaptornim proteinom Apaf 1 što indukuje konformacionu promenu koja omogućava stabilno vezivanje dATP/ATP (adenozintrifosfata) i na taj način formiranje Apoptosoma - heptamerni kompleks koga čine Apaf 1 i citohrom C (183, 184). Ovaj kompleks proteolitički aktivira prokaspazu 9 (Apaf 3) (150). Protein-sku interakciju Apaf 1 i Apaf 3 molekula omogućavaju njihove homologe sekvence nazvane CARD (engl. caspase activating and recruitment domains-CARD). Kada nedostaje citohrom C ova interakcija je blokirana zahvaljujući strukturnoj konfiguraciji molekula Apaf 1. Prisustvo nekoliko WD ponovaka na karboksilnom kraju molekula čini CARD domene nedostupne za interakciju sa homologim domenima drugih proteina (150). Vezivanjem citohroma C za molekul Apaf 1 nastaju njegove konformacijske promene koja CARD domene čini dostupnim za interakciju sa homologim domenima prokaspaze 9. Rezultat takve interakcije je proteolizna aktivacija prokaspaze 9. Aktivirana kaspaza 9 u kaskadi apoptotskih događaja aktivira kaspazu 3, 6 i 7, a to je početak ireverzibilne izvršne faze procesa apoptoze (150).

Značajnu ulogu u regulaciji apoptoze imaju i drugi članovi *Bcl-2* familije gena. Pojedini autori smatraju da ključnu ulogu u regulisanju apoptoze ćelija sisara ima *Bcl-X* gen (138). Alternativnim procesovanjem ovog gena moguće je dobiti dva različita molekula iRNK, tj. dva *Bcl-X* proteina: $Bcl-X_L$ i $Bcl-X_S$. $Bcl-X_L$ protein je strukturno i funkcionalno sličan *Bcl-2* proteinu. $Bcl-X_L$ se vezuje za Apaf 1 i inaktivira ga. Proapoptotski članovi familije *Bcl-2* mogu da uklone $Bcl-X_L$ sa Apaf 1, omogućavajući da Apaf 1 aktivira kaspazu 9. Drugi protein $Bcl-X_S$ u heterodimernoj kombinaciji sa *Bcl-2* proteinom funkcioniše kao dominantni inhibitor *Bcl-2* funkcije (138). *Bad* gen (engl. *Bcl-XI/Bcl-2* associated death

promoter homolog-Bad) je član *Bcl* familije gena sa značajnom ulogom u kompleksnim mehanizmima regulacije procesa apoptoze. Proteinski produkt *Bad* gena vezujući se za proteinski produkt *Bcl-X_L* gena favorizuje stimulatorno dejstvo homodimera Bax/Bax na indukciju apoptoze (138).

Molekularna veza koja spreže aktiviranje DISC-a i mitohondriju je kaspazom 8 indukovano isecanje Bid-a, proapoptotskog člana Bcl-2 familije proteina (151,185). C-terminalni kraj Bid-a (tBid) se translocira u mitohondriju gde indukuje oslobađanje citohroma C (186, 187).

Inhibitori apoptotskih proteina (IAP) predstavljaju poslednju liniju odbrane protiv ćelijske razgradnje, vezujući i neutrališući aktivne forme kaspaza (188). IAP porodica proteina ima devet članova XIAP, cIAP-1, cIAP-2, NAIP, ML-IAP, ILP2, LIVIN, APOLLON, SURVIVIN. IAP direktno suprimira aktivnost kaspaza 3, 7 i 9 vezujući se za kaspaze preko BIR (engl. Bacilovirus IAP repeat-BIR) domena (189). U uslovima kada ćelija mora da umre IAP su antagonizovani. Antagonističku ulogu imaju proteini koji poseduju IBM (engl. IAP binding motif-IBM) koji se vezuju za BIR površinu IAP-a i kompetitivno oslobađaju kaspaze njihove inhibicije. Proteini koji poseduju IBM su SMAC/DIABLO i Htr A2/OMI koji se oslobađaju zajedno sa efektorima smrti (AIF i ENDO G) u citosol iz mitohondrija pod uticajem apoptotskih signala (190-192).

Pored mitohondrija, i druge organele mogu biti uključene u detekciju stresnog oštećenja i inicijaciji globalnog odgovora u pravcu adaptacije ili stimulacije zajedničkog apoptotskog puta. Taj proces odvija se aktivisanjem centralnog egzekutora (kaskadna reakcija proteolizne aktivacije kaspaza i/ili permeabilizacija mitohondrijalne membrane) (193-195).

Oštećenje DNK izazvano stresom inicira apoptozu najvećim delom povećanjem permeabilizacije mitohondrijalne membrane. U ovom procesu glavnu ulogu ima tumor supresorski gen *p53*, koji je lokalizovan na 20kb dugoj sekvenci 17. humanog hromozoma (196). Gen se sastoji od 11 egzona koji se transkribuju u 1.8kb dugu iRNK. Proteinski produkt ovog gena se sastoji od 375 aminokiselina i ima masu od oko 53 kDa (197). To je fosfoprotein koji se vezuje za DNK i inicijalno je okarakterisan kao koprecipitat velikog T antigena u CV 40-transformisanim ćelijama. Poluživot ovog nuklearnog proteina je kratak i iznosi od 5 do 20 minuta, a svoju biološku ulogu ispoljava kao transkripcioni faktor (198).

Transkripcioni faktor *p53* protein ima različita dejstva:

- Kao transkripcioni supresor gen čiji su proteinski produkti potrebni za normalnu propagaciju ćelije kroz faze ćelijskog ciklusa i

Kao transkripcioni aktivator gena čiji su proteinski produkti uključeni u procese zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G_1 fazi i u indukciji procesa apoptoze (Bax, npr.) (198).

Modifikacija p53 izazvana enzimima iz familije kinaza (ATM, ATR, CHK1, CHK2) povećava transaktivacionu funkciju i/ili inhibira interakciju p53 sa mdm2 tako što sprečava degradaciju p53 proteina koji se akumulira i deluje kao transkripcioni faktor (199).

- p53 inhibiše ekspresiju barem jednog antiapoptotskog proteina i vrši ekspresiju proapoptotskih članova Bcl-2 familije BAX, NOXA, PUMA koji se iz citosola translociraju na spoljašnju membranu mitohondrije i indukuju njenu permeabilizaciju (200, 201).
- p53 pokreće (započinje) ekspresiju prolinoksidaze mitohondrijalnog enzima koji generiše ROS (engl. reactive oxygen species-ROS) u procesu oksidacije prolina u pirolin 5 karboksilat (202).
- p53 indukuje ekspresiju p53 AIP1, mitohondrijalnog matriks proteina, čija primarna ekspresija izaziva gubitak membranskog potencijala.
- p53 izaziva ekspresiju citosolnog proteina Apaf 1 (proteina koji ulazi u sastav apoptozoma), omogućavajući na taj način citohrom C indukovano aktiviranje kaspaza (203).
- Translokacija p53 u mitohondriju, gde se locira na površini i unutar organele i interaguje sa Hsp 70, predstavlja transkripciono nezavisnu aktivnost p53 (204).

U detekciji stresnog oštećenja i započinjanju apoptotskog procesa učestvuju i endoplazmin retikulum (ER) i Goldžijev aparat (205). Opisano je više različitih okolnosti u kojima ER započinje apoptotsku kaskadu, kao što su stanja koja kompromituju normalno sklapanje i konformaciju proteina, odnosno poremećaji koncentracije kalcijumovih jona (206, 207). Pojedini signalni proteini koji su uključeni u proces apoptoze lokalizovani su na membranama Goldžijevog aparata: kaspaza 2, TNFR1, CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2, PI(3)K, Beclin, GD3 sintaza (208-211). Lokalizacija kaspaze 2 u Goldžijevom kompleksu ukazuje na moguću komunikaciju sa ER i integrisanje stres signala, čime je kod teških oštećenja omogućena aktivacija specifičnih mehanizama popravke ili započinjanje apoptoze (205).

1.2.4 Tehnike utvrđivanja apoptoze

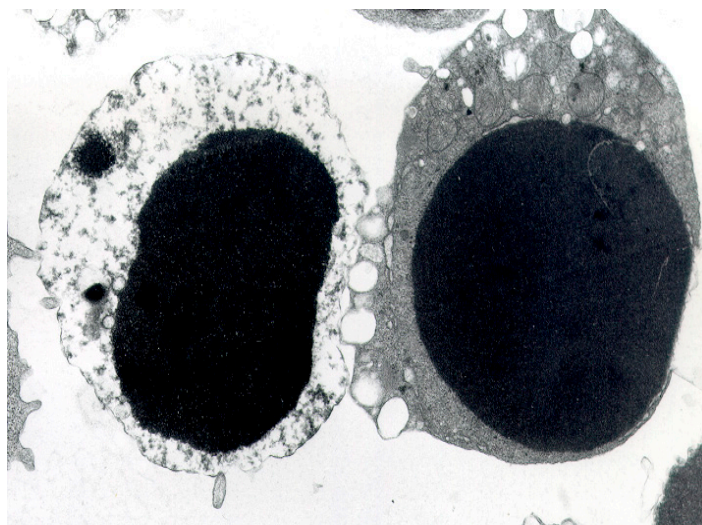
Apoptozu je moguće identifikovati primenom različitih metoda koje se izvode na tkivnim isečcima, ćelijskim kulturama ili na izdvojenim (separisanim) ćelijama.

Mikroskopska analiza uzorka je još uvek najpouzdaniji način identifikacije apoptoze zbog toga što je podela ćelijske smrti na nekrozu i apoptozu izvršena na osnovu morfoloških karakteristika posmatranih ćelija.

U obradi tkivnog uzorka se primenjuju različite histološke tehnike i metode bojenja

preparata. Za mikroskopsku analizu i detekciju apoptoznih ćelija koriste se svetlosni ili fluorescentni mikroskop ili transmisiona elektronska mikroskopija (212).

- Na standardnim parafinskim histološkim isečcima bojenim hematoksilinom i eozinom apoptotske ćelije se prepoznaju na osnovu kondenzovanog hromatina u jedru i povećane eozinofilije citoplazme. Apoptotske ćelije podležu fragmentaciji na apoptotska tela koje okolne ćelije brzo uklanjaju. Zbog toga se na isečcima zapažaju apoptotska tela koja su ekstracelularno ili unutar drugih ćelija (posle fagocitoze).
- Preciznija identifikacija morfoloških promena u jedru apoptotskih ćelija je moguća primenom fluorescentnog mikroskopa i fluorescentnih nuklearnih boja (DAPI i HOECHST 33258) na polutankim isečcima tkiva kalupljenog u epoksi smole.
- Smatra se da je najpouzdanija metoda elektronska mikroskopija jer se njome mogu identifikovati rane promene ćelija u apoptozi. Međutim, njen nedostatak je u tome što se pregleda mali broj ćelija i što se ne može izvršiti kvantifikacija tj. određivanje apoptotskog indeksa (AI) (Slika 1.14).



Slika 1.14: Elektronska fotomikrografija (TEM) apoptoze timocita, na kojima se uočava karakteristična kondenzacija hromatina u jedru. Timocit sa leve strane ispoljava morfološke karakteristike za kasni stadijum apoptoze – sekundarnu nekrozu (212).

Novija ispitivanja su usmerena na otkrivanje biohemijskih promena koje su specifične za apoptozu ili ekspresiju proteina koji direktno prate apoptozu u uzorku tkiva (212).

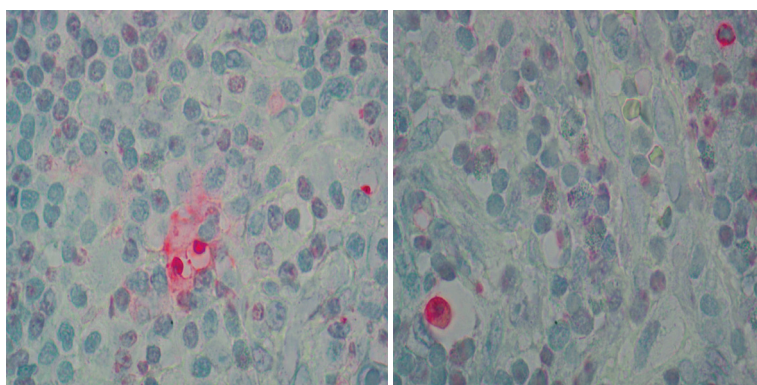
Promene jedra i kondenzacija hromatina u jedru su ključne morfološke promene za

koje je odgovoran endonukleolitni proces koji dovodi do razgradnje DNK na male oligonukleozomne fragmente (213-215).

Postoji više tehnika detekcije fragmentacije DNK na histološkim isečcima ili na pojedinačnim ćelijama. U tu svrhu koriste se enzimski ili fluorescentni obeleživači (elektroforeza DNK na agaroznom gelu, protočna citometrija), a najčešće primenjavana od svih je TUNEL tehnika (engl. Terminaldeoxynucleotidyl transferase-Mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling-TUNEL) koja je uvedena 1992. godine (214-216). Ubrzo posle otkrića pojavili su se komercijalni kompleti za izvođenje ove metode (217, 218) (Slike 1.15, 1.16).

TUNEL-metoda je popularna među istraživačima jer je prilično senzitivna, ali uvek treba imati na umu saznanja u vezi sa njenim nedostacima. U pripremi tkivnog uzorka je neophodno sprovesti tretman proteazama jer one mogu da utiču na validnost rezultata. Lažno pozitivni rezultati mogu se dobiti za druge tipove ćelijske smrti kao što je autofagija, a u određenim slučajevima i za nekrozu (218, 219). Kada je reč o specifičnosti metode treba biti obazriv. Za nedovoljnu specifičnost metode za apoptozu govori činjenica da ćelije u kojima se odvija intenzivna sinteza i obrada informacionih RNK mogu biti TUNEL-pozitivne, a takav rezultat mogu dati i citoplazmatske ili matriksne vezikule bogate kalcijumom (220, 221).

Primena ove metode zahteva visok stepen opreza i paralelne potvrde tipa ćelijske smrti detektovane nekom drugom metodom, najbolje morfološkom. To je važno jer se u određenim ćelijskim populacijama apoptoza može ispoljiti bez ekstenzivne internukleozomne fragmentacije DNK, odnosno, prisustvo fragmentacije DNK ne označava uvek apoptozu (218, 222-224).



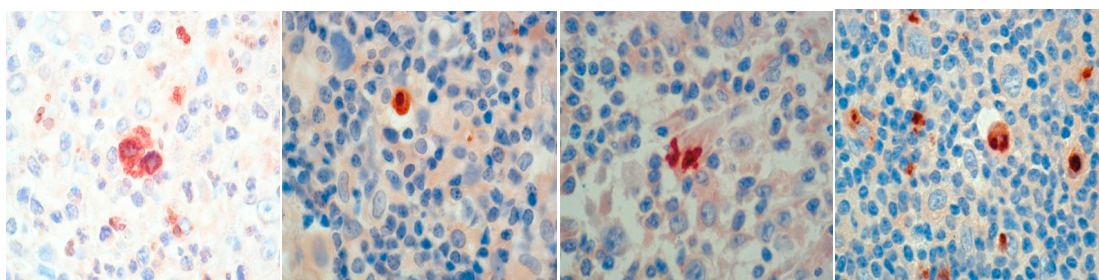
Slika 1.15 i 1.16: TUNEL pozitivne Rid-Šternbergova i Hočkinova ćelija.

Jedan od ključnih događaja tokom procesa apoptoze je narušavanje asimetrije rasporeda fosfolipida u plazma membrani. Naime, u ranoj fazi apoptoze fosfatidil-serin, koji

se normalno nalazi isključivo u unutrašnjem listu fosfolipidnog dvosloja, prebacuje se u spoljašnji list (141, 225). Na osnovu ove promene, između ostalog, makrofagi mogu da prepoznaju i fagocituju apoptotska tela i ćelije. Prisutnost fosfatidil-serina u spoljašnjem listu plazmaleme koristi se i za obeležavanje apoptotskih ćelija. U tu svrhu najčešće se koristi Aneksin V obeležen fluorohromom (fluorescinom) koji se u prisustvu jona kalcijuma vezuje za fosfatidil-serin. Tako obeležene apoptotske ćelije moguće je detektovati pomoću fluorescentnog mikroskopa ili uz pomoć protočne citometrije (226, 227).

TUNEL- metoda može da se primeni samo kod ispitivanja celih ćelija. Kod tkivnih isečaka su na presecima ćelije otvorene pa se Aneksin V može vezivati i kod normalnih ćelija sa unutrašnje strane membrane. Zbog toga se koristi uglavnom za kvantifikaciju apoptoze pomoću protočne citometrije kada se uz Aneksin V dodaje i Propidijum jodid (PI). Na taj način moguće je napraviti razliku između žive ćelije (nebojene), ranih stadijuma apoptoze (Aneksin V pozitivne, PI negativne) i sekundarne nekroze (Aneksin V pozitivne, PI pozitivne). Metoda je prilično jednostavna i omogućava praćenje dinamike procesa uz kvantifikaciju (228).

Za dokazivanje apoptoze se koristi činjenica da u toku apoptoze dolazi do aktivacije kaspaza (229, 230). Najčešće se, u različitim eksperimentalnim in vitro modelima, primenjuju specifični inhibitori kaspaza koji mogu da spreče ispoljavanje ćelijske smrti, te na taj način potvrđuju da se radi o apoptozi. Pored toga, moguće je meriti kaspaznu aktivnost, što, takođe, može da pomogne ne samo u rasvetljavanju puta aktivacije nego i samog odvijanja apoptotskog procesa. U ovom pogledu najčešće se ispituju efektorske kaspaze, posebno kaspaza 3.



Slike 1.17-1.20: Rid-Šternbergove i Hočkinove ćelije ekspimiraju aktivnu kaspazu 3. (IHH)

Pošto se kaspaze mogu i normalno naći u citoplazmi ćelija njihova imunocitohemijska detekcija nije dovoljna da bi se potvrdilo da su pozitivne ćelije započele proces apoptoze. Međutim, kako aktivacija kaspaza podrazumeva njihovu proteolitnu razgradnju, primena specifičnih antitela na aktivan fragment kaspaze 3 omogućava prepoznavanje ćelija u kojima je došlo do aktivacije kaspaza, pa samim tim i do aktivne apoptoze (230)

(Slike 1.17-1.20). Na taj način je moguće otkriti apoptotske ćelije u ranoj fazi, pre nastanka morfoloških promena. Od posebnog značaja je da aktivacija kaspazne kaskade nije opisana u nekrozi tako da je ova metoda znatno specifičnija od drugih.

Poznato je da je aktivacija kaspaza najvećim delom odgovorna za razgradnju najvažnijih proteina u ćeliji izazivajući na taj način ispoljavanje karakteristične morfologije apoptoze. Do sada su identifikovani mnogobrojni supstrati kaspaza, a razgradnja nekih od njih se koristi za detekciju apoptoze. Tako se, na primer, primena specifičnih antitela na fragment citokeratina 18, nastao delovanjem kaspaza, upotrebljava za imunocitohemijsku detekciju apoptoze u epitelnim ćelijama (231). Antitela na fragment polimeraze poli (ADP)-riboze od 85kD koji predstavlja supstrat kaspaze 3, mogu specifično prepoznati razgradnju ovog enzima nastalu u toku procesa apoptoze, pa samim tim i apoptotske ćelije (232).

Primenom ovih metoda može specifično da se detektuje klasična, kaspazno-zavisna apoptoza. Međutim, ove metode nisu adekvatne za ispitivanje smrti ćelija nastale kaspazno-nezavisnim mehanizmima, a sa morfološkim karakteristikama apoptoze.

Postojanje većeg broja metoda za identifikaciju apoptoze ukazuje da ni jedna od njih nije idealna. Načelno jasne razlike između različitih tipova nisu uvek dovoljno primetne, pa se često zapažaju mešoviti oblici, kao i preklapanje više tipova ćelijske smrti. Zbog toga je potrebno uvek primeniti paralelno više različitih metoda u identifikaciji ćelijske smrti. Pošto je apoptoza definisana pre svega na osnovu morfoloških kriterijuma oni bi morali da se uzmu uvek u obzir prilikom analize ćelijske smrti.

2. TEMA I PREDMET ISTRAŽIVANJA

2.1 OBRAZLOŽENJE TEME

Na osnovu do sada poznatih činjenica vezanih za HL, ali i dugo godina prisutne enigme u vezi sa poreklom RS, razumljivo je veliko interesovanje istraživača za ovaj problem. Naponi koji imaju za cilj da se otkriju i protumače mehanizmi delovanja RS treba da doprinesu boljem razumevanju karakteristika ovih malignih ćelija i njihovog uticaja na tok i prognozu bolesti.

Proučavanje kliničkih, molekularnih i patomorfoloških parametara kod HL je, prema našem uverenju, korak više prema pouzdanijem i efikasnijem terapijskom modalitetu u borbi protiv ove, još uvek, u mnogim detaljima misteriozne bolesti.

