

**UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Boško M. Andjelić

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ
ANGIOGENEZE I MIKROSREDINE
TUMORA NA ISHOD LEČENJA
BOLESNIKA SA HOČKINOVIM
LIMFOMOM**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Beograd, 2014. godina

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE**

Boško M. Andjelić

**PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF
ANGIOGENESIS AND TUMOR
MICROENVIRONMENT ON
TREATMENT OUTCOME OF HODGKIN
LYMPHOMA PATIENTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Belgrade, 2014

Mentor doktorske disertacije:

Prof. dr Biljana Mihaljević, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

1. Prof. dr Gradimir Janković, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu – predsednik komisije
2. Prof. dr Milena Todorović, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu – član komisije
3. Prof. dr Miodrag Rajić, Stomatološki Fakultet Univerziteta u Beogradu – član komisije

SADRŽAJ

SAŽETAK	2
ABSTRACT	3
1. UVOD	4
1.1. O HOČKINOVOM LIMFOMU	4
1.1.1. DEFINICIJA, ISTORIJAT I UČESTALOST BOLESTI.....	4
1.1.2. ETIOLOGIJA HOČKINOVOG LIMFOMA.....	5
1.2. HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE HOČKINOVOG LIMFOMA	6
1.2.1. OSNOVNE HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE HOČKINOVOG LIMFOMA	6
1.2.2. KLASIČAN HOČKINOV LIMFOM	6
1.2.3. HOČKINOV LIMFOM TIP NODULARNE LIMFOCITNE PREDOMINACIJE.....	10
1.3. KLINIČKE KARAKTERISTIKE HOČKINOVOG LIMFOMA.....	11
1.3.1. SIMPTOMI, ZNACI I LABORATORIJSKE KARAKTERISTIKE BOLESTI	11
1.3.2. ODREĐIVANJE RASPROSTRANJENOSTI BOLESTI I KLINIČKOG STADIJUMA	13
1.4. LEČENJE HOČKINOVOG LIMFOMA	15
1.4.1. OPŠTI PRINCIPI	15
1.4.2. LEČENJE RANOG POVOLJNOG STADIJUMA BOLESTI	17
1.4.3. LEČENJE RANOG NEPOVOLJNOG STADIJUMA BOLESTI.....	18
1.4.4. LEČENJE UZNAPREDOVALOG STADIJUMA BOLESTI	18
1.4.5. LEČENJE RECIDIVA BOLESTI.....	19
1.5. PROGNOСТИČKI FAKTORI ZA HOČKINOV LIMFOM	20
1.5.1. ZNAČAJ I ISTORIJAT PROGNOСТИČKIH MARKERA	20
1.5.2. SPECIFIČNI PROGNOСТИČKI FAKTORI ZA HOČKINOV LIMFOM.....	21
1.6. PROGNOСТИČKI ZNAČAJ ANGIOGENEZE I MIKROSREDINE TUMORA	22
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
3. BOLESNICI I METODE	26
3.1. IZBOR BOLESNIKA I KLINIČKO LABORATORIJSKI PODACI	26
3.2. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA PREPARATA LIMFNOG TKIVA.....	27
3.3. ANALIZA I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	28
4. REZULTATI	29
4.1. DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA, HISTOLOŠKE, KLINIČKE I BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE BOLESTI	29
4.2. UTICAJ ANGIOGENEZE NA PREŽIVLJAVANJE	31
4.2.1. UTICAJ GUSTINE KRVNIH SUDOVA NA PREŽIVLJAVANJE	32
4.2.2. UTICAJ VEGF EKSPRESIJE NA PREŽIVLJAVANJE.....	34
4.3. UTICAJ MIKROSREDINE TUMORA NA PREŽIVLJAVANJE	36
4.3.1. UTICAJ BROJA MAKROFAGA U TUMORU NA PREŽIVLJAVANJE.....	37
4.3.2. UTICAJ BROJA FOXP3 LIMFOCITA U TUMORU NA PREŽIVLJAVANJE.....	39
4.4. ANALIZA UDRUŽENOSTI ANGIOGENEZE I ČELIJA MIKROSREDINE TUMORA	42
4.5. ANALIZA PREŽIVLJAVANJA BOLESNIKA	44
4.6. UPOREDNA ANALIZA KLINIČKO-LABORATORIJSKIH I BIOLOŠKIH PARAMETARA U CILJU FORMIRANJA OPTIMALNOG PROGNOСТИČKOG MODELA.....	54
4.7. PROGNOСТИČKI MODEL.....	56
5. DISKUSIJA	58
6. ZAKLJUČAK	66
7. FOTODOKUMENTACIJA REZULTATA	67
8. LITERATURA	71
9. SKRAĆENICE	88

SAŽETAK

Uvod: I pored značajnog napretka u lečenju bolesnika sa Hočkinovim limfomom (HL) poslednjih nekoliko decenija i dalje značajan broj bolesnika ima loš klinički tok i kratko preživljavanje. U poslednje vreme su vrlo atraktivna istraživanja angioogeneze i mikrosredine tumora u limfomima i njihov prognostički značaj.

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja je ispitivanje prognostičkog značaja karakteristika mikrosredine tumora (broj makrofaga (TAM), FOXP3 limfocita, gustine krvnih sudova i nivo ekspresije faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF)), rutinskih kliničkih i biohemijskih parametara, i određivanje profila bolesnika sa rizikom za loš ishod lečenja.

Materijal i metode: Ova retrospektivna studija je obavljena na 84 bolesnika sa novodijagnostikovanim Hočkinovim limfomom. Demografski, patohistološki, klinički i biohemijski podaci su dobijeni iz medicinske dokumentacije. Karakteristike angioogeneze i mikrosredine tumora određivane su na preparatima tkiva dobijenih iz parafinskih kalupa limfnih žlezda iz kojih je postavljena dijagnoza.

Rezultati: U univarijantnoj analizi pacijenti sa VEGF pozitivnošću, velikim brojem TAM, malim brojem FOXP3, bulky bolešću, B simptomima, SE>50 mm/h i visokim IPS skorom imali su značajno kraće ukupno preživljavanje (OS) ($p=0.046$, $p=0.017$, $p=0.003$, $p=0.006$, $p=0.022$, $p=0.013$, $p=0.024$, po redosledu). Multivarijantna analiza kao nezavisne faktore rizika za OS identifikovala je veliki broj TAM i mali broj FOXP3 u grupi biomarkera ($p=0.034$, $p=0.006$, po redosledu), dok među kliničkim i laboratorijskim parametrima bulky bolest ($p=0.002$) i visok IPS ($p=0.004$) su identifikovani. Na osnovu kumulativnog skora nepovoljnih prognoznih faktora za OS, dizajnirali smo prognozni model za identifikovanje pacijenata sa malim (0-1 faktor), srednjim (2 faktora) i visokim rizikom (3-4 faktora) za loš ishod ($p=0.000$), sa 5-godišnjim OS 100%, 75% i 50%.

Zaključak: Kombinovanje bioloških sa poznatim kliničkim i laboratorijskim prognoznim faktorima može rezultirati boljom stratifikacijom rizika pacijenata sa HL.

Ključne reči: Hočkinov limfom, angioogeneza, mikrosredina tumora, prognoza

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Hematologija

ABSTRACT

Introduction: In spite of great progress in treatment of Hodgkin's lymphoma (HL) in recent few decades, still there is a portion of patients who have bad clinical course of the disease and short survival. In the past few years, the researches regarding prognostic role of angiogenesis and the tumor microenvironment in lymphomas are very attractive.

Aim: The aim of this research is to investigate prognostic significance of the characteristics of tumor microenvironment (number of macrophages (TAM), FOXP3 lymphocytes, the density of blood vessels and, the level of expression of vascular endothel growth factor (VEGF)), routine clinical and laboratory findings and, to determinate profile of patients with risk for poor outcome.

Patients and methods: A retrospective study was performed on 84 newly diagnosed Hodgkin lymphoma patients. Demographic, pathohistological, clinical and laboratory findings were collected from medical records. The characteristics of angiogenesis and microenvironment were determined on tissue samples taken from paraffin embedded tissue blocks of lymph nodes from which the diagnosis was established.

Results: In univariate analysis patients with VEGF positivity, high number of TAM, low number of FOXP3, bulky disease, B symptoms, ESR>50 mm/h and high IPS score had significantly shorter overall survival (OS) ($p=0.046$, $p=0.017$, $p=0.003$, $p=0.006$, $p=0.022$, $p=0.013$, $p=0.024$, respectively). Multivariate analysis as the independent risk factors for poor OS identified high number of TAM and low number of FOXP3 in the group of biomarkers ($p=0.034$, $p=0.006$, respectively), while between clinical and laboratory parameters bulky disease ($p=0.002$) and high IPS ($p=0.004$) were identified. Utilizing the cumulative score of unfavorable prognostic factors for OS, we developed prognostic model for identifying patients at low (0-1 factors), intermediate (2 factors) and high risk (3-4 factors) for poor outcome ($p=0.000$), with 5-years OS of 100%, 75% and 50%.

Conclusion: Combining of biological with established clinical and laboratory prognostic factors could result in better risk stratification of patients with HL.

Keywords: Hodgkin lymphoma, angiogenesis, tumor microenvironment, prognosis

Science field: Medicine

Specific science field: Hematology

1. UVOD

1.1. O HOČKINOVOM LIMFOMU

1.1.1. DEFINICIJA, ISTORIJAT I UČESTALOST BOLESTI

Hočkinov limfom (HL) je specifičan malignitet limfoidnog sistema, prvi put opisan od strane Thomasa Hočkina 1832. godine, a tridesetak godina kasnije, nezavisno od Hočkinovog istraživanja, i Samuel Wilks opisuje ovu bolest (1,2). Nakon toga, usledila su istraživanja koja su opisala histološke karakteristike džinovskih ćelija karakterističnih za Hočkinov limfom, koje su dobile naziv Reed-Sternbergove ćelije prema autorima koji su ih opisali (3,4). I pored temeljnog histopatološkog opisa tkiva ove bolesti, dugo vremena nije bila razjašnjena priroda ove bolesti i postojale su različite pretpostavke da se radi o hroničnom imunološkom poremećaju, granulomatoznoj inflamaciji ili o malignoj bolesti (5). Kasnija istraživanja su utvrdila da je reč o malignoj bolesti (6). I u današnje vreme, Hočkinov limfom je vrlo atraktivna oblast za naučna istraživanja, obzirom na veliku heterogenost u kliničkoj prezentaciji, epidemiološkim karakteristikama, kao i kompleksnim histološkim karakteristikama tumora (7).

Za razliku od nehočkinskih limfoma čiji se porast incidence beleži u poslednjim decenijama, incidenca Hočkinovog limfoma je relativno stabilna (8,9). Hočkinov limfom je relativno redak malignitet i procenjuje se da je u SAD njegova incidenca dvadeset puta manja u odnosu na karcinom pluća i sedam puta manja u odnosu na nehočkinske limfome (9). Globalno, bolest je češća kod muškaraca kod kojih procenjena godišnja incidenca iznosi 1,2 na 100000 muškaraca, dok kod žena godišnje ona iznosi 0,8 na 100000 žena (10). Analiza relativno homogenih populacija dovela je do zaključka da je incidenca veća u razvijenim zemljama (2,3/1,9 na 100000 muškaraca/žena) u odnosu na nerazvijene (1/0,5 na 100000 muškaraca/žena) (10). U pogledu starosne strukture obolelih, za ovu bolest je sredinom 60-ih godina prošlog veka definisana karakteristična bimodalna krivulja učestalosti, sa pikovima incidence između 15. i 35. godine života, kao i nakon 50-e godine života (11). Iako bimodalna krivulja incidence prema starosti perzistira i u kasnijim istraživanjima, njen oblik se menja u zavisnosti od rase, geografske oblasti, pola i karakteristika tumora (12-17).

1.1.2. ETIOLOGIJA HOČKINOVOG LIMFOMA

Etiologija Hočkinovog limfoma još uvek nije razjašnjena. Heterogenost ove bolesti koja je uočena u epidemiološkim istraživanjima praktično je potaknula i istraživanja u smeru etiologije i patogeneze.

Prva hipoteza o etiologiji Hočkinovog limfoma, hipoteza „kasne infekcije“, proistekla je iz observacije da prvi pik incidence HL nastupa uglavnom zbog osoba koje su u detinjstvu odrastale u porodicama višeg socioekonomskog statusa, koji su manje izloženi infektivnim agensima (18). Ova hipoteza podržana je i u kasnijim ispitivanjima, te je prihvaćeno da je kasno izlaganje infekcijama i manja učestalost infekcija u dečjem uzrastu faktor rizika za nastajanje HL (19-25).

U istraživanjima početkom 80-ih godina prošlog veka zabeležen je značajno veći titar antitela na Epstein-Barr-ov virus (EBV) kod bolesnika sa HL u odnosu na kontrolnu grupu (26). Ovo saznanje poslužilo je kao osnova budućih istraživanjima, gde je, pogotovo u dece i u starijih, u značajnom procentu u tumorskom tkivu HL uočena pozitivnost na EBV genske produkte, kao i veći procenat mešovite celularnosti u odnosu na EBV negativne HL bolesnike (27-31). Rezultati ovih istraživanja doveli su do zaključka da je defektan imunološki odgovor na EBV infekciju jedan od mogućih uzroka Hočkinovog limfoma. Ova hipoteza, kao i prethodno pomenuta, dodatno dobijaju na svom značaju u situaciji kada novija epidemiološka istraživanja ukazuju da stanja primarne imunodeficijencije, zaraženost virusom HIV i autoimune bolesti imaju značajno veću učestalost HL (32-34).

Razvoj molekularnih tehnika doveo je do mogućnosti za ispitivanje genetske predispozicije za nastanak Hočkinovog limfoma, obzirom da je veća učestalost zabeležena u porodicama gde je neko od članova bolovao od HL (35-37). U jedinom istraživanju gde je vršen skrining genoma na 44 zahvaćene porodice, kao geni kandidati implikuju se HLA region hromozoma 6, kao i recesivno nasleđivanje na hromozomima 4q, 2, 7, 11 i 17 (38).

Ipak, obzirom na heterogenost Hočkinovog limfoma, svi pobrojani mogući uzroci nisu dovoljni da objasne kompleksnu etiologiju ove bolesti. Novija istraživanja koja bi se bavila određivanjem genetske predispozicije i mogućeg uticaja faktora neposrednog okruženja, mogla bi biti od koristi za dalje razjašnjenje etiologije Hočkinovog limfoma.

1.2. HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE HOČKINOVOG LIMFOMA

1.2.1. OSNOVNE HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE HOČKINOVOG LIMFOMA

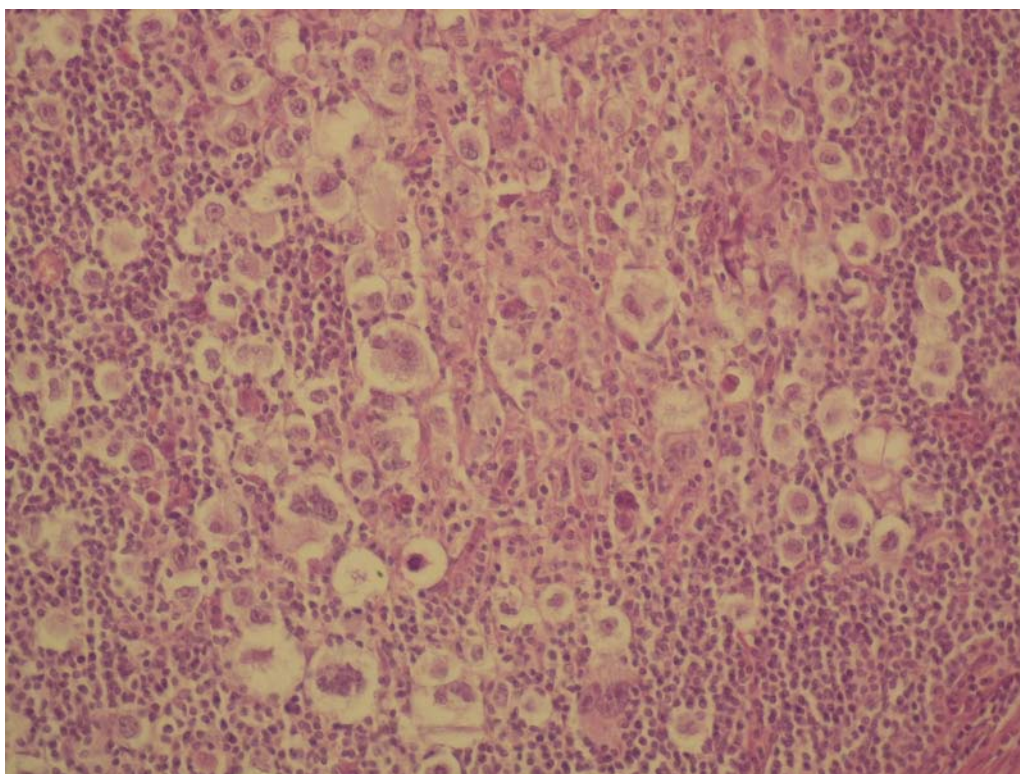
Hoćkinov limfom je sa patohistološke strane vrlo kompleksna bolest za koju je karakteristićan vrlo mali broj malignih ćelija sa varijabilnim površinskim ćelijskim markerima koje su okružene velikim brojem normalnih reaktivnih ćelija (7). Za razliku od istorijskih istraživanja o morfologiji ćelija u Hoćkinovom limfomu, u današnje vreme na osnovu morfoloških i imunohistohemijskih karakteristika razlikuju se dva tipa malignih ćelija koje čine osnovu za dijagnostičku podelu na klasićan Hoćkinov limfom (cHL) i nodularna limfocitna predominacija Hoćkinov limfom (LPHL) (39). Oba tipa malignih ćelija vode poreklo od B ćelija germinativnog centra (40-44). Pored histoloških, ova dva tipa Hoćkinovog limfoma se razlikuju i po epidemiološkim i klinićkim karakteristikama.

1.2.2. KLASIĆAN HOĆKINOV LIMFOM

Karakteristićna tumorska ćelija u klasićnom Hoćkinovom limfomu je Reed-Sternbergova ćelija koja je velika i sadrži obilnu, blago eozinofilnu ili amfofilnu citoplazmu (45). Jedro je krupno bilobarno ili ćelija ima dva ili više jedara, a svaki lobus jedra ima krupno centralno lokalizovano eozinofilno jedarce. Pored klasićne varijante, postoje i monojedarna, lakunarna, pleomorfna i „zombi“ varijanta (46). Karakteristićan imunofenotip ovih ćelija je CD15+/-, CD30+, CD45-, nedostatak ekspresije B-ćelijskih markera (39). Najveći deo tumorske mase čini zapaljenski infiltrat, najviše sastavljen od malih limfocita, što je rezultat citokinske proukcije od strane Reed-Sternberg ćelija (47). Takođe, fibroza je čest nalaz u klasićnom Hoćkinovom limfomu (46). Morfologija Reed-Sternbergovih ćelija, kao i raširenost fibroze i njene morfološke karakteristike su znaćajne za podtipizaciju klasićnog HL.

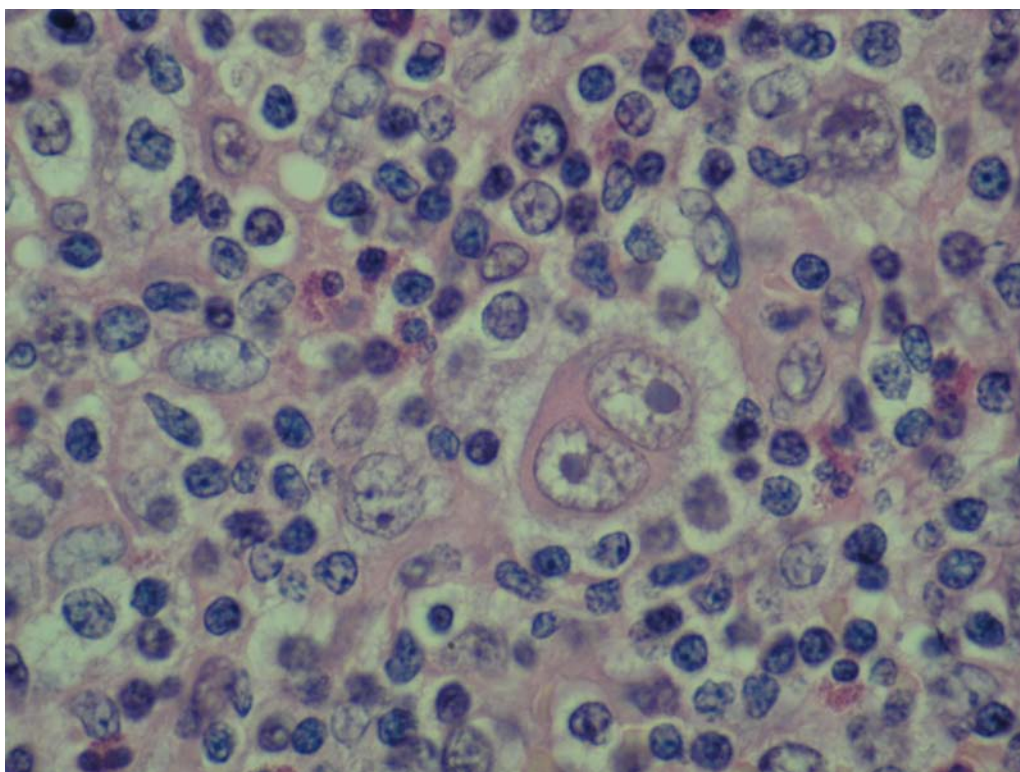
U okviru klasićnog Hoćkinovog limfoma razlikuju se četiri podtipa: nodularna skleroza (NS), mešovita celularnost (MC), limfocitima bogat klasićan Hoćkinov limfom (LRCH) i limfocitna deplecija (LD).

Nodularna skleroza (slika 1) je najčešći podtip klasičnog Hočkinovog limfoma (48). Kod ovog podtipa karakteristično je prisustvo lakunarnih ćelija i fibroze u vidu debelih kolagenih traka deleći tako tumor na nodule. Pored lakunarnih ćelija prisutne su i klasične Reed-Sternbergove ćelije, kao i zapaljenski infiltrat, a imunohistohemijski u odnosu na druge podtipove klasičnog HL prisutna je manja učestalost EBV pozitivnosti.



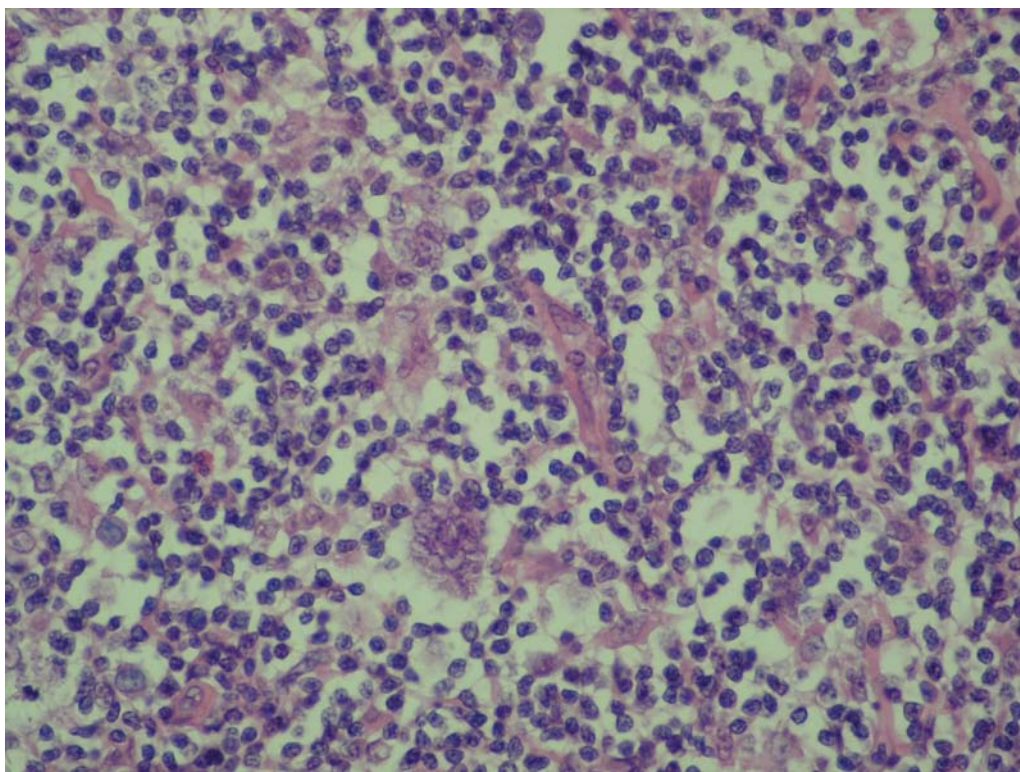
Slika 1. Klasičan Hočkinov limfom – podtip nodularna skleroza

Podtip mešovite celularnosti (slika 2) karakteriše relativno veliki broj klasičnih Reed-Sternberg ćelija i njenih varijanti, prisustvo zapaljenskog infiltrata, potpuno zbrisana građa limfnog čvora, odsustvo ili diskretno prisustvo fibroze (48).