2.1.1 Aktuelna problematika, hipoteza i cilj istraživanja

Savremenim metodama lečenja obolelih od Hočkinovog limfoma se posle inicijalnog tretmana postigne remisija bolesti kod više od 90% bolesnika (233). Međutim, kod približno jedne trećine bolesnika kod kojih postoje prognozni znaci visokog rizika prilikom otkrivanja bolesti javlja se relaps ili progresija bolesti (234). Napredak u primeni savremenih terapijskih modela HL dodatno opterećuju neželjeni efekti primenjene terapije kao što su srčana slabost, razvoj steriliteta ili sekundarni maligniteti (235).

Da bi se sa većom pouzdanošću predvideo ishod lečenja možda bi bilo od pomoći da se otkriju bolesnici kod kojih se očekuje manje efikasan odgovor na standardnu terapiju prve linije i oni bolesnici koji mogu imati korist od primene redukovanih doza lečenja (236).

Glavni pravci u razvoju strategije lečenja HL bili su od početka usmereni prema identifikaciji faktora rizika i strategiji prilagođenoj mogućim rizicima primenjenih protokola lečenja (237). Strategija konvencionalnog tretmana sastoji se od dva komplementarna pristupa:

1. Stratifikacija rizika primenom prognoznih modela koji se baziraju na nepovoljnim kliničkim parametrima kao što su Internacionalni prognozni skor i Ann Arbor klasifikacija i
2. Modeliranje terapijskog odgovora u kome je izbor lečenja usklađen prema PET-CT nalazima posle indukciono terapije (89,100,102).

Međutim, nijedna od ovih strategija nije dovoljno pouzdana jer nije u mogućnosti da precizno odredi individualni terapijski pristup za svakog pojedinačnog bolesnika (233). Zbog toga je teško primenjivati jedino ove terapijske strategije.

Biološki aspekt HL proučavan je takođe ciljem da se identifikuju pouzdane ini-

cijalne tkivne varijable kao determinante kliničkog ishoda bolesti (238). Utvrđeno je da prognoza bolesti ima veze sa histološkim podtipom, fenotipskim karakteristikama Hočkin i Rid-Šternberg-ovih ćelija, ćelijskog sastava mikrosredine (engl. microenvironment) i povišenog nivoa citokina/hemokina u plazmi koji učestvuju u formiranju mikrosredine limfoma (238-244). Prognozna vrednost ovih parametara nije još uvek dovoljna da bi se oni mogli uzeti u obzir prilikom planiranja načina lečenja (245).

Naša hipoteza je da molekularni i patomorfološki parametri mogu doprineti prognoznoj vrednosti standardnih kliničkih parametara i da u tom slučaju oni mogu poslužiti za bolju procenu stepena rizika u bolesnika sa HL.

Cilj našeg istraživanja je da u bolesnika sa klasičnim HL u uznapredovalom stadijumu bolesti, u trenutku postavljanja dijagnoze, ispitamo prognozni uticaj molekularnih (Bcl-2, Survivin, aktivna kaspaza 3, Ki-67, CD68), patomorfoloških (potpuna zahvaćenost limfnog čvora tumorskim i ćelijama zapaljenja) i kliničkih parametra (IPS i prisustvo voluminozne tumorske mase).

3. MATERIЈAL I METODE

3.1 HISTOPATOLOŠKA I IMUNOHISTOHEMIJSKA ISPITIVANJA

Studija je retrospektivna i obavljena je na grupi od 85 bolesnika koji su lečeni u intervalu od 1997.godine do 2005.godine. Svi bolesnici zadovoljavaju sledeće kriterijume: inicijalna dijagnoza cHL postavljena je posle biopsije limfnog čvora i pre bilo koje vrste lečenja; reprezentativan dijagnostički uzorak hirurški ekstirpiranog limfnog čvora dostupan za histološku reviziju i dopunska imunohistohemijska ispitivanja; dostupnost kliničkih i laboratorijskih podataka prilikom prijema i obavljenih kontrola; negativan test na humanu imunodeficientnu virusnu infekciju; potpuni stejdžing za odmakli stadijum cHL prema kriterijumima Kotsvoldove revizije Ann Arbor klasifikacije; uniformno primenjena terapija prema vodičima za terapiju u vreme postavljanja dijagnoze; praćenje svih pacijenata u intervalu 5 godina i duže.

Ova studija započeta je posle dobijanja odobrenja Etičkog odbora Klinike za hematologiju, Kliničkog Centra Srbije i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, Srbija, a prema Helsinškoj deklaraciji i pravilima Dobre kliničke prakse.

Dva hematopatologa (LJJ i MPJ) analizirala su odvojeno i nezavisno sve patohistološke pločice, bez uvida u kliničke podatke i ishod lečenja bolesnika. U svim slučajevima dijagnoza cHL potvrđena je imunohistohemijskom analizom i potom klasifikovana u skladu sa klasifikacijom Svetske Zdravstvene Organizacije za tumore hematopoeznog i limfoidnog tkiva (65). Imunohistohemijska bojenja obavljena su ručno, metodom streptavidin biotin imunoperoksidaze, aplikacijom monoklonalnih antitela Bcl-2 (124, monoclonal, DakoCytomation®), Survivin (polyclonal, LabVision®), aktivna kaspaza 3 (y83-77, monoclonal, Novus Biologicals®), Ki-67 (MIB 1, monoclonal, DakoCytomation®) i CD68 (PG-M1, DakoCytomation®).

Korišćeni su sledeći sistemi za vizualizaciju: LSAB 2, DakoCytomation® ili Ultravision LPDetection system, LabVision®.

Brojanje i određivanje procenta RS ćelija koje eksprimiraju analizirane imunofenotipske parametre i tumoru-pridruženih makrofaga obavljani su korištenjem Leica® DMBR mikroskopa na ukupno 10 nasumično izabranih polja na velikom uvećanju (400x) unutar cHL infiltrata. Indeks obeleženih tumorskih ćelija određen je korelacijom između pozitivnih i ukupnog broja procenjivanih RS ćelija. Procenat CD68+ tumoru-pridruženih makrofaga određen je odnosom CD68+ tumor-pridruženih makrofaga i ukupnog broja ne-neoplastičnih ćelija u cHL mikrosredini. Imunohistohemijski rezultati procenjivani su u skladu sa prethodno objavljenim podacima sa graničnom vrednošću od 50% za Bcl-2,

Survivin i Ki-67, 5% za aktivnu kaspazu 3 i 25% za CD68+ tumoru-pridružene makrofage (240, 242, 246, 247).

3.2 PATOMORFOLOŠKA ISPITIVANJA

Patomorfološke karakteristike zahvaćenosti limfnog čvora neoplastičnim i ćelijama zapaljenja (potpuna zahvaćenost nasuprot fokalnim reziduama sekundarnih folikula) analizirani su prema kriterijumima Nemačke studijske grupe za Hočkinov limfom (248).

3.3 KLINIČKI PARAMETRI

Pregledane su istorije bolesti radi dobijanja dopunskih kliničkih i laboratorijskih podataka: životno doba, En Arbor stadijum bolesti, prisustvo ili odsustvo sistemskih simptoma, voluminozna tumorska masa, hemoglobin, broj leukocita, broj limfocita i serumski albumin. IPS i voluminoznost tumorske mase procenjivani su u skladu sa ustanovljenim kriterijumima (100, 249).

Izbor analiziranih varijabli učinjen je na osnovu njihove moguće prognozne vrednosti, svojstava da predstavljaju različite aspekte oboljenja ili njihovih uzajamnih dejstava.

3.4 LEČENJE

Svi bolesnici lečeni su po istom terapijskom protokolu koji se sastojao od 6-8 ciklusa klasičnog ABVD režima (doxorubicine, bleomycine, vinblastine, dacarbazine) i dopunske radioterapije (RT) na mestima gde je postojala zahvaćenost tumorom. U bolesnika u kojih nije ostvaren terapijski efekat ili se javio relaps, primenjena je visokodozna hemoterapija po DHAP režimu (dexamethasone, cisplatinum, ara-c).

Posle završenog kombinovanog lečenja vršena je procena efekata lečenja i statusa bolesti, odnosno, da li bolesnici imaju potpunu remisiju (CR), parcijalnu remisiju (PR), stabilnu bolest (SD) ili progresivnu bolest (PD). Kao neuspeh lečenja posle inicijalne terapije označeni su slučajevi kada nije bilo moguće ostvariti CR ili PR i slučajevi kada je odgovor na terapiju (CR/PR) posle završene terapije trajao kraće od 3 meseca. Relaps je definisan kao bolest koja se javila ponovo posle kompletiranja lečenja pošto je ostvarena CR u trajanju od najmanje 3 meseca, ili ukoliko bolest progredira u slučaju kada je ostvarena PR.

3.5 STATISTIČKE METODE

Glavni fokus studije bio je ukupno preživljavanje (OS) koji je meren od početka lečenja do datuma poslednje kontrole (izabrani bolesnici koji su živi u intervalu koji obuhvata studija) ili do smrti bolesnika usled bilo kod razloga.

Drugi važan cilj bio je preživljavanje bez znakova bolesti - EFS. On je procenjivan od početka lečenja do podatka o progresiji oboljenja, relapsa, ili do trenutka smrti usled bilo kod razloga, ili ukoliko se nijedan događaj nije desio, do datuma poslednje kontrole izabranog bolesnika.

Analiza preživljavanja vršena je Kaplan-Majer-ovom (engl. Kaplan-Meier) metodom. Statistička značajnost razlike u EFS i OS između grupa bolesnika utvrđena je *log rank* testom. Multivarijantna analiza izvedena je primenom Koksovog (engl. Cox) proporcionalnog hazard metoda. Svi testovi su dvostruki na pragu od $p=0,05$. Sve statističke analize izvedene su primenom Statistica® (data analysis software system, version 8.0, StatSoft®, Inc. Tulsa USA, 2007) licenciranog softverskog statističkog paketa.

4. REZULTATI

4.1 OSNOVNE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA

Osnovne karakteristike bolesnika prikazane su na Tabeli 5.

Tabela 5: Osnovne karakteristike bolesnika

Osnovne karakteristike bolesnika (n=85)				
karakteristike	Varijable	Specifičnost	N	%
Demografski podaci	Pol	Muški	46	(54)
	Starost	≥45	21	(25)
Klinički podaci	Ann Arbor stadijum	II*	7	(8)
		III	44	(52)
		IV	34	(40)
	B simptomi	Da	70	(82)
	IPS (>2)	Visoki rizik	43	(51)
	Voluminozna tu masa	Da	34	(40)
Histološki podtip	Klasičan Hočkinov Limfom	Nodulska skleroza	66	(78)
		Mešovita celularnost	12	(14)
		Limfocitima bogat	4	(5)
		Limfocitna deplecija	3	(3)
Patomorfologija	Potpuna zahvaćenost limfnog čvora	Tumorskim ćelijama i ćelijama zapaljenja	31	(36)
Imunohistohemija	Bcl-2	>50%	26	(31)
	Survivin	>50%	29	(34)
	Aktivna kaspaza 3	>5%	14	(16)
	Ki67	>50%	38	(45)
	CD68	>25%	33	(39)

*- IIB stadijum sa medijastinalnom voluminoznom tumorskom masom i/ili ektranodalnom bolešću.

U trenutku postavljanja dijagnoze, u stadijumu bolesti IIB (sa medijastinalnom voluminoznom tumorskom masom i/ili ekстранodalnom bolešću), III i IV bilo je 7 (8%), 44 (52%), 34 (40%) bolesnika, po redosledu.

Sedamdeset bolesnika (82%) imalo je B simptome (Tabela 5).

U analiziranoj grupi bilo je 46 (54%) muškaraca od kojih je 21 (25%) starije od 45 godina (srednje životno doba 35.43 ± 13.5 godina; u intervalu od 16-68 godina) (Tabela 5).

Visok IPS skor (>2) imalo je 43 (51%) bolesnika.

Voluminozna tumorska masa (*bulky disease*) dijagnostikovana je inicijalno u 34 (40%) bolesnika (Tabela 5).

U odnosu na histopatološki tip tumora, bilo je 78% podtipa nodulske skleroze, 14% mešovite celularnosti, 5% limfocitima bogat cHL i 3% limfocitne deplecije (Tabela 5).

Ekspresija Bcl-2, Survivina, aktivne kaspaze-3 i Ki-67 u RS ćelijama bila je kod 64 (75%), 77 (91%), 54 (64%) i 83 (98%) bolesnika, po redosledu.

Visoka ekspresija ($>50\%$ +RS ćelija) Bcl-2, Survivina i Ki-67 otkrivena je u 26 (34%), 29 (34%) i 38 (45%) bolesnika, po redosledu.

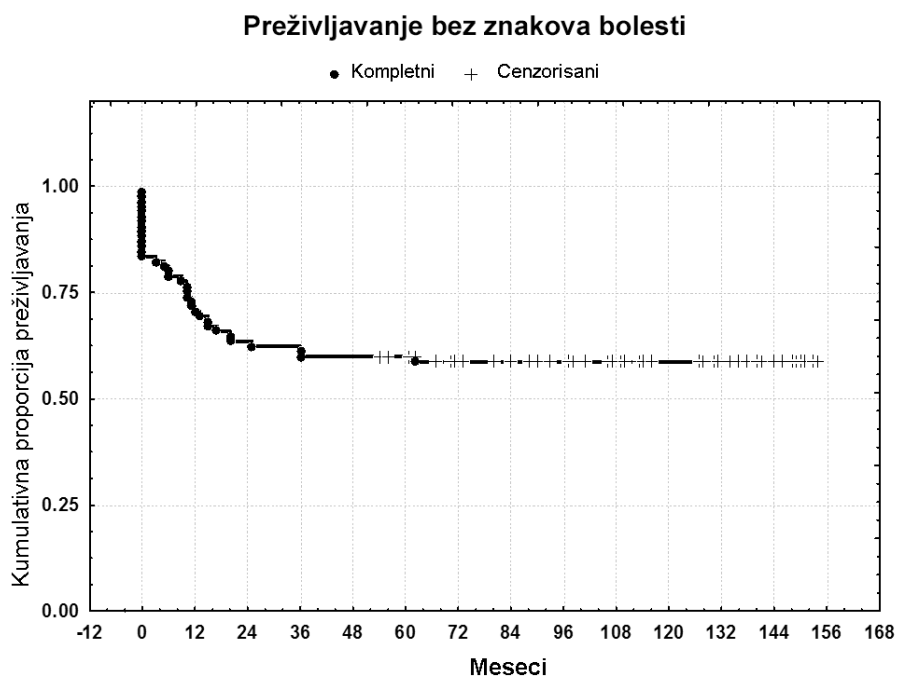
Četrnaest bolesnika (16%) imalo je aktivnu kaspazu-3 u više od 5% +RS ćelija (Tabela 5).

Ekspresija CD68 otkrivena je u svim ispitivanim slučajevima. Tumor-pridružene makrofage $>25\%$ imalo je 33 (39%) bolesnika (Tabela 5).

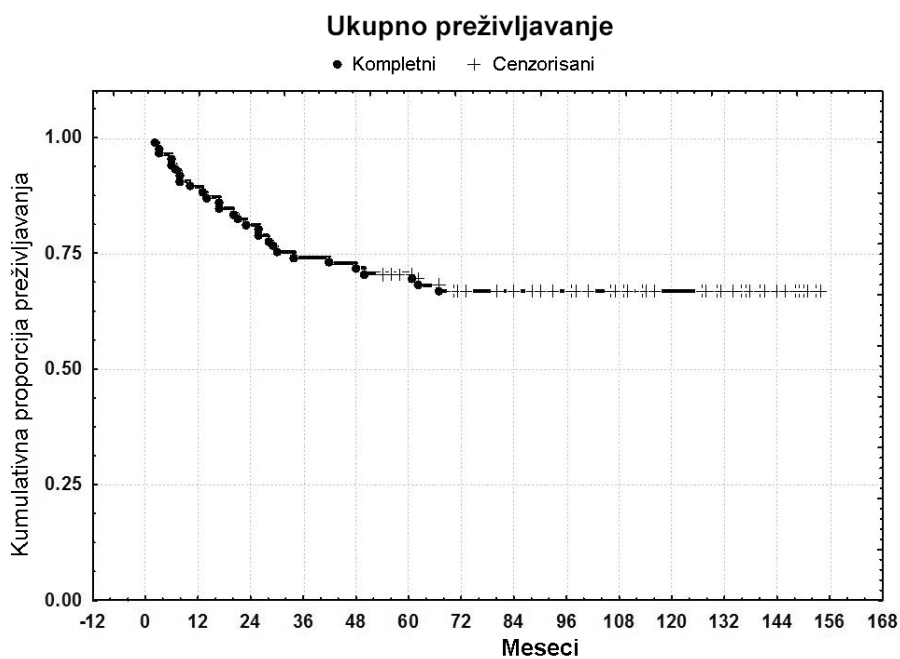
U trenutku postavljanja dijagnoze u 31 (36%) bolesnika postojala je potpuna zahvaćenost limfnog čvora neoplastičnim i ćelijama zapaljenja (Tabela 5).

U trenutku preseka praćenja od 85 bolesnika koji su uključeni u studiju živo je 57, a medijana njihovog praćenja je 88 meseci. U 18 (21%) bolesnika postojala je primarna rezistencija na terapiju i oni su umrli.

Fatalan ishod desio se i kod 10 od 26 bolesnika sa relapsom bolesti. EFS i OS od 5 godina bio je 61% i 68% u odnosu na celu grupu bolesnika (Grafikoni 1.1, 1.2).



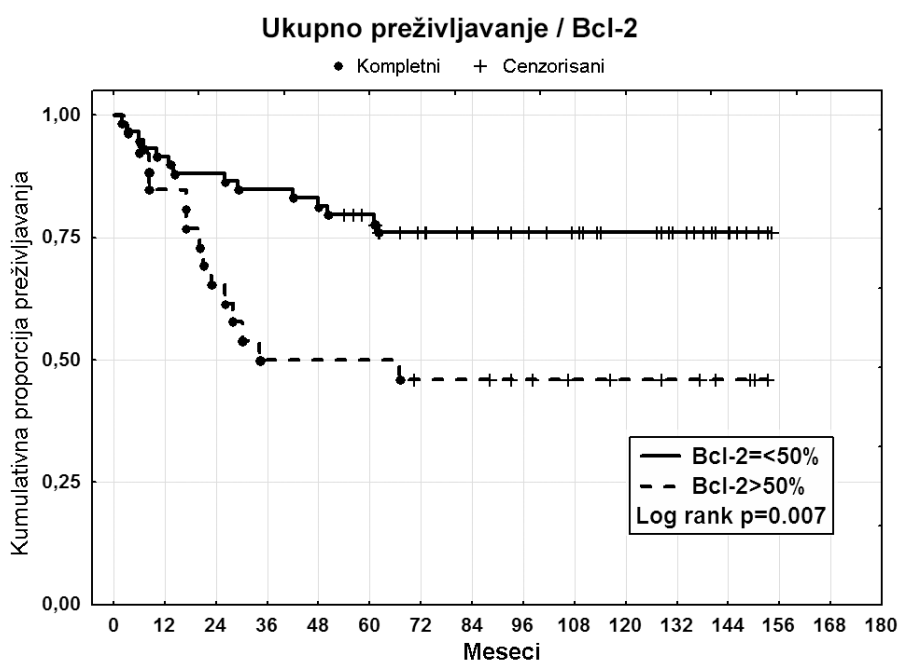
Grafikon 1.1: Vreme do neželjenog događaja za celu grupu bolesnika.



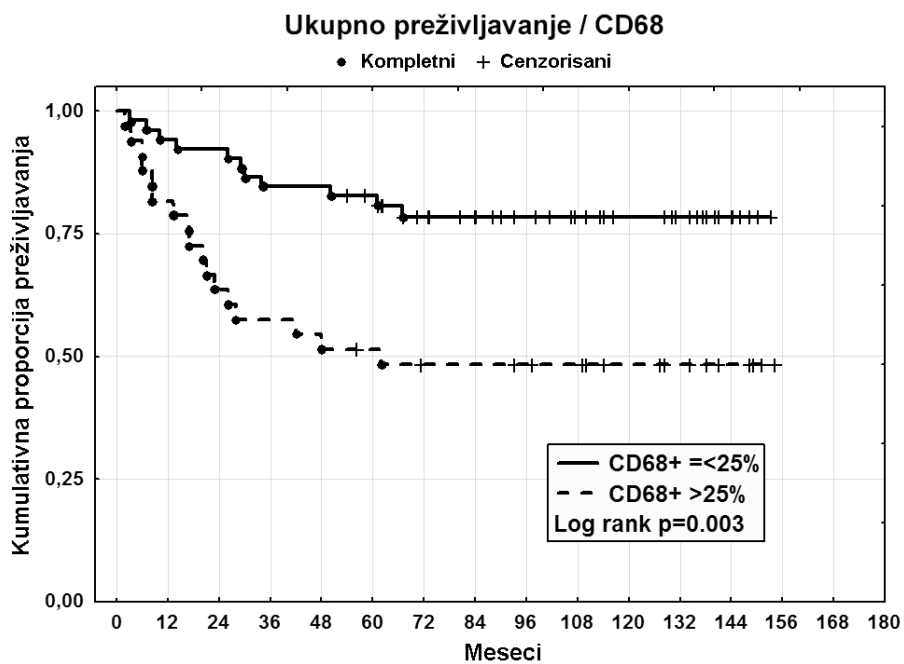
Grafikon 1.2: Ukupno preživljanje za celu grupu bolesnika.

4.2 UNIVARIJANTNA ANALIZA

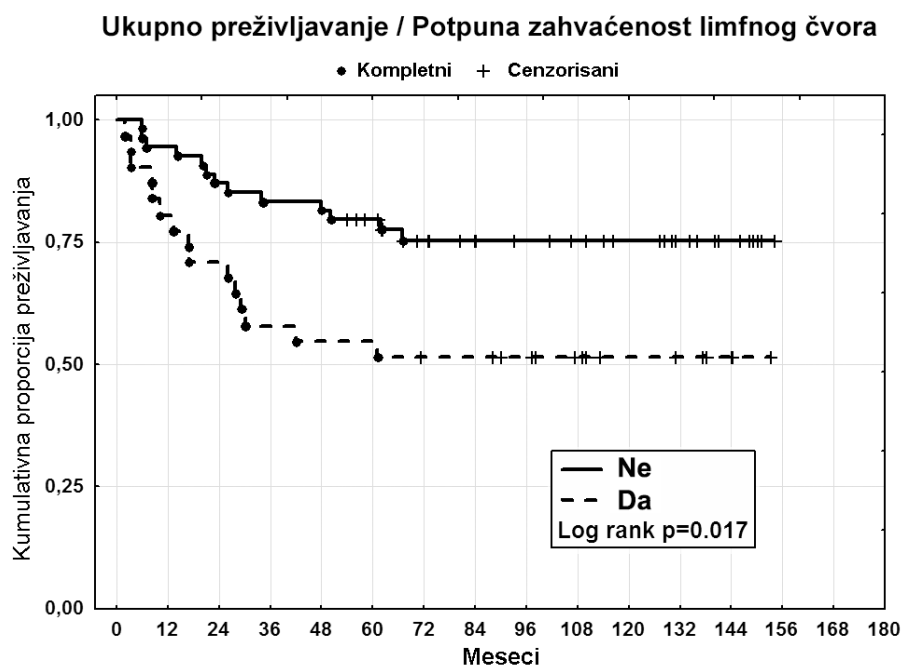
Univarijantna analiza pokazala je da su sledeći faktori bili udruženi sa niskim OS: visoka ekspresija Bcl-2 u RS ćelijama (>50%) (OS_{5god} sa/bez faktora rizika 50% vs. 80%; *log rank* p=0.007); povećan broj (>25%) CD68+ tumoru-pridruženih makrofaga (OS_{5god} sa/bez faktora rizika 52% vs. 83%, *log rank* p=0.003); visok IPS (>2) skor (OS_{5god} sa/bez faktora rizika 51% vs. 90%, *log rank* p<0.001); voluminozna tumorska masa (*bulky disease*) (OS_{5god} sa/bez faktor rizika 53% vs. 82%, *log rank* p=0.002); potpuna zahvaćenost limfnog čvora neoplastičnim i ćelijama zapaljenja (TLNI) (OS_{5god} sa/bez faktor rizika 55% vs. 80%, *log rank* p=0.017) (Grafikoni 1.3-1.7).



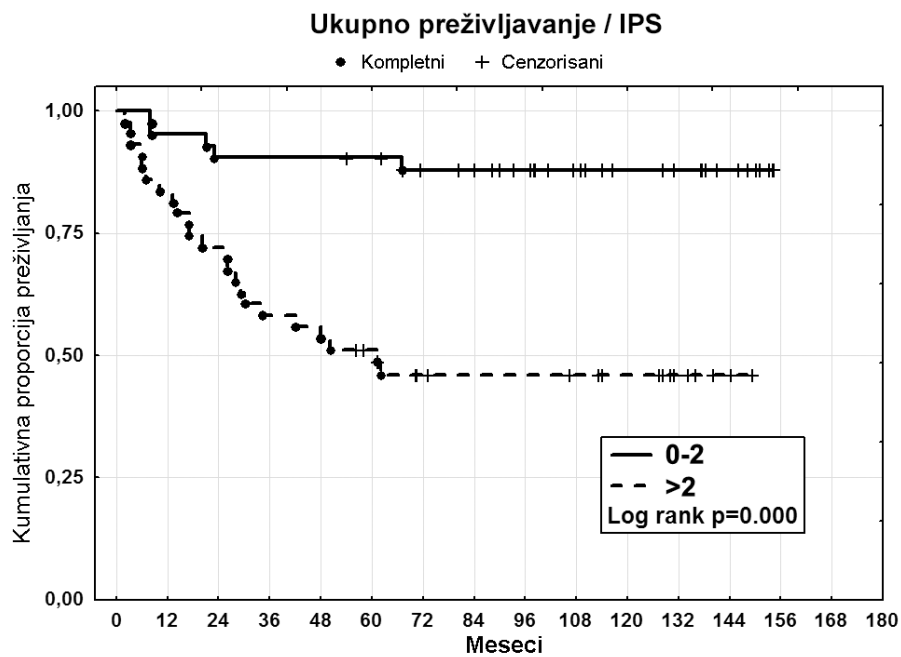
Grafikon 1.3: Krive ukupnog preživljavanja na osnovu Bcl-2.



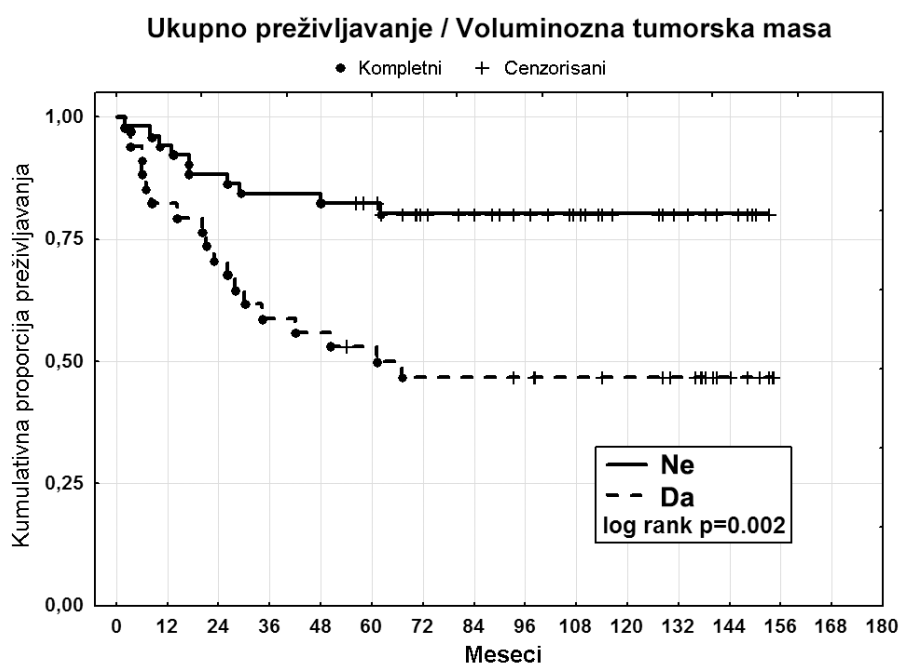
Grafikon 1.4: Krive ukupnog preživljavanja na osnovu CD68.



Grafikon 1.5: Krive ukupnog preživljavanja na osnovu potpune zahvaćenosti limfnog čvora.

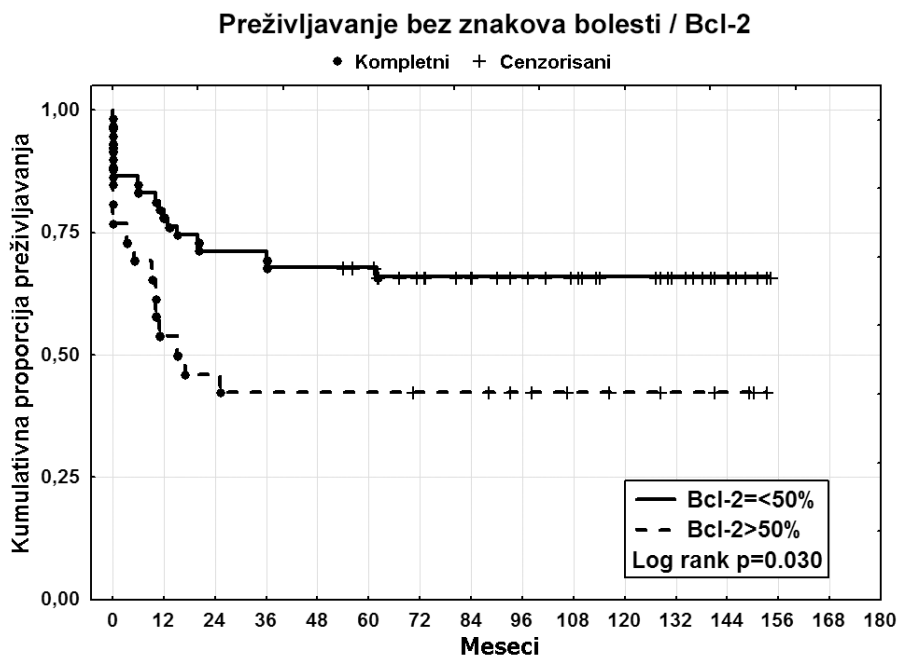


Grafikon 1.6: Krive ukupnog preživljavanja na osnovu IPS.

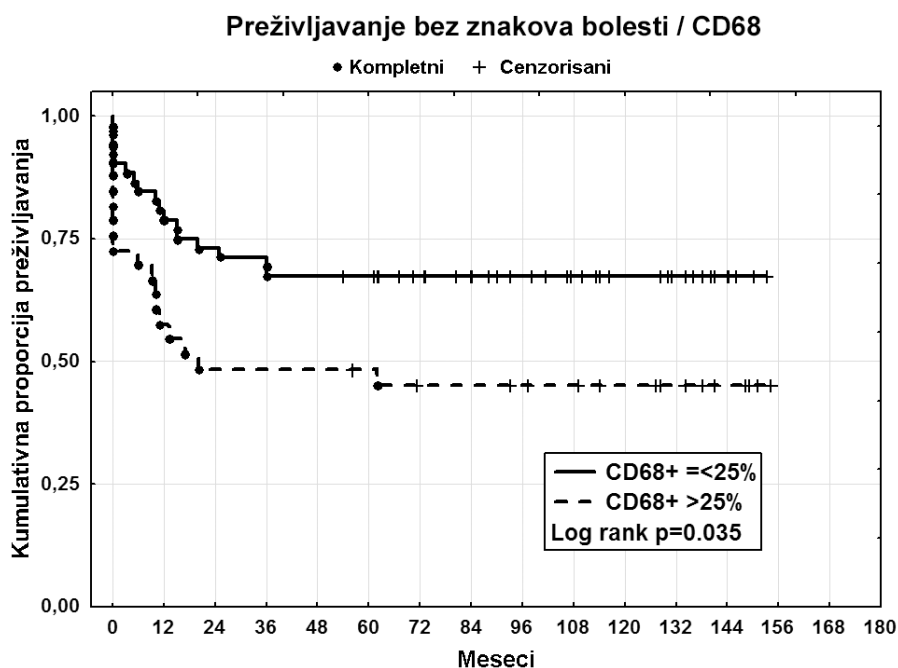


Grafikon 1.7: Krive ukupnog preživljavanja na osnovu voluminoznosti tumorske mase,

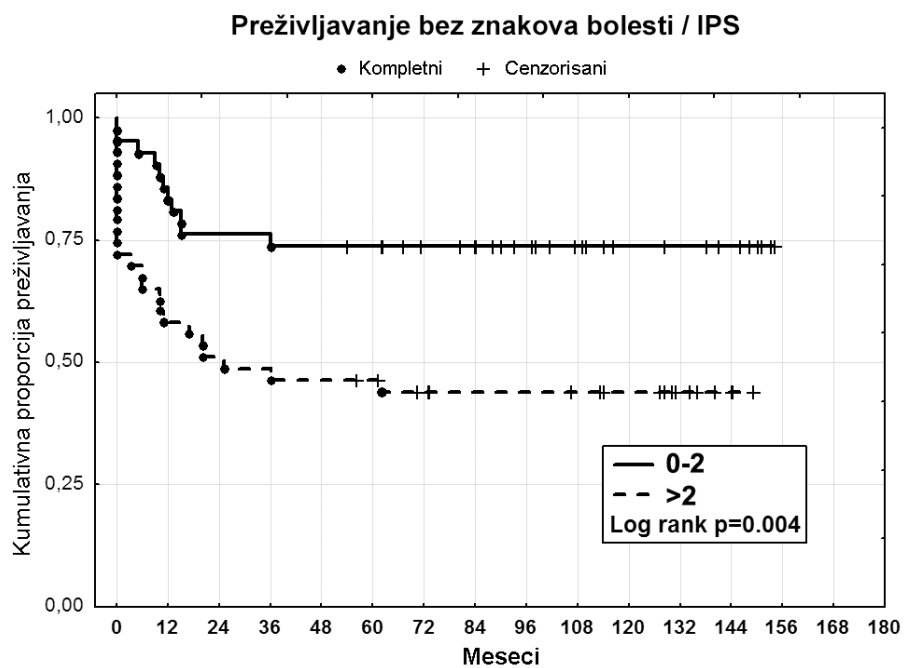
Faktori sa značajnim uticajem na EFS bili su: visoka ekspresija Bcl-2 (EFS_{5god} sa/bez faktora rizika 43% vs. 68%; *log rank* p=0.031); povećan broj CD68+TAM (EFS_{5god} sa/bez faktora rizika 48% vs. 68%; *log rank* p=0.035); visok IPS (>2) skor (EFS_{5god} sa/bez faktora rizika 46% vs. 74%; *log rank* p=0.004); voluminozna tumorska masa (bulky disease) (EFS_{5god} sa/bez faktor rizika 44% vs. 71%; *log rank* p=0.014) (Grafikoni 1.8-1.11).



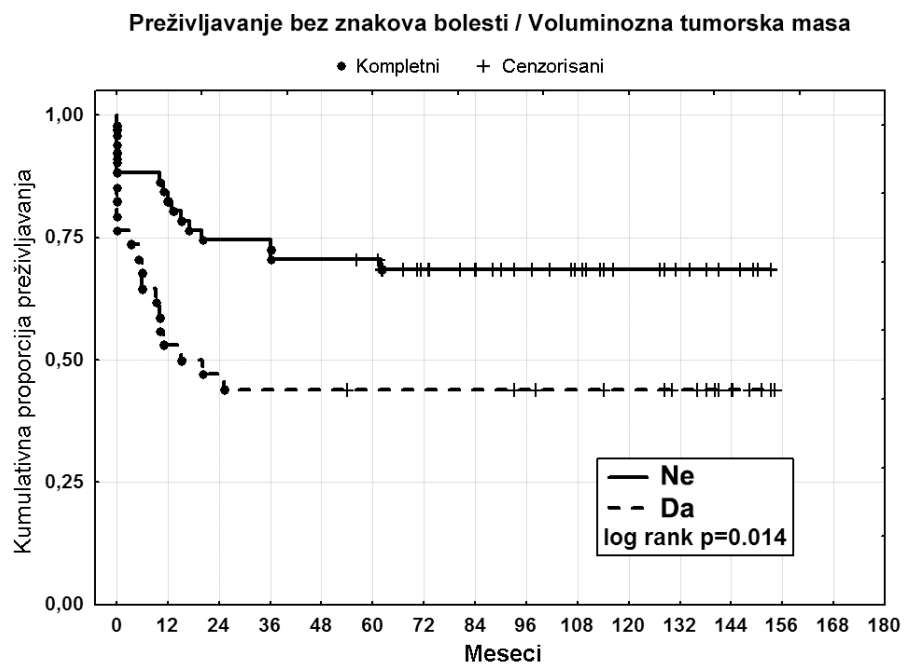
Grafikon 1.8: Krive preživljavanja bez znakova bolesti na osnovu Bcl-2.



Grafikon 1.9: Krive preživljavanja bez znakova bolesti na osnovu CD68.

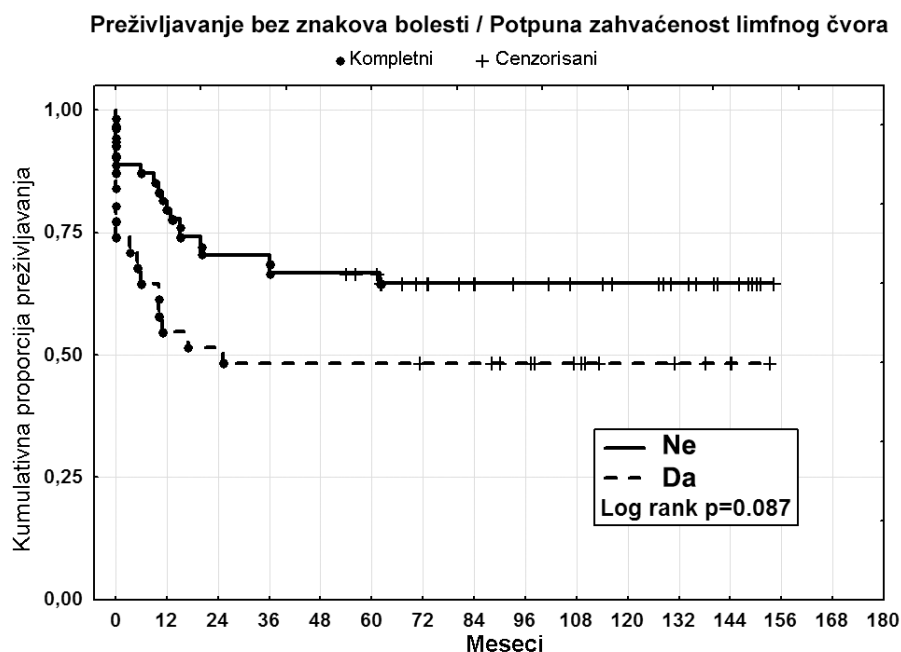


Grafikon 1.10: Krive preživljanja bez znakova bolesti na osnovu IPS.



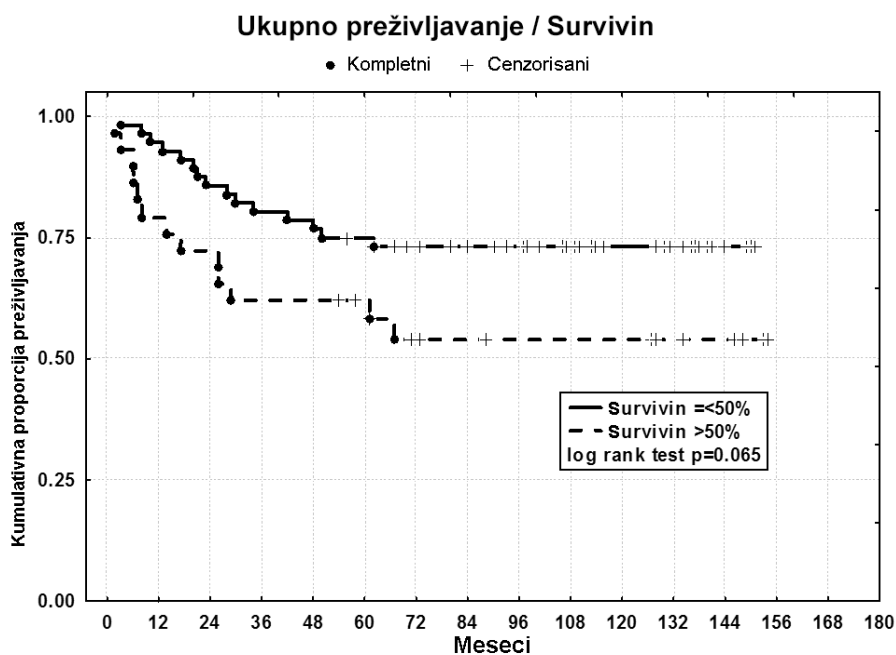
Grafikon 1.11: Krive preživljanja bez znakova bolesti na osnovu voluminozne tumorske mase.

Pored navedenog, TLNI je pokazao trend prema nižem EFS (EFS_{5god} sa/bez faktora rizika 48% vs. 66%; log rank p=0.087) (Grafikon 1.12).