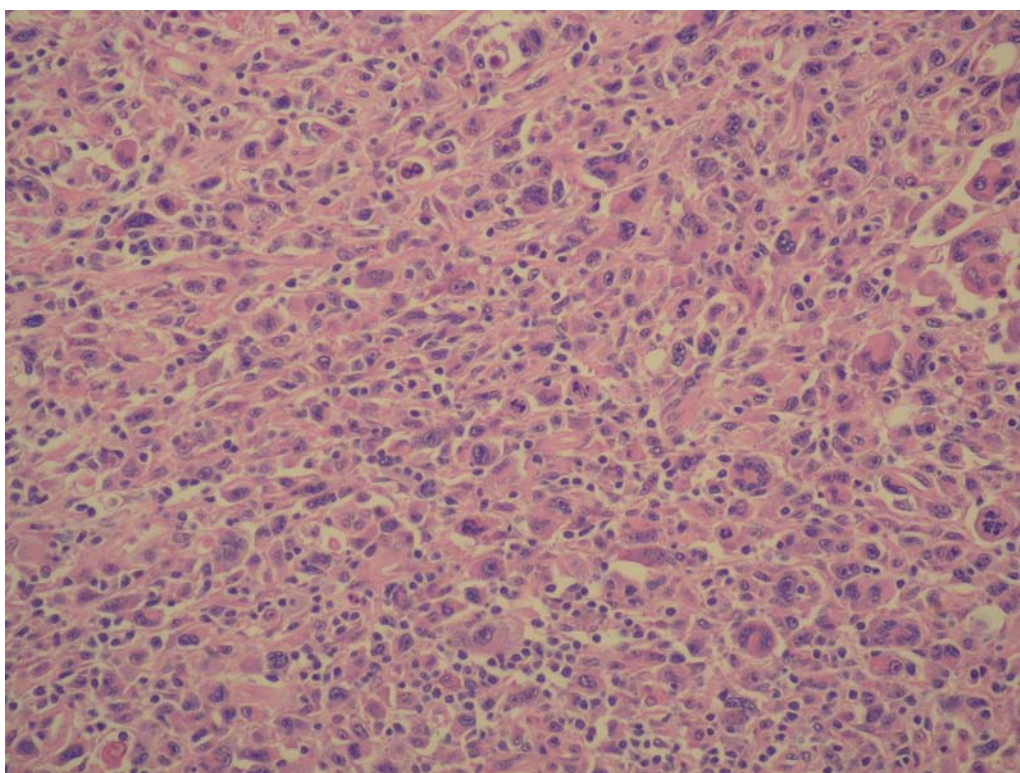
Slika 2. Klasičan Hočkinov limfom – podtip mešovita celularnost

Limfocitima bogat klasičan Hočkinov limfom (slika 3) odlikuje mali broj Reed-Sternbergovih ćelija koje morfološki i imunofenotipski odgovaraju malignim ćelijama u klasičnom Hočkinovom limfomu, uz zapaljenski infiltrat koji se gotovo isključivo sastoji od malih limfocita (49).



Slika 3. Klasičan Hočkinov limfom – podtip limfocitima bogat klasičan Hočkinov limfom

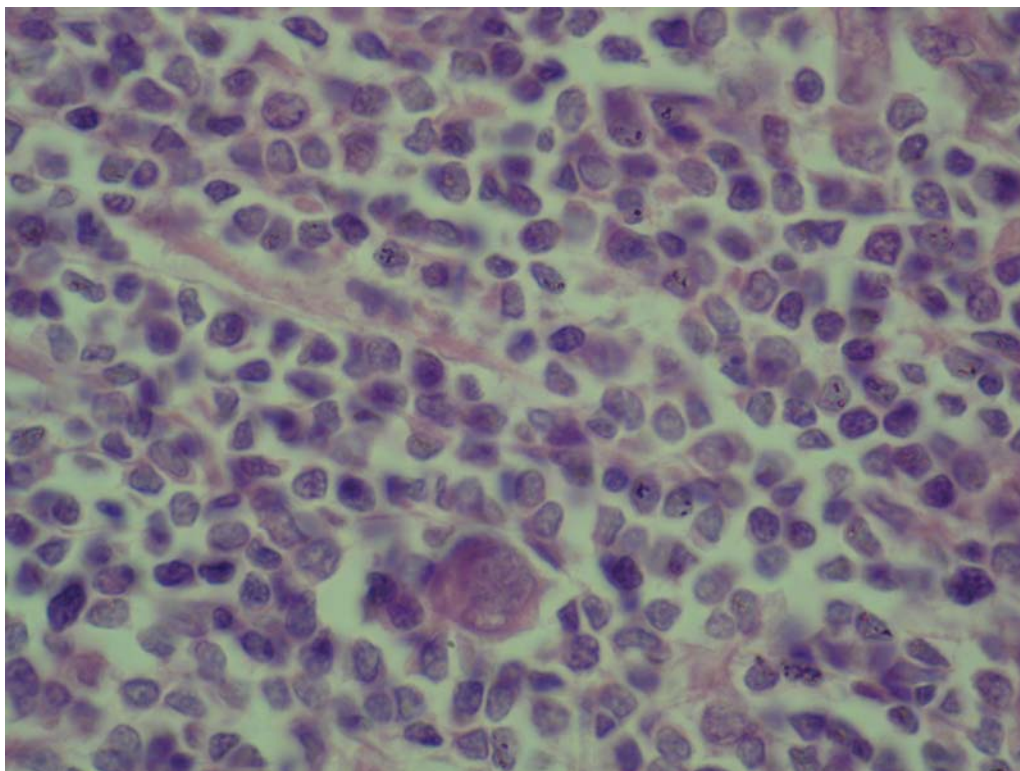
Limfocitna deplecija (slika 4) je najređi tip klasičnog Hočkinovog limfoma i odlikuje ga veliki broj Reed-Sternbergovih ćelija (dominantno pleomorfna varijanta) uz mali broj limfocita. Može se javiti u dve forme, kao difuzna fibroza gde je tumorsko tkivo hipocelularno zbog prisustva dezorganizovanog vezivnog tkiva i kao retikularna varijanta gde je celularnost veća i dominiraju pleomorfne Reed-Sternbergove ćelije (48).



Slika 4. Klasičan Hočkinov limfom – podtip limfocitna deplecija

1.2.3. HOČKINOV LIMFOM TIP NODULARNE LIMFOCITNE PREDOMINACIJE

Karakteristična krupna tumorska ćelija nodularne limfocitne predominacije (slika 5) smatra se varijantom Reed-Sternbergove ćelije, velika je i sadrži oskudnu, blago bazofilnu citoplazmu (50). Jedro je krupno multilobularno i sadrži sitna bazofilna jedarca. Karakterističan imunofenotip ovih ćelija je CD15-, CD30-, pozitivnost svih B ćelijskih markera, CD45+, EMA +/- (39). Maligne ćelije u tumorskom tkivu su retke i najveći deo tkiva tumora čine mali reaktivni limfociti.



Slika 5. Hočkinov limfom – nodularna limfocitna predominacija

1.3. KLINIČKE KARAKTERISTIKE HOČKINOVOG LIMFOMA

1.3.1. SIMPTOMI, ZNACI I LABORATORIJSKE KARAKTERISTIKE BOLESTI

Ne postoje simptomi, znaci i laboratorijski nalazi specifični za ovu bolest.

U preko 50% slučajeva kod bolesnika postoji samo bezbolna limfadenopatija. U retkim slučajevima, na do sada nerazjašnjen način, nakon konzumacije alkohola javljaju se bolovi u zahvaćenim limfnim čvorovima i ovaj redak simptom koji nema prognostički značaj (manje od 10% slučajeva) praktično upućuje na dijagnozu HL (51). U slučaju da je bolest simptomatska predominantno su prisutni opšti simptomi - temperature preko 38° C, obilno noćno znojenje, gubitak telesne težine više od 10 % osnovne telesne težine u toku 6 meseci pre dijagnoze. Prisustvo ovih simptoma upućuje na nepovoljniju prognozu i ako je prisutan jedan ili više od navedenih simptoma bolest se za svakog pojedinačnog bolesnika označava kao simptomatska, odnosno kao bolest sa prisutnim "B" simptomima. Ukoliko postoji temperatura ona se obično javlja nepravilno, a u retkim slučajevima one su ciklične na 1 do 2 nedelje i smenjuju se sa periodima afebrilnosti sličnog trajanja. Takav tip temperatura je skoro dijagnostički za

bolest i naziva se Pel-Ebstein temperatura (52,53). Pored ovih karakterističnih simptoma bolesti, kod pojedinih bolesnika mogu biti prisutni i drugi nespecifični simptomi izazvani najčešće kompresivnim efektom tumorske mase poput kašlja, bola u grudima ili dispneje kod bolesnika s velikom mediastinalnom tumorskom masom ili, dosta ređe, bolove u leđima praćene simptomima i znacima kompresije kičmene moždine. Pri dijagnozi, u malom broju slučajeva bolesnici se mogu žaliti na generalizovan svrab po koži i tada su često prisutne i ekzorijacije.

Pregledom bolesnika, najčešće se otkriva tumorska masa ili otok u perifernim supradijafragmalnim limfnim čvorovima (60-70% vrata i supraklavikularne regije, 15-20% aksilarnih), dok je subdijafragmalna bolest na prezentaciji prisutna kod samo 15 do 20 % pacijenata (54). Pored palpacije perifernih limfnih žlezda, potrebno je palpatorno utvrditi i da li postoji uvećanje jetre i slezine i eventualno prisustvo tu mase u gornjem retroperitonealnom području. U retkim slučajevima, kompresija gornje šuplje vene rezultira otokom lica, nabreklošću vena vrata i gornjeg dela grudnog koša. Perkutorni i auskultatorni nalaz koji ukazuje na prisustvo pleuralnog izliva može biti prisutan kod bolesnika sa uznapredovalom bolešću. Vrlo retko na prezentaciji inspeksijski i auskultatorno mogu biti prisutni znaci perikardnog izliva, kao i brojni retki paraneoplastični sindromi, uključujući idiopatski holangitis s kliničkom slikom žutice, nefrotski sindrom sa anasarkom, autoimune hematološke bolesti (npr. imunološka trombocitopenija ili hemolitička anemija), neurološke znakove i simptome (55-57).

Laboratorijski nalazi nisu specifični za postavljenje dijagnoze, ali imaju značajnu prognostičku ulogu, obzirom da su: nalaz anemije, povišenog broja leukocita, limfopenije i niske vrednosti serumskog albumina četiri od sedam nepovoljnih prognostičkih faktora utvrđenih u uznapredovalom HL prema internacionalnom prognoznom skor (58). U nalazima krvne slike često se može otkriti jedan ili više poremećaja poput povišenog broja granulocita, eozinofila, trombocita, odnosno prosustvo anemije ili limfopenije (59,60). Anemija je obično po tipu hronične bolesti, a u retkim slučajevima može biti uzrokovana hemolizom zbog visoke febrilnosti ili povezana s pozitivnim direktnim antiglobulinskim (Coombs) testom (61,62). Zahvaćenost koštane srži bolešću, hipersplenizam ili imunološki mehanizmi mogu dovesti do trombocitopenije (63). Neutropenija uzrokovana imunološkim mehanizmima takođe može biti prisutna na prezentaciji HL (64). Nalaz citopenije se uglavnom viđa kod bolesnika sa uznapredovalim stadijumom bolesti koji imaju podtip limfocitne

deplecije. Brzina sedimentacije je značajan parametar koji koreliše s prognozom, naročito u ograničenom stadijumu bolesti. Ipak, ubrzana sedimentacija je češća u uznapredovaloj bolesti i obično koreliše s opštim simptomima (65). Ovaj parametar je značajno pratiti i u toku i po završetku lečenja jer iako nije specifičan, može označavati jedan od prvih nalaza koji ukazuje na povratak bolesti. Nalaz povišenog beta2-mikroglobulina u serumu može korelisati s veličinom tumora i prognozom u HL (66). Nivo laktat dehidrogenaze u serumu takođe može biti povišen na prezentaciji i javlja se u oko 35% bolesnika (67). Nespecifično ili u vezi sa infiltracijom jetre, kosti, ili koštane srži alkalna fosfataza takođe može biti povišena u HL (68). U slučaju punkcije pleuralnog izliva, nalaz punktata takođe nije specifičan i mogu se otkriti transudativna, eksudativna ili hlozna svojstva. Pored navedenih poremećaja može biti prisutan i niz drugih abnormalnosti zbog sekretorne aktivnosti malignih ćelija ili aktivacije imunološkog sistema, poput hiperkalcemije ili hipoglikemije (69, 70).

1.3.2. ODREĐIVANJE RASPROSTRANJENOSTI BOLESTI I KLINIČKOG STADIJUMA

U oko 70 % bolesnika, HL zahvata limfne čvorove vrata, u 12 % aksilarne, a u 9% ingvinalne čvorove (71). Mali broj bolesnika ima isključivo subdijafragmalnu bolest. Patohistološki nalazi preparata slezine nakon laparotomije u nelečenih bolesnik ukazuju da je zahvaćenost ovog organa oko 37 % i češće se nalazi kod podtipa mešovite celularnosti (71). Takođe, utvrđeno je da u slučaju zahvaćenosti jetre ili koštane srži gotovo uvek bi bila zahvaćena i slezina.

Decenijama unazad, klasifikacija Hočkinovog limfoma se vrši na osnovu Ann Arbor klasifikacije koja obuhvata četiri klinička stadijuma, kao što je navedeno u tabeli 1(72).

Tabela 1. Ann Arbor staging klasifikacija

Stadijum I	zahvaćenost jedne limfne regije ili jedna ekстранodalna lokalizacija
Stadijum II	zahvaćenost dve ili više limfnih regija sa iste strane dijafragme
Stadijum III	zahvaćenost dve ili više limfnih regija sa obe strane dijafragme
Stadijum IV	diseminovana ekстранodalna bolest
A- bez opštih simptoma bolesti	
B- prisutni opšti simptomi bolesti: povišena telesna temperatura (>38°C), noćno znojenje, gubitak u telesnoj težini preko 10% u periodu od 6 meseci	
E- ekстранodalna lokalizacija	

Klasifikacija se bazira na nalazima fizikalnog pregleda, radioloških ispitivanja i histopatološkoj analizi bioptata koštane srži. Dodatno, pored kliničkog stadijuma označava se i prisustvo opštih simptoma i ukoliko nisu prisutni dodaje se A odnosno, ukoliko su prisutni dodaje se B. Za razliku od difuzne diseminovanosti bolesti van limfnih čvorova što predstavlja IV klinički stadijum bolesti, u slučaju kada postoji ekstrakapsularno proširenje limfnih čvorova bolesti i zahvatanje okolnih tkiva a koje bi moglo biti uključeno u jedno standardno polje radioterapije, pored oznake za klinički stadijum i prisustvo ili odsustvo opštih simptoma, dodaje se i oznaka E. Po uvođenju ovog klasifikacionog sistema, njegov prognostički značaj je potvrđen kroz ispitivanja kada je radioterapija služila kao načelno lečenje za sve osim IV stadijum bolesti. Napredak u lečenju HL koji je podrazumevao primenu sistemske hemioterapije uz radioterapiju i u nižim kliničkim stadijumima, doveo je do potrebe za uvođenjem dodatnih prognostičkih informacija u cilju boljeg definisanja terapijskog pristupa. Stoga, 1989. su u Ann Arbor klasifikaciju uvrštene dodatne informacije poput velike tumorske mase ili ekстранodalne bolesti, što je poznato kao Cotswold modifikacija Ann Arbor klasifikacije (73).

Kompjuterizovana tomografija (CT) predstavlja standard radiološke dijagnostike za procenu anatomske distribucije i veličinu tumorske mase kod obolelih od HL počev od 1989. godine kada je uvršćena kao neophodna metoda prema Cotswold modifikaciji Ann Arbor klasifikacije. Ipak, klasična P/A radiografija pluća se tradicionalno i dalje uglavnom koristi da bi se opisala veličina medijastinalne tumorske mase. Od druge polovine poslednje decenije dvadesetog veka, 18F-fluorodeoksiglukoza pozitronska emisiona tomografija (FDG-PET *scan*) se sve više koristi i polako postaje standard u

određivanju raširenosti bolesti na prezentaciji (74). Iako postoji dobra korelacija FDG-PET *scan*-a s CT nalazima, upotrebom FDG-PET *scan*-a mogu se dokazati dodatna područja bolesti, što u određenom procentu slučajeva može rezultovati promenom stadijuma bolesti i potencijalno donošenju terapijske odluke na osnovu tog nalaza (75). Pored toga, FDG-PET *scan* je superioran u odnosu na CT sken u proceni da li rezidualni tumor nakon lečenja predstavlja i dalje aktivnu bolest (ako je povećan metabolizam glukoze), što je godinama unazad bio veliki problem. Stoga, nalaz FDG-PET *scan*-a je i formalno uklopljen u preporuke za procenu terapijskog odgovora (76). U današnje vreme, kliničke studije ispituju i potencijalnu ulogu FDG-PET *scan*-a za ranu procenu odgovora na terapiju, s ciljem potencijalne izmene terapije u skladu sa nalazom (77,78). Ipak, u većini situacija, posebno kada su prema FDG-PET *scan*-u zahvaćene lokalizacije koje prethodno nisu bile zahvaćene ili ukoliko se abnormalnost ne registruje na CT, obično je potrebna biopsija tkiva radi potvrde prisustva bolesti.

1.4. LEČENJE HOČKINOVOG LIMFOMA

1.4.1. OPŠTI PRINCIPI

Istorijski, Hočkinov limfom se smatra za prvi izlečiv malignitet kao rezultat sistemskog istraživanja u cilju procene adekvatne doze citostatskih lekova, polja zračenja, kao i kombinacija ova dva modaliteta.

Inicijalno, lečenje se sprovodilo isključivo radioterapijom, a radioterapijska doza na zahvaćena polja obično je bila u rasponu 3500 - 4400 cGy, a preventivna doza 3000 - 3500 cGy na nezahvaćena tkiva. S povećanim saznanjem o kasnim toksičnim efektima zračenja i uvođenjem kombinovanog pristupa sa hemoterapijom, klasična široka radioterapijska područja ozračivanja poput mantle, paraaortalne regije i male karlice su napuštena i zračna terapija se sprovodi na područja zahvaćenih limfnih čvorova (*involved field*) ili rest tumora nakon hemoterapije, a doza ozračivanja je takođe smanjena. Ovakav savremen pristup rezultuje u manjoj izloženosti radijaciji vrata, ženskih grudi, srca i pluća, što bi sve trebalo rezultirati smanjenjem kasnih komplikacija zračenja.

Protokol MOPP, dizajniran od DeVita i saradnika, smatra se za prvu modernu hemoterapijsku kombinaciju (79). Ovakav pristup doveo je do smanjenja smrtnosti od

HL za više od 60% u deceniji koja je usledila (80). Sredinom sedamdesetih godina prošlog veka Bonadonna sa saradnicima razvio je alternativni protokol za lečenje HL, ABVD. Incijalno, ovaj protokol je bio korišćen u lečenju pacijenata koji nisu reagovali na MOPP, a obzirom da je ustanovljen povoljniji profil toksičnosti u odnosu na MOPP, ABVD je nedugo potom postao hemoterapija izbora u prvoj liniji, sam ili u kombinaciji s radioterapijom (81- 84). Od više pokušaja da se pronade još efikasnija hemoterapijska kombinacija od ABVD, samo bleomicin, etopozid, doksorubicin, ciklofosamid, vinkristin, prednizon, prokarbazin (BEACOPP) kombinacija, razvijena od strane Diehla i saradnika, nameće se kao potencijalno superiornija kombinacija (85). Ipak, ovaj pristup sa sobom nosi i značajno veći nivo toksičnih komplikacija (85).

U današnje vreme, terapijski pristup bolesniku određuje se uglavnom na bazi kliničkog stadijuma i prisustva ili odsustva faktora rizika, kao što je prikazano na tabeli 2 (86). U ovom trenutku, faktori rizika su isključivo klinički i laboratorijski parametri.

Tabela 2. Principi svrstavanja bolesnika u 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 *	povišena sedimentacija eritrocita	C*	povišena 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 Hočkin's Lymphoma Study Group; *povišena sedimentacija eritrocita ≥ 50 mm/1.h bez B simptoma ili ≥ 30 mm/1.h sa B simptomima

1.4.2. LEČENJE RANOG POVOLJNOG STADIJUMA BOLESTI

U ovom trenutku, postoji više definicija povoljnog stadijuma bolesti. U Severnoj Americi pod povoljnim, ograničenim stadijumom bolesti se obično smatra asimptomatski I ili II klinički stadijum supradijafragmalne bolesti, bez „bulky“ bolesti. U Evropi, definicije su striktnije jer se pored Ann Arbor kliničkog stadijuma koristi i drugi parametri kao na primer sedimentacija eritrocita, godine života i zahvaćenost ili ne ektranodalnih lokalizacija (tabela 2), i procenjuje se da oko 35% pacijenata sa kliničkim stadijumom I i II ispunjavaju ovu ograničenu definiciju ranog povoljnog stadijuma bolesti. Inicijalno, prošireno polje radioterapije bio je tretman izbora. Međutim, visoka stopa smrtnosti od posledica zračenja nakon 10 i više godina premašila je smrtnost od HL (87). Inicijalna istraživanja kombinacije hemoterapije i zračne terapije zahvaćenih polja pokazala su ekvivalentan ili superiorniji rezultat u odnosu na zračenje širokog područja, nakon čega je kroz randomizovana ispitivanja definisan standard lečenja koji je i danas aktuelan, kombinacija antraciklinskih protokola i zračne terapije (88-92). Klinička ispitivanja koja su potom usledila su imala za cilj određivanje optimalnog broja ciklusa terapije, polja i doze zračenja, prvenstveno u cilju smanjenja toksičnosti uz održavanje nivoa efikasnosti lečenja (93,94). Poslednja studija u nizu čiji su rezultati prihvaćeni kao trenutni standard lečenja je studija Nemačke Studijske Grupe za Hočkinov limfom (GHSG) (95). U ovoj studiji poređena su dva u odnosu na četiri ciklusa hemoterapije ABVD u paru s 20 Gy ili 30 Gy i rezultati ukazuju da nema razlike u rezultatima lečenja između ispitivanih grana.

Mali broj studija ispitivao je hemoterapiju bez zračne terapije u ranom povoljnom HL i, rezultati ovih studija ukazuju da nakon 5 godina bolesnici koji su imali radioterapiju imaju duži period bez progresije, ali razlike u ukupnom preživljavanju nije bilo (96-98). Ipak, i dalje postoji tendencija za eliminisanje zračne terapije u lečenju ograničenog stadijuma HL. U tom cilju, u ovom trenutku su aktuelne studije za procenu upotrebe FDG-PET *scan*-a kao sredstva za identifikovanje pacijenata kojima se radioterapija može izostaviti.

1.4.3. LEČENJE RANOG NEPOVOLJNOG STADIJUMA BOLESTI

Pod ranim nepovoljnim stadijumom HL stratifikovani su bolesnici sa kliničkim stadijumima I i II uz prisutne faktore rizika (tabela 2). Kao i kod bolesnika sa ranim povoljnim stadijumom korišćenje kombinacije hemoterapije i zračenja predstavlja standard lečenja koji rezultuje višegodišnjim periodom bez relapsa u oko 80% pacijenata. Ipak, jedinstven stav o vrsti terapije, broju neophodnih ciklusa i dozi radioterapije i dalje ne postoji obzirom da vodeće internacionalne studijske grupe različito definišu faktore rizika. Tako, prema GHSG standard lečenja predstavlja primena dva ciklusa eskalirajućeg BEACOPP-a praćena primenom dva ciklusa ABVD, nakon čega sledi zračna terapija zahvaćenih polja sa 30 Gy (99). S druge strane, standard lečenja prema GELA i EORTC predstavlja 4 ciklusa ABVD uz zračnu terapiju zahvaćenih polja sa 30 Gy (100).

U cilju smanjena hemoterapije kao i redukcije zračne terapije, i za ove bolesnike trenutno su aktuelne studije za procenu upotrebe FDG-PET *scan*-a kao sredstva za modifikaciju terapijskog pristupa u zavisnosti od nalaza.

1.4.4. LEČENJE UZNAPREDOVALOG STADIJUMA BOLESTI

Kao bolesnici sa uznapredovalim stadijumom HL stratifikuju se bolesnici sa kliničkim stadijumima III i IV, kao i pojedini bolesnici sa II kliničkim stadijumom uz prisutne faktore rizika. Decenijama unazad primena ABVD hemoterapije sa ili bez zračne terapije je bila jedini standard lečenja u ovih bolesnika, obzirom na zadovoljavajuću efikasnost i povoljan profil toksičnosti, čime je postignuto višegodišnje preživljavanje ovih bolesnika u preko 70% slučajeva (83,84).

Sredinom poslednje decenije dvadesetog veka u cilju daljeg poboljšanja rezultata lečenja, na bazi matematičkih modela koji pokazuju da bi umereni porast doze hemoterapije rezultirao značajnim povećanjem izlečenja, GHSG je razvila BEACOPP protokol, koji je u izvornom HD9 istraživanju, imao "standardnu" i "eskaliranu" verziju, a poređenje je izvršeno sa ciklofosamid, vinkristin (onkovin), prokarbazin, prednizon (COPP)-ABVD protokolom (85). Rezultati ove studije nakon 5 i 10-godina pokazuju značajan napredak perioda bez progresije bolesti i ukupnog preživljavanja kod bolesnika lečenih eskalirajućim BEACOPP-om (85, 101). Ipak, BEACOPP nije

globalno prihvaćen kao novi standard obzirom na značajnu akutnu i hroničnu toksičnost, što rezultira većom potrebom za hospitalizacijama i transfuzijama, visok procenat steriliteta u oba pola i povećan rizik od sekundarne leukemije (85). U narednom periodu, dve kliničke studije su potvrdile nadmoć BEACOPP nad ABVD u dužini perioda bez progresije bolesti, ali ne i ukupnog preživljavanja (102,103). Modifikacije u lečenju eskalirajućim BEACOPP-om od strane GHSG dovele su do smanjenja toksičnosti uz zadržavanje nivoa efikasnosti (104). Takođe, bitno je i napomenuti da ne postoje studije koje porede ABVD i eskalirajući BEACOPP u kojima se BEACOPP primenjuje prema preporukama GHSG. Obzirom na navedeno, iznalaženje opšte prihvaćenog standarda za lečenje uznapređovalog HL i dalje je predmet brojnih ispitivanja, uključujući i studije za procenu upotrebe FDG-PET *scan*-a kao sredstva za modifikaciju terapijskog pristupa u zavisnosti od nalaza.