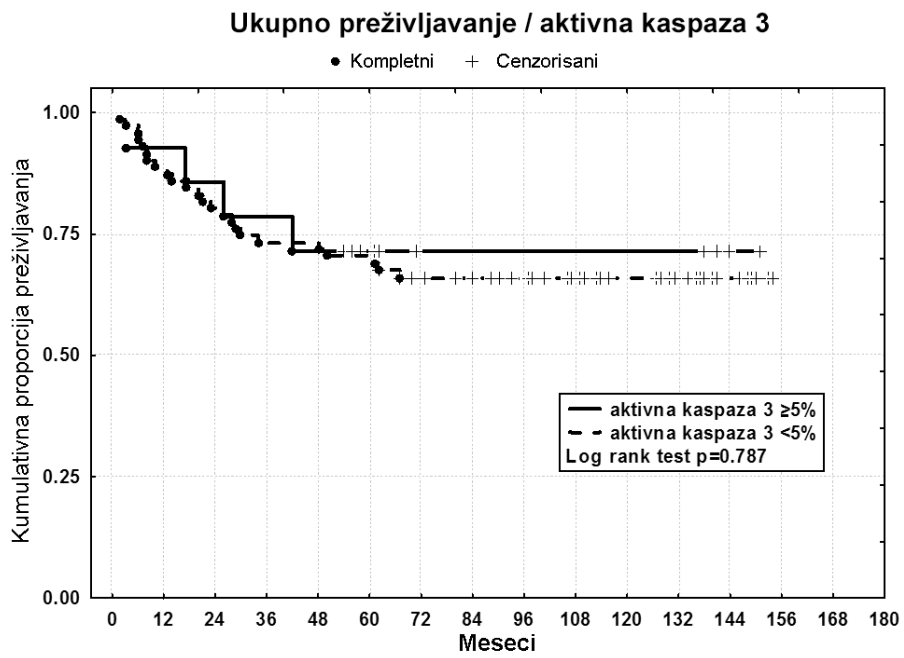


Grafikon 1.12: Krive preživljavanja bez znakova bolesti na osnovu potpune zahvaćenosti limfnog čvora.

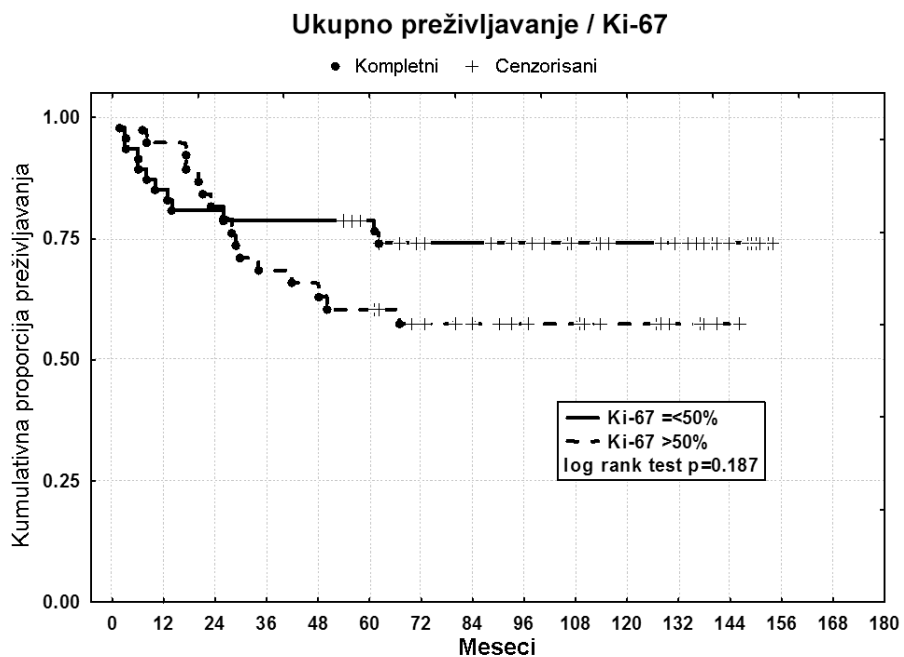
Faktori, Survivin, aktivna kaspaza 3 i Ki-67 nisu pokazali značajan uticaj na OS (log rank p=0.065, p=0.787, p=0.187, po redosledu) (Grafikon 1.13-1.15).



Grafikon 1.13: Krive ukupnog preživljavanja na osnovu Survivin-a.

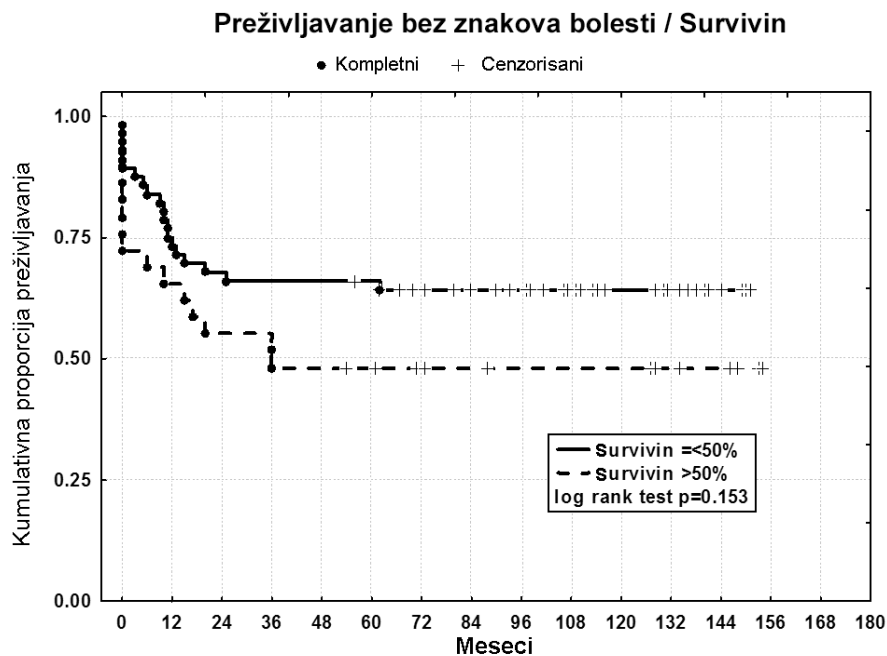


Grafikon 1.14: Krive ukupnog preživljavanja na osnovu aktivne- kaspaze 3.



Grafikon 1.15: Krive ukupnog preživljavanja na osnovu Ki-67.

Takođe analizirani faktori Survivin, aktivna kaspaza 3 i Ki-67 nisu pokazali značajan uticaj na EFS (*log rank* $p=0.153$, $p=0.677$, $p=0.319$, po redosledu) (Grafikoni 1.16-1.18).

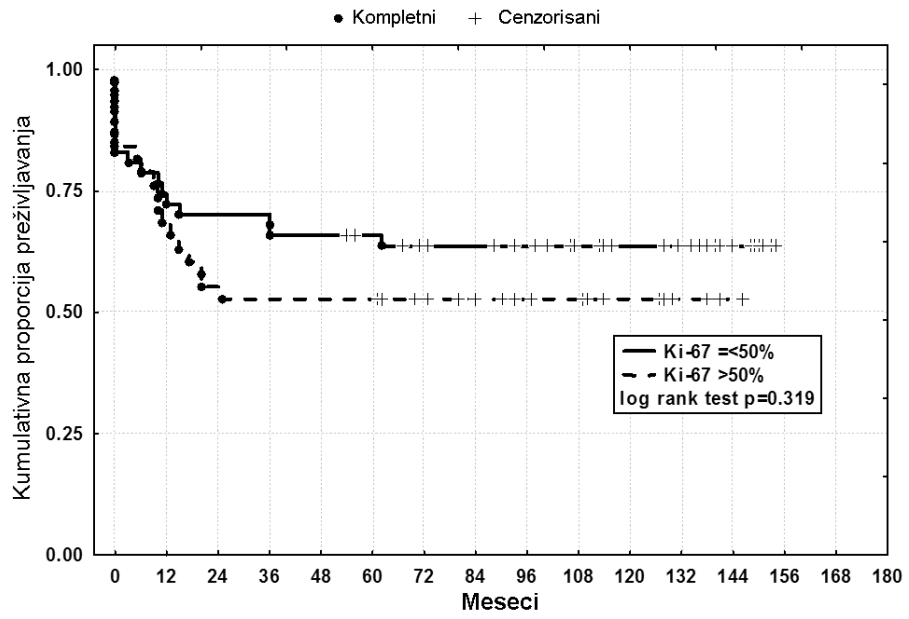


Grafikon 1.16: Krive preživljavanja bez znakova bolesti na osnovu Survivin-a.



Grafikon 1.17: Krive preživljavanja bez znakova bolesti na osnovu aktivne-kaspaze 3.

Preživljanje bez znakova bolesti / Ki-67



Grafikon 1.18: Krive preživljanja bez znakova bolesti na osnovu Ki-67.

4.3 MULTIVARIJANTNA ANALIZA

Multivarijantna analiza za OS, uključujući sve faktore rizika koji su pokazali značajnost u univarijantnoj analizi, identifikuje Bcl-2+>50%, >25% CD68+TAM, TLNI, IPS>2 i voluminoznu tumorsku masu kao nezavisne prognozne faktore za OS (p=0.026, p=0.042, p=0.004, p=0.0004, p=0.003 po redosledu). U dotičnom modelu za EFS povišeni CD68+TAM, IPS>2 i voluminozna tumorska masa ostaju značajni (p=0.044, p=0.009, p=0.018, po redosledu) (Tabela 6).

Tabela 6: Multivarijantna analiza

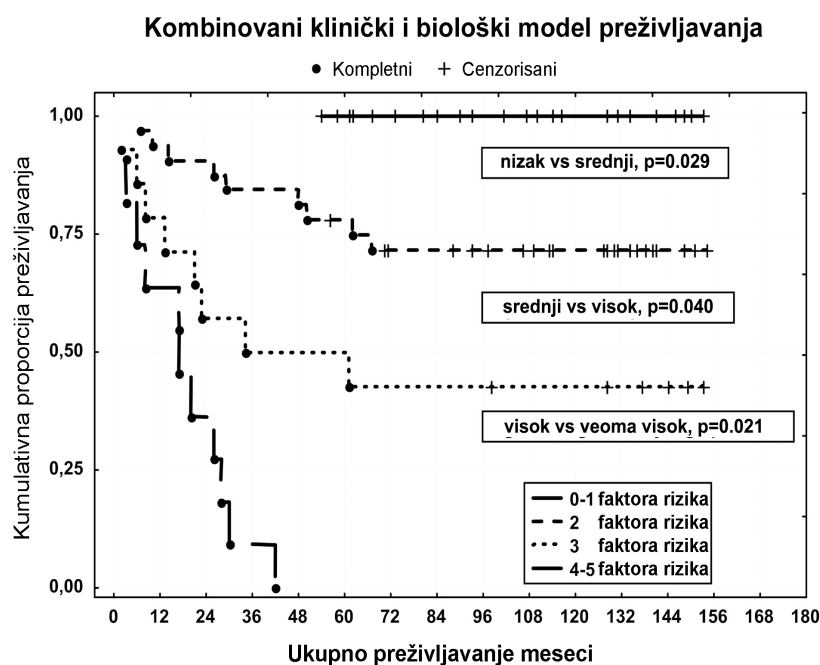
Multivarijantna analiza (n=85)						
Varijabla	Preživljavanje bez znakova bolesti			Ukupno preživljavanje		
	p vrednost	Koeficijent rizika	Interval poverenja	p vrednost	Koeficijent rizika	Interval poverenja
Bcl-2>50%+RS	0.117	1.747	0.869-3.510	0.025	2.452	1.114-5.395
CD68>25%+TAM	0.044	2.016	1.018-3.993	0.003	3.243	1.468-7.162
Potpuna zahvaćenost limfnog čvora	0.147	1.667	0.835-3.328	0.042	2.241	1.029-4.883
IPS>2	0.009	2.598	1.262-5.347	0.000	6.031	2.238-16.253
Voluminozna tumorska masa	0.018	2.280	1.150-4.522	0.003	3.344	1.506-7.424

4.4 MODEL PREŽIVLJAVANJA

Prognozni skor načinjen je na osnovu kumulativnog skora identifikovanih nepovoljnih prognoznih faktora za OS (dva molekularna, jedan mofološki i dva klinička). Broj bolesnika u svakoj grupi bio je: 12 bolesnika nije imalo ni jedan faktor; 16 je imalo jedan faktor; 32 je imalo po dva faktora; 14 po tri; 10 po četiri; i jedan bolesnik je imao svih pet faktora. Analiza unutar grupe pokazala je da ne postoji razlika u OS u bolesnika koji imaju kumulativni skor od 0 i 1 (p=1.0) i u onih sa skorom od 4 i 5 (p=0.98).

Na osnovu ovih rezultata predlažemo model preživljavanja koji stratifikuje bole-

snike u 4 grupe rizika u odnosu na broj nepovoljnih prognoznih faktora. Bolesnici koji nemaju ni jedan ili imaju samo jedan prognozni faktor pripadaju niskom riziku, sa dva faktora su intermedijerni rizik, sa tri su visoki i sa četiri ili pet su veoma visok rizik. Prime-nom ovakve definicije, 33% bolesnika pripadali su nisko rizičnoj grupi, 38% srednjoj, 16% visokoj i 13% veoma visoko rizičnoj grupi. Poređenje grupa pokazalo je statistički značajnu razliku u prognozi: niska vs. srednji rizik (*log rank*, $p=0.029$); srednji vs. visok rizik (*log rank*, $p=0.040$); visok vs. veoma visok rizik (*log rank*, $p=0.021$) (Grafikon 1.19). Petogo-dišnje OS bilo je progresivno lošije prema grupama rizika: u bolesnika sa niskim rizikom bio je 100%, sa srednjim 78%, sa visokim 45% i u veoma visokog rizika 0%, po redosledu (Chi square =42.13, $p<0.001$) (Grafikon 1.19).



Grafikon 1.19. Model preživljavanja. Na osnovu rezultata multivarijantne analize, formirane su prognozne grupe prema broju nepovoljnih faktora rizika: Bcl-2, CD68, TLNI, IPS, Voluminozna tumorska masa. Nizak rizik, 0-1 faktora rizika; srednji-2; visoki -3; veoma visoki 4-5 faktora rizika, svaka sa progresivno lošijim petogodišnjim OS (100%, 78%, 45%, 0% po redosledu, $p<0.001$).

5. DISKUSIJA

Životna prognoza bolesnika sa klasičnim HL poboljšana je značajno tokom poslednjih nekoliko decenija bez obzira na klinički stadijum oboljenja u trenutku postavljanja dijagnoze (99). Povoljniji rezultati u lečenju ove bolesti ostvareni su uvođenjem efikasne hemioterapije i primenom radioterapije po modelu strategije kontrolisanog rizika (redukcija u dozi i u obimu zračnog polja). Želje brojnih terapeuta da izleče što je moguće više bolesnika jedino primarnom terapijom, kao i naponi da se izbegnu i redukuju rani i kasni neželjeni efekti terapije, nisu još uvek ostvareni. Zbog toga je razumljivo da su savremena istraživanja usmerena prema otkrivanju novih bioloških markera koji, kombinovani sa standardnim prognosnim činiocima treba da omoguće bolju stratifikaciju bolesnika i primenu efikasnije inicijalne terapije (245).

Rezultati naše studije potvrdili su pet nezavisnih indikatora koji kod odmaklog stadijuma HL utiču na OS. Među njima su: visoka ekspresija Bcl-2 (>50%); povećan broj CD68+TAM (>25%); TLNI; visok IPS (>2); i voluminozna tumorska masa (bulky disease). Tri indikatora (povećani broj CD68+TAM; IPS>2; i voluminozna tumorska masa) utiču na EFS, takođe. Kombinovanjem nepovoljnih prognosnih faktora koje smo utvrdili za OS (Bcl-2; CD68; TLNI; IPS; i voluminozna tumorska masa) dizajnirali smo prognosni model koji stratifikuje bolesnike u 4 grupe rizika.

Određeni indikatori ukazuju na to da lošiji ishod može zavisiti od specifičnog molekularnog mehanizma koji utiče na terapijski odgovor (250, 251). Smatra se da u genezi klasičnog Hočkinovog limfoma izbegavanje apoptoze verovatno predstavlja glavni onkogeni mehanizam (252). S tim u vezi je predmet istraživanja bio prognosni značaj brojnih regulatornih molekula uključenih u proces apoptoze, uglavnom iz Bcl-2 familije (241, 253, 254). Uloga Bcl-2 dosta je razmatrana u literaturi, ali bez usaglašenih rezultata. Nekoliko izveštaja ukazuje da preterana ekspresija u RS ćelijama predstavlja nagoveštaj lošeg ishoda (255,256). U pokušaju da identifikuju različite prognosne grupe nekoliko istraživača je analiziralo jedan ili više bioloških markera zajedno sa kliničkim parametrima. U većini ovih studija nije bilo specifične selekcije bolesnika na osnovu stadijuma bolesti.

Garcia i sar. su primenom IHC i ISH analizirali 29 markera u studiji na 259 bolesnika sa Hočkinovim limfomom u svim stadijumima bolesti. (240). Oni su pokušali da biološke varijable uključe u standardni klinički prognosni scoring sistem. Kraće preživljavanje bilo je u direktnoj vezi sa preteranom ekspresijom Bcl-2, koja je bila prisutna u 23% slučajeva, što je bio slučaj i sa drugim varijablama, kao što su Bcl-XI, p53, Bax, MIB 1 i indeks apoptoze (240). Isto tako, *Sup i sar.* su u studiji na 107 neselektovanih bolesnika sa klasičnim HL, primenom tkivnog mikroniza, pokazali da je Bcl-2, ali ne p53 i p21, bio nezavistan prognosni faktor za preživljavanje. Kada je pridodat identifikovanim nezavisnim kliničkim parametrima (starost ≥ 45 i stadijum III ili IV), formiran je scoring sistem koji je

stratifikovao pacijente u tri grupe rizika (sa nula, jedan ili dva do tri od ovih faktora rizika) sa progresivno lošijim OS i EFS (257).

Rassidakis i sar. su analizirali Bcl-2 ekspresiju imunohistohemijski zajedno sa kliničkim i laboratorijskim parametrima u studiji na 412 bolesnika u svim kliničkim stadijumima klasičnog HL lečenih ABVD-om. Visoka Bcl-2 ekspresija, starost veća od 45 godina, stadijum IV bolesti, nizak serumski albumin i visok nivo LDH pokazali su se kao nezavisni prognostički faktori. Kombinacija ovih 5 nepovoljnih parametara u korelaciji je sa značajno nižim FFS (255).

Takođe, *Canioni i sar.* su imunohistohemijskom analizom pokazali da visoka Bcl-2 i CD20 ekspresija u RS ćelijama, kao i povećani broj citotoksičnih TIA1+ limfocita i c-kit pozitivnih mast ćelija predstavljaju nezavisne prognozne parametre za refrakternu bolest u klasičnom HL (256).

Nedavno su *Sanches-Espiridon i sar.* u studiji na 282 bolesnika sa uznapredovalim stadijumom bolesti, primenom tehnike *low density* genske ekspresije, utvrdili da je *Bcl-2* jedan od najboljih prognoznih gena kod pacijenata u odmaklom stadijumu cHL. *Bcl-2* je integrisan u prognozni genski model (uključuje funkcionalne puteve za ćelijski ciklus, apoptozu, aktivnost makrofaga i interferon regulatorni faktor 4) koji stratifikuje nisko i visoko rizične bolesnike sa značajno različitim FFS vrednostima (258).

Međutim, postoje studije sa potpuno suprotnim rezultatima kao što su *Montalbana i sar.*, *Morentea i sar.* i *Spectora i sar.* u kojima Bcl-2 nije značajnije povezan sa ishodom bolesti, odnosno lečenja (238, 259, 260).

Montalban i sar. analizirali su 40 bioloških markera i IPS u grupi od 259 bolesnika sa klasičnim HL i potom ih korelirali sa ishodom. Među biološkim markerima bili su oni koji su uključeni u ćelijsku diferencijaciju i aktivaciju, kontrolu ćelijskog ciklusa, regulaciju apoptoze i odgovor domaćina. Ekspresija Bcl-2 pokazala je trend ka kraćem DFS.

U multivarijantnoj analizi p53, Bcl-XL i TUNEL su bili povezani sa lošijim ishodom (238).

Morente i sar. analizirali su prognozni značaj p53, bcl-2, Rb, Ki-67, CD15, EBV imunohistohemijskom analizom, kao i standardne kliničke parametre 140 bolesnika sa HL. Bcl-2 ekspresija nije bila u korelaciji sa ishodom lečenja. Ipak, multivarijantna analiza pokazala je da odsustvo EBV infekcije, visoka proliferacija, starost preko 60 godina, i stadijum III i IV predstavljaju nezavisne prognozne faktore (259).

Spector i sar. su u studiji 83 bolesnika u svim stadijumima HL analizirali klinički značaj ekspresije Bcl-2, p53, i LMP-1 imunohistohemijski, kao i IPS. Ekspresija Bcl-2, p53, i LMP-1 nije pokazala uticaj na CR, FFS i OS. Jedini značajan uticaj pokazao je IPS na OS. Ekspresija Bcl-2, p53, i LMP-1 nije dodala prognoznu značajnost IPS-u. (260).