U sklopu istraživanja o optimalnom terapijskom pristupu, redefinisana je i primena zračne terapije, tako da se njena primena danas preporučuje nakon završenog lečenja ukoliko postoje znaci rest tumora nakon 6-8 ciklusa ABVD, odnosno 6 ciklusa eskalirajućeg BEACOPP-a (86).

1.4.5. LEČENJE RECIDIVA BOLESTI

Bolesnici sa recidivom bolesti, odnosno primarno rezistentnom bolešću značajno pogoršavaju prognozu bolesnika sa HL. U poslednje dve decenije do značajnog poboljšanja rezultata lečenja ovih bolesnika dovela je primena visokodozne hemoterapije praćene autologom transplantacijom matičnih ćelija, što predstavlja standard lečenja kod bolesnika mlađih od 65 godina (105, 106). Nakon transplantacije, stopa izlečenja kreće se u rasponu od 40 do 60%, a smrtnost vezana za proceduru je manja od 5% (107,108). Najčešće korišćene druge linije hemoterapije koje prethode visokodoznoj terapiji su DHAP (deksametazon, cisplatin, citarabin), ICE (ifosfamid, karboplatin, etopozid), ili IGEV (ifosfamid, gemcitabin, etoposid, vinorelbin) i koriste se kako bi se postiglo smanjenje tumorske mase ili postizanje kompletne remisije pre mobilizacije matičnih ćelija i transplantacije (109). Visokodozni kondicioni režimi koji se koriste su BEAM (karmustin, etopozid, citarabin, melfalan) i CBV (ciklofosfamid, karmustin, etopozid). Nakon transplantacije, radioterapija može igrati ulogu u nekim slučajevima i njena primena je opcionalna.

Izuzetak ovakvom pristupu su bolesnici sa recidivom rane neuznapredovale bolesti, i oni mogu biti razmotreni za primenu retreatmana nekim od protokola za prvu liniju lečenja, ukoliko prethodno lečenje omogućava primenu antraciklina (110).

Recidiv nakon autologe transplantacije predstavlja izazov za lečenje, obzirom da ne postoji uniformno prihvaćen terapijski pristup za ove bolesnike. Visoka stopa mortaliteta vezanog za lečenje ograničava ulogu alogene transplantacije (111). Novija istraživanja koja ukazuju na dobru efikasnost i povoljan profil toksičnosti u fokus stavljaju upotrebu monoklonskih antitela, pre svega anti-CD30 (112,113).

1.5. PROGNOŠTIČKI FAKTORI ZA HOČKINOV LIMFOM

1.5.1. ZNAČAJ I ISTORIJAT PROGNOŠTIČKIH MARKERA

I pored značajnog napretka u lečenju bolesnika sa Hočkinovim limfomom, kod ove bolesti je i dalje prisutna nepredvidivost u kliničkom toku i ishodu, čak i unutar podgrupa HL formiranih na osnovu histološkog podtipa bolesti i kliničkog stadijuma. S napretkom u lečenju prvenstveno u smislu postojanja agresivnih i neagresivnih pristupa, javlja se potreba za definisanjem pouzdanih prognostičkih markera koja je vremenom sve veća, a sa ciljem identifikacije bolesnika u visokom riziku, a radi izbora odgovarajuće terapije. Drugi benefit definisanja prognostičkih markera bio bi obezbeđivanje dobre komunikacije između lekara i pacijenta i realno sagledavanje šansi bolesnika za povoljan ishod lečenja. Pouzdan prognostički marker, bilo da je u pitanju pojedinačni marker ili multipli prognostički model, mora da bude zasnovan na standardizovanoj tehnologiji, da bude široko i lako dostupan i da predviđa širok spektar kliničkih ishoda ili da definiše molekularni profil koji bi imao korist od specifične ciljane terapije.

Kroz brojna ispitivanja pokazano je da stratifikacija bolesnika prema Ann Arbor kliničkom stadijumu HL pored informacije o rasprostranjenosti bolesti ujedno ima i prognostičku ulogu. Cotswold revizija Ann Arbor klasifikacije pruža dodatne informacije o faktorima rizika i služi kao osnov za stratifikaciju bolesnika. Ipak, ova stratifikacija još uvek nije dovoljna obzirom da unutar različitih grupa rizika i dalje postoji značajan broj bolesnika koji imaju loš ishod lečenja.

Međunarodna kooperativna grupa sačinjena radi formiranja prognoznog indeksa za NHL 1993. godine objavljuje internacionalni prognozni indeks koji na osnovu demografskih, kliničkih i laboratorijskih nalaza stratifikuje bolesnike u četiri rizične grupe (114). Ovaj model se pokazao kao izuzetno dobar za agresivne limfome, prvenstveno za difuzni B krupnoćelijski limfom koji je i najčešći NHL, i predstavlja praktično prekretnicu u daljim istraživanjima prognoznih faktora u limfoproliferativnim bolestima.

Napredak i šira dostupnost imunohistohemije i molekularnih dijagnostičkih tehnika u poslednjih nekoliko godina dovela je do identifikacije brojnih novih, bioloških prognostičkih markera. Takođe, metodologija ovih tehnika je u značajnoj meri standardizovana, ali definisanje novog, pouzdanijeg, kliničko-biološkog prognostičkog indeksa i dalje nije jednostavno u ovom trenutku (115).

1.5.2. SPECIFIČNI PROGNOŠTIČKI FAKTORI ZA HOČKINOV LIMFOM

Veliki broj kliničkih i bioloških faktora je intenzivno proučavan u oblasti Hočkinovog limfoma u pokušaju identifikacije bolesnika sa rizikom za loš ishod (116-120). Iako su translaciona i klinička ispitivanja identifikovala brojne biomarkere u oblasti Hočkinovog limfoma, i dalje ni jedan molekularni prognozni marker nije našao svoje mesto u prognoznim modelima, uglavnom zbog poteškoća u uspostavljanju jedinstvene metodologije i ograničene dostupnosti (121). Ipak, ova istraživanja su u velikoj ekspanziji, a sve u cilju definisanja pouzdanih biomarkera koji bi našli svoje mesto u rutinskoj kliničkoj praksi (122). Slična situacija je i sa prognostičkom ulogom FDG-PET *scan*-a koji ima prognostičku uloga za ishod lečenja, ali ne ulazi u prognozne modele koji se koriste u rutinskoj praksi (123, 124).

Praktično jedini široko prihvaćen prognostički model u oblasti Hočkinovog limfoma je Internacionalni prognozni skor (*International Prognostic Score, IPS*), baziran na kliničko-laboratorijskim parametrima (tabela 3) i koristi se u grupi uznapredovalih Hočkinovih limfoma (58). Ovaj model stratifikuje bolesnike na bolesnike u malom ili visokom riziku za loš ishod, a na osnovu zbira nepovoljnih prognoznih parametara na prezentaciji bolesti (0-2 ili 3-7). Ipak, ni ovaj skor još uvek nije deo terapijskih preporuka koje propisuju terapiju na osnovu rizika za loš ishod.

Tabela 3. Internacionalni prognozni skor za Hočkinov limfom (IPS)

IPS		
Starosna dob	<45 godina	0
	≥45 godina	1
Pol	Ženski	0
	Muški	1
Ann Arbor klinički stadijum	I-III	0
	IV	1
Hemoglobin	≥105 g/l	0
	<105 g/l	1
Albumin u serumu	≥40 g/l	0
	<40 g/l	1
Broj leukocita > 15x10 ⁹ /l	Ne	0
	Da	1
Limfopenija (limfociti <0.6x10 ⁹ /l ili <8% u leukocitnoj formuli	Ne	0
	Da	1
UKUPAN ZBIR		

Procena rizika: 0-2= nizak rizik; 3-7 visok rizik

1.6. PROGNOŠTIČKI ZNAČAJ ANGIOGENEZE I MIKROSREDINE TUMORA

Prvo savremeno istraživanje o značaju angiogeneze u malignim bolestima publikovano je od strane Folkmana 1971. godine, kada se po prvi put ukazuje na značaj razvoja vaskularne mreže u tumoru za metastatsko širenje tumora, ali i za nutritivnu podršku tumora (125). Ubrzo nakon toga došlo se i do zaključaka da bez vaskularizacije dolazi do nekroze, pa čak i apoptoze tumora. Brojna istraživanja identifikovala su brojne faktore koji stimulišu angiogenezu, od kojih najveću pažnju istraživača je privukao vaskularni faktor rasta endotela (*eng. Vascular endothelial growth factor, VEGF*), za koji je tokom 90-ih godina prošlog veka dokazano da ga sekretuju maligne ćelije, ali i ćelije strome tumora (126-128). Prvo istraživanje koje opisuje angiogenezu u limfoproliferativnim bolestima datira iz 1997. godine (129), ali i u ovom trenutku njen značaj u limfoproliferativnim bolestima još uvek nije dovoljno ispitan.

Prva saznanja o prisustvu nemalighnih ćelija u tumorskom tkivu i pretpostavka da mogu imati značaj potiču iz 1863. godine kada je Rudolf Virchow uočio prisustvo leukocita u malignom tkivu (130). Savremena saznanja ukazuju da mikrosredina, stroma tumora koja okružuje tumorsko tkivo ima značajnu ulogu u nastanku i progresiji tumora. Takođe, pretpostavlja se i da bi mogla biti važan faktor u odlučivanju o terapijskom pristupu. Ona može uticati na rast tumora i njegovu sposobnost da metastazira, može ograničavati pristup lekova tumoru, remetiti metabolizam lekova i učestvovati u razvoju rezistencije na lekove. S obzirom da praktično ima ulogu u svim fazama razvoja tumora, mikrosredina predstavlja atraktivnu oblast proučavanja kako sa biološke strane, tako i sa strane iznalaženja adekvatnog terapijskog pristupa koji bi doveo do boljih rezultata lečenja remeteći interakciju malignih i nemalighnih ćelija u tumoru.

Uprkos činjenici da je značaj mikrosredine tumora odavno prepoznat, i dalje postoji vrlo ograničen nivo saznanja o sastavu strome tumora, kao i kompleksnim interakcijama malignih i nemalighnih ćelija. U tom smislu, Hočkinov limfom predstavlja klasičan primer histološke kompleksnosti malignog tkiva, s obzirom na minimalan broj malignih ćelija i veliku populaciju reaktivnih inflamatornih ćelija sastavljenu od B i T ćelija, makrofaga, eozinofila, neutrofila i plazma ćelija.

U ovom trenutku još uvek nije razjašnjena kompleksna interakcija Hočkin i Reed Sternbergovih ćelija sa mikrosredinom, međutim u poslednje dve decenije brz razvoj molekularne dijagnostike doveo je do značajnog napretka u izučavanju mikrosredine tumora. Sa daljim napretkom u ovoj oblasti, očekuje se poboljšanje u dijagnostici i lečenju maligniteta, a možda i mogućnost prevencije tumora.

Jedno od prvih molekularnih istraživanja u oblasti limfoproliferativnih bolesti sprovedeno je kod Hočkinovog limfoma na grupi od 21 preparata malignog tkiva i tada je konstatovano da različiti molekularni obrasci ekspresije u tumorskom tkivu mogu uticati na ishod lečenja (131). Ubrzo nakon toga definisana su i četiri obrasca genske ekspresije u tumorskom tkivu HL od čega dva potiču od tumorskih ćelija, a dva potiču od imunog odgovora domaćina i mikrosredine tumora (132). U jednom od ovih obrazaca ekspresije uočena je ekspresija gena makrofaga, uz pojedine subpopulacije T ćelija i plasmocitoidne dendritične ćelije.

Zbog kompleksnosti molekularnog testiranja, javila se potreba za iznalaženjem imunohistohemijski detektibilnog markera koji bi bio pristupačan za rutinsku praksu. U

2009. godini učinjena je prva korelacija između eksprimiranih molekularnih obrazaca mikrosredine tumora u HL i imunohistohemijski detektovanih ćelija i uočeno je da prisustvo ćelija karakterističnih za Th1 imunološki odgovor koreliše sa lošim ishodom, dok prisustvo FOXP3+ ćelija u visokom broju koreliše sa povoljnim ishodom bolesti (133). Prisustvo makrofaga u tumorskom tkivu HL za koje se pretpostavlja da bi u malignom tkivu mogli da utiču i na formiranje krvnih sudova korelisalo je sa lošijim preživljavanjem obolelih od HL (134).

Dokazan značaj angiogeneze i nemalignih ćelija u malignim tumorima, neveliki broj ovakvih istraživanja u oblasti Hočkinovog limfoma, kao i nedostatak istraživanja u pravcu njihove korelacije u trenutku prijave ovog istraživanja, poslužila su kao osnova za ispitivanja koja su učinjena u okviru ove doktorske teze.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati da li je ekspresija VEGF, povećana gustina krvnih sudova, povišen broj makrofaga ili FOXP3 limfocita u tumoru, povezana sa lošim ishodom lečenja
2. Ispitati da li postoji udruženost nivoa angiogeneze i predominacije jedne vrste netumorskih ćelija u tumorskom tkivu.
3. Uporedna analiza kliničko-laboratorijskih parametara sa nivoom angiogeneze, procentom makrofaga i T limfocita u tumorskom tkivu, radi formiranja optimalnog inicijalnog prognostičkog modela.

3. BOLESNICI I METODE

3.1. IZBOR BOLESNIKA I KLINIČKO LABORATORIJSKI PODACI

Ispitivanje je obuhvatilo 84 bolesnika kod kojih je dijagnostikovano Hočkinov limfom na Klinici za hematologiju KCS u vremenskom periodu 2000-2008. godine. Studija je retrospektivna i prati efekat i ishod lečenja bolesnika u toku narednih minimum 5 godina od trenutka postavljanja dijagnoze i početka lečenja. Dijagnoza Hočkinovog limfoma je postavljena histopatološkim (HP) i imunohistohemijskim (IHH) pregledom biopsiranih limfnih žlezda dobijenih biopsijom ili resekcijom tkiva limfnog čvora, prema kriterijumima *WHO* klasifikacionog sistema (39). Svi tkivni uzorci inicijalno su obrađeni klasičnim metodama bojenja (hematoksilin-eozin, Gimza, retikulin). Inicijalna imunohistohemijska analiza tumorskog tkiva pri dijagnozi sprovedena je sa ciljem utvrđivanja imunofenotipa tumorskih ćelija metodom streptavidin-biotin, korišćenjem sledećih monoklonskih antitela: CD20, CD3, CD15, CD30, MUM-1, Ki 67.

Klinički podaci u ispitivanoj grupi bolesnika su obuhvatili: pol, starosno doba, Ann Arbor klinički stadijum bolesti (4 moguća klinička stadijuma bolesti (*CS* I-IV), uz sufiks A ili B u zavisnosti da li bolesnik ima prisustvo ili odsustvo opštih simptoma bolesti), prisustvo *bulky* tumorske mase koje podrazumeva prisustvo medijastinalne adenopatije veće od 1/3 horizontalnog torakomedijastinalnog indeksa i/ili prisustvo nodalne mase maksimalnih dimenzija većih od 7 cm.

Laboratorijski podaci koji su ispitivani su bili sedimentaciju eritrocita i vrednost laktat dehidrogenaze (*LDH*) u serumu. Takođe, prikupljeni su rezultati laboratorijskih analiza koji su uključeni u Internacionalni Prognostički Skor.

U bolesnika je utvrđivan Internacionalni Prognostički Skor koji kao nepovoljne parametre obuhvata nivo serumskog albumina ispod 40 g/l, nivo hemoglobina ispod 105 g/l, muški pol, starost iznad 45 godina, IV klinički 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 (tabela 3).

Inicijalna terapija bolesnika sprovedena je po ABVD protokolu. Efekat terapije se procenjivao (na osnovu kriterijuma International Workshop-a iz 1999. pod rukovodstvom B. Cheson-a) kao kompletna klinička remisija (CR), parcijalna remisija

(PR) ili kao izostanak odgovora (135). Pod kompletnom remisijom se podrazumeva nestajanje svih znakova bolesti uz normalizaciju laboratorijskih i radiografskih nalaza. Parcijalna remisija označava redukciju tumorske mase za preko 50%. Izostanak odgovora podrazumeva stabilnu bolest (eng. *stable disease, SD*), odnosno regresiju tumorske mase za manje od 50%, ili, progresiju bolesti (eng. *progressive disease, PD*), odnosno uvećanje tumorske mase za 25% i više u odnosu na inicijalni nalaz.

Ukupno preživljavanje (eng. *overall survival, OS*) je određivano kao interval od početka bolesti do poslednje kontrole pre završetka istraživanja ili kao interval od početka bolesti do smrtnog ishoda. Takođe, određivano je period bez događaja (eng. *event-free survival, EFS*). EFS se definiše kao interval između dijagnoze i progresije bolesti, relapsa limfoma ili smrti, u zavisnosti od toga šta prvo nastupi.

3.2. IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA PREPARATA LIMFNOG TKIVA

Za analizu su korišćeni tkivni uzorci kada je bolest dijagnostikovana, pre otpočinjanja terapije, obrađeni na standardan način: fiksirani u 10% pufersanom formalinu, kalupljeni u parafinu, sečeni na mikrotomu (preseći debljine 3-5 μ m) i inicijalno obrađeni klasičnim metodama bojenja (hematoksilin eozin, Gimza, i Gordon Sweet). Na svim parafinskim isečcima je sprovedena dehidratacija i deparafinizacija u skladu sa standardnim procedurama.

Pre-tretman tkiva i demaskiranje antigena obavljeno je kuvanjem u mikrotalasnoj pećnici. Imunohistohemijska analiza je sprovedena ručno (manuelnom metodom) korišćenjem sledećih monoklonskih antitela: CD20, CD3, CD15, CD30, MUM-1, Ki 67, CD68, FOX-P3, CD34, VEGF (tabela 4). Posle inkubacije primarnim antitelima prema procedurama za svako od primenjenih antitela, imunoreakcija je izvršena manuelnom metodom, primenom standardizovane Streptavidin-Biotin AEC metode, tj. primenom sistema za vizualizaciju (LSAB2*HRP ili Abcam discover more AB64359), ili DAKO Envision+ System sa diaminobenzidin (DAB) hromogenom. Na kraju, isecci su kontrastirani u hemotoksilinu. Za svako primenjeno antitelo je korišćena pozitivna i negativna kontrola.

Tabela 4. Monoklonska antitela koja su korišćena

Antitelo	Klon	Razblaženje	Proizvođač
CD20	L26	1:20	Dako
CD3	F7.2.38	1:20	Dako
CD15	M3631	1:20	Dako
CD30	Ber-H2	1:25	Dako
MUM-1	MUM1p(45)	1:25	Dako
Ki 67	MIB 1	1:50	Dako
VEGF	SP-28	RTU	Dako
CD34	M7165	1:25	Dako
CD68	PGM-1	RTU	Dako
FOX-P3	ab20034	1:50	Abcam

Na preparatima je određivan broj makrofaga, FOXP3 limfocita, krvnih sudova i ekspresija VEGF u vidnom polju velikog uvećanja (1000x) (eng. high-power field, hpf), na standardnom svetlosnom mikroskopu.

3.3. ANALIZA I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

U radu su od metoda deskriptivne statistike korišćene:

- mere centralne tendencije: aritmetička sredina, medijana
- mere varijabiliteta: interval varijacije (min-max) i standardna devijacija (SD)
- relativni brojevi

Od metoda analitičke statistike u radu su korišćene:

1. Metode identifikacije empirijskih raspodela
2. Metode za procenu značajnosti razlike:
 - Hi kvadrat test (χ^2 test)

U istraživanju za određivanje najoptimalnije *cut-off* vrednosti za rezultate ispitivanih bioloških parametara, a u cilju dalje statističke analize korišćena je *receiver operating characteristic* analiza (konstrukcija ROC krive).

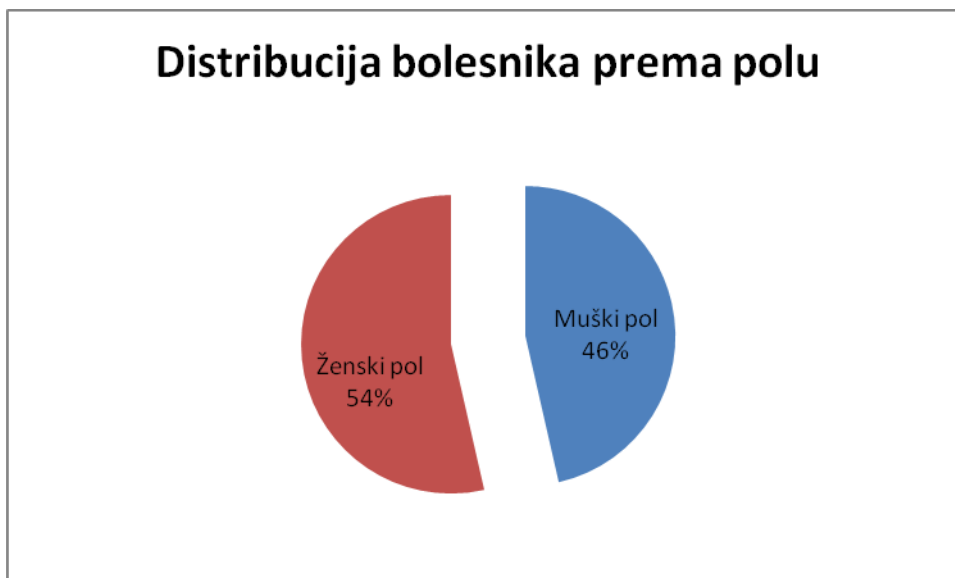
Za analizu preživljavanja korišćena je Kaplan-Meierova metoda, kao i Log Rank test za poređenje preživljavanja među ispitivanim grupama. Za utvrđivanje faktora rizika korišćen je univarijacioni i multivarijacioni Cox-ov regresioni model.

4. REZULTATI

U ovo ispitivanje uključeno je 84 bolesnika kod kojih je postavljena dijagnoza na Klinici za hematologiju KCS u periodu 2000. – 2008. godina. Medijana praćenja bolesnika je bila 75 meseci (2-150 meseci). Interval praćenja živih bolesnika je bio od 61 do 150 meseci, medijana je bila 93 meseca.

4.1. DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE BOLESNIKA, HISTOLOŠKE, KLINIČKE I BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE BOLESTI

U ispitivanoj grupi 45 (54%) bolesnika je bilo ženskog i 39 (46%) muškog pola (grafikon 1).



Grafikon 1. Distribucija bolesnika prema polu

Prosečna starosna dob bolesnika bila je $29,5 \pm 14,94$ godina, sa rasponom od 17 do 84 godine. Bolesnika starijih od 45 godina bilo je 18 (21.4%), a starijih od 60 godina 6 (7.1%).

Histološki podtip nodularne skleroze je bio verifikovan u 70 (83.3%), mešovita celularnost u 7 (8.3%), limfocitima bogat klasičan Hočkinov limfom u 2 (2.4%) bolesnika, dok u 5 (6%) bolesnika nije bio određen podtip (tabela 5). Nije bilo bolesnika sa klasičnim Hočkinovim limfomom podtip limfocitne deplecije.

Tabela 5. Histološki podtipovi klasičnog Hočkinovog limfoma u ispitivanih bolesnika

Histološki podtip	broj bolesnika
Nodularna skleroza	70 (83.3%)
Mešovita celularnost	7 (8.3%)
Limfocitima bogat cHL	2 (2.4%)
Limfocitna deplecija	0 (0%)
Neodređen podtip cHL	5 (6%)

Kliničke karakteristike ispitivanih bolesnika prikazane su u tabeli 6. Prvi klinički stadijum imalo je 3 (4%) bolesnika, II klinički stadijum 39 (46%) bolesnika, III klinički stadijum 25 (30%), a 17 (20% bolesnika) imalo je klinički stadijum IV. B simptomi su bili prisutni u 50 (60%) bolesnika. Po GHSG kriterijumima, rani povoljni stadijum imalo je 6 (7%) bolesnika, rani nepovoljni klinički stadijum 23 (27%), a uznapredovala bolest 55 (66%) bolesnika. Veliku, „bulky“ tumorsku masu imalo je 39 (46%) bolesnika.

Tabela 6. Kliničke karakteristike ispitivanih bolesnika

Kliničke karakteristike	broj bolesnika
CS I	3 (4%)
CS II	39 (46%)
CS III	25 (30%)
CS IV	17 (20%)
B simptomi	50 (60%)
Rani povoljni stadijum	6 (7%)
Rani nepovoljni stadijum	23 (27%)
Uznapredovala bolest	55 (66%)
Velika „bulky“ tumorska masa	39 (46%)

Laboratorijske karakteristike ispitivanih bolesnika su prikazane u tabeli 7. Anemija sa $Hb < 105$ g/l je bila prisutna kod 27 bolesnika (32%). Leukocitozu veću od $15 \times 10^9/l$ je imalo 18 (22%) bolesnika, a limfopeniju sa manje od $0,6 \times 10^9/l$ ili manje od 8% limfocita u leukocitarnoj formuli imalo je 9 (11%) bolesnika. Hipoalbuminemija (< 40 g/l) je zabeležena kod 36 (43%) bolesnika. Povišenu aktivnost LDH imalo je 35

(42%) bolesnika. Ubrzanu sedimentaciju eritrocita preko 50 mm/h imalo je 46 (55%) bolesnika.

Tabela 7. Laboratorijske karakteristike ispitivanih bolesnika

Laboratorijski parametri	broj bolesnika
Hb<105 g/l	27 (32%)
WBC>15x10 ⁹ /l	18 (22%)
Ly<0,6x10 ⁹ /l ili Ly<8% u LF	9 (11%)
albumin<40 g/l	36 (43%)
LDH>ULN	35 (42%)
SE>50 mm/1.h	46 (55%)

IPS prognostički indeks je određen u svih bolesnika. Visok IPS skor (≥ 3) imalo je 29 (35%) bolesnika, a nizak 55 (65%) bolesnika (tabela 8).

Tabela 8. IPS prognostički skor u ispitivanih bolesnika

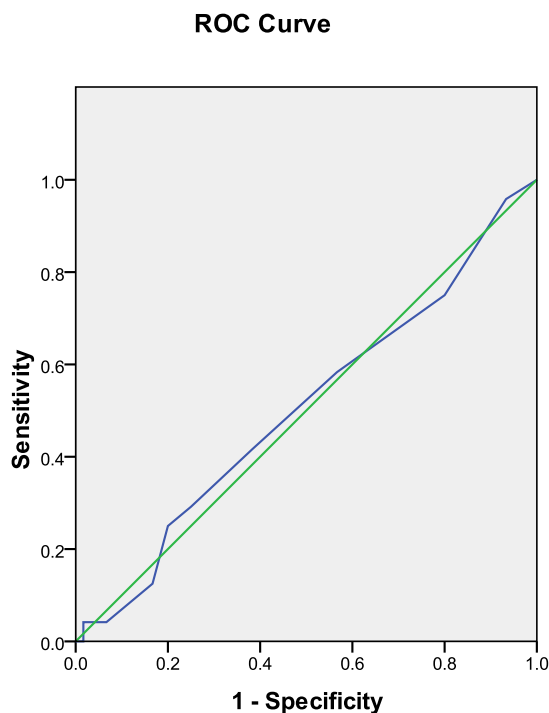
IPS	nizak (0-2)	55 (65%)
	visok (3-7)	29 (35%)

4.2. UTICAJ ANGIOGENEZE NA PREŽIVLJAVANJE

U cilju procene uticaja angioneze u tumoru ispitivana je statistička značajnost gustine krvnih sudova u tumorskom tkivu i prisustvo ekspresije VEGF. Eventualno postojanje najsignifikantnije vrednosti koja bi bila presek (*cut-off*) za ispitivanje značajnosti broja krvnih sudova po polju velikog uvećanja ispitivana je pomoću ROC krive, a ukoliko na ovaj način nije moglo biti utvrđeno ispitivana je i značajnost broja krvnih sudova po polju velikog uvećanja ispod i iznad vrednosti medijane.

4.2.1. UTICAJ GUSTINE KRVNIH SUDOVA NA PREŽIVLJAVANJE

Na grafikonu 2 prikazana je ROC kriva za ispitivanje optimalnog nivoa preseka vrednosti broja krvnih sudova po polju velikog uvećanja u odnosu na ukupno preživljavanje, a koja bi bila korišćena za dalja ispitivanja.

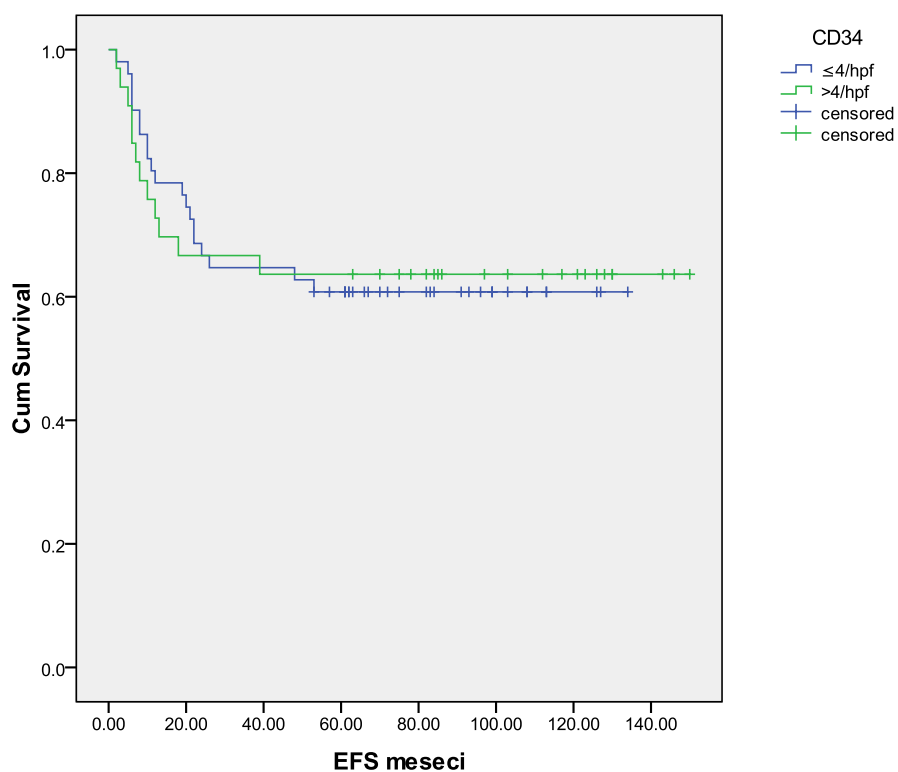


Grafikon 2. ROC kriva – gustina krvnih sudova u odnosu na ukupno preživljavanje

Pomoću ROC krive nije dobijena vrednost preseka sa najvećom statističkom značajnošću ($p=0,957$).

S obzirom na navedeno, određivanje eventualnog uticaja gustine krvnih sudova na preživljavanje vršeno je prema vrednosti medijane koja je iznosila 4 krvna suda po polju velikog uvećanja.

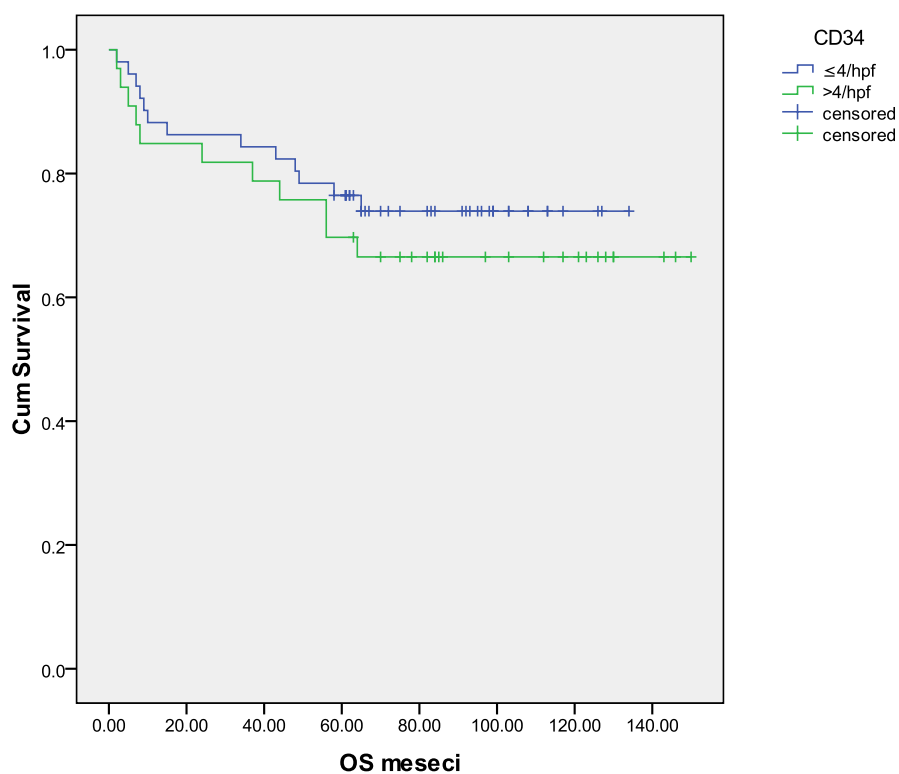
EFS bolesnika sa ≤ 4 i > 4 krvna suda po hpf prikazano je na grafikonu 3.



Grafikon 3. Kaplan-Meirova kriva EFS bolesnika u odnosu na ≤ 4 i > 4 krvna suda po hpf

Dobijena razlika između ispitivanih grupa prema broju krvnih sudova na hpf nije statistički značajna (log-rank 0,001, $p>0,05$).

OS bolesnika sa ≤ 4 i > 4 krvna suda po hpf prikazano je na grafikonu 4.

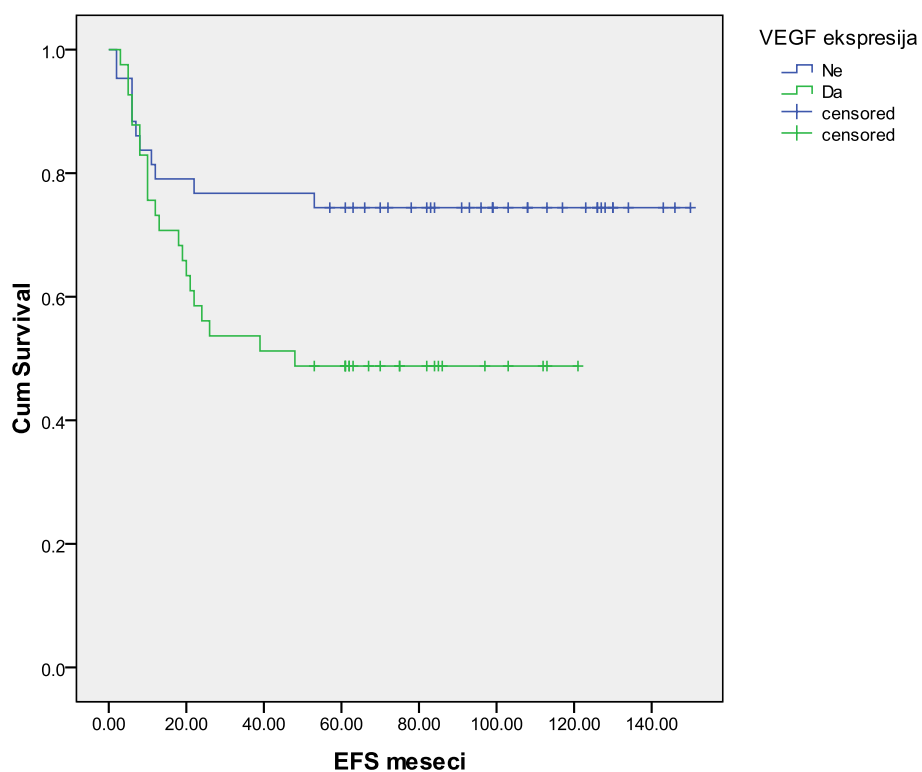


Grafikon 4. Kaplan-Meirova kriva OS bolesnika u odnosu na ≤ 4 i > 4 krvna suda po hpf

Dobijena razlika ukupnog preživljavanja između ispitivanih grupa prema broju krvnih sudova na hpf nije statistički značajna (log-rank 0,558, $p>0,05$).

4.2.2. UTICAJ VEGF EKSPRESIJE NA PREŽIVLJAVANJE

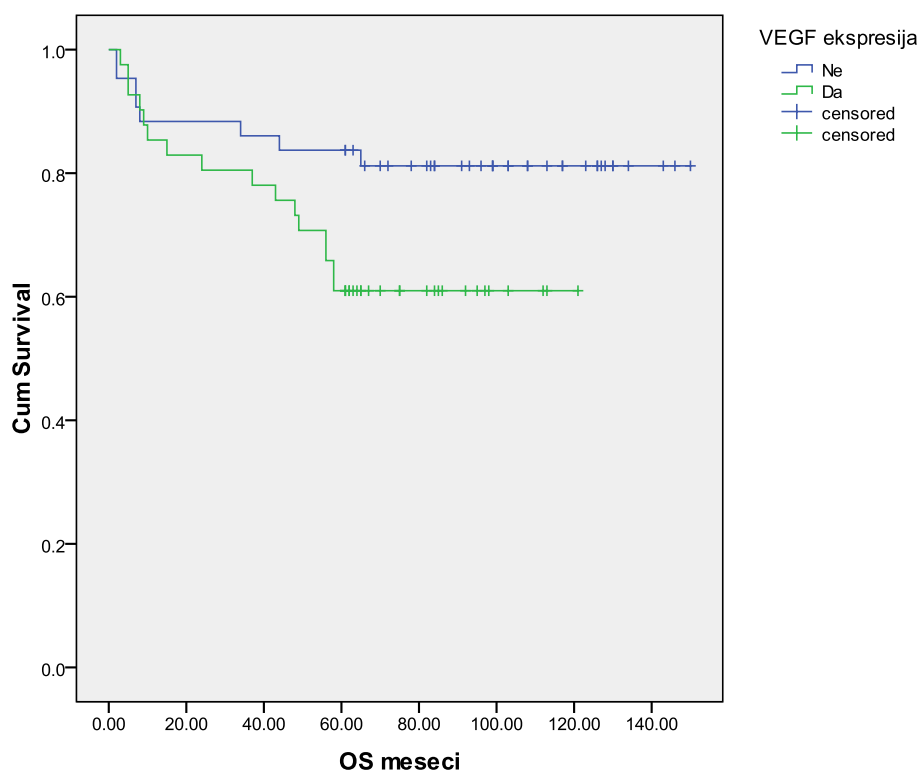
EFS bolesnika u zavisnosti od ekspresije VEGF prikazano je na grafikonu 5.



Grafikon 5. Kaplan-Meirova kriva verovatnoće EFS bolesnika u odnosu na ekspresiju VEGF

Dobijena razlika između ispitivanih grupa prema ekspresiji VEGF je statistički značajna (log-rank 4,945, $p < 0,05$).

OS bolesnika u zavisnosti od ekspresije VEGF prikazano je na grafikonu 6.



Grafikon 6. Kaplan-Meirova kriva verovatnoće OS bolesnika u odnosu na ekspresiju VEGF

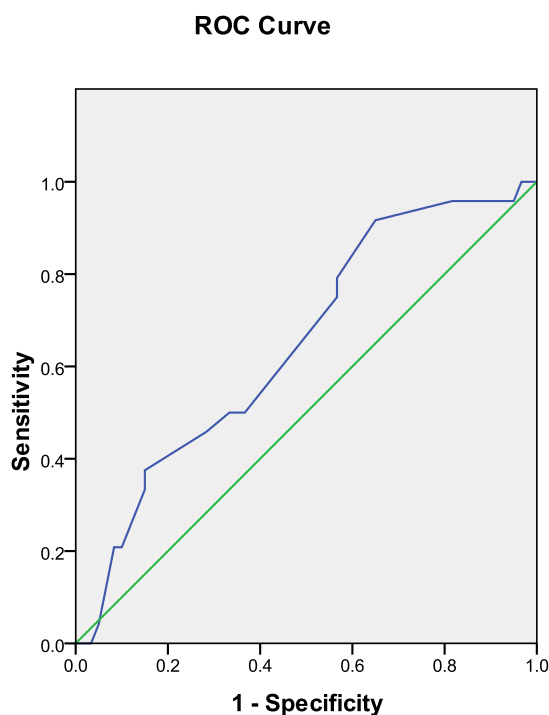
Dobijena razlika između ispitivanih grupa prema ekspresiji VEGF je statistički značajna (log-rank 3,866, $p < 0,05$).

4.3. UTICAJ MIKROSREDINE TUMORA NA PREŽIVLJAVANJE

U cilju procene uticaja mikrosredine tumora na ishod bolesti ispitivana je statistička značajnost prisustva makrofaga i FOXP3 limfocita u tumorskom tkivu. Eventualno postojanje najsignifikantnije vrednosti koja bi bila presek (*cut-off*) za ispitivanje značajnosti broja makrofaga, odnosno FOXP3 limfocita po polju velikog uvećanja utvrđivana je pomoću ROC krive, a ukoliko na ovaj način nije mogla biti utvrđena vrednost preseka, ispitivana bi bila značajnost broja makrofaga i limfocita po polju velikog uvećanja ispod i iznad vrednosti medijane.

4.3.1. UTICAJ BROJA MAKROFAGA U TUMORU NA PREŽIVLJAVANJE

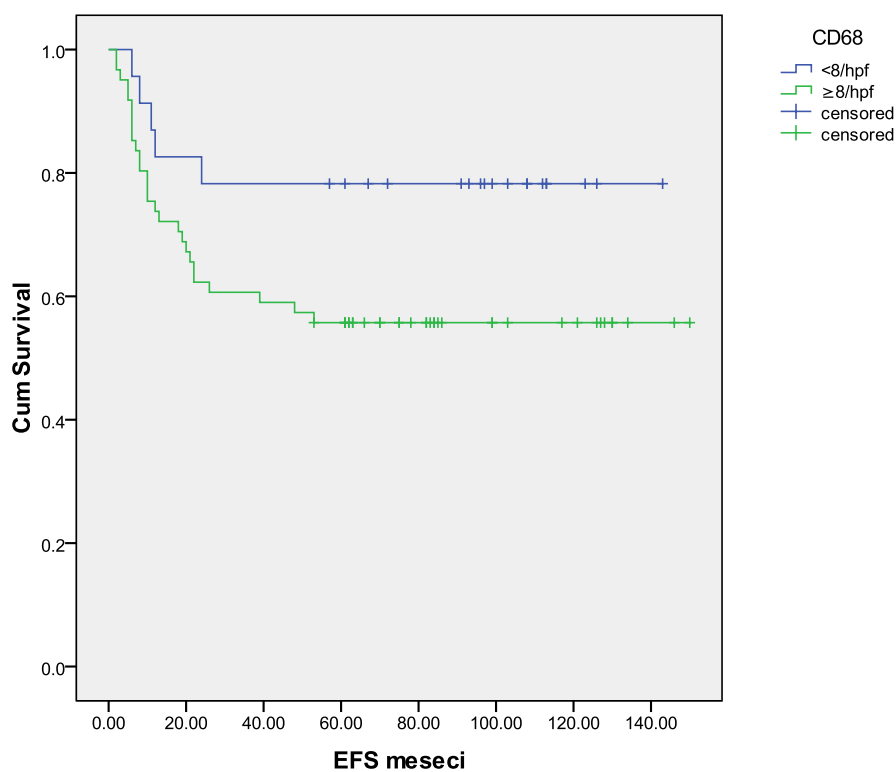
Na grafikonu 7 prikazana je ROC kriva za ispitivanje optimalnog nivoa preseka vrednosti broja makrofaga po polju velikog uvećanja (TAM) u odnosu na ukupno preživljavanje, a koja bi bila korišćena za dalja ispitivanja.



Grafikon 7. ROC kriva – broj makrofaga po hpf u odnosu na na ukupno preživljavanje

Pomoću ROC krive određena je vrednost preseka od 8 i više makrofaga po hpf, kao presek sa najvećim statističkim značajem ($p=0,035$).

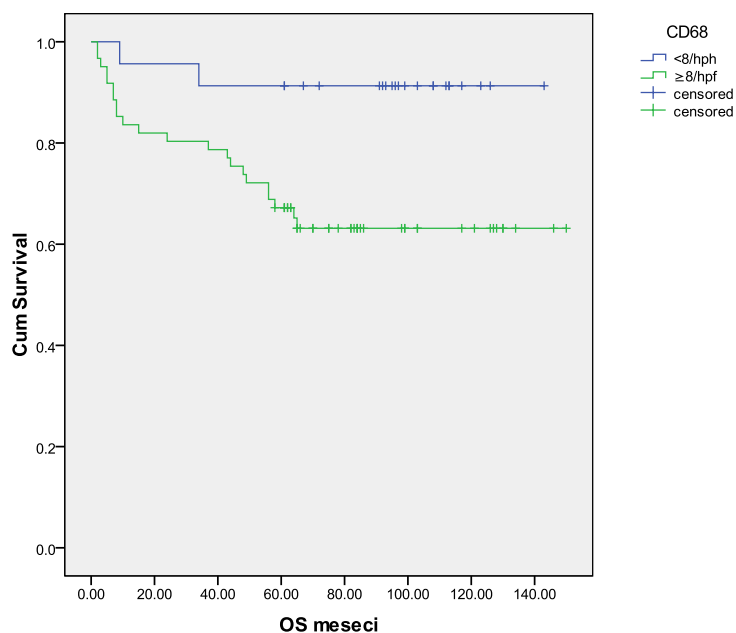
EFS bolesnika sa ≥ 8 i < 8 makrofaga po hpf prikazano je na grafikonu 8.



Grafikon 8. Kaplan-Meirova kriva EFS bolesnika u odnosu na ≥ 8 i < 8 makrofaga po hpf

Postojala je tendencija ka lošijem preživljavanju bolesnika sa ≥ 8 makrofaga -hpf, ali dobijena razlika između ispitivanih grupa nije statistički značajna (log-rank 3,334, $p > 0,05$).

OS bolesnika sa ≥ 8 i < 8 makrofaga po hpf prikazano je na grafikonu 9.

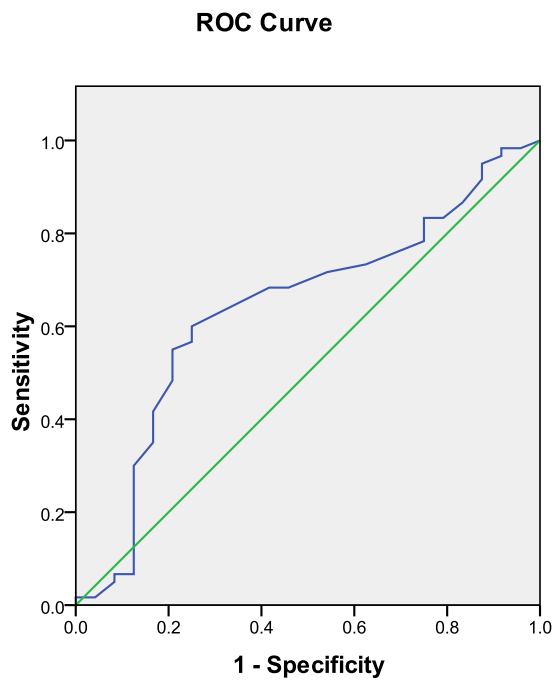


Grafikon 9. Kaplan-Meirova kriva OS bolesnika u odnosu na ≥ 8 i < 8 makrofaga po hpf

Dobijena razlika između ispitivanih grupa prema broju makrofaga na hpf je statistički značajna (log-rank 5,674, $p < 0,05$).

4.3.2. UTICAJ BROJA FOXP3 LIMFOCITA U TUMORU NA PREŽIVLJAVANJE

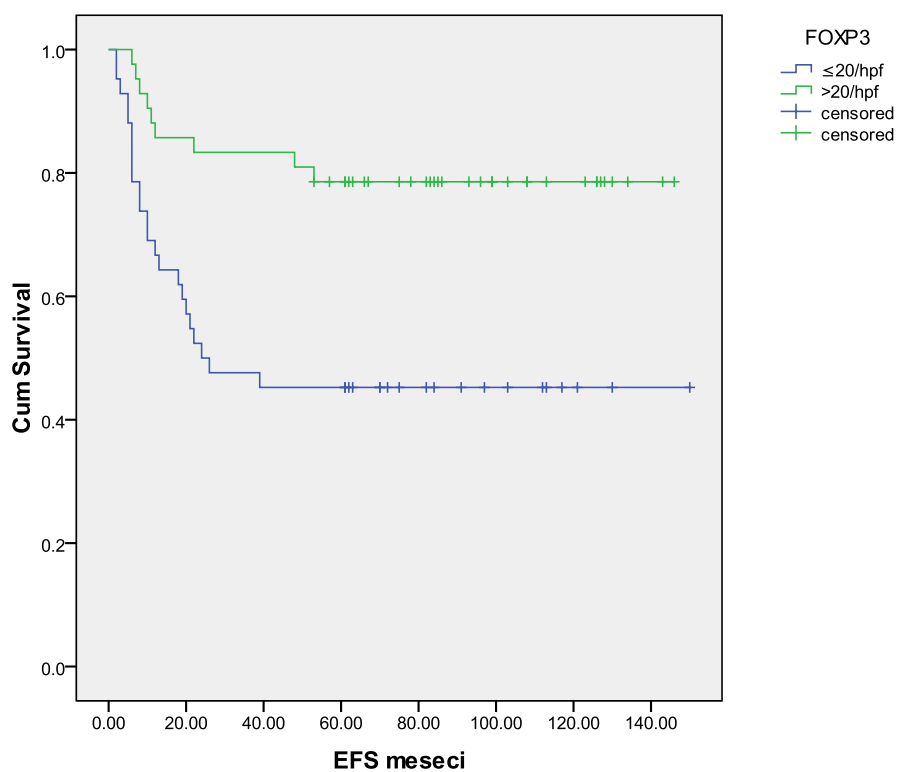
Na grafikonu 10 prikazana je ROC kriva za ispitivanje optimalnog nivoa preseka vrednosti broja FOXP3 limfocita po polju velikog uvećanja u odnosu na ukupno preživljavanje, a koja bi bila korišćena za dalja ispitivanja.



Grafikon 10. ROC kriva – broj FOXP3 limfocita po hpf u odnosu na ukupno preživljavanje

Pomoću ROC krive određena je vrednost preseka od 20 i manje FOXP3 limfocita po hpf, kao presek sa najvećim statističkim značajem ($p=0,048$).