U našoj studiji 85 bolesnika sa uznapredovalim stadijumom klasičnog HL, povećana Bcl-2 ekspresija (Bcl-2+ >50%), bila je prisutna u 31% slučajeva. Bolesnici sa povećanom ekspresijom Bcl-2 imali su lošije 5-godišnje OS 50% u poređenju sa onima koji su imali nižu Bcl-2 ekspresiju i 5-godišnje OS 80% (log rank p=0.007), kao i kraće 5-godišnje EFS (43% vs 68%; log rank p=0.031). Koksov multivarijantni model pokazao je da povećana Bcl-2 ekspresija predstavlja nezavisan prognozni faktor za sveukupno preživljavanje (p=0.025).

Prisustvo tumoru pridruženih makrofaga, koje je do skora smatrano delom imunog odgovora na tumor, danas se dovodi u vezu sa lošijom prognozom i u solidnim tumorima i u B-ćelijskim malignitetima (261-263). Pored toga, u nekoliko studija na grupama bolesnika sa HL otkrivena je, takođe, njihova prognozna vrednost (264-266).

Postoje naznake da tumoru pridruženi makrofagi u karcinomu dojke putem regulisanja angiogenog *switch-a* utiču na formiranje krvnih sudova (267). Kada je reč o Hočkinovom limfomu, migracija makrofaga u tumorom zahvaćene limfne čvorove verovatno se dešava u kasnijim fazama bolesti (268). Makrofagi i druge ćelije zapaljenja mogu biti privučene u primarnu tumorsku leziju putem granulocitno-makrofagnog stimulišućeg faktora kolonija i drugih citokina koje luče RS ćelije (24, 269). Njihova aktivacija odvija se pod kontrolom TNFa, a aktivnost RS ćelija reguliše se medijatorima parakrinog luka, kao što su *Notch 1/ Jagged 1* i putem angiogenog *switch-a*, koji su kontrolisani preko VEGF, endotelnih i glatkih mišićnih ćelija (233).

Međutim, još uvek, postoje brojna otvorena pitanja i nedovoljno precizna objašnjenja koja se odnose na fenotip, hemotaksu i mehanizme kojima makrofagi utiču na razvoj rezistencije na primenjenu terapiju, odnosno, na koji način njihovi signali deregulišu apoptotske puteve u RS ćelijama (268).

Stiedl i sar. su u studiji 166 bolesnika u svim stadijumima klasičnog HL, koristili tkivni mikroniz (242). Oni su pokazali da je u bolesnika sa uznapredovalim stadijumom HL povećani broj CD68+ makrofaga (CD68+>25%) povezan sa kraćim sveukupnim preživljavanjem i kraćim periodom bez progresije bolesti (242). Takođe, kod bolesnika sa ranim stadijumom bolesti u odsustvu povećanog broja CD68+ (CD68+<5%) ćelija pokazan je dugotrajni 100% period bez bolesti (242).

Tzankov i sar. su u studiji 105 neselektovanih bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom zaključili da povećani broj CD68 pozitivnih tumoru pridruženih makrofaga ima nepovoljan uticaj na ishod lečenja (267). U prilog ovih rezultata mogu se pomenuti i nalazi *Kampera i sar.* koji su u istraživanju na 288 bolesnika, u svim kliničkim stadijumima klasičnog HL, primenom tkivnog mikroniza pokazali da je visoka ekspresija antigena CD68 i CD163 u značajnoj korelaciji sa kraćim sveukupnim preživljavanjem i periodom bez neže-

ljenog događaja. Takođe, oni su utvrdili da je povećanje CD68+ makrofaga nezavisan prognostički faktor za preživljavanje (264).

Yoon i sar. pokazali su u studiji 144 bolesnika sa HL da visoki indeks (>20%) i CD68+ i CD163+ makrofaga ima značajnu korelaciju sa EFS, DSS i OS (266).

U studijama koje su se odnosile na profilisanje genske ekspresije većih grupa neselektovanih bolesnika sa klasičnim HL, pokazalo se, da u slučaju neuspeha primarnog lečenja postoji prognostički značaj tumoru-pridruženih makrofaga (242, 271).

Međutim, *Azambuja i sar.* u studiji, koja je obuhvatila kohortu od 265 neselektovanih bolesnika sa klasičnim HL, nisu potvrdili da postoji veza između broja CD68+ i CD163+ makrofaga sa kliničkim ishodom bolesti (PFS i DSS) (272).

U našoj studiji 85 bolesnika sa uznapredovalim stadijumom klasičnog HL posle analize preživljavanja koja se bazirala na rezultatima imunohistohemijske analize na tkivnim isečcima celih limfnih čvorova, utvrdili smo da bolesnici sa povećanim brojem tumoru pridruženih makrofaga CD68+>25% imaju kraće 5-godišnje OS (52%) u odnosu na one sa nižim brojem (CD68+≤25%) i 5-godišnjim OS 83% (p=0.003). Naši rezultati pokazali su, takođe, da bolesnici sa povećanim brojem CD68+ makrofaga (>25%) u primarnim tumorskim lezijama, imaju kraće 5-godišnje EFS (48% vs 68% u grupi sa CD68+≤25%, *log rank* p=0.035). U multivarijantnoj analizi Koksovim modelom pokazano je da povećani broj tumoru pridruženih makrofaga predstavlja nezavisan prognostički faktor za OS (p=0.0421) i EFS (p=0.0441).

Činjenica da se povećani broj tumoru pridruženih makrofaga (CD68+>25%) dovodi u vezu sa lošim ishodom lečenja kod bolesnika sa uznapredovalim stadijumom klasičnog HL može da podrži hipotezu da se migracija makrofaga u zahvaćene regione tumorom dešava u kasnim fazama bolesti.

Tumoru-pridruženi makrofagi su deo onih ćelija koje podržavaju razvoj (engl. - *nursing cells*) u tumorskoj mikrosredini. Iz toga sledi zaključak da jedinstveno lokalno delovanje tumorskog mikrookruženja, takođe, označeno kao „premetastatska niša“ (engl. - *premetastatic niche*), može biti odgovorno za nastanak cirkulišućih HL ćelija koje se u ranoj fazi razvoja bolesti usmeravaju prema susednim limfnim čvorovima projektujući na taj način oblik metastatske diseminacije (273, 274). Studije koje su se zasnivale na proučavanju ćelijskih kultura pokazale su da su klonalne B ćelije verovatno odgovorne za podršku i stvaranje RS ćelija (275). Takođe, postoje izveštaji u kojima se navodi da kod većine bolesnika u stadijumu IV HL, kao i u ranom stadijumu bolesti, postoje visoki nivoi cirkulišućih klonalnih B ćelija (275).

Wasielewski i sar. su u studiji na 965 bolesnika sa podtipom cHL nodulska skleroza

našli da je potpuna zahvaćenost limfnog čvora tumorskim i ćelijama zapaljenja postojala kod 79% slučajeva, ali da to nije imalo uticaj na dužinu preživljavanje (248).

U našoj studiji bio je 31 (36%) bolesnik sa potpunom zahvaćenošću limfnih čvorova tumorskim ćelijama i ćelijama zapaljenja (26 bolesnika sa nodulskom sklerozom). Bolesnici u kojih je postojala potpuna zahvaćenost limfnog čvora tumorskim ćelijama i ćelijama zapaljenja imali su lošiju stopu 5-godišnje OS (55%) u odnosu na bolesnike bez tumorske ili zapaljenske infiltracije (80%, *log rank*, $p=0.017$). Takođe, između ovih grupa postojao je trend prema nižem 5-godišnjem EFS (48% vs 68%, *log rank* $p=0.087$).

Potpuna zahvaćenost limfnog čvora tumorskim i zapaljenskim ćelijama pokazala je u multivarijantnoj analizi značaj nezavisne prognozne varijable za sveukupno preživljavanje ($p=0.0036$)

Interakcija između matičnih tumorskih ćelija i načina formiranja, kao i anatomske organizacije posebnog okruženja koja im pruža podršku, još uvek se istražuje (276). Potrebno je razjasniti da li potpuna zahvaćenost limfnog čvora predstavlja deo ovog procesa koji bi mogao uticati na kliničkobiološke varijetete bolesti.

Naše istraživanje potvrdilo je, takođe, prognoznu vrednost analiziranih kliničkih faktora, koji su odranije poznati kao važni u prognozi HL-IPS i voluminozna tumorska masa.

Internacionalni Prognozni Skor, koji se sastoji od sedam nezavisnih kliničkih i laboratorijskih prognoznih parametara, a koji utiču na progresiju i sveukupno preživljavanje u Hočkinovom limfomu, definisan je u okviru Međunarodnog Projekta Prognoznih Faktora za uznapredovali stadijum HL. Analiza je obavljena na 5141 bolesnika koji su inicijalno lečeni hemioterapijskim protokolima koji sadrže antraciklin (100). Ovaj prognozni skor razvijen je sa ciljem da se u grupi bolesnika sa uznapredovalim stadijumom bolesti identifikuju bolesnici koji bi mogli imati korist od redukovane primarne terapije i bolesnici kod kojih se očekuje nepovoljan odgovor nakon primljene standardne terapije (100). Rezultati studija u kojih je izvršeno upoređivanje nekoliko različitih prognoznih modela, uključujući i IPS, pokazali su da nijedan od analiziranih modela nije dovoljno precizan da bi se sa relevantnom pouzdanošću mogla izdvojiti grupa bolesnika veoma niskog rizika (<10% stope neuspeha) ili grupa bolesnika veoma visokog rizika (>50% stope neuspeha) (101). Ovi modeli mogu da prave razliku samo između bolesnika sa relativno niskim rizikom i bolesnika sa relativno visokim rizikom (npr. $IPS \leq 2$ i $IPS > 2$) (101). Međutim, smatra se da je IPS metoda izbora u selekciji bolesnika visokog rizika u uznapredovalom stadijumu HL i tako će biti sve dok se ne identifikuju novi pouzdani specifični biološki prognozni markeri (93).

U našoj studiji su bolesnici sa visokim IPS (>2) imali značajno nizak OS ($OS_{5\text{god}}$ sa/bez faktora rizika 51% vs. 90%, *log rank* $p<0.001$) i značajno kraće EFS ($EFS_{5\text{god}}$ sa/bez faktora rizika 46% vs. 74%; *log rank* $p=0.004$). Multivarijanta analiza pokazala je da $IPS > 2$ predstavlja nezavisan prognozni faktor za OS ($p=0.0004$) kao i za EFS ($p=0.009$).

Princip da tumorska masa predstavlja glavnu determinantu u prognozi pokazan je i u uznapredovalom stadijumu HL (277, 278, 279). Takođe, poseban prognozni značaj se pridaje velikoj primarnoj tumorskoj masi u medijastinumu (koje zahvataju više od 45% torakalne aperture), koja se, iako relativno retka (učestalost manja od 10% slučajeva u uznapredovalom stadijumu bolesti), u rezultatima nekoliko studija navodi kao nepovoljan prognozni faktor (280, 281). Međutim, postoje izveštaji koji nisu dokazali da prisustvo primarne tumorske mase u medijastinumu (koja zahvata od 1/3 dijametra do 45% torakalne aperture medijastinuma), tj. u bolesnika u uznapredovalom stadijumu bolesti lečenih modernom hemioterapijom, predstavlja parametar koji može imati značaj za prognozu (100).

Rezultati naše studije pokazali su da prisustvo velike tumorske mase značajno utiče na kraće OS (OS_{5god} sa/bez faktora rizika 53% vs. 82%, *log rank* $p=0.002$) i EFS (EFS_{5god} sa/bez faktora rizika 44% vs. 71%; *log rank* $p=0.014$). Multivarijantnom analizom utvrđeno je da voluminozna tumorska masa predstavlja nezavisan prognozni faktor za OS ($p=0.003$) i EFS ($p=0.018$).

Rezultati naših analiza pokazali su, takođe, da Survivin, aktivna kaspaza 3 i Ki-67 nemaju značajan prognozni uticaj na OS i na EFS.

Survivin, koji je član familije inhibitora apoptotskih proteina, doveden je u vezu sa lošijom prognozom u nekoliko maligniteta (282). Njegova povišena ekspresija pokazana je kod B Ne-Hoćkinovih limfoma niskog i visokog rizika, T ćelijskih limfoma kod odraslih, leukemija i Hoćkinovog limfoma (240, 283-286). *Alvaro i sar.*, utvrdili su visok stepen ekspresije Survivina kod većine analiziranih bolesnika (studija na neselektovanoj grupi od 257 bolesnika sa Hoćkinovim limfomom) (287). Oni su utvrdili, takođe, da je povećani procenat Survivina, i drugih identifikovanih antiapoptotskih proteina (Bcl-XL, kaspaza 3 i NfKB) bio u obrnutoj proporciji sa stepenom infiltracije citotoksičnih ćelija u tumorskom okruženju (287). U studiji *Garcia i sar.*, Survivin je bio eksprimiran u većini analiziranih slučajeva, a multiparametrijska analiza pokazala je njegovu udruženost sa povećanom proliferacijom tumorskih ćelija zajedno sa drugim identifikovanim proteinima (Hdm2, p53, p21, Rb, cyclins A, B1, D3 I E, CDK2, CDK6, SKP2, Bcl-XL, STAT1 I STAT3) (240). Međutim, u univarijantnoj analizi Survivin nije pokazao značajan uticaj na preživljavanje (242). Slične rezultate saopštili su *Monatalban i sar.* koji su dokazali visoku ekspresiju Survivina u većini slučajeva, ali bez uticaja na ishod lečenja (238).

Rezultati našeg istraživanja u saglasnosti su sa rezultatima drugih studija obavljenim na velikim grupama neselektovanih bolesnika (238, 240). U našoj studiji, Survivin je bio eksprimiran u većini analiziranih slučajeva (91%) i nije pokazao uticaj od značaja na OS (*log rank* $p=0.065$), kao i na EFS (*log rank* $p=0.153$).

Aktivacija efektornog enzima kaspaze 3 važna je da bi započela ćelijska smrt putem apoptoze (288, 289). Stavovi u vezi sa prognoznim značajem aktivne kaspaze 3 u Hočkinovom limfomu su kontradiktorni. *Dukers i sar.* su u studiji na 63 bolesnika u svim stadijumima bolesti sa klasičnim Hočkinovim limfomom (55 bolesnika sa podtipom nodulske skleroze i 8 bolesnika sa podtipom mešovite celularnosti) utvrdili da povećani broj tumorskih ćelija (5 i više %) koji sadrži aktivnu kaspazu 3 predstavlja povoljan faktor za sveukupno preživljavanje (290). Suprotno ovim rezultatima, *Montalban i sar.* su u istraživanju na neselektovanoj grupi od 259 bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom, pokazali da aktivna kaspaza 3 nema značajan uticaj na preživljavanje (238).

Ekspresija aktivne kaspaze 3 u RS ćelijama, u našoj studiji bila je prisutna kod 61% slučajeva (raspon 0-10%), što je slično nalazima *Bai i sar.* koji navode 67% slučajeva (raspon 0-12%) (254). U univarijantnoj analizi povećan procenat tumorskih ćelija koji ekspri-mira aktivnu kaspazu 3 (5 i više %) nije pokazao statistički značajan uticaj na OS (*log rank* $p=0.787$) i na EFS (*log rank* $p=0.677$).

Poznato je da većina RS ćelija u klasičnom Hočkinovom limfomu pokazuje odsustvo ili nisku ekspresiju aktivne kaspaze 3 (291). Niska ekspresija aktivne kaspaze 3 može biti rezultat ekspresije inhibitornih proteina pre aktivacije kaspaze 3, kao što su antiapoptotski članovi Bcl-2 familije i članovi IAP familije protein (292). U skladu sa rezultatima koje su saopštili *Dukers i sar.*, i *Bai i sar.* mi u našem istraživanju nismo utvrdili značajnu inverznu korelaciju između ekspresije aktivne kaspaze 3 i antiapoptotskih proteina Bcl-2 i Survivin-a (254, 290). Međutim, značajnu pozitivnu korelaciju između ekspresije aktivne kaspaze 3 i c-IAP2 proteina u RS ćelijama utvrdili su *Durkop i sar.* i na taj način pružili su dokaz da c-IAP2 inhibira apoptozu blokirajući aktivnu kaspazu 3 (292).

Indeks proliferacije tumorskih ćelija i njegova prognozna vrednost predmet su istraživanja u brojnim studijama. Visok indeks proliferacije tumorskih ćelija meren Ki-67 pozitivnošću, opisan je kao nepovoljan prognozni faktor u agresivnim ne-Hočkinovim limfomima (293). Međutim, rezultati u vezi sa prognoznim značajem indeksa proliferacije tumorskih ćelija nisu usaglašeni posle istraživanja na neselektovanim grupama bolesnika sa Hočkinovim limfomom. *Garsija i sar.* pokazali su da je visok indeks proliferacije povezan sa lošim ishodom, odnosno, da visok indeks proliferacije predstavlja nezavisan prognozni faktor za sveukupno preživljavanje (240). Do sličnih zaključaka došli su i *Morente sa i sar.* jer su pokazali da povišena ekspresija Ki-67 utiče na sveukupno kraće preživljavanje i nemogućnost da se postigne kompletna remisija (259).

Montalban i Abele sa svojim saradncima nisu uspeali da dokažu prognozni značaj Ki-67 u Hočkinovom limfomu (238, 294).

U našoj studiji, analizirani faktor Ki-67 nije pokazao statistički značajanu povezanost sa OS (*log rank* $p=0.187$) kao i na EFS (*log rank* $p=0.319$), mada se pokazalo da bolesnici sa visokim indeksom proliferacije imaju kraće preživljavanje i kraći EFS.

6. ZAKLJUČAK

Sa ciljem da se bolesnici u uznapredovalom stadijumu cHL stratifikuju u grupe rizika razvili smo prognozni model OS koji integriše kliničke parametre i varijable koje se zasnivaju na tkivnim karakteristikama.

Ključni parametri za stratifikaciju su: Bcl-2 pozitivnost u >50% RS ćelija, u >25% CD68+ tumoru-pridruženih makrofaga, potpuna zahvaćenost limfnog čvora tumorskim i ćelijama zapaljenja, IPS viši od 2 i voluminozna tumorska masa. Zasnovano na kumulativnom skorom ovih faktora rizika, bolesnici su stratifikovani u 4 grupe (niska 0-1, intermedijerna 2, visoka 3, veoma visoka, 4-5 faktora rizika), svaka sa progresivnim smanjenjem OS.

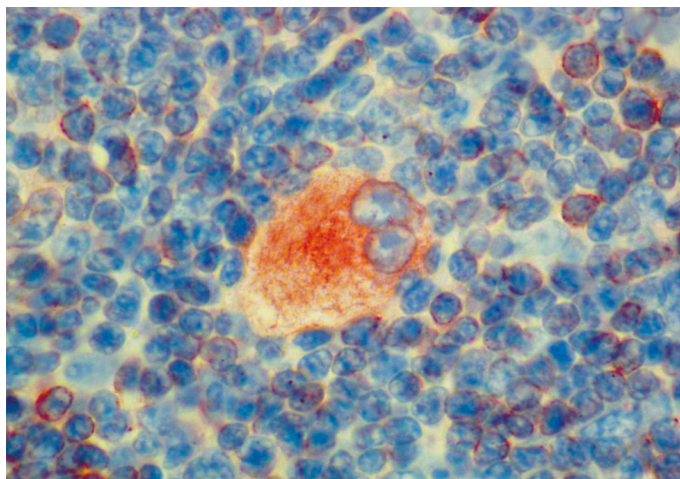
Visok rizik za loš ishod lečenja, prema našim nalazima, imaju bolesnici sa dva ili više faktora rizika koji se utvrde u trenutku postavljanja dijagnoze, cHL.

Naš model omogućuje preciznu stratifikaciju rizika u trenutku postavljanja dijagnoze i kao takav može se koristiti kao vodič za individualan pristup lečenju. Međutim, njegovu prognoznu vrednost potrebno je proveriti i potvrditi u studijama koje obuhvataju veći broj bolesnika.