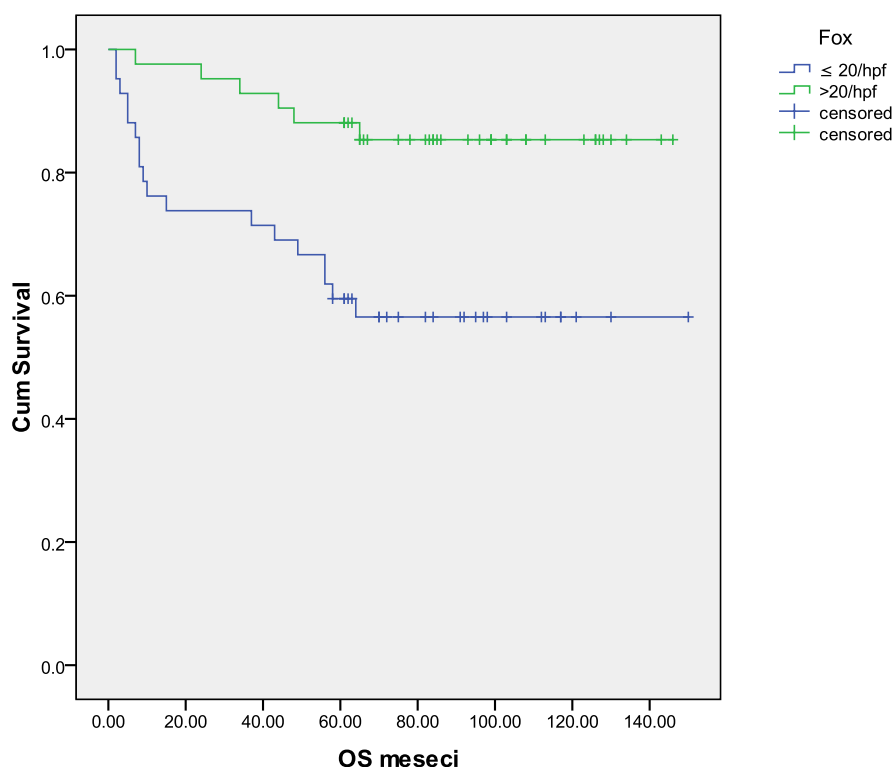
EFS bolesnika sa ≤ 20 i > 20 FOXP3 limfocita po hpf prikazano je na grafikonu 11.



Grafikon 11. Kaplan-Meirova kriva EFS bolesnika u odnosu na ≤ 20 i > 20 FOXP3 limfocita po hpf

Dobijena razlika između ispitivanih grupa je visoko statistički značajna (log-rank 10,675, $p < 0,01$).

OS bolesnika sa ≤ 20 i > 20 FOXP3 limfocita po hpf prikazano je na grafikonu 12.



Grafikon 12. Kaplan-Meirova kriva OS bolesnika u odnosu na ≤ 20 i > 20 FOXP3 limfocita po hpf

Dobijena razlika između ispitivanih grupa prema broju FOXP3 limfocita po hpf je visoko statistički značajna (log-rank 8,981, $p < 0,01$).

4.4. ANALIZA UDRUŽENOSTI ANGIOGENEZE I ĆELIJA MIKROSREDINE TUMORA

U odnosu na medijanu broja krvnih sudova po hpf i ekspresiju VEGF, ispitivana je povezanost sa brojem makrofaga po hpf i FOXP3 limfocita po hpf. Takođe, ispitivana je udruženost ekspresije VEGF i broja krvnih sudova po hpf. Dobijeni rezultati prikazani su u sledećim tabelama.

Tabela 9. Distribucija gustine krvnih sudova u odnosu na makrofage u tumoru

CD68	K. sudova ≤ 4 /hpf	K. sudova > 4 /hpf	Ukupno
≥ 8 /hpf	32	29	61
< 8 /hpf	19	4	23
Svega	51	33	84

Rezultati analize ukazuju na postojanje udruženosti gustine krvnih sudova i broja makrofaga po hpf ($X^2=6,365$; $df=1$; $p<0,05$)

Tabela 10. Distribucija gustine krvnih sudova u odnosu na FOXP3 limfocite u tumoru

FOXP3	K. sudova ≤ 4 /hpf	K. sudova > 4 /hpf	Ukupno
≤ 20 /hpf	25	17	42
> 20 /hpf	26	16	42
Svega	51	33	84

Rezultati analize ukazuju da ne postoji udruženost gustine krvnih sudova i broja broja FOXP3 limfocita po hpf ($X^2=0,823$; $df=1$; $p>0,05$)

Tabela 11. Distribucija ekspresije VEGF u odnosu na makrofage u tumoru

CD68	VEGF -	VEGF +	Ukupno
≥ 8 /hpf	29	32	61
< 8 /hpf	14	9	23
Svega	43	41	84

Rezultati analize ukazuju da ne postoji udruženost ekspresije VEGF i broja monocita po hpf ($X^2=1,188$; $df=1$; $p>0,05$)

Tabela 12. Distribucija ekspresije VEGF u odnosu na FOXP3 limfocite u tumoru

FOXP3	VEGF -	VEGF +	Ukupno
≤ 20 /hpf	15	27	42
> 20 /hpf	28	14	42
Svega	43	41	84

Rezultati analize ukazuju da je ekspresija VEGF značajno veća u slučaju malog broja FOXP3 limfocita po hpf ($X^2=8,052$; $df=1$; $p<0,05$)

Tabela 13. Distribucija ekspresije VEGF u odnosu na gustinu krvnih sudova u tumoru

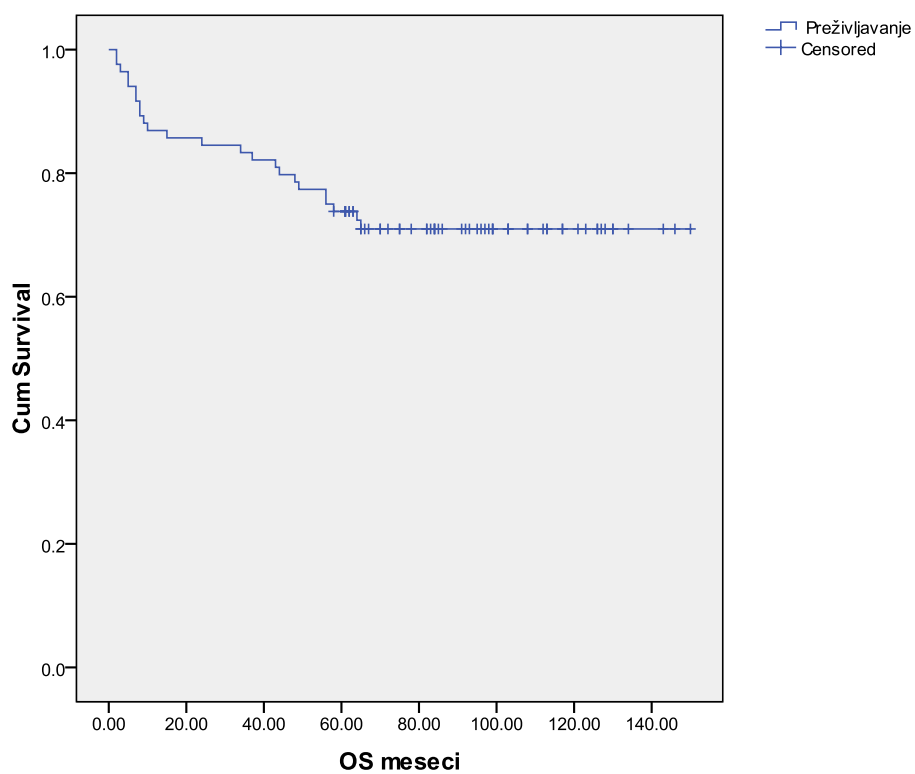
K. sudova/hpf	VEGF -	VEGF +	Ukupno
≤ 4	19	17	36
> 4	24	24	48
Svega	43	41	84

Rezultati analize ukazuju da ne postoji udruženost ekspresije VEGF sa gustinom krvnih sudova ($X^2=0,159$; $df=1$; $p>0,05$)

4.5. ANALIZA PREŽIVLJAVANJA BOLESNIKA

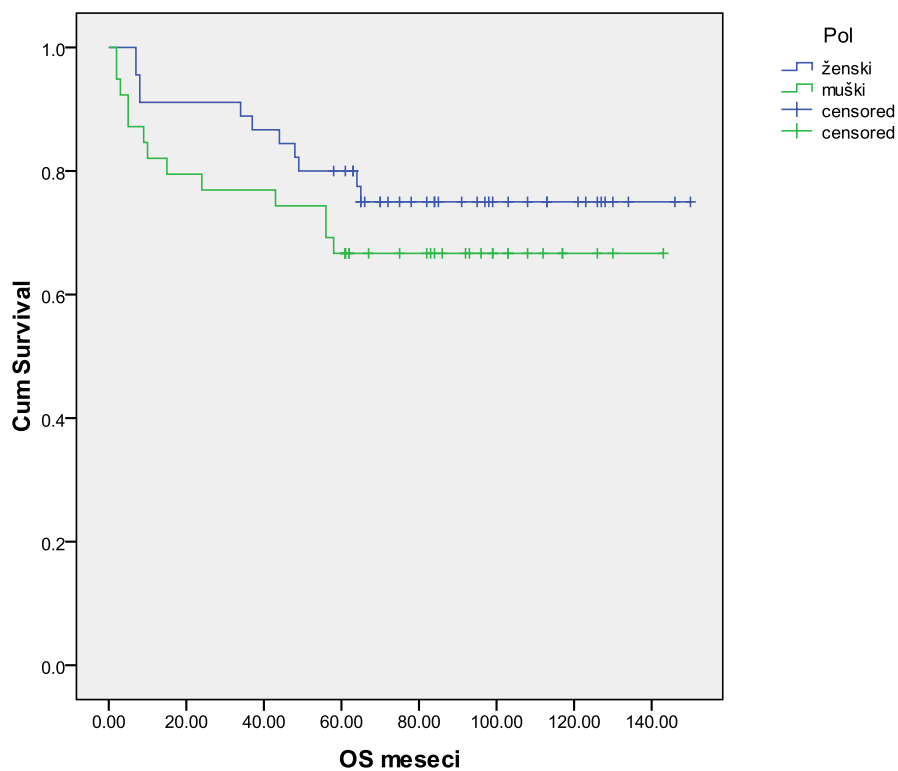
Od 84 ispitivanih bolesnika 60 (71%) su živi, a 24 (29%) ih je umrlo. Petogodišnje preživljavanje imalo je 62 (74%) bolesnika.

Kaplan-Meirova kriva verovatnoće preživljavanja je prikazana na grafikonu 13.



Grafikon 13. Kaplan-Meirova kriva verovatnoće ukupnog preživljanja

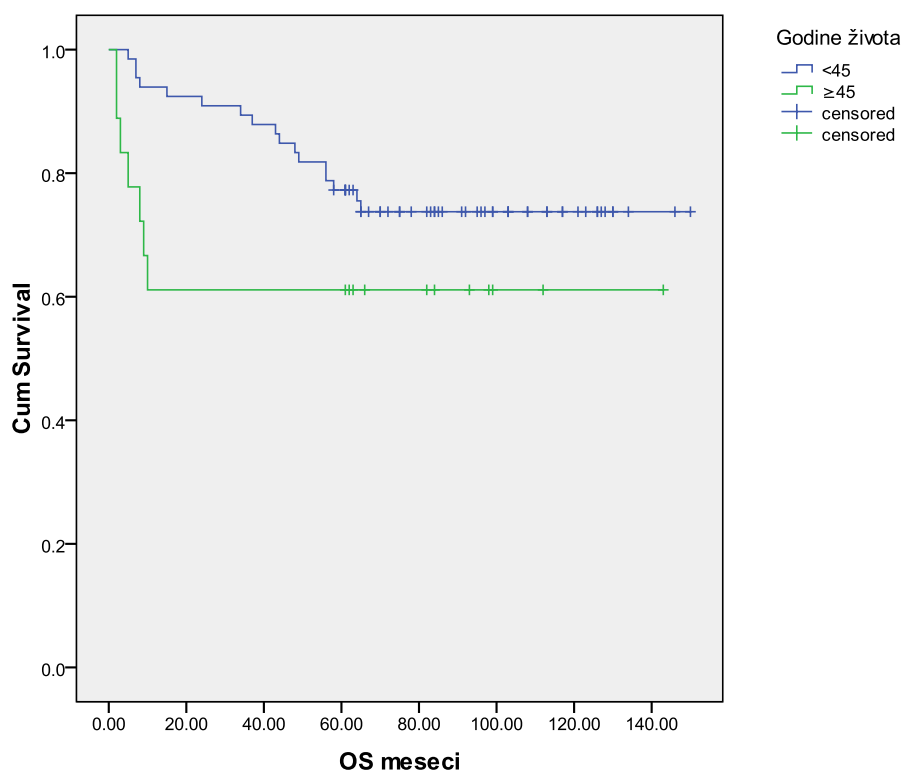
Preživljanje bolesnika prema polu prikazano je na grafikonu 14.



Grafikon 14. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće ukupnog preživljavanja prema polu

Dobijena razlika između ispitivanih grupa nije bila statistički značajna (log-rank 1,098, $p > 0,05$).

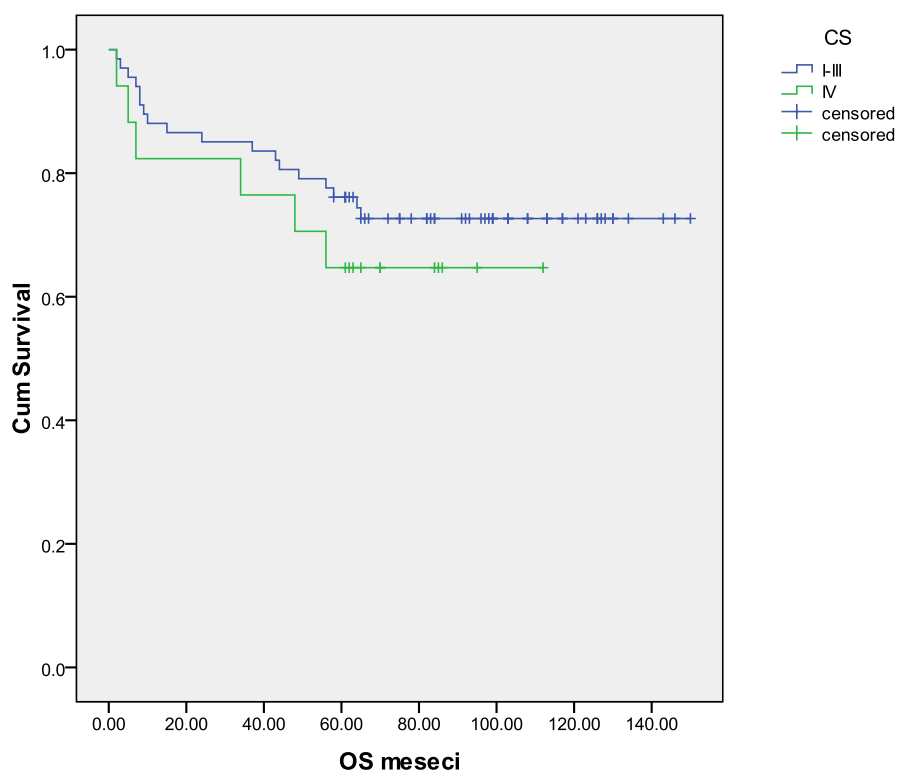
Preživljavanje bolesnika prema starosnoj dobi prikazano je na grafikonu 15.



Grafikon 15. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće ukupnog preživljavanja prema starosnoj dobi

Dobijeni rezultati ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju prema starosnoj dobi ispitivanih grupa (log-rank 2,409, $p > 0,05$).

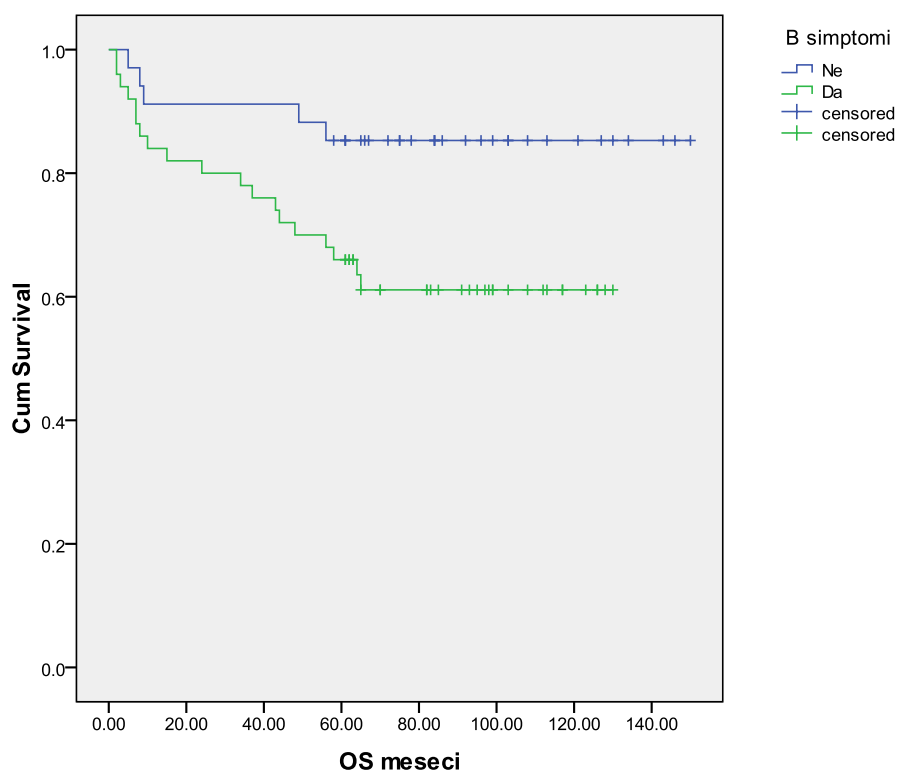
Preživljavanje bolesnika prema kliničkom stadijumu prikazano je na grafikonu 16.



Grafikon 16. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće ukupnog preživljavanja prema kliničkom stadijumu

Dobijena razlika u ukupnom preživljavanju prema kliničkom stadijumu, četvrtom ili ne, nije statistički značajna (log-rank 0,626, $p > 0,05$).

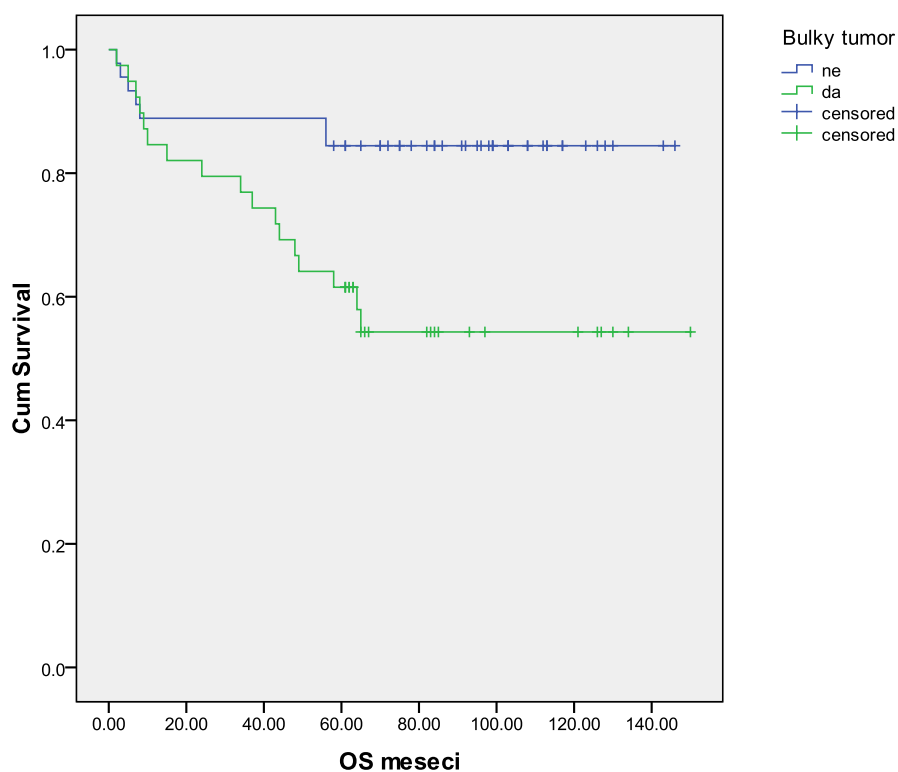
Preživljavanje bolesnika prema prisustvu ili odsustvu B simptoma prikazano je na grafikonu 17.



Grafikon 17. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće preživljavanja prema prisustvu B simptoma

Dobijeni rezultati ukazuju da postoji značajno bolje preživljavanje bolesnika koji nemaju B simptomatologiju (log-rank 5,212, $p < 0,05$).

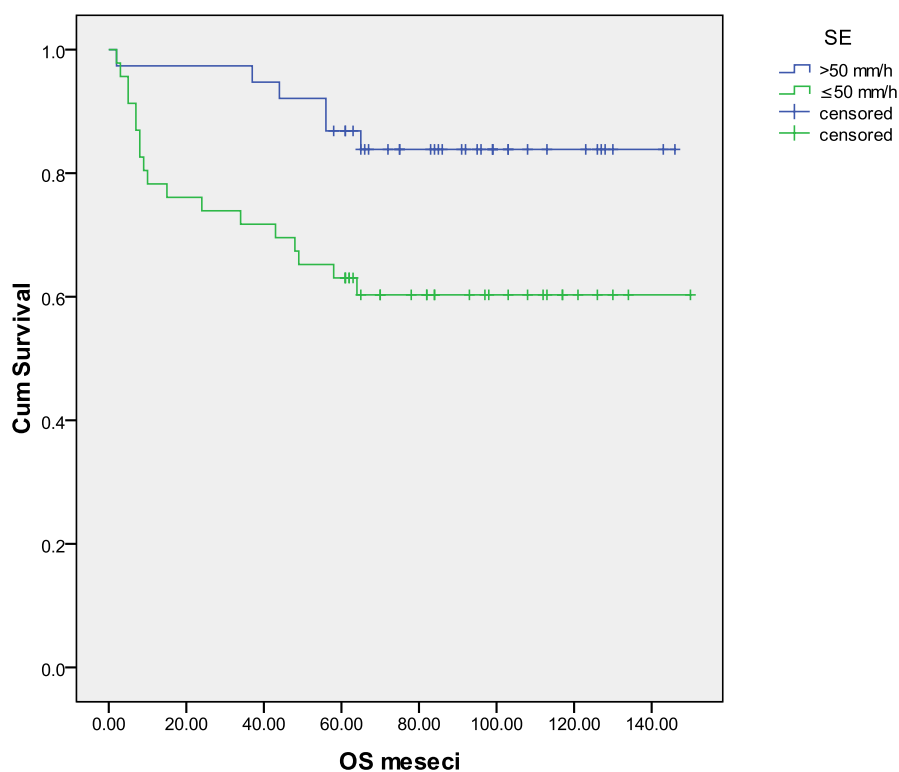
Preživljavanje bolesnika prema velikoj „bulky“ tumorskoj masi prikazano je na grafikonu 18.



Grafikon 18. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće preživljavanja prema „bulky“ velikoj tumorskoj masi

Bolesnici koji nisu imali veliki „bulky“ tumor imali su vrlo značajno lošije preživljavanje (log-rank 7,676, $p < 0,01$).

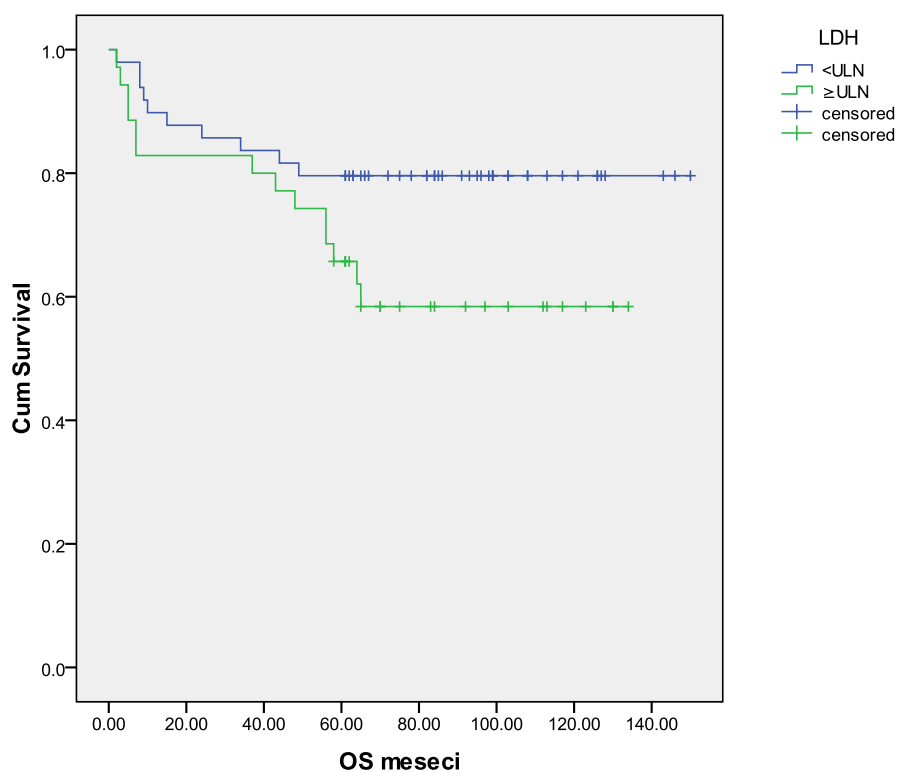
Preživljavanje bolesnika u zavisnosti od brzine sedimentacije prikazana je na grafikonu 19.



Grafikon 19. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće preživljavanja u zavisnosti od brzine sedimentacije

Dobijena razlika ukazuje na značajno kraće preživljavanje bolesnika koji su imali $SE > 50$ mm/h. Ova razlika je visoko statistički značajna (log rank 6,189, $p < 0,01$).

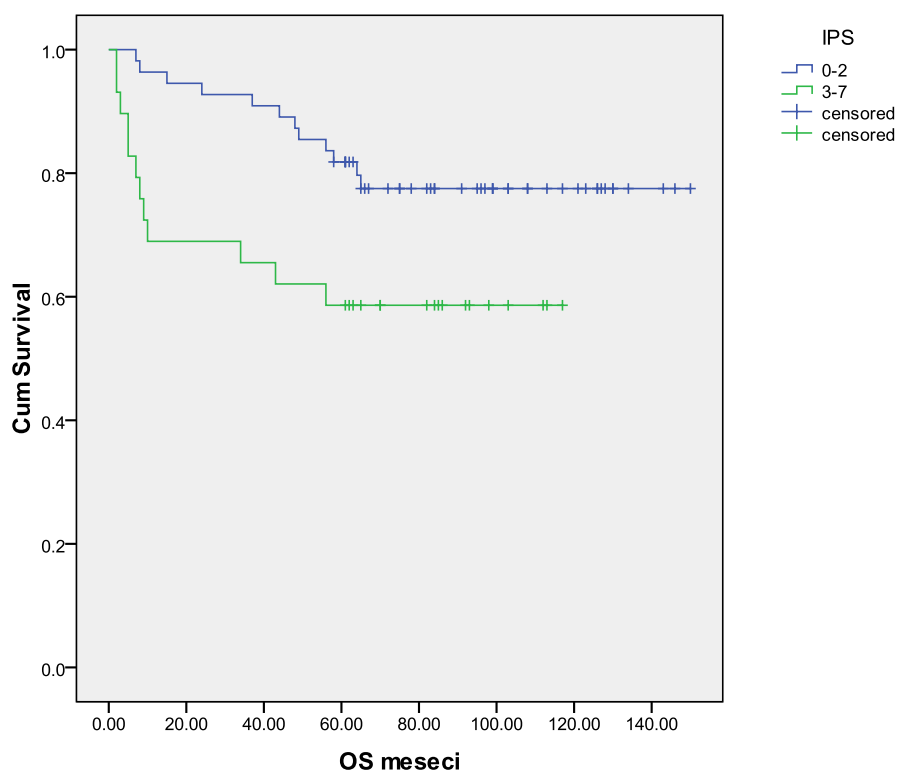
Preživljavanje bolesnika u zavisnosti od aktivnosti LDH prikazana je na grafikonu 20.



Grafikon 20. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće preživljavanja u zavisnosti od aktivnosti LDH

Dobijena razlika ukazuje na kraće preživljavanje bolesnika koji su imali povišenu aktivnost LDH, ali ova razlika nije statistički značajna (log rank 3,618, $p > 0,05$).

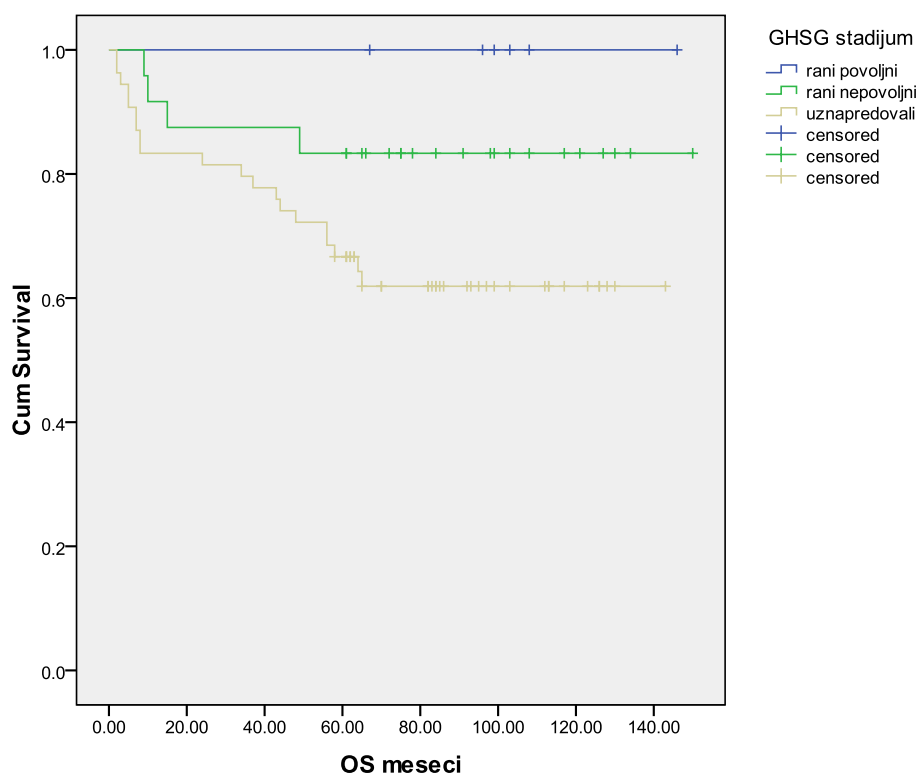
Preživljavanje bolesnika u zavisnosti od vrednosti IPS skora prikazana je na grafikonu 21.



Grafikon 21. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće preživljavanja u zavisnosti od vrednosti IPS skora.

Dobijena razlika ukazuje na značajno kraće preživljavanje bolesnika koji su imali vrednost IPS skora 3-7 (log rank 5, 910, $p < 0,05$).

Preživljavanje bolesnika u zavisnosti od stadijuma po GHSG prikazano je na grafikonu 22.



Grafikon 22. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće preživljavanja u zavisnosti od stadijuma po GHSG.

Dobijena razlika ukazuje na trend kraćeg preživljavanja bolesnika u zavisnosti od stadijuma bolesti po GHSG, ali ova razlika nije statistički značajna (log rank 5,127, $p > 0,05$).

4.6. UPOREDNA ANALIZA KLINIČKO-LABORATORIJSKIH I BIOLOŠKIH PARAMETARA U CILJU FORMIRANJA OPTIMALNOG PROGNOŠTIČKOG MODELA

U cilju identifikacije potencijalnih faktora rizika za loše preživljavanje korišćena je univarijantna i multivarijantna Cox-ova regresiona analiza.

Rezultati univarijantne Cox-ove regresione analize su pokazani u tabeli 14.

Tabela 14. Univarijantna Cox-ova regresiona analiza

Ispitivana karakteristika	P	RR (relativni rizik)	95% interval poverenja
CD34	0,918		
VEGF	0,053	2,313	0,988-5,418
TAM	0,032	4,878	1,146-20,762
FOXP3	0,005	3,726	1,477-9,399
Pol	0,296		
starost u vreme dg >60 godina	0,122		
CS IV	0,430		
B simptomi	0,030	2,976	1,110-7,977
Bulky	0,009	3,248	1,342-7,858
SE > 50 mm/1.h	0,018	3,046	1,207-7,687
LDH	0,058		
IPS	0,029	2,437	1,093-5,431
Cotswold rizik	0,034	2,889	1,084-7,700

U univarijantnoj Cox-ovoj regresionoj analizi značajno lošiju prognozu imaju bolesnici koji ekspimiraju VEGF, imaju visok broj CD68 makrofaga u tumoru, mali broj FOXP3 limfocita u tumoru, imaju B simptome, Bulky bolest, ubranu sedimentaciju >50 mm/1.h, visok IPS skor i visok Cotswold rizik.

Prema multivarijantnoj Cox-ovoj analizi za biomarkere visok broj TAM i nizak broj FOXP3 su nezavisni prognostni faktori (tabela 15), dok su u grupi kliničkih parametara visok IPS skor i Bulky bolest identifikovani kao nezavisni prognostički faktori (tabela 16).

Tabela 15. Multivarijantna Cox-ova regresiona analiza za biomarkere

Ispitivana karakteristika	P	RR (relativni rizik)	95% interval poverenja
VEGF	0,280		
TAM	0,034	4,811	1,129-20,507
FOXP3	0,006	3,690	1,460-9,325

Tabela 16. Multivarijantna Cox-ova regresiona analiza za kliničke parametre

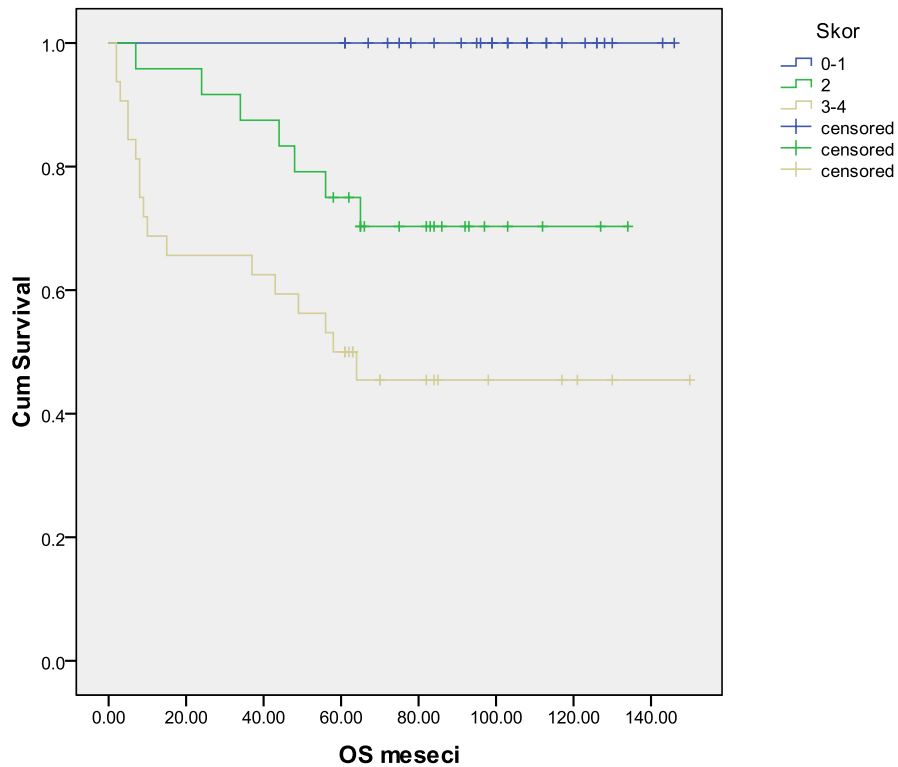
Ispitivana karakteristika	P	RR (relativni rizik)	95% interval poverenja
B simptomi	0,153		
Bulky	0,002	4,162	1,685-10,277
SE > 50 mm/1.h	0,373		
IPS	0,004	3,283	1,446-7,453
Cotswold rizik	0,114		

4.7. PROGNOŠTIČKI MODEL

Na osnovu kumulativnog skora identifikovanih nezavisnih prognostičkih faktora napravljen je prognozni skor za OS koji obuhvata dva biološka i dva klinička parametra. Broj bolesnika u svakoj grupi bio je: 6 bolesnika nije imalo ni jedan faktor; 22 je imalo jedan faktor; 24 je imalo dva faktora; 27 je imalo tri faktora; 5 je imalo sva četiri faktora. Unutargrupnom analizom utvrđeno je da ne postoji razlika u OS među bolesnicima koji imaju kumulativni skor od 0 i 1 ($p=1.0$) i kod onih sa skorom od 3 i 4 ($p=0.072$).

Na osnovu ovih rezultata definisan je model preživljavanja koji stratifikuje bolesnike u 3 grupe rizika – nizak, srednji i visok. Bolesnici koji nemaju ni jedan ili imaju samo jedan prognostički faktor pripadaju niskom riziku, sa dva faktora su intermedijerni rizik, sa tri ili sa četiri su visok rizik. Primenom ovog modela na analiziranu grupu ukupno 28 (33.3%) bolesnika u analiziranoj grupi imali su nizak rizik, 24 (28.6%) srednji, a 32 (38.1%) visok rizik. Petogodišnje ukupno preživljavanje bilo je progresivno lošije

prema grupama rizika: kod bolesnika sa niskim rizikom bio je 100%, srednjim 75%, a visokim 50% (log rank 22,257, p=0.000) (grafikon 23).



Grafikon 23. Kaplan-Meierova kriva verovatnoće preživljavanja prema definisanom kombinovanom biološko-kliničkom modelu

5. DISKUSIJA

Moderan pristup u lečenju Hočkinovog limfoma rezultirao je sa oko 90% postignutih remisija nakon inicijalne terapije (136). Međutim, čak oko jedna trećina bolesnika koji su u visokom riziku na prezentaciji ima progresivnu bolest ili u daljem toku recidivira (137). Savremen terapijski pristup bolesnicima sa HL podrazumeva da se pre izbora i primene početnog lečenja bolesnici klasifikuju u podgrupe prema riziku za loš ishod i da na osnovu toga bude primenjeno lečenje. Ipak, i dalje je prisutan značajan procenat bolesnika sa progresivnom bolešću ili recidivom bolesti što stvara potrebu za još boljom stratifikacijom rizika kako bi bili prepoznati bolesnici kod kojih se ne može očekivati dobar odgovor na standardne terapijske pristupe, a u cilju iznalaženja efikasnijeg terapijskog pristupa (138). Dodatnu potrebu za utvrđivanjem još preciznijih prognostičkih faktora nameću i težnje ka smanjenju toksičnosti lečenja, obzirom da se smatra da se u današnje vreme kod oko trećine bolesnika primenjuju veće terapijske doze nego što je to potrebno (137).

Faktori koji mogu uticati na ishod lečenja i prognozu uključuju faktore vezane za tumor (patohistološke karakteristike, raširenost bolesti, biologija tumora), pacijenta (demografske karakteristike, komorbiditeti) i faktore spoljne sredine (socioekonomski status, dostupnost i kvalitet zdravstvene usluge) (139). Oni mogu da posluže kao parametri na osnovu kojih kliničar može, sa manjom ili većom sigurnošću da shodno riziku za loš ishod, usmeri lečenje bolesnika. Na osnovu faktora koji ulaze u sastav jedinog rutinski korišćenog multifaktorskog prognostičkog modela, IPS skora, moglo bi se reći da prognoza bolesnika zavisi od interakcije između dve grupe parametara, onih koji pripadaju tumoru i onih koji pripadaju bolesniku (58).

Bolje razumevanje molekularnih abnormalnosti koje se nalaze u osnovi bolesti mogu voditi ka poboljšanju stratifikacije rizika bolesnika i, što je još važnije, mogli bi da dovedu do iznalaženja novih meta na osnovu kojih bi se dizajnirali novi lekovi i budući terapijski protokoli (140).

Naše istraživanje je obuhvatilo ispitivanje angiogeneze i tumorske mikrosredine kod bolesnika sa novodijagnostikovanom Hočkinovim limfomom, njihov prognostički značaj i eventualno prisustvo njihove međusobne povezanosti. Takođe, statistički opsežno ispitivana je i potencijalna mogućnost njihovog kombinovanja sa

demografskim, kliničkim i laboratorijskim karakteristikama u cilju bolje prognostičke stratifikacije bolesnika kroz formiranje optimalnog inicijalnog prognostičkog modela.

Uzorak je činilo 84 bolesnika, od kojih je 60 živih i 24 umrlih, sa medijanom praćenja 75 meseci za celu grupu, odnosno 93 meseca za žive bolesnike. Ispitivani su ekspresija VEGF, gustina krvnih sudova, prisustvo TAM i FOXP3 limfocita u tumoru, pol i starosna dob bolesnika u vreme dijagnoze, klinički stadijum, prisustvo ili odsustvo B simptoma, prisustvo ili ne velike tumorske mase (bulky disease), vrednost SE, LDH i IPS skor.

Rezultati naše studije utvrdili su po dva nezavisna prognozna faktora među biološkim i kliničkim parametrima kod bolesnika sa novodijagnostikovanim HL koji utiču na ukupno preživljvanje. Visok broj TAM ($p=0,034$) i nizak broj FOXP3 limfocita ($p=0,006$) u tumorskom tkivu su nezavisni biološki prognozni faktori za OS, dok su to među kliničkim parametrima prisustvo bulky tumorske mase ($p=0,002$) i visok IPS ($p=0,004$). Takođe, naša ispitivanja su identifikovala nizak broj FOXP3 limfocita ($p=0,002$) u tumorskom tkivu kao nezavisni biološki prognozni faktor, odnosno visok IPS ($p=0,011$) kao nezavistan klinički prognozni faktor za EFS. Kombinovanjem zbiru nepovoljnih prognostičkih faktora koje smo utvrdili za OS (TAM, FOXP3, bulky tumorska masa i visok IPS) dizajnirali smo kombinovani biološko-klinički prognostički model ($p=0,000$) koji stratifikuje bolesnike u 3 grupe rizika za loš ishod - nizak rizik (0-1 faktor), srednji rizik (2 faktora) i visok rizik (3-4 faktora).

Ispitivanja o uticaju angiogeneze u Hočkinovom limfomu otpočeta su 90.-ih godina prošlog veka, a ispitivanja u vezi ekspresije VEGF počinju od 1997. godine (129,141). U ispitivanju Fossa i sar. konstatovano je postojanje ekspresije VEGF u reaktivnim limfocitima u tumorskom tkivu HL (129). Nakon ovog inicijalnog ispitivanja u vezi ekspresije VEGF koje je obuhvatalo pored Hočkinovog limfoma i druge limfome, kao i nakon što je utvrđena njegoova prognostička uloga kod solidnih tumora, usledila su i druga ispitivanja uloge VEGF u Hočkinovom limfomu (142, 143). Za razliku od Fossa i sar., u istraživanju Doussis-Anagnostopoulou utvrđeno je da u oko 70% slučajeva u tumorskom tkivu Hočkinovog limfoma postoji ekspresija VEGF i da ona potiče ne samo od strane reaktivnih limfocita, već i od strane Reed Sternberg i Hočkin ćelija, kao i od drugih reaktivnih ćelija prisutnih u tumoru uključujući makrofage (144). Pored toga, ovo ispitivanje je po prvi put proučavalo i gustinu krvnih sudova u tumorskom tkivu HL i zaključeno je da ne postoji korelacija između ekspresije

VEGF i gustine krvnih sudova. Do zaključka da maligne ćelije u HL ekspimiraju VEGF nedugo potom došao je i Agarwal, međjutim, u svom ispitivanju Mainou-Fowler i sar 2006. dolaze do zaključka da ekspresija VEGF potiče od endotelijalnih ćelija i folikularnih dendritičnih ćelija u tumoru (145, 146). Imajući u vidu histološku kompleksnost Hočkinovog limfoma, kao i rezultate inicijalnih istraživanja, vrlo brzo su otpočeta ispitivanja koja pored VEGF ispituju i druge moguće činioce koji utiču na angiogenezu u Hočkinovom limfomu, kao i njihovu povezanost. Ipak, rezultati svih ovih ispitivanja nisu ukazivali da postoji uniformnost dobijenih rezultata (147). Paralelno sa tim, sprovode se i israživanja koja imaju za cilj da utvrde prognostički uticaj gustine krvnih sudova u tumorskom tkivu Hočkinovog limfoma nezavisno od mehanizama stimulacije njihovog nastanka. Međutim, rezultati i ovih ispitivanja kao i ispitivanja faktora koji stimulišu angiogenezu nisu donela uniformne rezultate, u pojedinim ispitivanjima gustina krvnih sudova je imala značajnu prognostičku ulogu dok u drugim ispitivanjima prognostička uloga nije utvrđena.

Naši rezultati ukazuju da kod bolesnika kod kojih postoji ekspresija VEGF u tumorskom tkivu postoji značajno lošije preživljavanje (EFS i OS) u odnosu na bolesnike koji nemaju ekspresiju VEGF. Ipak, multivarijantna analiza ovaj parametar nije identifikovala kao nezavistan prognostički faktor. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima gde se navodi da ekspresija VEGF može ubrzati rast tumora, a nije skladu su sa nalazom Koha i saradnika gde je zaključeno da ekspresija VEGF ne utiče na preživljavanje (144, 148). Takođe, nije u skladu sa nalazima gde se potencira slaba ekspresija VEGF u tumorskom tkivu (146).

Analizom naših rezultata nismo utvrdili da postoji granična vrednost gustine krvnih sudova ispod ili iznad koje bi bolesnici sa novodijagnostikovanim Hočkinovim limfomom imali lošije preživljavanje. Takođe, ispitivanje preživljavanja u zavisnosti od gustine krvnih sudova gde je korišćena medijana gustine krvnih sudova u ispitivanoj grupi nije pokazalo da gustina krvnih sudova utiče na preživljavanje bolesnika, kako na EFS, tako i na OS. Ovakvi nalazi su u skladu sa najnovijim ispitivanjima Passama i saradnika, Koha i saradnika i Panico i saradnika, dok nisu u skladu sa ranijim ispitivanjima Doussis-Anagnostopoulou i sar, Korkolopouolu i sar i Mainou-Fowler i sar (144,146-150). Daljim ispitivanjima nismo utvrdili da postoji povezanost ekspresije VEGF i gustine krvnih sudova, odnosno da kod bolesnika u kojih postoji ekspresija VEGF postoji i veća gustina krvnih sudova. Ovakav nalaz je u skladu sa nalazom

Doussis-Anagnostopoulou i sar i Passama i sar 2009, dok nije u skladu sa nalazom Koha i saradnika (144, 147, 148). Ovakve diskrepance kako u nalazima u našoj analizi, tako i u nalazima drugih istraživača ukazuju na kompleksnost patogeneze Hočkinovog limfoma. Pretpostavlja se da je VEGF samo jedan od faktora koji utiče na angiogenezu i da pored VEGF i drugi nedovoljno definisani faktori imaju značaj u angiogenezi u Hočkinovom limfomu, a do ekspresije VEGF dolazi u slučajevima kada postoji hipoksija (151, 152).

Do skora, makrofazi u tumorskom tkivu posmatrani su kao deo imunog odgovora. Makrofazi i druge ćelije bivaju privučene u tumor putem granulocitno-makrofagnog stimulišućeg faktora rasta kolonija, kao i drugih citokina koje luče RS ćelije (153,154). Međutim, nakon istraživanja Steidla i saradnika 2010. kada je otkriveno da oni imaju prognostičku ulogu u Hočkinovom limfomu, oni su u fokusu interesovanja u poslednjih nekoliko godina, kako u smislu daljih ispitivanja njihove prognostičke uloge, tako i u smislu otkrivanja mehanizama kojima utiču na rezistenciju tumora (134). U prognostičkom smislu, ispitivanja koja su usledila potvrdila su inicijalne rezultate, izuzev ispitivanja Azambuje i saradnika (155-159). Takođe, pojedina od ovih ispitivanja ispitivala su pored CD68+ makrofaga i prognostičku ulogu CD163+ makrofaga za koje je takođe utvrđeno da imaju prognostičku ulogu (158,159). Međutim, mehanizmi kojima makrofazi utiču na rast i rezistenciju tumora nisu u potpunosti razjašnjeni. Kao jedan od mogućih mehanizama smatra se i regulisanje angiogeneze, kroz ekspresiju VEGF i angiogenog *switch*-a (160, 161), što je potvrđeno u ispitivanjima u karcinomu dojke, a u oblasti Hočkinovog limfoma ovakva ispitivanja aktuelna su u poslednjih godinu dana (162). U ispitivanju Panico i saradnika, dokazana je prognostička uloga CD68+ makrofaga i uočena je korelacija između broja makrofaga i gustine krvnih sudova (149). Ipak, u ovom ispitivanju nije ustanovljeno da gustina krvnih sudova ima prognostičku ulogu. U svom istraživanju Koh i saradnici su takođe potvrdili prognostičku ulogu CD68+ makrofaga, ali i CD163+ makrofaga, kao i da gustina krvnih sudova nema prognostičku ulogu (148). Međutim, ovo ispitivanje nije potvrdilo da postoji korelacija između broja CD68+ makrofaga i gustine krvnih sudova, već je utvrđeno da postoji korelacija gustine krvnih sudova i CD163+ makrofaga, za koje se smatra da imaju veću specifičnost u smislu izraženije ekspresije VEGF (160, 161). Ova pretpostavka je potkrepljena i činjenicom da je u ovom ispitivanju utvrđena

korelacija i CD163+ i ekspresije VEGF, a utvrđena je i korelacija ekspresije VEGF i gustine krvnih sudova.

Naše ispitivanje takođe ukazuje da CD68+ makrofazi imaju prognostičku ulogu u Hočkinovom limfomu. U pogledu ukupnog preživljavanja, makrofazi u tumorskom tkivu u multivarijantnoj analizi identifikovani su kao nezavistan prognostički faktor. Takođe, utvrđena je i korelacija broja CD68+ makrofaga sa gustinom krvnih sudova u tumorskom tkivu, što je u saglasnosti sa nalazima Panico i saradnika, a suprotno nalazu Koha i saradnika (148, 149). Nije utvrđena korelacija broja CD68+ makrofaga i ekspresije VEGF, što je u saglasnosti sa nalazom Koha i saradnika (148).

Slično makrofazima u tumorskom tkivu, i limfociti u tumorskom tkivu, predominantno T limfociti su posmatrani kao deo imunog odgovora, obzirom na nedostatak podataka o njihovoj funkciji (163). Nakon ispitivanja u solidnim tumorima gde je uočeno da T regulatorni limfociti (FOXP3) koji suprimiraju imuni odgovor imaju prognostičku ulogu, usledila su ispitivanja i u Hočkinovom limfomu (133, 157, 164-166). Već u prvom ispitivanju o prognostičkom značaju FOXP3 limfocita u Hočkinovom limfomu potvrđen je njihov prognostički značaj, ali i da u Hočkinovom limfomu suprotno solidnim tumorima mali broj FOXP3 limfocita u tumorskom tkivu ima prognostički značaj za loš ishod (164). Ovakvi nalazi su zabeleženi i u ispitivanjima koja su nakon toga usledila (165, 166). Objašnjenje ovog fenomena, kao i mehanizmi kojima T regulatorni limfociti deluju u tumorskom tkivu i dalje su nepoznanica. Pojedina ispitivanja pretpostavljaju da bi to moglo biti posledica uticaja Epstein-Barr virusa na mikrosredinu tumora (133, 167).