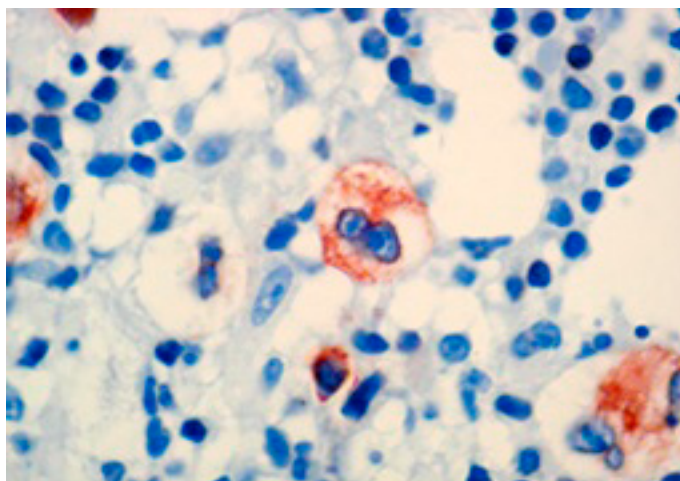
Zahvalnost

Istraživanje je obavljeno uz pomoć Ministarstva obrazovanja i nauke Republike Srbije (projekat br. 41025)

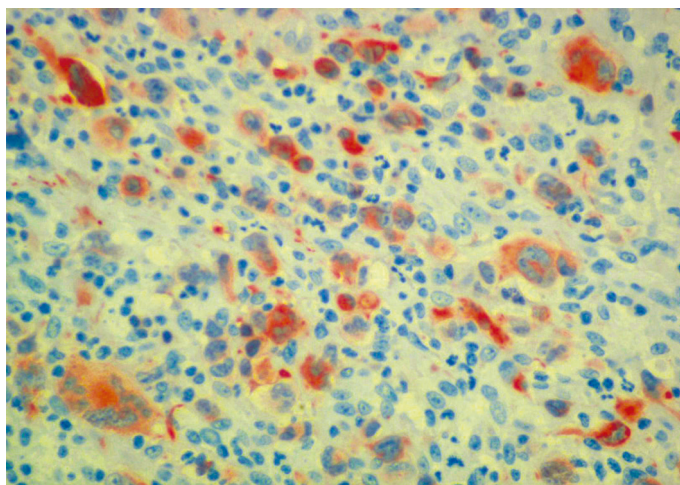
7. REZULTATI-FOTODOKUMENTACIJA



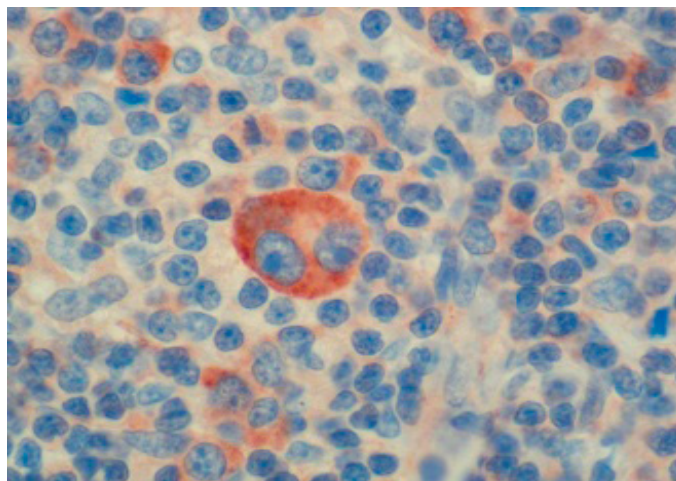
Slika 1. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Klasična RS ćelija-citoplazmatska pozitivnost. (IHH, bcl-2, x 400)



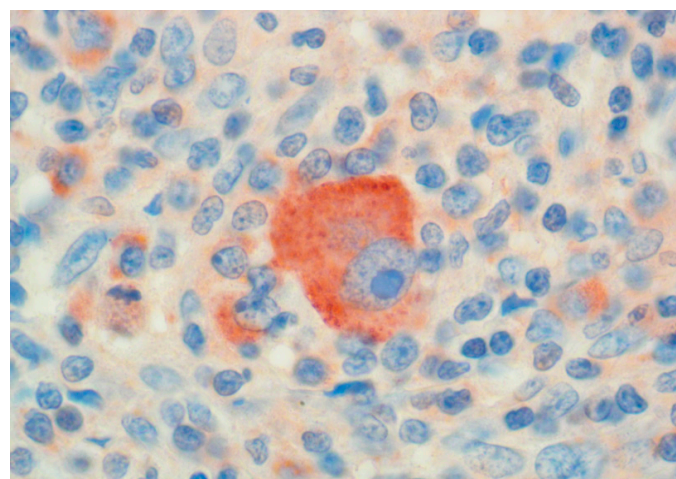
Slika 2. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. (IHH, bcl-2, x400)



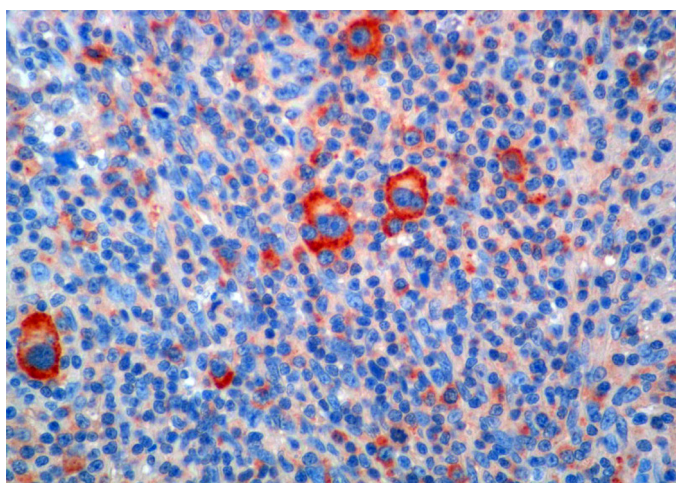
Slika 3. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. (IHH, bcl-2, x200)



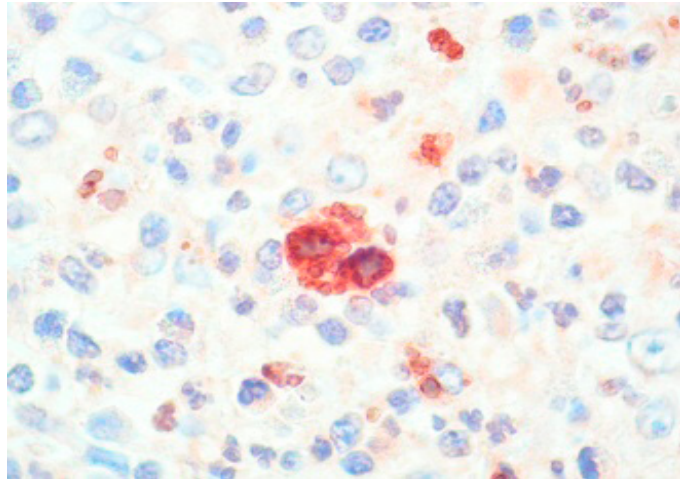
Slika 4. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Klasična RS ćelija-citoplazmatska pozitivnost. (IHH, Survivin, x400)



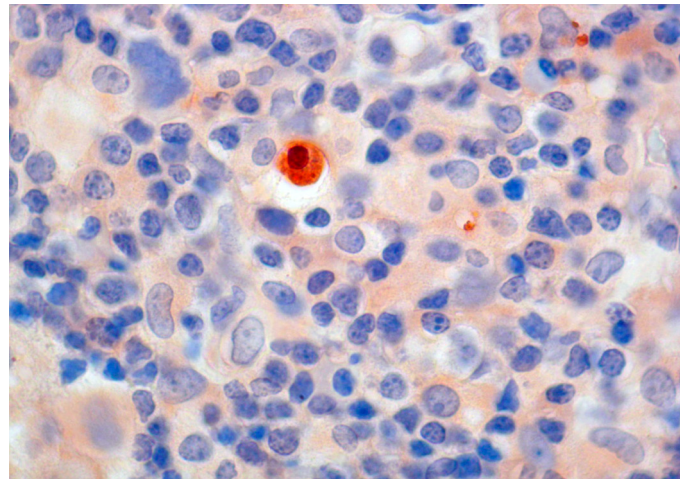
Slika 5. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Hočkinova ćelija-citoplazmatska pozitivnost. (IHH, Survivin, x400)



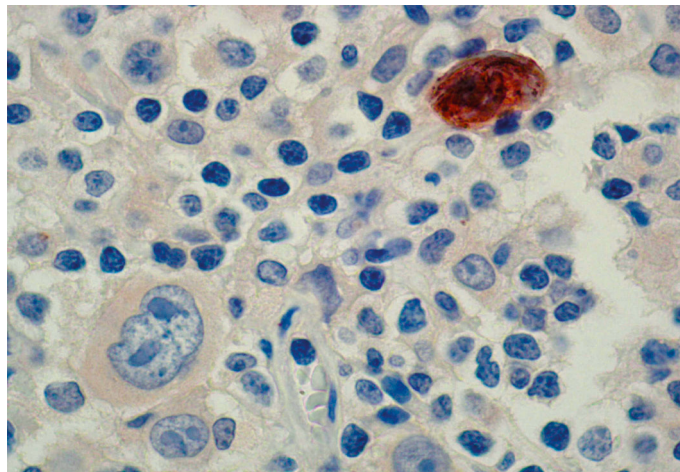
Slika 6. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Pozitivne Hočkinove i Rid Šternbergove ćelije. (IHH, Survivin, x200)



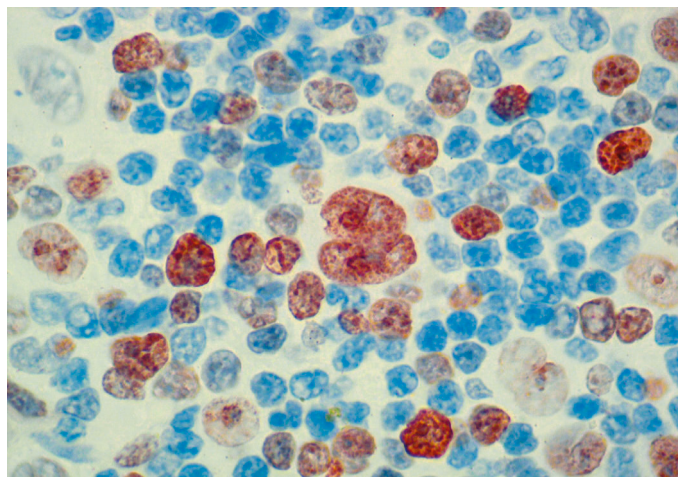
Slika 7. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Jedarna pozitivnost Rid-Šternbergove ćelije. (IHH, aktivna kaspaza 3, x400)



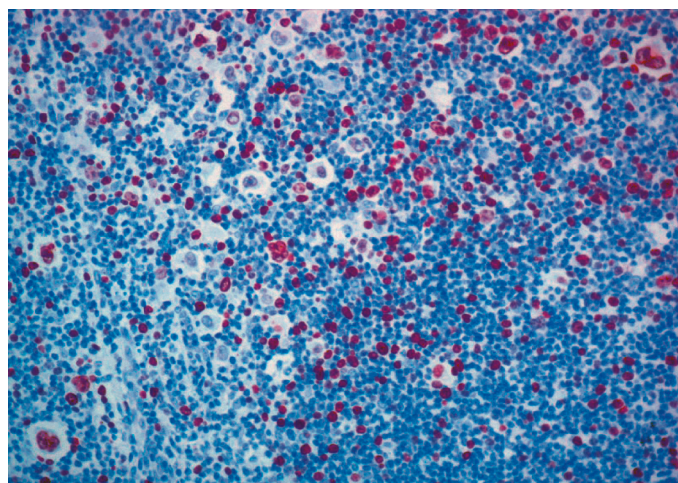
Slika 8. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Tumorska ćelija u apoptozi (faza kondenzacije). (IHH, aktivna kaspaza 3, x400)



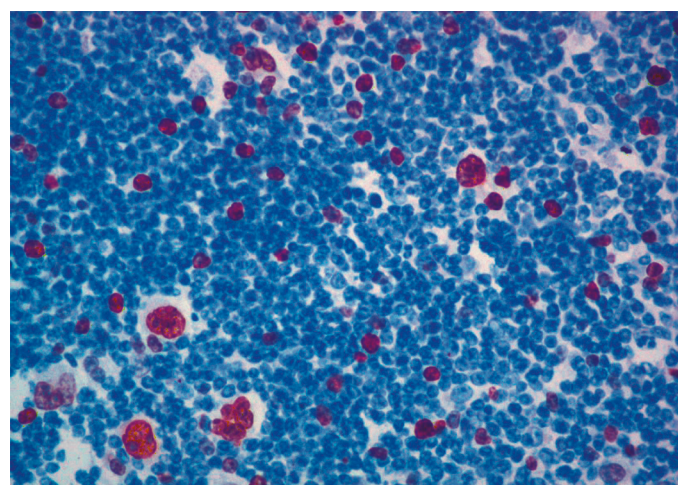
Slika 9. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Tumorske ćelije sa pozitivnom i negativnom reakcijom na aktivnu kaspazu 3. (IHH, aktivna kaspaza 3, x400)



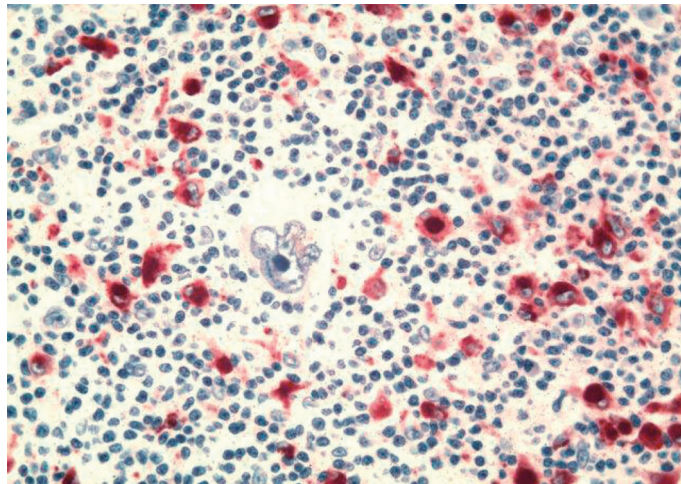
Slika 10. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Pozitivna nuklearna reakcija Rid-Šternbergove ćelije. (IHH, Ki-67, x 400)



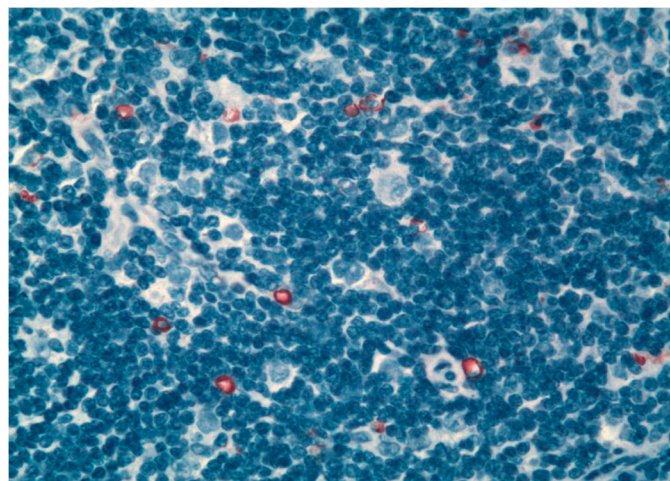
Slika 11. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. (IHH, Ki-67, x100)



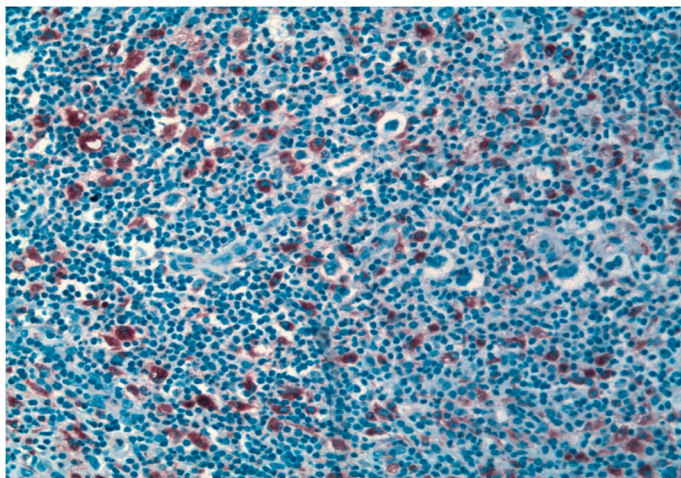
Slika 12. Klasičan HL, podtip mešovita celularnost. (IHH, Ki-67, x200)



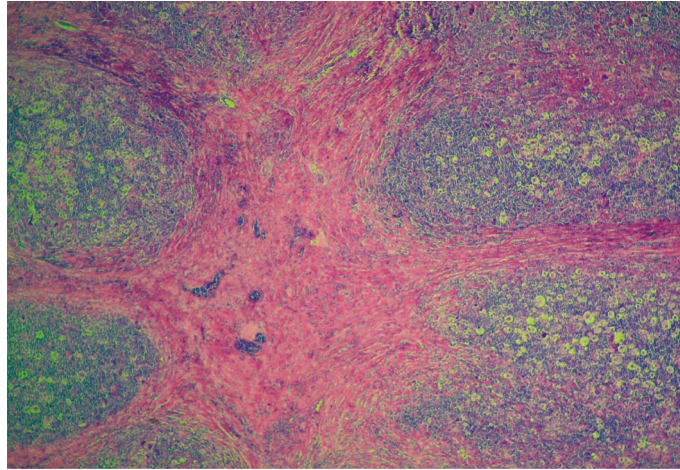
Slika 13. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Tumoru pridruženi makrofagi pozitivni na CD68. (IHH, CD68, x 400)



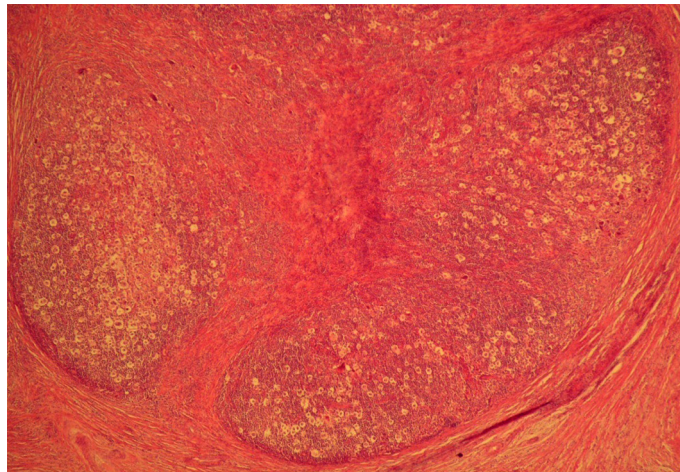
Slika 14. Klasičan HL, podtip mešovita celularnost. Nizak procent tumoru pridruženih makrofaga. (IHH, CD68, x 200)



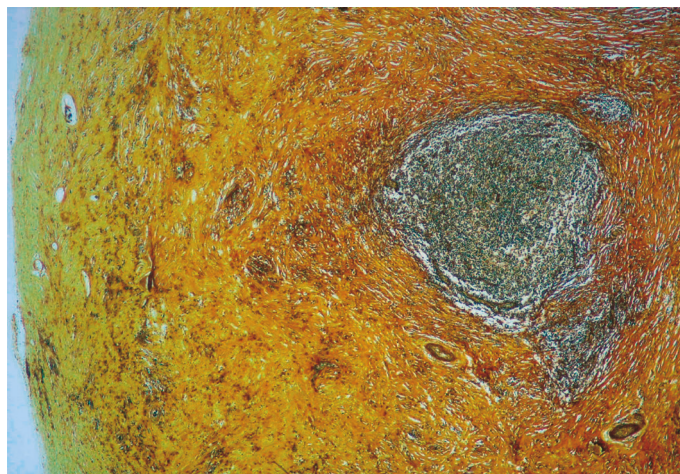
Slika 15. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Visok procent tumoru pridruženih makrofaga pozitivnih na CD68. (IHH, CD68, x 200)



Slika 16. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Potpuna zahvaćenost limfnog čvora tumorskim nodulima i širokim trakama kolagenog veziva. (HE, x 40)



Slika 17. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Noduli koji se sastoje od brojnih lakunarnih RS ćelija i ćelija zapaljenja okruženi trakama kolagenog veziva. (HE, x40)



Slika 18. Klasičan HL, podtip nodulske skleroze. Zadebljanje kapsule i izrazita skleroza limfnog čvora, kao i retki tumorski noduli. (Gordon/Sweet, x 40)

8. LITERATURA

1. Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans* 1832;17:68-114.
2. Wilks S. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's disease) with remarks. *Guys Hosp Rep* 1865;11:56-67.
3. Rather L. Who discovered the pathognomic giant cell of Hodgkin's disease? *Bull NY Acad Med* 1972;48:943-50.
4. Sternberg C. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates. *Ztschr Heilk* 1898;19:21-90.
5. Reed DM. On the pathological changes in Hodgkin's disease with especial reference to its relation to tuberculosis. *John Hopkins Hosp Rep* 1902;10:133-96.
6. Kaplan HS. Hodgkin's disease: unfolding concepts concerning its nature, management and prognosis. *Cancer* 1980;45:2439-74.
7. Rosenberg SA. Hodgkin's disease: challenges for the future. *Cancer Res* 1989;49:767-9.
8. Urban WJ, Longo DL. Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1992;326:678-87.
9. De Vita VT, Hubbard SM. Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1993;328:560-5.
10. Stein H. Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol* 1997;21:119-20.
11. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J et al. World Health Organisation classification of lymphomas: a work in progress. *Ann Oncol* 1998;9(Suppl 5):25-30.
12. Kanzler H, Küppers R, Hansman M-L, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 1996;184:1495-505.
13. Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease form a clonal expansion of a highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med* 1997;337:453-8.
14. Ohno T, Stribley JA, Wu G, et al. Clonality in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1997;337:459-65.
15. Tindle BH, Parker JW, Lukes RJ. „Reed-Sternberg cells“ in infectious mononucleosis? *Am J Clin Pathol* 1972;58:607-17.
16. Strum SB, Park JK, Rappaport H. Observation of cells resembling Reed-Sternberg cells in conditions other than Hodgkin's disease. *Cancer* 1970;26:176-190.
17. Schwab U, Stein H, Gerdes J, et al. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 1982;299:65-7.