U našem ispitivanju takođe je pokazano da FOXP3 limfociti imaju prognostičku ulogu u Hočkinovom limfomu. Kako u pogledu ukupnog preživljavanja, tako i u pogledu preživljavanja bez značajnog događaja, FOXP3 limfociti u tumorskom tkivu u multivarijantnoj analizi identifikovani su kao nezavistan prognostički faktor. Takođe, bazirano na činjenici da ekspresija VEGF u tumoru potiče i od limfocita, ispitivana je i korelacija broja FOXP3 limfocita sa angiogenezom. Utvrđeno je da postoji udruženost između broja FOXP3 limfocita i ekspresije VEGF, odnosno da je ekspresija VEGF prisutna u značajno većem broju kod bolesnika kod kojih je bio mali broj FOXP3 limfocita u tumorskom tkivu. Takođe, ispitivano je i utvrđeno da ne postoji udruženost FOXP3 limfocita i gustine krvnih sudova u tumorskom tkivu. U ovom trenutku rezultati ispitivanja udruženosti FOXP3 limfocita i angiogeneze u tumoru ne postoje u literaturi i

ovaj rezultat bi mogao biti osnova za buduća istraživanja u cilju potvrde ovog nalaza i u slučaju da se potvrdi, istraživanja sa ciljem utvrđivanja mehanizama koji na to utiču.

Ovo istraživanje pored ispitivanja angiogeneze i mikrosredine tumora imalo je takođe za cilj i ispitivanje značaja za ishod lečenja demografskih, kliničkih i laboratorijskih parametara, kao i Internacionalnog prognostičkog skora.

Veliki broj ispitivanja iz oblasti Hočkinovog limfoma utvrdio je da muškarci imaju lošije preživljavanje u odnosu na žene (168-170). Muški pol je takođe identifikovan u ispitivanju kojim je definisan Internacionalni prognostni skor, i u njega je uvršten kao jedan od faktora rizika (58). Vrlo malo se zna o mehanizmima koji dovode do lošijeg preživljavanja muškaraca, ali u istraživanju Klimm i saradnika uočeno je da su bolesnici muškog pola imali značajno manji procenat leukopenija, a bolesnici kod kojih se nije razvijala leukopenija nakon hemoterapije imali su lošije preživljavanje (170). U našem istraživanju postojalo je slabije preživljavanje kod bolesnika muškog pola ali statistička značajnost razlike u preživljavanju nije potvrđena, a uzrok toga je najverovatnije mala grupa ispitivanih bolesnika.

Slično tome, u našem istraživanju je postojala razlika u preživljavanju i kod bolesnika sa HL starijih od 45 godina i bolesnika u četvrtom kliničkom stadijumu, ali statistički značajna razlika nije utvrđena najverovatnije zbog malog broja ispitanika. Ova dva prognostička faktora takođe su uvrštena u Internacionalni Prognostički Skor (58). Pored istraživanja Hasenclevera i Diehla, i brojna druga istraživanja su ukazala na prognostički značaj ova dva faktora (83, 116, 168, 171-175).

Prisustvo velike tumorske mase u brojnim istraživanjima identifikovano je kao prognostički faktor za nepovoljan ishod lečenja HL (117, 168, 174, 176, 177). Poseban prognostički značaj se pridaje velikoj tumorskoj masi u medijastinumu na prezentaciji (koja zahvata više od 33% torakalne aperture), koja se u rezultatima nekoliko studija navodi kao nepovoljan prognostički faktor, a prema GHSG se koristi i kao jedan od faktora za stratifikaciju bolesnika koja utiče na izbor terapije (86, 173, 175). I u našem ispitivanju prisustvo velike tumorske mase imalo je negativan prognostički značaj, kako u univarijantnoj, tako i u multivarijantnoj analizi gde je prisustvo velike tumorske mase identifikovano kao nezavistan prognostički faktor.

Značaj ubrzane sedimentacije eritrocita uočen je u brojnim istraživanjima i, u današnje vreme i dalje služi kao jedan od faktora rizika na osnovu koga se bolesnici stratifikuju u grupe rizika (73, 86). U našem ispitivanju ovaj parametar imao je

prognostičku ulogu u univarijantnoj analizi, međutim u kombinaciji sa drugim faktorima ona nije imala nezavisni prognostički uticaj. Do sličnog zaključka došlo se i u brojnim drugim ispitivanjima gde je uočeno da ovaj parametar korelira sa drugim parametrima i gubi svoj nezavistan prognostički uticaj ako se ispituje sa drugim faktorima (58, 178, 179).

Brojna ispitivanja su identifikovala prisustvo B simptoma kao negativan prognostički parametar (175, 180-184). Ovaj prognozni faktor i u današnje vreme se prema GHSG koristi kao jedan od parametara na osnovu kojeg se bolesnici stratifikuju, a na osnovu te stratifikacije određuje se terapija (86). U ispitivanoj grupi bolesnika u našem istraživanju ovaj parametar je imao prognostičku ulogu u univarijantnoj analizi, međutim u kombinaciji sa drugim faktorima nije imao nezavistan prognostički značaj. Slično ubrzanoj sedimentaciji eritrocita, i za ovaj faktor je u brojnim ispitivanjima uočeno da korelira sa drugim parametrima i gubi svoj nezavistan prognostički uticaj ako se ispituje sa drugim faktorima (177, 181, 183- 185).

Povišena aktivnost LDH identifikovana je kao nepovoljan prognozni faktor u oblasti nehoćkinskih limfoma i obuhvaćena je u najšire korišćene prognozne indekse (114,186). Za razliku od ovih istraživanja, rezultati u oblasti Hoćkinovog limfoma nisu uniformni. U inicijalnim istraživanjima povišena aktivnost LDH imala je prognostički značaj, međutim u istraživanjima Henry-Amara i Hasenclevera na velikim serijama bolesnika ovi rezultati nisu potvrđeni (58, 171, 175). U našem istraživanju bolesnici koji su imali povišenu aktivnost LDH imali su lošije preživljavanje, ali ova razlika nije bila statistički značajna.

Internacionalni Prognostički Skor sastavljen od sedam nezavisnih kliničkih i laboratorijskih prognostičkih parametara, definisan je u okviru Međunarodnog Projekta Prognostičkih Faktora prognozni indeks za uznapredovali stadijum HL, a na osnovu analize koja je obavljena na 5141 bolesnika (58). Cilj ovakvog prognoznog skora je prvenstveno bio identifikacija podgrupe bolesnika u grupi bolesnika sa uznapredovalim stadijumima koji bi mogli imati korist i nakon redukovane primarne terapije, kao i bolesnici koji su u riziku za loš odgovor na primljenu standardnu terapiju (58). Ipak, ispitivanje koje je poredilo nekoliko različitih prognostičkih modela uključujući i IPS utvrdilo je da se bolesnici mogu stratifikovati na bolesnike visokog i niskog rizika, ali nije identifikovan nijedan model koji bi bio dovoljno precizan da sa relevantnom pouzdanoću identifikuje bolesnike vrlo niskog rizika (<10% *failure rate*) ili podgrupu

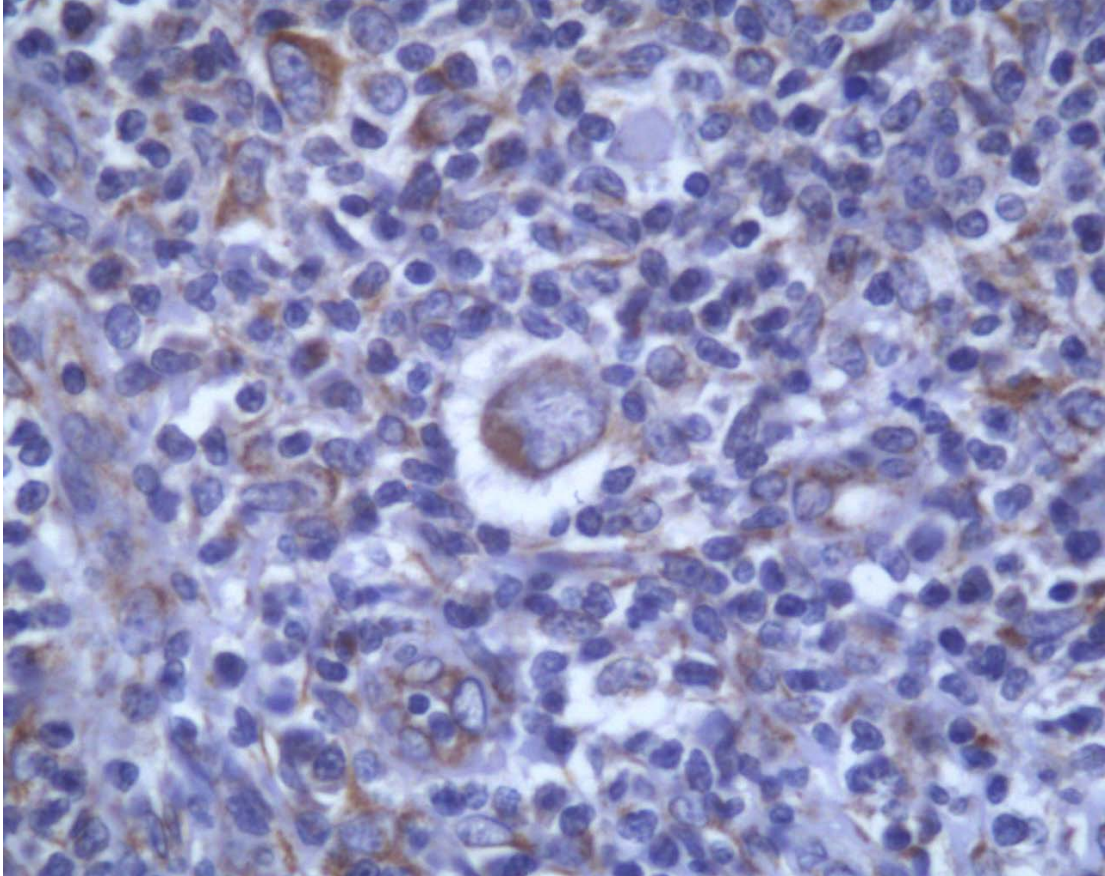
bolesnika vrlo visokog rizika ($>50\%$ *failure rate*) (187). I pored toga, IPS je i danas najupotrebljavaniji prognozni model i smatra se da će tako biti sve dotle dok ne budu identifikovani novi, pouzdaniji specifični biološki prognostički markeri (122). I u našem istraživanju bolesnici sa visokim IPS skorom ($IPS > 2$) su imali lošiju prognozu, kako u univarijantnoj analizi, tako i u multivarijantnoj analizi koja ga je identifikovala kao nezavistan prognozni faktor za loš ishod lečenja.

6. ZAKLJUČAK

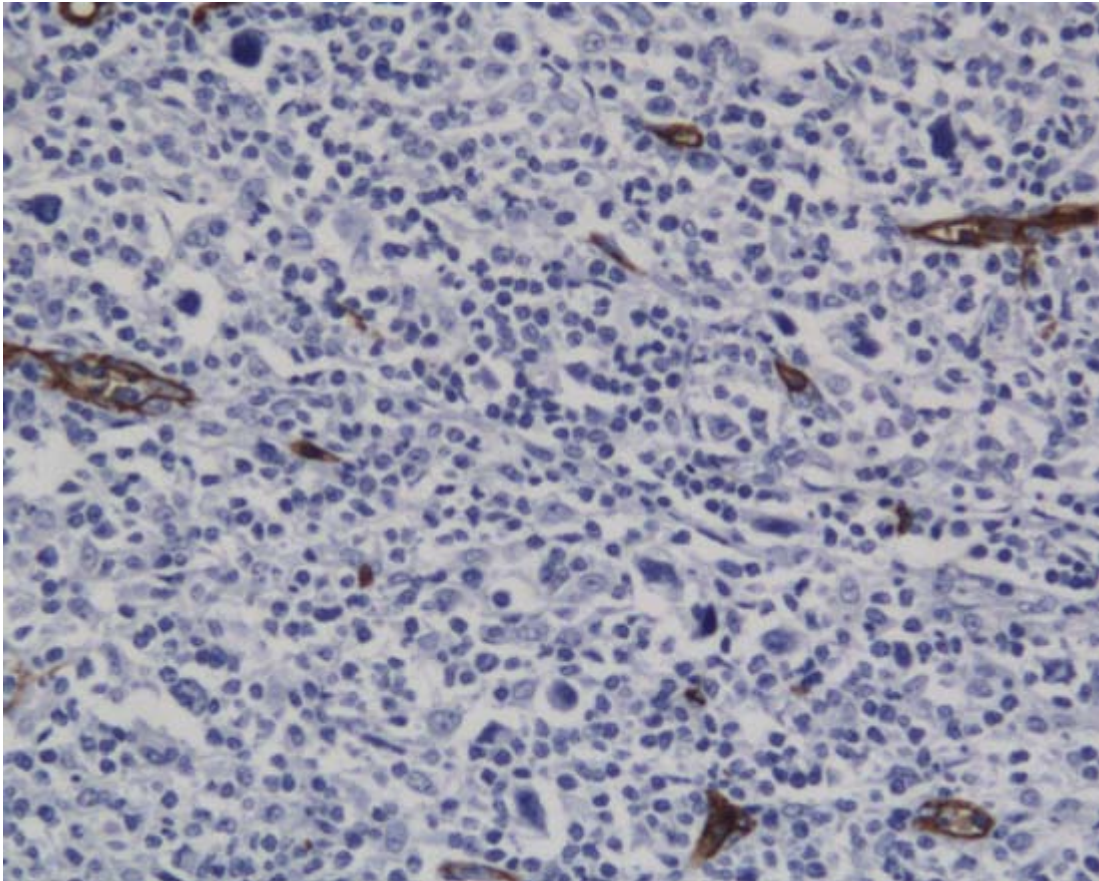
Na osnovu postavljenih ciljeva, analizom dobijenih rezultata kod bolesnika sa novodijagnostikovanim Hočkinovim limfomom mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Angiogeneza u tumoru nema prognostički značaj za ishod lečenja bolesnika sa Hočkinovim limfomom
2. Povišen broj CD68 makrofaga u tumorskom tkivu je nezavistan prognostički faktor za loše ukupno preživljavanje bolesnika sa Hočkinovim limfomom
3. Snižen broj FOXP3 limfocita u tumorskom tkivu je nezavistan prognostički faktor za loše ukupno preživljavanje i period bez događaja bolesnika sa Hočkinovim limfomom
4. Povišen broj CD68 makrofaga u tumorskom tkivu praćen je većom gustinom krvnih sudova u tkivu
5. Snižen broj FOXP3 limfocita udružen je sa povišenom ekspresijom VEGF
6. Razvijen je pouzdan prognostički model za ukupno preživljavanje koji integriše zajedno biomarkere i kliničke parametre

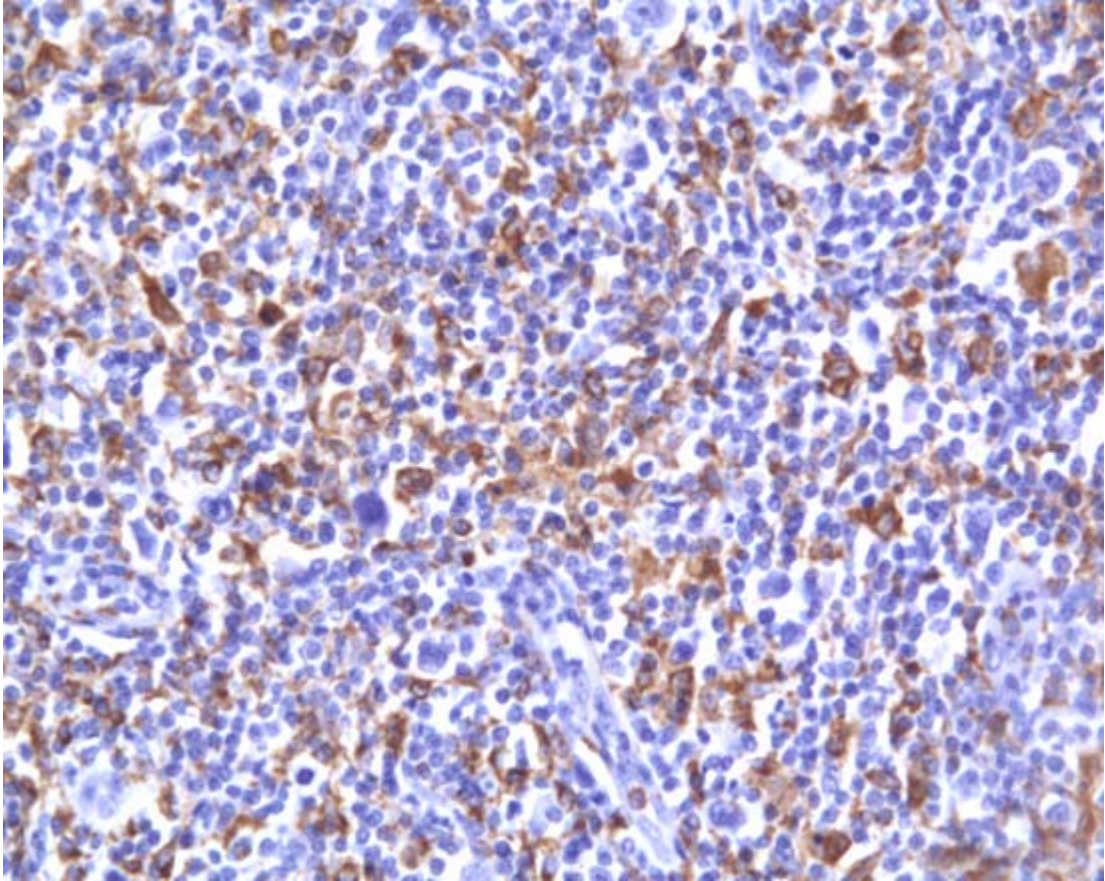
7. FOTODOKUMENTACIJA REZULTATA



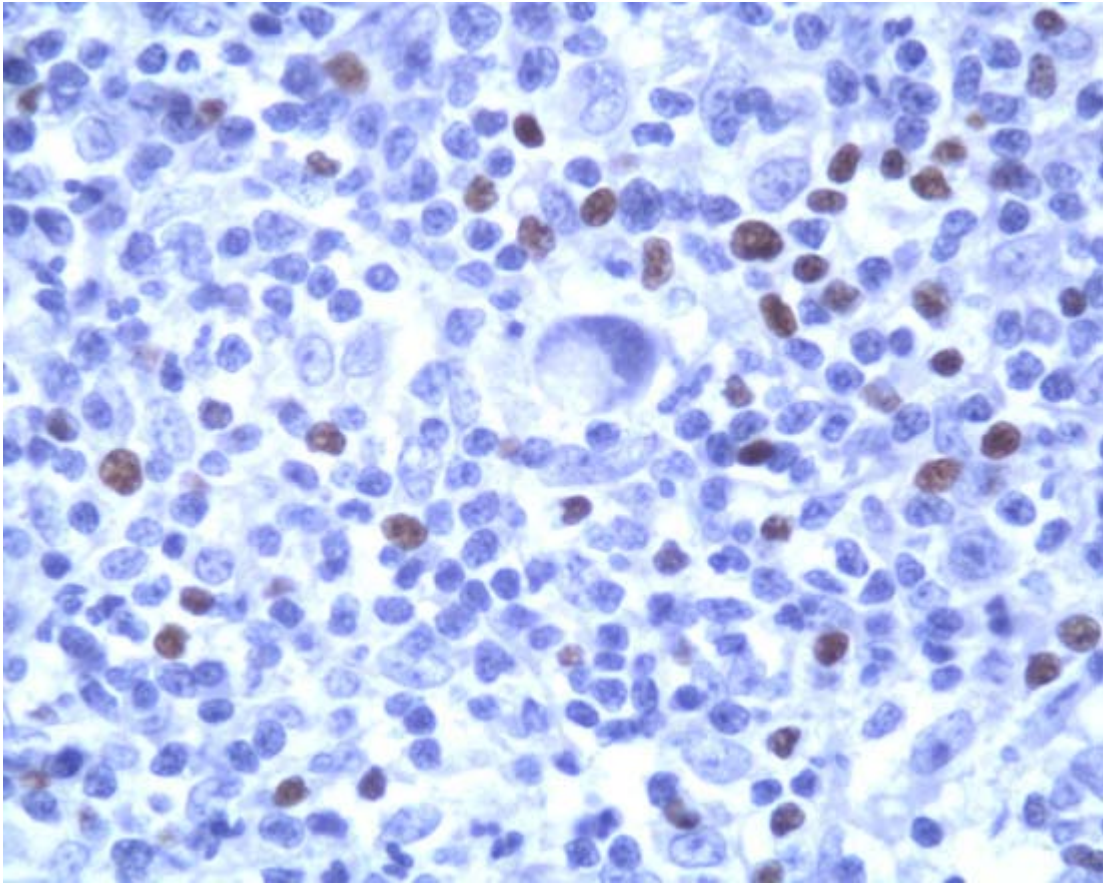
Slika 6. Klasičan HL (IHH, VEGF, x400).



Slika 7. Klasičan HL (IHH, CD34, x200).



Slika 8. Klasičan HL (IHH, CD68, x200).



Slika 9. Klasičan HL (IHH, FOXP3, x400).

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. Sternberg C. Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates. *Ztschr Heilk* 1898;19:21-90.
4. 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.
5. Kaplan HS. Hodgkin's disease: unfolding concepts concerning its nature, management and prognosis. *Cancer* 1980;45:2439-74.
6. Rosenberg SA. Hodgkin's disease: challenges for the future. *Cancer Res* 1989;49:767-9.
7. 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.
8. Lin A, Tucker M. Epidemiology of Hodgkin's diseases and non-Hodgkin's lymphoma. U: *The Lymphomas* (Canellos G, Lister TA, Sklar J, urednici). W.B. Saunders, London, 1998; 43-62
9. Homer MJ, Ries LAG, Krapcho M, et al., urednici. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006*. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2009.
10. Ferlay J, Bray F, Pisani P, et al. *GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. In: *IARC CancerBase No 5 version 20*. Lyon: IARC Press; 2004.
11. MacMahon B. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Cancer Res*. 1966;26(6):1189–201.
12. Correa P, O'Connor GT. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. *Int J Cancer*. 1971;8(2):192–201.

13. Macfarlane G, Evstifeeva T, Boyle P, et al. International patterns in the occurrence of Hodgkin's disease in children and young adult males. *Int J Cancer*. 1995;61(2):165–9.
14. Glaser SL, Hsu JL. Hodgkin's disease in Asians: incidence patterns and risk factors in population-based data. *Leuk Res*. 2002;26:261–9.
15. Au WY, Gascoyne RD, Gallagher RE, et al. Hodgkin's lymphoma in Chinese migrants to British Columbia: a 25-year survey. *Ann Oncol*. 2004;15(4):626–30.
16. Caporaso NE, Goldin LR, Anderson WF, et al. Current insight on trends, causes, and mechanisms of Hodgkin's lymphoma. *Cancer J*. 2009;15:117–23.
17. Clarke CA, Glaser SL, Keegan THM, et al. Neighborhood socioeconomic status and Hodgkin lymphoma incidence in California. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2005;14:1441–7.
18. Gutensohn N, Cole P. Epidemiology of Hodgkin's disease in the young. *Int J Cancer*. 1977;19(5):595–604.
19. Cozen W, Katz J, Mack TM. Risk patterns of Hodgkin's disease in Los Angeles vary by cell type. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 1992;1(4):261–8.
20. Glaser SL. Regional variation in Hodgkin's disease incidence by histologic subtype in the US. *Cancer*. 1987;60:2841–7.
21. Grufferman S, Delzell E. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Epidemiol Rev*. 1984;6:76–106.
22. Abramson JH, Pridan H, Sacks MI, et al. A case-control study of Hodgkin's disease in Israel. *J Natl Cancer Inst*. 1978;61:307–14.
23. Bernard SM, Cartwright RA, Darwin CM, et al. Hodgkin's disease: case control epidemiological study in Yorkshire. *Br J Cancer*. 1987;55(1):85–90.
24. Glaser SL, Clarke CA, Nugent RA, et al. Social class and risk of Hodgkin's disease in young-adult women in 1988-94. *Int J Cancer*. 2002;98:110–7.
25. Serraino D, Franceschi S, Talamini R, et al. Socio-economic indicators, infectious diseases and Hodgkin's disease. *Int J Cancer*. 1991;47:352–7.
26. Evans AS, Gutensohn NM. A population-based case-control study of EBV and other viral antibodies among persons with Hodgkin's disease and their siblings. *Int J Cancer*. 1984;34:149–57.
27. Mueller N, Evans A, Harris NL, et al. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med*. 1989;320(11):689–95.

28. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1989;320:502–6.
29. Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer.* 1997;70:375–82.
30. Jarrett RF. Risk factors for Hodgkin's lymphoma by EBV status and significance of detection of EBV genomes in serum of patients with EBV-associated Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2003;44 Suppl 3:S27–32.
31. Glaser SL, Gulley ML, Clarke CA, et al. Racial/ethnic variation in EBV-positive classical Hodgkin lymphoma in California populations. *Int J Cancer.* 2008;123:1499–507.
32. Mueller NE, Grufferman S. Hodgkin lymphoma. U: Schottenfeld D, Fraumeni JF, urednici. *Cancer epidemiology and prevention.* 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2006; 872–97.
33. Frisch M, Biggar RJ, Engels EA, et al. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *JAMA.* 2001;285(13):1736–45.
34. Smedby KE, Baecklund E, Askling J. Malignant lymphomas in autoimmunity and inflammation: a review of risks, risk factors, and lymphoma characteristics. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2006;15:2069–77.
35. Razis DV, Diamond HD, Craver LF. Familial Hodgkin's disease: its significance and implications. *Ann Intern Med.* 1959;51(5):933–71.
36. Lin AY, Kingma DW, Lennette ET, et al. Epstein-Barr virus and familial Hodgkin's disease. *Blood.* 1996;88(8):3160–5.
37. Bjerrum OW, Hasselbalch HC, Drivsholm A, et al. Non-Hodgkin malignant lymphomas and Hodgkin's disease in first-degree relatives. Evidence for a mutual genetic predisposition? *Scand J Haematol.* 1986;36(4):398–401.
38. Goldin LR, McMaster ML, Ter-Minassian M, et al. A genome screen of families at high risk for Hodgkin lymphoma: evidence for a susceptibility gene on chromosome 4. *J Med Genet.* 2005;42:595–601.
39. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.

40. Bräuninger A, Hansmann ML, Strickler JG, et al. Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1999;340:1239-47.
41. Küppers R, Sousa AB, Baur AS, et al. Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. *Mol Med.* 2001;7:285-92.
42. Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J Clin Oncol.* 1999;17:3804-9.
43. Natkunam Y, Lossos IS, Taidi B, et al. Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein, a new marker of germinal center B-cell derivation. *Blood.* 2005;105:3979-86.
44. Braeuninger A, Küppers R, Strickler JG, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:9337-42.
45. Haluska FG, Brufsky AM, Canellos GP. The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. *Blood.* 1994;84:1005-19.
46. Čemerikić-Martinović V. Patologija limfoma. U: Maligne bolesti krvi (Čolović M, Janković G, urednici). Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1999; 223-302.
47. Herbst H, Samol J, Foss HD, et al. Modulation of interleukin-6 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells by Epstein-Barr virus. *J Pathol.* 1997;182:299-306.
48. Butler JJ. The histologic diagnosis of Hodgkin's disease. *Semin Diagn Pathol.* 1992;9:252-6.
49. Stickler JG, Burgart LJ, Weiss LM. Classical Hodgkin's disease. U Weiss LM: Pathology of lymph nodes. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1996: 169.
50. Poppema S. Immunology of Hodgkin's disease. *Ballieres Clin Haematol.* 1996;9:447-57.
51. Atkinson K, Austin DE, McElwain TJ, et al: Alcohol pain in Hodgkin's disease. *Cancer* 1976;37:895-9.

52. Pel PK: Zur symptomatologie der sogenannten pseudoleukamie. II. Pseudokeukamie oder chronisches Ruckfallsfieber? Berl Klin Wochenschr 1887;24:844.
53. Ebstein WV: Das chronische Ruckfallsfieber, eine neu infectionskrankheit. Berl Klin Wochenschr 1887;24:565.
54. Rueffer U, Sieber M, Josting A, et al: Prognostic factors for subdiaphragmatic involvement in clinical stage I-II supradiaphragmatic Hodgkin's disease: A retrospective analysis of the GHSG. Ann Oncol. 1999;10:1343-8.
55. Cavalli F: Rare syndromes in Hodgkin's disease. Ann Oncol 1998;9 Suppl 5:S109.
56. Barta SK, Yahalom J, Shia J, et al: Idiopathic cholestasis as a paraneoplastic phenomenon in Hodgkin's lymphoma. Clin Lymphoma Myeloma 2006;7:77-82.
57. Audard V, Larousserie F, Grimbert P, et al: Minimal change nephrotic syndrome and classical Hodgkin's lymphoma: Report of 21 cases and review of the literature. Kidney Int 2006;69:2251-60.
58. 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.
59. Simmons AV, Spiers AS, Fayers PM: Haematological and clinical parameters in assessing activity in Hodgkin's disease and other malignant lymphomas. Q J Med. 1973;42:111-24.
60. MacLennan KA, Hudson BV, Jelliffe AM, et al: The pretreatment peripheral blood lymphocyte count in 1100 patients with Hodgkin's disease: The prognostic significance and the relationship to the presence of systemic symptoms. Clin Oncol. 1981;17:333-9.
61. Storgaard L, Karle H: Fever and haemolysis in Hodgkin's diseases. Acta Med Scand 1975;197:311-6.
62. Jones SE: Autoimmune disorders and malignant lymphoma. Cancer 1973;31:1092-8.
63. Cohen JR: Idiopathic thrombocytopenic purpura in Hodgkin's disease: A rare occurrence of no prognostic significance. Cancer 1978;41:743-6.
64. Hunter JD, Logue GL, Joyner JT: Autoimmune neutropenia in Hodgkin's disease. Arch Intern Med 1982;142:386-8.

65. Le Bourgeois J, Tubiana M: The erythrocyte sedimentation rate as a monitor for relapse in patients with previously treated Hodgkin's disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1977;2:241-7.
66. Dimopoulos MA, Cabanillas F, Lee JJ, et al: Prognostic role of serum beta 2-microglobulin in Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1993;11:1108-11.
67. Schilling RF, McKnight B, Crowley JJ: Prognostic value of serum lactic dehydrogenase level in Hodgkin's disease. *J Lab Clin Med.* 1982;99:382-7.
68. Aisenberg AC, Kaplan MM, Rieder SV: Serum alkaline phosphatase at the onset of Hodgkin's disease. *Cancer* 1970;26:318-26.
69. Mercier RJ, Thompson JM, Harman GS, et al: Recurrent hypercalcemia and elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in Hodgkin's disease. *Am J Med.* 1988;84:165-8.
70. Braund WJ, Naylor BA, Williamson DH, et al: Autoimmunity to insulin receptor and hypoglycaemia in patient with Hodgkin's disease. *Lancet* 1987;1:237-40.
71. Kaplan HS: *Hodgkin's Disease.* Harvard University Press, Cambridge, MA, 1980.
72. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971;31:1860-1.
73. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, et al. 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.
74. Juweid ME: Utility of positron emission tomography (PET) scanning in managing patients with Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:259-265, 510-1.
75. Bangerter M, Moog F, Buchmann I, et al: Whole-body 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) for accurate staging of Hodgkin's disease. *Ann Oncol.* 1998:1117-22.
76. Juweid ME, Stroobants S, Hoekstra OS, et al: Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: Consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007;25:571-8.

77. 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* 107:52, 2006.
78. Avigdor A, Bulvik S, Levi I, et al. Two cycles of escalated BEACOPP followed by four cycles of ABVD utilizing early-interim PET/CT scan is an effective regimen for advanced high-risk Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2010;21:126–32.
79. DeVita V, Serpick A, Carbone P: Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Ann Intern Med*. 1970;73:881-95.
80. Feuer EJ, Kessler LG, Baker SG, et al: The impact of breakthrough clinical trials on survival in population based tumor registries. *J Clin Epidemiol* 1991;44:141-53.
81. Santoro A, Bonadonna G: Prolonged disease-free survival in MOPP-resistant Hodgkin's disease after treatment with Adriamycin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine (ABVD). *Cancer Chemother Pharmacol* 1979;2:101-105.
82. Santoro A, Bonfante V, Bonadonna G: Salvage chemotherapy with ABVD in MOPP-resistant Hodgkin's disease. *Ann Intern Med* 1982;96:139-43.
83. Canellos GP, Anderson JR, Propert K et al. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Engl J Med* 1992; 327: 1478-1484.
84. Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, et al: Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: Report of an intergroup trial. *J Clin Oncol* 2003;21:607-14.
85. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, et al: Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 2003;348:2386-95.
86. Eichenauer DA, Engert A, Dreyling M. Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2011; Suppl 6:vi55-8.
87. Hancock SL, Hoppe RT, Horning SJ, et al: Intercurrent death after Hodgkin disease therapy in radiotherapy and adjuvant MOPP trials. *Ann Intern Med* 1988;109:183-9.

88. Rosenberg SA, Kaplan HS: The evolution and summary results of the Stanford randomized clinical trials of the management of Hodgkin's disease: 1962–1984. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985;11:5-22.
89. Horning SJ, Hoppe RT, Hancock SL, et al: Vinblastine, bleomycin, and methotrexate: An effective adjuvant in favorable Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1988;6:1822-31.
90. Press OW, LeBlanc M, Lichter AS, et al: Phase III randomized intergroup trial of subtotal lymphoid irradiation versus doxorubicin, vinblastine, and subtotal lymphoid irradiation for stage IA to IIA Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 2001;19:4238-44.
91. Tesch H, Sieber M, Ruffer J, et al: Two cycles ABVD plus radiotherapy is more effective than radiotherapy alone in early stage HD: Interim analysis of the HD7 trial of the GHSg clinic of internal medicine, University of Cologne. *Proc Am Soc Hematol* 1998;92 Suppl 10:485a.
92. Ferme C, Eghbali H, Meerwaldt JH, et al: Chemotherapy plus involved-field radiation in early-stage Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 2007;357:1916-27.
93. Bonadonna G, Bonfante V, Viviani S, et al: ABVD plus subtotal nodal versus involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin's disease: Long-term results. *J Clin Oncol* 2004;22:2835-41.
94. Engert A, Schiller P, Josting A, et al: Involved-field radiotherapy is equally effective and less toxic compared with extended-field radiotherapy after four cycles of chemotherapy in patients with early-stage unfavorable Hodgkin's lymphoma: Results of the HD8 trial of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2003;21:3601-8.
95. Engert A, Plütschow A, Eich HT, et al. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010;363:640-52.
96. Meyer R, Gospodarowicz M, Connors JM, et al: Randomized comparison of ABVD chemotherapy with a strategy that includes radiation therapy in patients with limited-stage Hodgkin's lymphoma: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group and the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005;23:4634-42.
97. Straus DJ, Portlock CS, Qin J, et al: Results of a prospective randomized clinical trial of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine (ABVD) followed

- by radiation therapy (RT) versus ABVD alone for stages I, II, and IIIA nonbulky Hodgkin disease. *Blood* 2004;104:3483-9.
98. Laskar S, Gupta T, Vimal S, et al: Consolidation radiation after complete remission in Hodgkin's disease following six cycles of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine chemotherapy: Is there a need? *J Clin Oncol* 2004;22:62-8.
 99. Klimm B, Engert A, Brillant C, et al: Comparison of BEACOPP and ABVD chemotherapy in intermediate stage Hodgkin's lymphoma: Results of the fourth interim analysis of the HD11 trial of the GHSG. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005;23:6507A.
 100. Noordijk E, Thomas J, Ferme C, et al: First results of the EORTC-GELA H9 randomized trials: The H9-F trial and H9u trial in patients with favorable or unfavorable early stage Hodgkin's lymphoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005;23:6505A.
 101. Engert A, Diehl V, Franklin J, et al: Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 years of follow-up of the GHSG HD9 Study. *J Clin Oncol* 2009;27:4548-54
 102. Federico M, Luminari S, Iannitto E, et al: ABVD compared with BEACOPP compared with CEC for the initial treatment of patients with advanced Hodgkin's lymphoma: Results from the HD2000 Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi Trial. *J Clin Oncol* 2009;27:805-11.
 103. Gianni AM, Rambaldi A, Zinzani PL, et al: Comparable 3-year outcome following ABVD or BEACOPP first-line chemotherapy, plus pre-planned high-dose salvage, in advanced Hodgkin lymphoma (HL): A randomized trial of the Michelangelo, GITIL and IIL cooperative groups. *J Clin Oncol* 2008;26:Abstract 8506.
 104. Engert A, Haverkamp H, Kobe C, et al. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2012;379:1791-9.
 105. Linch DC, Winfield D, Goldstone AH, et al: Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant Hodgkin's disease: Results of a BNLI randomised trial. *Lancet* 1993;341:1051-4.

106. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, et al: Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive Hodgkin's disease: A randomised trial. *Lancet* 2002;359:2065-71.
107. Horning SJ, Chao NJ, Negrin RS, et al: High-dose therapy and autologous hematopoietic progenitor cell transplantation for recurrent or refractory Hodgkin's disease: Analysis of the Stanford University results and prognostic indices. 1997;*Blood* 89:801-13.
108. Nademanee A, O'Donnell MR, Snyder DS, et al: High-dose chemotherapy with or without total body irradiation followed by autologous bone marrow and/or peripheral blood stem cell transplantation for patients with relapsed and refractory Hodgkin's disease: Results in 85 patients with analysis of prognostic factors. *Blood* 1995;85:1381-90.
109. Santoro A, Magagnoli M, Spina M, et al: Ifosfamide, gemcitabine, and vinorelbine: A new induction regimen for refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2007;92:35-41.
110. Sieniawski M, Franklin J, Nogova L, et al: Outcome of patients experiencing progression or relapse after primary treatment with two cycles of chemotherapy and radiotherapy for early-stage favorable Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:2000-5.
111. Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM, et al: Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:1279-87.
112. Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, et al. Results of a Pivotal Phase 2 Study of Brentuximab Vedotin for Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2012;30:2183-9.
113. Pro B, Advani R, Brice P, Bartlett NL, Rosenblatt JD, Illidge T, et al. Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large cell lymphoma: Results of a phase II study. *J Clin Oncol.* 2012;30:2190-6.

114. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med.* 1993;329:987-94.
115. Sehn LH. Optimal use of prognostic factors in non-Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006;295-302.
116. Peterson BA, Pajak TF, Cooper MR et al. Effect of age on therapeutic response and survival in advanced Hodgkin's disease. *Cancer Treat Rep*1982; 66: 889–898.
117. Specht L. Tumour burden as the main indicator of prognosis in Hodgkin's disease. *Eur J Cancer* 1992; 28A:1982-85.
118. Axdorph U, Sjoberg J, Grimfors G et al. Biological markers may add to prediction of outcome achieved by the international prognostic score in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2000; 11: 1405-1411.
119. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP et al. 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.
120. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunicic Jovanovic MD, et al. The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2011 Oct;52:1913-9.
121. Hagenbeek A, Gascoyne RD, Dreyling M, et al. Biomarkers and prognosis in malignant lymphomas. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009;9:160-6.
122. 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.
123. Gallamini A, Patti C, Viviani S, et al. Early chemotherapy intensification with BEACOPP in advanced-stage Hodgkin lymphoma patients with a interim-PET positive after two ABVD courses. *Br J Haematol.* 2011 Mar;152(5):551-60.
124. Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L, et al. Early interim 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission 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.

125. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285:1182-6.
126. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1:27-31.
127. Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev.* 1990;9:171-4.
128. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:4-6.
129. Foss H, Araujo I, Demel G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease, *J Pathol* 1997;183:44-50.
130. Virchow R. Aetiologie der Neoplastischen Geschwulste/Pathogenie der Neoplastischen Geschwulste. U: Die Krankhaften Geschwulste (Virchow R, urednik). August Hirschwald Verlag, Berlin, 1863; 57-101.
131. Devilard E, Bertucci F, Trempat P, et al. Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene.* 2002;21:3095-102.
132. Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, de la Cueva P, et al. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2006; 108:662-8.
133. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood.* 2009; 113:2765-3775.
134. Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010; 362:875-85.
135. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol.* 1999;17:1244.
136. Diehl V. Are macrophages the bad guys in Hodgkin lymphoma? *Nature* 2010;7: 301-2.
137. Brice P. Managing relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141: 3-13.
138. Fuchs M, Diehl V and Re D. Current strategies and new approaches in the treatment of Hodgkin's lymphoma. *Pathobiology* 2006; 73: 126-140.

139. Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Koh ES. Prognostic factors: principles and applications. In: Gospodarowicz MK, O'Sullivan B, Sobin LH, eds. *Prognostic Factors in Cancer*, 3rd edn. Hoboken, NJ: Wiley-Liss; 2006:23-38.
140. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*. 2005;106:2169-74.
141. Kadin ME¹, Agnarsson BA, Ellingsworth LR, Newcom SR. 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.
142. Ishigami SI, Arii S, Furutani M, et al. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998;78:1379-84.
143. Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, et al. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. *Br J Cancer*. 1998;77:1704-9.
144. Doussis-Anagnostopoulou IA¹, Talks KL, Turley H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *J Pathol*. 2002;197:677-83.
145. B. Agarwal, K.N. Naresh, Re: Doussis-Anagnostopoulou et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed by neoplastic Hodgkin-Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 2002;197:677-683, *J. Pathol*. 201 (2003) 334-335.
146. Mainou-Fowler T, Angus B, Miller S, et al. Micro-vessel density and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived endothelial cell growth factor (PDEGF) in classical Hodgkin lymphoma (HL). *Leuk Lymphoma*. 2006;47:223-230.
147. Passam FH, Alexandrakis MG, Kafousi M, et al. Histological expression of angiogenic factors: VEGF, PDGFRalpha, and HIF-1alpha in Hodgkin lymphoma. *Pathol Res Pract*. 2009;205:11-20.
148. Koh YW, Park CS, Yoon DH, et al. CD163 expression was associated with angiogenesis and shortened survival in patients with uniformly treated classical Hodgkin lymphoma. *PLoS One*. 2014 Jan 29;9:e87066.

149. Panico L, Ronconi F, Lepore M, et al. The prognostic role of tumor associated macrophages and angiogenesis in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2013;54: 2418–2425.
150. Korkolopoulou P, Thymara I, Kavantzias N, et al. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia* 2005;19:894–900.
151. Choi K, Bae M, Jeong J, et al. Hypoxia- induced angiogenesis during carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36:120–127.
152. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:167–171.
153. 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.
154. Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009;9:15-27.
155. Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, et al. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2012 Mar;23:736-42.
156. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunicic Jovanovic MD, et al. The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2011;52:1913-9.
157. Greaves P, Clear A, Coutinho R, et al. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *J Clin Oncol.* 2013;31:256–262.
158. Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, et al. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2011;96:269-76.
159. Yoon DH, Koh YW, Kang HJ, et al. CD68 and CD163 as prognostic factors for Korean patients with Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol.* 2011;88:292–305.
160. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, et al. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25: 315–322.
161. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:618–631.

162. Lin EY, Pollard JW. Tumor associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:5064-6.
163. Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol*. 2011;29:1812-26.
164. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al: Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:1467-73.
165. Kelley TW, Pohlman B, Elson P, et al: 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;128:958-965.
166. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, et al: Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3 regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008;93:193-200.
167. Flavell KJ, Murray PG. Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. *Mol Pathol*. 2000;53:262-9.
168. Specht L, Nissen NI. Prognostic factors in Hodgkin's disease stage IV. *Eur J Haematol*. 1988;41:359-67.
169. Gobbi PG, Comelli M, Grignani GE, et al. Estimate of expected survival at diagnosis in Hodgkin's disease: a means of weighting prognostic factors and a tool for treatment choice and clinical research. A report from the International Database on Hodgkin's Disease (IDHD). *Haematologica*. 1994;79:241-55.
170. Klimm B, Reineke T, Haverkamp H, et al. Role of hematotoxicity and sex in patients with Hodgkin's lymphoma: an analysis from the German Hodgkin Study Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:8003-11.
171. Ferme C, Bastion Y, Brice P, et al. Prognosis of patients with advanced Hodgkin's disease: evaluation of four prognostic models using 344 patients included in the Group d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte Study. *Cancer*. 1997;80:1124-33.
172. Low SE, Horsman JM, Walters SJ, et al. Risk-adjusted prognostic models for Hodgkin's disease (HD) and grade II non- Hodgkin's lymphoma (NHL II):

- validation on 6728 British National Lymphoma Investigation patients. *Br J Haematol.* 2003;120:277–80.
173. Proctor SJ, Taylor P, Donnan P, et al. A numerical prognostic index for clinical use in identification of poor-risk patients with Hodgkin's disease at diagnosis. Scotland and Newcastle Lymphoma Group (SNLG) Therapy Working Party. *Eur J Cancer.* 1991;27:624–9.
 174. 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.
 175. Straus 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.
 176. Gobbi PG, Broglia C, Di Giulio G et al. The clinical value of tumor burden at diagnosis in Hodgkin lymphoma. *Cancer* 2004;101:1824-34.
 177. Specht L, Nordentoft AM, Cold S, et al. Tumor burden as the most important prognostic factor in early stage Hodgkin's disease. Relations to other prognostic factors and implications for choice of treatment. *Cancer.* 1988;61:1719–27.
 178. Vaughan HB, MacLennan KA, Bennett MH, et al. Systemic disturbance in Hodgkin's disease and its relation to histopathology and prognosis (BNLI report No. 30). *Clin Radiol.* 1987;38:257–61.
 179. MacLennan KA, Vaughan HB, Easterling MJ, et al. The presentation haemoglobin level in 1103 patients with Hodgkin's disease (BNLI report no. 21). *Clin Radiol.* 1983;34:491–5.
 180. Hoppe RT, Cox RS, Rosenberg SA, et al. Prognostic factors in pathologic stage III Hodgkin's disease. *Cancer Treat Rep.* 1982;66:743–9.
 181. Mauch P, Goffman T, Rosenthal DS, et al. Stage III Hodgkin's disease: improved survival with combined modality therapy as compared with radiation therapy alone. *J Clin Oncol.* 1985;3:1166–73.
 182. Franklin J, Paulus U, Lieberz D, et al. Is the international prognostic score for advanced stage Hodgkin's disease applicable to early stage patients? German Hodgkin Lymphoma Study Group. *Ann Oncol.* 2000;11:617–23.

183. Tubiana M, Henry-Amar M, Werf-Messing B, et al. A multivariate analysis of prognostic factors in early stage Hodgkin's disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1985;11:23–30.
184. Proctor SJ, Rueffer JU, Angus B, et al. Hodgkin's disease in the elderly: current status and future directions. *Ann Oncol.* 2002;13 Suppl 1:133–7.
185. Brusamolino E, Orlandi E, Morra E, et al. Analysis of longterm results and prognostic factors among 138 patients with advanced Hodgkin's disease treated with the alternating MOPP/ABVD chemotherapy. *Ann Oncol.* 1994;5 Suppl 2:53–7.
186. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R i sar. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood.* 2004;104:1258-65.
187. Gobbi PG, Zinzani PL, Broglia C et al. Comparison of prognostic models in patients with advanced Hodgkin disease. Promising results from integration of the best three systems. *Cancer* 2001;91:1467-78.

9. SKRAĆENICE

ABVD	Adriablastin, Bleomicin, Vinblastin, Dakarbazin
BEACOPP	Bleomicin, Etoposid, Adriablastinin, Ciklofosamid, Onkovin, Prokarbayin, Pronizon
BEAM	Karmustin, Etopozid, Citarabin, Melfalan
CBV	Ciklofosamid, Karmustin, Vepesid
COPP	Ciklofosamid, Onkovin, Prokarbazin, Pronizon
CR	Kompletna remisija
CS	Klinički stadijum
DHAP	deksametazon, citarabin, cisplatin
EFS	<i>Event-free survival</i> , Period bez događaja
EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
GELA	<i>Groupe d'Etude des Lymphomes Adultes</i>
HIV	Humani imunodeficijentni virus
HP	Histopatološki
Hpf	Polje velikog uvećanja
HL	Hodgkinov limfom
IHH	Imunohistohemija
ICE	Ifosamid, Karbaplatinum, Etoposid
IGEV	Ifosamid, Gemcitabin, Etoposid, Vinorelbin
IPI	<i>International prognostic index</i>
IPS	<i>International profnostic score</i>
Lgl	Limfna žlezda
MOPP	Mustargen, Onkovin, Prokarbazin, Pronizon
NHL	Non-Hodgkin limfom
OS	Ukupno preživljavanje
PD	Progresivna bolest
PR	Parcijalna remisija
REAL	<i>Revised European American Lymphoma Classification</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
RR	<i>Response rate</i> , stopa odgovora na terapiju
SD	Stabilna bolest
TAM	Makrofazi pridruženi tumorskim ćelijama
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Svetska zdravstvena organizacija
β2-M	beta 2 mikroglobulin

BIOGRAFIJA

Dr Boško Andjelić rođen je 04.02.1975.god. u Beogradu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet u Beogradu upisao je školske 1993/94. godine, a diplomirao u februaru 2001. godine sa prosečnom ocenom 9,03.

Nakon obavljenog obaveznog lekarskog staža položio je stručni ispit marta 2002.

Specijalistički ispit iz Interne medicine položio je u maju 2007. sa odličnim uspehom.

Magistarsku tezu pod naslovom „Značaj uporedne analize FLIPI indeksa i biomarkera LAM (makrofazi pridruženi limfomskim ćelijama) na efekat terapije i prognozu novodijagnostikovanih folikularnih limfoma“ odbranio je u martu 2010. godine, mentor: Prof.dr Biljana Mihaljević.

Rad uže specijalizacije pod nazivom „Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika u relapsu folikularnog limfoma i njihov prognostički značaj za ishod lečenja“ odbranio je a aprilu 2011. godine, mentor: Prof. dr Biljana Mihaljević.

Autor i koautor je više stručnih radova objavljenih u referentnim stranim i domaćim časopisima.

Od oktobra 2006. godine zaposlen je na Klinici za hematologiju KCS.

U periodu avgust-septembar 2010. kao stipendista DAAD (Deutscher Akademische Austausch Dienst) boravio na stručnom usavršavanju u Univerzitetnoj Klinici u Kelnu, sedištu Nemačke studijske grupe za Hočkinov limfom.

Veće naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu na sednici održanoj 10.07.2012. odobrilo je izradu doktorske disertacije dr Bošku Andjeliću sa temom: „Prognostički značaj angiogeneze i mikrosredine tumora na ishod lečenja bolesnika sa Hočkinovim limfomom“, a za mentora je određena Prof.dr Biljana Mihaljević.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Boško Andjelić

broj upisa _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Prognostički značaj angiogeneze i mikrosredine tumora na ishod lečenja bolesnika sa
Hočkinovim limfomom“

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.09.2014.

B. Andjelić

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Boško Andjelić

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada „Prognostički značaj angiogeneze i mikrosredine tumora na ishod
lečenja bolesnika sa Hočkinovim limfomom“

Mentor Prof. dr Biljana Mihaljević

Potpisani Boško Andjelić

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.09.2014.

B. Andjelić

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

„Prognostički značaj angiogeneze i mikrosredine tumora na ishod lečenja bolesnika sa Hočkinovim limfomom“

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.09.2014.

B. Andjelić