18. Stein H, Mason DY, Gardes J, et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells in hystiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985;66:848-58.
19. Kuzu I, Delsol G, Jones M, Gatter KC, Mason DY. Expression of the Ig-associated heterodimer (mb-1 and B29) in Hodgkin's disease. *Histopathology*, 1993; 22: 141-4.
20. Re D, Muschen M, Ahmadi T et al. Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res* 2001; 61: 2080-4.
21. Stein H, Marafioti T, Foss HD et al. Down-regulation of Bob.1/OBF.1 and Oct-2 in classical Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood* 2001; 97: 496-501.
22. Watanabe K, Yamashita Y, Nakayama A et al. Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin's disease. *Histopathol* 2000; 36: 353-61.
23. Schwering I, Brauninger A, Klein U et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 101:1505-12.
24. Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:15-27.
25. Stein H, Delsol G, Pileri SA et al. Classical Hodgkin's lymphoma, introduction. In WHO Classification of Tumours of Haematopoetic and Lymphoid Tissues, 4th edn, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (eds) IARC: Lyon, 2008; 326-329.
26. Schwartz LB, Gerdes J, Durkop H et al. BER-H2: a new anti-K-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formol-resistant epitope. *Blood* 1989; 74: 1678-1689.
27. Stein H, Uchanska-Ziegler B, Gerdes J et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells contain antigens specific to late cells of granulopoiesis. *Int J Cancer* 1982; 29: 283-290.
28. Chittal SM, Caveriviere P, Schwarting R et al. Monoclonal antibodies in the diagnosis of Hodgkin's disease. The search for the rational panel. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 9-21.
29. Schmid C, Pan I, Diss T et al. Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 1991; 139: 701-707.
30. Carbone A, Gloghini A, Aldinucci D et al. Expression pattern of MUM1/IRF4 in the spectrum of pathology of Hodgkin's disease. *Br J Haematol* 2002; 117: 366-372.
31. Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M et al. Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, OCT2, PU.1 and immunoglobulin in reac-

- tive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas and Hodgkin lymphomas. *J Pathol* 2004; 202: 60-69.
32. Gerdes J, Van Baarlen J, Pileri S et al. Tumor cell growth fraction in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1987; 128: 390-393.
 33. Rosenwald A, Kuppers R. Pathology and Molecular Pathology of Hodgkin Lymphoma. In: Hodgkin Lymphoma A Comprehensive Update on Diagnostics and Clinics, 1st edn, Engert A, Horning S. (eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011; 33-43.
 34. Bargou RC, Emmerich F, Krappman D et al. Constitutive nuclear factor kappa B-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997; 100: 2961-9.
 35. Dutton A, Reynolds GM, Dawson CW et al. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol* 2005; 205: 498-506.
 36. Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Medeiros LJ et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3 kinase/Akt promotes G1 cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2006; 132: 503-11.
 37. Scheeren FA, Diehl SA, Smit LA et al. IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5; evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* 2008; 111: 4706-15.
 38. Baus D, Pfitzner E. Specific function of STAT 3, SOCS1 and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *ITM Cancer* 2006; 118: 1404-13.
 39. Kube D, Hotlick U, Vockerodt M et al. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* 2001; 98: 762-70.
 40. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD et al. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 618-26.
 41. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S et al. The AP-1 dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin's lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 13134-9.
 42. Watanabe M, Ogawa Y, Ito K et al. AP-1 mediated relief of repressive activity of the CD30 promoter microsatellite in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol* 2003; 163: 633-41.
 43. Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L et al. Expression of CCR5 receptors of Reed-

- Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int J Cancer* 2008; 122: 769-76.
44. Emmerich F, Meiser M, Hummel M et al. Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 1999; 94: 3129-34.
 45. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 4283-4297.
 46. Schreck S, Friebael D, Buettner M et al. Prognostic impact of tumor-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 2009; 27: 31-39.
 47. Lamprecht B, Kreher S, Anagnostopoulos I et al. Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3a. *Blood* 2008; 112: 3339-3347.
 48. Pinto A, Aldinucci D, Gloghini A et al. The role of eosinophils in the pathobiology of Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1997; 8:89-96.
 49. Carbone A, Gloghini A, Gattei V et al. Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood* 1995; 85: 780-789.
 50. Aldinucci D, Olivo K, Lorenzon D et al. The role of interleukin-3 in classical Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 2005; 46: 303-311.
 51. Cattaruzza L, Gloghini A, Olivo K et al. Functional coexpression of Interleukin (IL)-7 and its receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg cells: involvement of IL-7 in tumour cell growth and microenvironmental interactions of Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2009; 125: 1092-1101.
 52. Gruss HJ, Kadin ME. Pathophysiology of Hodgkin's disease: functional and molecular aspects. In: Diehl V, ed. *Bailliere's clinical hematology: International practice and research*. London. *Bailliere Tindall* 1996;9:417-46.
 53. Kadin ME, Leibowitz D. Cytokines and cytokine receptors in Hodgkin's disease. In: Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, et al, ed. *Hodgkin's disease*. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins* 1999:139-58.
 54. Samoszuk M, Nansen L. Detection of interleukin-5 messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with eosinophilia. *Blood* 1990;75:13-6.
 55. Clutterbuck EJ, Hirst EMA, Sanderson CJ. Human interleukin-5 regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* 1980;73:1504-12.

56. Teruya-Feldstein JT, Jaffe ES, Burd PR, et al. Differential chemokine expression in tissues involved by Hodgkin's disease: direct correlation of eotaxin – 1 expression and tissue eosinophilia. *Blood* 1999; 93:2463.
57. Burcher H, Heit W, Schaadth M, et al. Production of colony-stimulating factors by Hodgkin's cell lines. *Int J Cancer* 1984;31:269-74.
58. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4167-71.
59. Kadin ME, Agnarsson BA, Ellingsworth LR, et al. Immunohistochemical evidence of a role for transforming growth factor beta in the pathogenesis of nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1990;136:1209-14.
60. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type B induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5788-92.
61. Visser L, Poppema S. The absence of effective T-cell activation in Hodgkin's disease may be the result of TGFβ production by Reed-Sternberg cells. *Leuk Lymphoma* 1998;29(Suppl 1):38.
62. Kurzrock R, Redman J, Cabanillas F, et al. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease with B symptoms. *Cancer Res* 1993;53:2118-22.
63. Lukes R, Butler J, Hicks E. Natural history of Hodgkin's disease as related to its pathological picture. *Cancer* 1966;19:317-44.
64. Lukes RJ, Craver LF, Hall TC, et al. Report of the nomenclature committee. *Cancer Res* 1966;26:1311.
65. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2008.
66. Piccaluga PP, Agostinelli C, Gazzola A et al. Pathobiology of Hodgkin lymphoma. *Adv Hematol* 2011; 920898. Epub 2010 Dec 22.
67. Mauch P, Armitage JO, Diehl V (1999). Hodgkin's Disease. *Lippincott Williams & Wilkins*: Philadelphia.
68. Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, Harris M, Harris NL, Jaffe ES, Han J, Van Krieken JM, Poppema S, Marafioti T, Franklin J, Sextro M, Diehl V, Stein H. European Task force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin

disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood* 2000;96:1889-99

69. Stein H, Wasielewski R, Poppema S et al. Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma. In WHO Classification of Tumours of Haematopoetic and Lymphoid Tissues, 4th edn, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (eds) IARC: Lyon, 2008; 330.
70. Weiss LM, Wasielewski R, Delsol G et al. Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma. In WHO Classification of Tumours of Haematopoetic and Lymphoid Tissues, 4th edn, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (eds) IARC: Lyon, 2008; 331.
71. Anagnostopoulos I, Isaacson PG, Stein H. Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma. In WHO Classification of Tumours of Haematopoetic and Lymphoid Tissues, 4th edn, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (eds) IARC: Lyon, 2008; 332-333.
72. Benharroch D, Stein H, Peh SC. Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma. In WHO Classification of Tumours of Haematopoetic and Lymphoid Tissues, 4th edn, Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (eds) IARC: Lyon, 2008; 334.
73. MacMahon B. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1996;26:1189-200.
74. Corea P, O'Connor GT. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1971; 8:192-201.
75. Guinee VF, Giacoo GG, Durand M, et al. The prognosis of Hodgkin's disease in older adults. *J Clin Oncol* 1991;9:947-53.
76. Armitage J, Gisselbrecht C. Clinical evaluation. In: Hodgkin Lymphoma A Comprehensive Update on Diagnostics and Clinics, 1st edn, Engert A, Horning S. (eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011; 65-74.
77. Austin-Seymour MM, Hopper RT, Cox RS, et al. Hodgkin's disease in patients over sixty years old. *Ann Intern Med* 1984;100:13-8.
78. Kaplan HS. Hodgkin disease, 2nd ed. Cambridge, MA: Harvard University Press 1980.
79. Regula DP Jr, Hoppe RT, Weiss LM. Nodular and diffuse types of lymphocyte predominance Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1988;318:214-9.
80. Neiman RS, Rosen PJ, Lukes RJ. Lymphocyte-depletion Hodgkin's disease; a clinico-pathological entity. *N Engl J Med* 1988;318:751-4.
81. Rosenberg SA, Canellos GP. Hodgkin's disease. In: Canellos GP, Lister TA, Sklar JL, eds. The lymphomas. Philadelphia: WB Saunders. 1998:305-31.

82. Aisenberg AC. Problems in Hodgkin's disease management. *Blood* 1999;93:761-79.
83. Haybittle JL, Hayhoe FG, Easterling MJ et al. Review of British National Lymphoma Investigation studies of Hodgkin's disease and development of prognostic index. *Lancet* 1985; 1: 967-72.
84. Kwee TC, Kwee RM, Nievelstein RA. Imaging in staging of malignant lymphoma: a systematic review. *Blood* 2008; 111 (2): 504-16.
85. Blodgett TM, Meltzer CC, Townsend DW. PET/CT: form and function. *Radiology* 2007; 242 (2): 360-85.
86. Von Schulthess GK, Steinert HC, Hany TF. Integrated PET/CT: current applications and future directions. *Radiology* 2006; 238:405-22.
87. Glasten E, Guernsey JM, Rosenberg SA, et al. The value of laparotomy and splenectomy in the staging of Hodgkin's disease. *Cancer* 1969;24:709-18.
88. Gerguson DJ, Allen LW, Griem ML, et al. Surgical experience with staging laparotomy in 125 patients with lymphoma. *Arch Intern Med* 1973;131:356-61.
89. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M. Report of committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 1989;7:1630-6.
90. Naeim F, Waisman J, Coulson WF. Hodgkin's disease: the significance of vascular invasion. *Cancer* 1974; 34:655-62.
91. Strum SB, Hutchison GB, Park JK, et al. Further observations on the biologic significance of vascular invasion in Hodgkin's disease. *Cancer* 1971;27:1-6.
92. Strum SB, Allen LW, Rappaport H. Vascular invasion in Hodgkin's disease: its relationship to involvement of the spleen and other extranodal sites. *Cancer* 1971;28:1329-34.
93. Specht L, Hasenclever D. Prognostic factors. In: Hodgkin Lymphoma A Comprehensive Update on Diagnostics and Clinics, 1st edn, Engert A, Horning S. (eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011; 97-109.
94. Rosenberg SA, Boiron M, De Vita Jr VT et al. Report of the committee on Hodgkin's disease staging procedures. *Cancer Res* 1971; 31(11): 1862-3.
95. George SL. Identification and assessment of prognostic factors. *Semin Oncol* 1988; 15:462-71.
96. Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Koh ES. Prognostic factors: principles and applications. In: Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Soin LH, editors. Prognostic factors in

cancer. 3rd ed. Hoboken, NJ: Wiley-Liss; 2006.

97. Byar DP. Identification of prognostic factors. In: Buyse ME, Staquet MJ, Sylvester RJ, editors. *Cancer clinical trials. Method and practice*. Oxford: Oxford University Press; 1988.
98. Specht L. Prognostic factors in Hodgkin disease. *Semin Radiat Oncol* 1996; 6:141-161.
99. Diehl V, Thomas RK, Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma-diagnosis and treatment. *Lancet Oncol* 2004; 5: 19-26.
100. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 1998; 339: 1506-14.
101. Gobbi PG, Zinzani PL, Brogna C et al. Comparison of prognostic models in patients with advanced Hodgkin's disease. Promising results from integration of the best three systems. *Cancer* 2001; 91: 1467-78.
102. Hutchings M, Loft A, Hansen M et al. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107: 52-9.
103. Hutchings M, Mikhael NG, Fields PA et al. Prognostic value of interim FDG-PET after two or three cycles of chemotherapy in Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* 2005; 16: 1160-8.
104. Gallamini A, Rigacci L, Merli F et al. The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage Hodgkin's disease. *Haematologica* 2006; 91:475-81.
105. Zinzani PL, Tani M, Fanti S et al. Early positron emission tomography (PET) restaging: a predictive final response in Hodgkin's disease patients. *Ann Oncol* 2006; 17: 1296-300.
106. Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L et al. Early interim 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3746-52.
107. Gerschenson L. and Rotello. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J* 1992;6:2450-5.
108. Kerr JFR, Wyllie AH, and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.

109. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med* 2009; 361(15): 1570-83.
110. Youle RJ, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 47-59.
111. Binder C and Hiddemann W: Programmed cell death – many questions still to be answered. *Ann Hematol* 1994;69:45-55.
112. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-26.
113. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-62.
114. Saikumar P, Dong Y, Mikhailov V, Denton M: Apoptosis: Definition, Mechanisms and Relevance to Disease. *The American Journal of Medicine* 1999;107:489-506.
115. Carson DA and Ribiero JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251-54.
116. Edgington SM. Looking death in the eye: apoptosis and cancer research. Is cancer really caused by cells refusing to commit suicide on cue? *Biotechnology* 1993;11:787-92.
117. Gougeon ML and Montagnier L. Apoptosis in AIDS. *Science* 1993;260:1269-70.
118. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146:3-15.
119. Lemasters JJ. Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 2005; 129:351-60.
120. Cellular adaptation, cell injury and cell death. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders, 2005: 4-46.
121. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 931-7.
122. Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:886-97.
123. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 767-77.
124. Levine B, Abrams J. P53: The Janus autophagy? *Nat Cell Biol* 2008; 10:637-9.
125. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P et al. Classification of cell death: recommendation of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16:3-11.

126. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1237-43.
127. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 931-7.
128. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of the disease. *Science* 1995; 267:1456-62.
129. Reed JC. Drug insight: cancer therapy strategies based on the restoration of endogenous cell death mechanism. *Nat Clin Pract Oncol* 2006; 3: 388-98.
130. Green DR, Kroemer G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical application in sight? *J Clin Invest* 2005; 115: 2610-7.
131. Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; 110: 2640-7.
132. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 2006; 20:1-15.
133. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis.: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007; 32:37-43.
134. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well orchestrated form of cell demise: signaling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochem Biophys Acta* 2006; 1757: 1371-87.
135. Luke CJ, Pak SC, Askew YS et al. An intracellular serpin regulates necrosis by inhibiting the induction and sequelae of lysosomal injury. *Cell* 2007; 130: 1108-19.
136. Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 1988; 141: 2629-34.
137. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; 115:2679-88.
138. Mconkey DJ, Zhivotovsky B, and Orrenius S. Apoptosis-Molecular Mechanisms and Biomedical Implications. *Molecular Aspects of Medicine* 1996;1(Suppl 1):5.
139. Wyllie AH, Kerr JFR, and Currie AR. Cell Death: The Significance of Apoptosis: *International Reviews of Cytology* 1980;68:251-99.
140. Đuričić B and Bumbaširević V. Programmed cell death. *Yugoslav Physiol Pharmacol Acta* 1994;30:169-87.
141. Bumbaširević V, Đuričić B. Ćelijska smrt: morfološke karakteristike i molekularni mehanizmi. U: Bumbaširević V, Đuričić B, ured. Molekularne osnove oštećenja, reparacije i smrti ćelija. *Medicinska akademija SLD*. Beograd: 1998;5-24.

142. Enari M. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
143. Zhang J and Hu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res* 2000;10: 205-11.
144. Fraser A and Evan G. A License to Kill. *Cell* 1996;85:781-4.
145. Rowan S and Fisher DE. Mechanism of apoptotic cell death. *Leukemia* 1997;11:457-65.
146. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and Yuan J. Human ICE/CED-3 Protease nomenclature. *Cell* 1996; 87:171-6.
147. Los M, Van de Crean, Penning LC, Schenk H, Westendorp M, Baeuerle PA, Doge W, Kramer PH, Flers W and Schulye-Osthof K. Requirement of an ICE/Ced3 protease for Fas/Apo-1 mediated apoptosis. *Nature* 1995;374:81-3.
148. Walker LSK, McLeod JD, Bouloungouris G, Patel YI, Hall ND, and Sansom DM. Down-regulation of Cd28 via Fas(CD95): Influence of CD28 on T cell apoptosis. *Immunology* 1998; 94:41-7.
149. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH et al. Cytotoxicity-dependent Apo-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14:5579-88.
150. Rudel T. Caspase Inhibitors in Prevention of Apoptosis. *Hery* 1999;24:236-41.
151. Song Q, Wei T, Lees-Miller S, Alnemri E, Watters D and Lavin MF. Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:157-62.
152. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-8.
153. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kB: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
154. Verma IM, Stevenson JK, Shwarz EM, Van antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kB/IkB family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995;9:2723-35.
155. Pahl HL. Activator and target genes of Rel/NF-KB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18:6853-66.
156. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and cIAP1 and cIAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-3.
157. Manick JB, Miao XQ, Stamler JS. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:24125-8.
158. Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboudi A, Green DR. DNA

- damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF- κ B and APO1. *Mol Cell* 1998;1:543-51.
159. Ravi R, Bedi GC, Egnstrom LW, et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/APO2L-induced apoptosis by NF- κ B. *Nat Cell Biol* 2001;3:409-16.
 160. Zhang H, Xu Q, Krajewski S, et al. BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2597-602.
 161. Ng FWH, Nguyen M, Kwana T, et al. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-H_L and procaspase-8 associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1997;139:327-38.
 162. Krataoka T, Schröter M, Hahne M, et al. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and γ irradiation. *J Immunol* 1998; 161:3936-42.
 163. Krammer PH. CD95 (Apo-1/Fas)-mediated apoptosis: live and die. *Adv Immunol* 1999; 71:163-210.
 164. Pitti RM, Masters SA, Lawrence DA, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998;396:699-703.
 165. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1997;281:1309-12.
 166. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-6.
 167. Yang J, Lui X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-32.
 168. Chao DT and Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: Regulators of Cell Death. *Ann Rev Immunol* 1998;16:395-419.
 169. Haldar S. Purification and Characterization of the Bcl-2 Protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994;315(Suppl 2):483-8.
 170. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE and Oltvai YN. Bcl -2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Seminars in Cancer Biology* 1993;4:327-32
 171. Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y and Tsujimoto Y. Multiple Subcellular Localization of bcl-2: Detection in Nuclear Outer Membrane, Endoplasmic Reticulum Membrane, and Mitochondrial membranes. *Cancer Research* 1994;54:2468-71.
 172. Yang E and Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996;88(Suppl 2):386-401.

173. Huang DC, Strasser A. BH-3-Only proteins – essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000;103:839-42.
174. Puthalakath H, Strasser A. Keeping killers on a tight leash: Transcriptional and post-transcriptional control of the proapoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Diff* 2002; 9:505-512
175. Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Research* 1999;159:1693-700.
176. Morhshi K, Huang DCS, Cory S and Adams JM. Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;99:9863-8.
177. Reed JC. Bcl-2 family proteins: Regulator of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 1996;60:23-33.
178. Oltvai Y, Milliman CL and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993,74:609-19.
179. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412:95-99.
180. Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2002;298:1587-92 .
181. Susin SA. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.
182. Joza N. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;410:549-54.
183. Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* 2000;275:31199-203.
184. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: Implication for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002;9:423-32.
185. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ et al. Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675-87.
186. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481-90.
187. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, and Wang X. Induction of apoptotic program

- in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-57.
188. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:401-10.
 189. Ditzel M, Meier P. IAP degradation: Decisive blow or altruistic sacrifice? *Trends Cell Biol* 2002;12:449-52.
 190. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
 191. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-5.
 192. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing death. *Mol Cell* 2001;8:613-21.
 193. Kroemer G and Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nature Med* 2000;6:513-9.
 194. Green DR and Kroemer G. The central executioner of apoptosis: mitochondria or caspases? *Trends Cell Biol* 1998;8: 267-71.
 195. Finkel E. The mitochondrion: Is it central to apoptosis? *Science* 2001;292:624-6.
 196. Villeundas R. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations *Blood* 1993;82(10):3152- 6.
 197. Guinn B and Padua RA. Do p53 mutations have role in the initiation and progression of leukaemia? *The Cancer Journal* 1995;8(4):195-200.
 198. Prives C and Hall PA The p53 pathway. *Journal of Pathology* 1999;187:112-26.
 199. Vogelstein B, Lane D and Levine AJ. Suffering the p53 network. *Nature* 2000;16:307-10.
 200. Oda E. Noxa, a BH3 only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 2000;288:1053-8.
 201. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler JW and Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001;7:673-82.
 202. Donald SP. Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. *Cancer Res* 2001;61:1810-5.

203. Moroni MC. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nature Cell Biol* 2001;3:552-8.
204. Marchenko ND, Zaika A and Moll UM. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2000;275:16202-12.
205. Karine F and Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology* 2001 May;Vol3.
206. Patil C and Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 1999;13: 1211-33.
207. Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca (2+) signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 2002;32:269-78.
208. Mancini M. Caspase-2 is localized at Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* 2000;149:603-12.
209. Bennett M. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998;282:290-3.
210. Zhang XD, Fanco AV, Nguyen T, Gray CP and Hersey P. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol* 2000;164:3961-70.
211. DeMaria R. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide- induced apoptosis. *Science* 1997;277:1652-5.
212. Bumbaširević V. Metode detekcije apoptoze. U: Apoptoza – Eksperimentalna i klinička iskustva (Kovačević ZL, urednik). SANU, Novi Sad, 2004; 7-21.
213. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998;391:96-9.
214. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-6.
215. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593-608.
216. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson BA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
217. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 1993;170:1-8.

218. Sloop GD, Roa JC, Delgado AG, Balarat Jt, Hines MO 3rd, Hill JM. Histologic sectioning produces TUNEL reactivity. A potential cause of false-positive staining. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:529-32.
219. Bulzingslowen I, Jontell M, Hurst P. 5-Fluorouracil induces autophagic degeneration in rat oral keratinocytes. *Oral Oncol* 2001;37:537-44.
220. Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, de Mayer GR. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol* 1998;152: 885-8.
221. Kockx MM, Muhring J, Bortier H, De Meyer GR, Jacob W. Biotin- or digoxien- in-conjugated nucleotides bind to matrix vesicles in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1998; 196:1771-7.
222. Collins RJ, Harmon BV, Gobe Gc, Kerr JFR. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1992;61:451-3.
223. Ferrer I. Nuclear DNA fragmentation in Creutzfeldt-Jacob disease: does a mere positive in situ nuclear end-labeling indicate apoptosis? *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;97:5-12.
224. Higuchi Y. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J Cell Mol Med* 2004;8:455-64
225. Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, et al.: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus. *J Exp Med* 1995;182:1545-56.
226. Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Paks ST, van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression of B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-20.
227. Engeland M van, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidyl-serine exposure. *Cytometry* 1998;31:1-9.
228. Cornelissen M, Philippe J, De Sitter S, De Ridder L. Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation. *Apoptosis* 2002 Feb;7(1): 41-7.
229. Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999;274:20049-52.
230. Urase K, Fujita E, Miho Y, Kouroku Y, Yagi Y, Momoi MY, Momoi T. Detection of activated Caspase-3 (CPP-32) in the vertebrate nervous system during development

- by a cleavage site-directed antiserum. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;111:77-87.
231. Leers MPG, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers FCS, Bjorklund B, Nap M, Jornvall H, Schutte B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187:567-72.
 232. Knaapen M, kDe Bie M, Muhring J, Kockx M. Cleaved PARP as a marker for apoptosis in tissue sections. *Promega Notes* 1999;72:7-9.
 233. Diehl V. Hematology. Are macrophages the bad guys in Hodgkin lymphoma? *Nat Rev Clin Oncol* 2010 Jun; 7 (6): 301-2.
 234. Brice P. Managing relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141: 3-13.
 235. Friedman DL, Constine LS. Late effects of treatment for Hodgkin lymphoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2006; 4: 249-57.
 236. Fuchs M, Diehl V and Re D. Current strategies and new approaches in the treatment of Hodgkin's lymphoma. *Pathobiology* 2006; 73: 126-140.
 237. Zender T, Wiedenmann S and Wolf J. Prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002; 13(1): 67-74.
 238. Montalban C, Garcia JF, Abraira V, Gonzales-Camacho L, Morente MM, Bello JL, Conde E, Cruz MA, Garcia-Sanz R, Garcia-Larana J, Grande C, Llanos M, Martinez R, Flores E, Mendez M, Ponderos C, Rayon C, Sanchez-Godoy P, Zamora J, Piris MA. Influence of Biologic Markers on the Outcome of Hodgkin's Lymphoma: A Study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2004; 22:1664-1673.
 239. Von Wasielewski R, Georgii A, Fischer R. Clinical impact of grading the nodular sclerosing Hodgkin's disease under modern therapy of the German Hodgkin Study Group. *Leuk Lymphoma* 1998;29:0-3.
 240. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalban C, Alvaro T, Bellas C, Castano A, Diez A, Flores T, Martin C, Martinez MA, Mazorra F, Menarguez J, Mestre MJ, Mollejo M, Saez AI, Sanchez L, Piris MA. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints. Analysis using tissue microarrays. *Blood* 2003; 101: 681-689.
 241. 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; 128:958-65.

242. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, Delaney A, Jones SJ, Iqbal J, Weisenburger DD, Bast MA, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Rimsza LM, Campo E, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Jaffe ES, Lens G, Connors JM, Staudt LM, Chan WC, Gascoyne RD. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010; 362:875-85.
243. Rautert R, Schinkothe T, Franklin J, Weinhrauch M, Boll B, Pogge E, Bredenfeld H, Engert A, Diehl V, Re D. Elevated pretreatment interleukin-10 serum level is an International Prognostic Score (IPS)-independent risk factor for early treatment failure in advanced stage Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*, Nov 2008; 49(11): 2091–2098.
244. Niens M, Visser L, Nolte IM, van der Steege G, Diepstra A, Cordano P, Jarret RF, Te Meerman GJ, Poppema S, van den Berg A. Serum chemokine levels in Hodgkin lymphoma patients: highly increased levels of CCL17 and CCL22. *Br J Haematol* 2008; 140: 527–536.
245. Horning JS. Risk, Cure and Complications in Advanced Hodgkin Disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:197-203.
246. Dukers DF, Meijer C, ten Berge RS, Vos W, Ossenkoppele GJ, Oudejans J. High numbers of active caspase 3–positive Reed- Sternberg cells in pretreatment biopsy specimens of patients with Hodgkin's disease predict favorable clinical outcome. *Blood* 2002; 100:36 – 42.
247. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, McDonnell TJ, Viviani S, Bonfante V, Nadali G, Vassilakopoulos TP, Giardini R, Chilosi M, Kittas C, Gianni AM, Bonadonna G, Pizzolo G, Pangalis GA, Cabanillas F, Sarris AH. Bax expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Correlation with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 488-493.
248. Von Wasielewski S, Franklin J, Fischer R, Hubner K, Hansmann ML, Diehl V, Georgii A, von Wasielewski R. Nodular sclerosing Hodgkin's disease: new grading predicts prognosis in intermediate and advanced stages. *Blood* 2003; 101:4063-4069.
249. Specht L. Tumour burden as the main indicator of prognosis in Hodgkin's disease. *Eur J Cancer* 1992; 28A:1982-85.
250. Axdorph U, Sjoberg J, Grimfors G, Landgren O, Porwit-MacDonald A, Bjorkholm M. Biological markers may add to prediction of outcome achieved by the international prognostic score in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2000; 11: 1405-1411.

251. Devilard E, Bertucci F, Trempat P, Bouabdallah R, Loroid B, Giaconia A, Brousset P, Granjeaud S, Nguyen C, Birnbaum D, Birg F, Houlgatte R, Xerri L. Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene* 2002; 21: 3095-3102.
252. Mani H. and Jaffe E. Hodgkin lymphoma: An update on its biology with newer insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009 June ; 9(3): 206–216.
253. Vassallo J, Metze K, Traina F et al. The prognostic relevance of apoptosis-related proteins in classical Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2003; 44:483-488.
254. Bai M, Papoudou-Baib A, Horianopoulos N, Grepia C, Agnantis NJ, Kanavaros P. Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas. *Human Pathology* 2007; 38:103– 113.
255. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, Viviani S, Bonfante V, Nadali G, Herling M, Angelopoulou MK, Giardiani R, Chilosi M, Kittas C, McDonnell TJ, Bonadonna G, Gianni AM, Pizzolo G, Pangalis GA, Cabanillas F, Sarris AH. Bcl-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood* 2002; 100:3935-3941.
256. Canioni D, Deau-Fischer B, Taupin P, Ribrag V, Delarue R, Bosq J, Rubio MT, Roux D, Vasiliu V, Varet B, Brousse N, Hermine O. Prognostic Significance of New Immunohistochemical Markers in Refractory Classical Hodgkin Lymphoma: A Study of 59 Cases. *PLoS ONE* 2009; 4(7): e6341.doi:10.1371/journal.pone.0006341
257. Sup SJ, Alemany CA, Pohlman B, Elson P, Malhi S, Thakkar S, Steinle R, His ED. Expression of Bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: An independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol* 2005; 23:3773-3779.
258. Sanchez-Espiridion B, Montalban C, Lopez A, Menarguez J, Sabín P, Ruiz-Marcellan C, Ruiz-Marcellan C, Lopez A, Ramos R, Rodriguez J, Canovas A, Camarero C, Canales M, Alves J, Arranz R, Acevedo A, Salar A, Serrano S, Bas A, Moraleda JM, Sanchez-Godoy P, Burgos F, Rayon C, Fresno MF, Larana JG, Garcia-Cosio M, santonja C, Lopez JL, Llanos M, Mollejo M, Gonzales-Carrero J, Marin A, Forteza J, Garcia-Sanz R, Tomas JF, Morente MM, Piris MA, Garcia JF. A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2010 Aug; 116: e12-e17.
259. Morente MM, Piris MA, Abraira V, Acevedo A, Aguilera B, Bellas C, Fraga M, Garcia-Del-Moral R, Gomez-Marcos F, Menargues J, Oliva H, Sanchez-Beato M, Montalban C. Adverse clinical outcome in Hodgkin's disease is associated with loss of retinoblas-

- toma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression. *Blood* 1997; 90:2429-2436.
260. Spector N, Milito CB, Biasoli I, Luiz RR, Pulcheri W, Morais JC. The prognostic value of the expression of Bcl-2, p53 and LMP-1 in patients with Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2005 Sep;46(9):1301-6.
 261. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010;141(1):39-51
 262. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, Klasa R, Voss N, Connors JM, Gascoyne RD. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* 2005;106(6):2169-74.
 263. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A and Caligaris-Capio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009; 114:3367-75.
 264. Tzankov A, Matter MS and Dimhofer S. Refined prognostic role of CD68 positive tumor macrophages in the context of the cellular micromilieu of classical Hodgkin lymphoma. *Pathobiology* 2010; 77 (6): 301-8.
 265. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunicic Jovanovic MD, Bogdanovic AD, Andjelic BM and Bumbasirevic VZ. The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2011 Oct; 52(10):1913-9.
 266. Yoon DH, Koh YW, Kang HJ, Kim S, Park CS, Lee SW, Suh C, Huh J. CD68 and CD163 as prognostic factors for Korean patients with Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol*. 2011 Nov 2. [Epub ahead of print]
 267. Lin EY, Pollard JW. Tumor associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 5064-6.
 268. De Vita VT and Costa J. Toward a personalized treatment of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 2010; 362: 942-3.
 269. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A et al. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumor growth and immune escape. *J Pathol* 2010; 221: 248-63.
 270. Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honore B, Nyengaard JR and d'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2011; 96 (2): 269-76.

271. Sanchez-Aguilera A, Montalban C, de la Cueva P, Sanchez-Verde L, Morente MM, Garcia-Cosio M, Garcia-Larana J, Bellas C, Provencio M, Romagosa V, de Sevilla AF, Menarguez J, Sabin P, Mestre MJ, Mendez M, Fresno MF, Nicolas C, Piris MA, Garcia JF. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006;108(2):662-8.
272. Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, Lossos IS, Anderson MW, Morais JC, Spector N. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2011 May 27. [Epub ahead of print]
273. Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* 2006;66:11089–11093.
274. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Schmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005;438:820–827.
275. Jones RJ, Gocke CD, Kasamon YL, Miller CB, Perkins B, Barber JP, Vala MS, Gerber JM, Gellert LL, Siedner M, Lemas MV, Brennan S, Ambinder RF, Matsui W. Circulating clonotypic B cells in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2009 June 4; 113(23): 5920–5926.
276. Lorusso G and Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* 2008;130:1091–1103.
277. Gobbi PG, Brogna C, Di Giulio G et al. The clinical value of tumor burden at diagnosis in Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2004; 101:1824-34.
278. Specht L, Nissen NI. Prognostic factors in Hodgkin's disease stage III with special reference to tumor burden. *Eur J Haematol* 1988; 41:80-7.
279. Specht L, Nissen NI. Prognostic factors in Hodgkin's disease stage IV. *Eur J Haematol* 1988; 41: 359-67.
280. Strauss DJ, Gaynor JJ, Myers J et al. Prognostic factors among 185 adults with newly diagnosed advanced Hodgkin's disease treated with alternating potentially noncross-resistant chemotherapy and intermediate-dose radiation therapy. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1173-86.
281. Proctor SJ, Taylor P, Mackie MJ et al. A numerical prognostic index for clinical use in identification of poor-risk patients with Hodgkin's disease at diagnosis. The Scot-

- land and Newcastle Lymphoma Group (SNLG) Therapy Working Party. *Leuk Lymphoma* 1992; 7 Suppl:17-20.
282. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, surviving, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3:917-921.
 283. Tracey L, Perez-Rosado A, Artiga MJ et al. Expression of the NF-kB and BIRC5/Survivine characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively. *J Pathol* 2006:123-134.
 284. Schlette EJ, Medeiros J, Goy A, Lai R and Rassidakis G. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2004; 22:1682-1688.
 285. Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, et al. Abberant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukemia: Survivin is an important determinant for prognosis. *Br J Haematol* 2001; 114: 63-69.
 286. Alvaro-Naranjo T, Leujeune M, Salvado-Usach MT, et al. Tumor infiltrating cells as prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. *Leuk Lymphoma* 2005; 46:1581-91.
 287. Alvaro T, Lejeune M, Garcia JF et al. Tumor-infiltrated immune response correlates with alterations in the apoptotic cell cycle pathways in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14 (3): 685-691.
 288. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277-88.
 289. Daniel NN, Korsmayer SJ. Cell Death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-19.
 290. Dukers DF, Meijer C, ten Berge RS et al. High number of active-caspase 3-positive Reed-Sternberg cells in pretreatment biopsy specimens of patients with Hodgkin's disease predict favorable clinical outcome. *Blood* 2002; 100: 36-42.
 291. Kim LH, Peh SC, Poppema S. Expression of retinoblastoma protein and p16 in classic Hodgkin lymphoma: relationship with expression of p53 and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death. *Hum Pathol* 2006; 37: 92-100.
 292. Durkop H, Hirsch B, Hahn C et al. cIAP2 is highly expressed in Hodgkin and Reed-Sternberg cells and inhibits apoptosis by interfering with constitutively active-caspase. *J Mol Med* 2005; 84: 132-41.
 293. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S et al. Prognostic significance of the Ki-67 associated proliferative antigen in aggressive Non- Hodgkin's lymphomas: A prospective Southwest Oncology Group Trial. *Blood* 1994; 83(6):1460-6.

294. Abele MC, Valente G, Kerim S et al. Significance of cell proliferation in assessing histological prognostic categories in Hodgkin's disease. An immunohistochemical study with Ki67 and MIB-1 monoclonal antibodies. *Haematologica* 1997; 82(3): 281-285.

9. SKRAĆENICE

ABVD	Doxurubicin, Bleomycin; Vinblastine, Dacarbazine
ADP	Adenosine diphosphate
AEC	Amino Etil Peroxidase
AI	Apoptotski indeks
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APAF	Apoptosis Protease Activating Factor
ATP	Adenosine triphosphate
bad	Bcl-x /Bcl-2 Associated Death-promoter Homolog-gen
Bax	Bcl-2 associated X-protein
bcl-2	b cell lymphoma 2 -gen
Bcl-2	B cell lymphoma 2 –protein
BIR	Bacilovirus IAP Repeat
BSAP	B-cell Specific Activator Protein
CAD	Casapase-activated Dnase
CARD	Caspase Activation and Recruitment Activation
CHL	Classical Hodgkin lymphoma
CPP	Cistein Protease Protein
CR	Complete Remission
CT	Computed Tomography
DCR	Decoy Receptor
DED	Death Effector Domain
DHAP	dexamethasone, cisplatinum, ara-c
DNK	Deoksiribonukleinska kiselina
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DSS	Disease Specific Survival
EBV	Epstein Barr virus
EMA	Epithelial Membrane Antigen
ENGL	Engleski jezik
EFS	Event Free Survival
EORTC	European Organization for the Research and Treatment of Cancer
ER	Endoplasmic Reticulum
FAAD	Fas Associated Death Domain
FDG-PET-CT	Fluorine-18-Deoxyglucose Positron Emission Tomography with CT
FLIP protein	FAAD like interleukin - 1 β converting enzyme like proteasa inhibitory

GHSG	German Hodgkin Study Group
HE	Hematoksin i eozin
HDM2	Human MDM2 protein
HL	Hočkinov limfom
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Latent Antigen
HRP	Horse Redish Peroxidase
RS	Hodgkin and Reed-Sternberg
IAP	Inhibitors of Apoptosis Proteins
IBM	IAP Binding Motif
ICAD	Inhibitor of caspase-activated Dnase
ICE	Interlukin 1 β konvertaza
IHC	Immunohistochemistry
IL	Interleukin
IPS	Internacionalni Prognozni Skor
ISH	In Situ Hybridization
JAK	Janus Kinase
LDH	Laktat dehidrogenaza
L&H	Lymphocytic&Histiocytic
LMP-1	Latentni Membranski protein-1
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin method
MR	Magnetna Rezonanca
MOPP	Mechlorethamine, Vincristine, Procarbazine, Prednisone
MUM	Multiple Myeloma-1/interferon regulatory factor-4
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
NHL	Ne-Hočkinov limfom
NLPHL	Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
OCT2	Octamerbinding Transcription factor 2
OS	Overall Survival
NO	Azot monoksid
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
PD	Progressive Disease
PI	Propidium jodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase

PFS	Progression Free Survival
PR	Partial Remission
Rb	Retinoblastoma progein
REAL	A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms
RNK	Ribonukleinska kiselina
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Radioterapija
SD	Stable disease
STAT	Signaling Transducer and Activator of Transcription
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
TAM	Tumor Associated Macrophages
TARC	Thymus and Activation Regulated Chemokine
TIA1	T-cell restricted Intracellular Antigen-1
TGF	Tumor Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TLNI	Total Lymph Node Involvement by neoplastic and inflammatory cells
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TRAF	TNF Receptor Associated Factors
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase- mediated dUTP biotin nick end labeling
UPR	Unfolded Protein Response
UV	Ultra-violetno
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WBC	White Blood Count
WHO	World Health Organisation

10. BIOGRAFIJA KANDIDATA

- Dr Ljubomir Jaković rođen je 1975. godine u Beogradu.
- Medicinski fakultet u Beogradu, Univerziteta u Beogradu, upisao 1994. God. i završio 2001 god. sa prosečnom ocenom 9,28.
- Specijalistički ispit iz patološke anatomije položio je aprila 2012. god. sa odličnim uspehom na Institutu za Patologiju, Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu.
- Magistarsku tezu pod nazivom „*Prognozni značaj detekcije apoptoze u Hočkinovoj bolesti*“ odbranio je marta 2006. god. na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.
- Problematika i rezultati ispitivnja iz doktorske disertacije publikovani su u 2 originalna istraživačka rada u međunarodnim stručnim časopisima i u vidu 6 poster prezentacija na međunarodnim stručnim sastancima patologa i hematologa.
- Autor i koautor 15 radova i 37 sažetaka publikovanih u CC i SCI časopisima.
- U periodu od 2006. do 2011. godine pohađao 10 tutoriala u organizaciji Evropske škole hematologije.
- Stipendista DAAD (Deutcher Akademischer Austausch Dienst) – dva meseca studijski boravak 2010 god. u centru Nemačke Studijske Grupe za Hočkinov Limfom u Univerzitetskoj bolnici u Kelnu.
- Dobitnik je prve nagrade za usmenu prezentaciju i doprinos u patologiji na 2. Kongresu patologa Srbije, jun 2012. godine.
- Posедуje akademski nivo znanja engleskog jezika – 2005. god. položio IELTS u organizaciji Britanskog Saveta.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада _____

Ментор _____

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, _____

Потпис докторанда



1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавања, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.