

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Antonija Miljak

**ZNAČAJ IZRAŽAJA LIGANDA PROGRAMIRANE STANIČNE SMRTI 1 U
KLASIČNOM HODGKINOVOM LIMFOMU**

Doktorska disertacija

Split, 2026. godine

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti i Zavodu za hematologiju Klinike za dječje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split. Voditeljica rada je prof. dr. sc. Merica Glavina Durdov.

ZAHVALE

Ova disertacija ne bi bila moguća bez podrške i pomoći iznimnih osoba koje su me tijekom rada nadahnjivale, usmjeravale i strpljivo vodile.

Svojoj mentorici, prof. dr. sc. Merici Glavina Durdov, dugujem duboku i trajnu zahvalnost za neumorno zalaganje, nadahnuće i vjeru koju je neprestano unosila u svaki, i mali i veliki, korak ovog rada – i subotom i nedjeljom, i u kasnim satima. Njena neiscrpna energija, ustrajnost i spremnost da mi bude oslonac i onda kada sam posustajala, ostavili su neizbrisiv trag u mom profesionalnom i osobnom razvoju. Svojim djelima, a ne samo riječima, pokazala mi je što znače izvrsnost, predanost i istinska posvećenost znanstvenom radu.

Od srca zahvaljujem dragom kolegi doc. dr. sc. Benjaminu Benzoni na stručnosti, strpljenju i spremnosti na suradnju, unatoč nebrojenim obvezama koje ga svakodnevno prate. Svojim znanjem, radom i svakako voljom da pomogne, učinio je da se i najsloženiji zadaci čine rješivima.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj obitelji – roditeljima Anđelki i Jakovu, koji su mi svojim povjerenjem, strpljenjem i trajnom podrškom omogućili obrazovanje i profesionalni razvoj, kao i bratu Ivanu.

Zahvaljujem i svojim prijateljicama, prijateljima i kolegama, koji su na različite načine bili stalna podrška tijekom mog školovanja, a posebno Ivani.

Posebnu zahvalnost dugujem Danielu, na osjećaju sigurnosti, razumijevanju i svakodnevnoj podršci koja je ovo razdoblje učinila lakšim i stabilnijim.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija klasičnog Hodgkinovog limfoma	2
1.2. Patogeneza klasičnog Hodgkinovog limfoma	3
1.2.1. Rizični čimbenici	3
1.2.2. Molekularne promjene	4
1.4. Klinička slika klasičnog Hodgkinovog limfoma	7
1.5. Dijagnostika i klasifikacija klasičnog Hodgkinovog limfoma	8
1.6. Procjena prognostičkog rizika i stratifikacija liječenja klasičnog Hodgkinovog limfoma	10
1.7. Liječenje klasičnog Hodgkinovog limfoma	11
1.7.1. Liječenje ranog povoljnog stadija	12
1.7.2. Liječenje ranog nepovoljnog stadija	13
1.7.3. Liječenje uznapredovalog stadija	14
1.7.4. Liječenje relapsnog ili refraktornog kHL-a	15
1.8. Problematika recidivirajuće i refraktorne bolesti u kHL-u	17
1.9. Izbjegavanje imunološkog odgovora u klasičnom Hodgkinovom limfomu	18
1.9.1. PD-1/PD-L1 osovina i uloga PD-L1 u promicanju regulacijskog mikrookoliša	18
1.9.2. Epstein-Barr virus i kHL	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	22
2.1. Ciljevi istraživanja	23
2.2. Hipoteza	23
3. METODE I MATERIJALI ISTRAŽIVANJA	24
3.1. Ustroj istraživanja	25
3.2. Ispitanici	25

3.3. Metode.....	27
3.3.1. <i>In situ</i> hibridizacija	27
3.3.2. Dvostruko imunohistokemijsko bojenje	28
3.4. Mikroskopska analiza.....	28
3.4.1. Analiza PD-L1 u HRS stanicama	29
3.4.2. Analiza PD-L1 u makrofagima	29
3.5. Dijagram tijekom istraživanja	30
3.6. Statistička analiza	31
4. REZULTATI.....	32
4.1. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika	33
4.2. Povezanost izražaja PD-L1 u HRS stanicama i makrofagima s kliničko- patološkim varijablama u kHL-u	35
4.3. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika prema bimodalnoj dobnoj raspodjeli kHL-a	39
4.4. Povezanost izražaja PD-L1 u HRS stanicama s ishodom kHL-a	41
4.5. Povezanost izražaja PD-L1u makrofagima s ishodom kHL-a.....	42
4.6. Modeliranje zajedničkog doprinosa kliničko-patoloških varijabli s H-skorom i izražajem PD-L1 u makrofagima na opće preživljenje i vrijeme bez progresije tumora.....	43
5. RASPRAVA.....	46
6. ZAKLJUČCI.....	52
7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU.....	54
8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	56
9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU	58
10. LAY SUMMARY	60
11. LITERATURA	62
12. ŽIVOTOPIS	80

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABVD	doksorubicin, bleomicin, vinblastin, dakarbazin
AP-1	aktivator proteina 1
APC	antigen-prezentirajuće stanice (engl. Antigen Presenting Cells)
ATKS	autologna transplantacija krvotvornih matičnih stanica
AVD	doksorubicin, vinblastin, dakarbazin
BCNU	visoke doze ciklofosfamida, karmustin
BEAM	karmustin, etopozid, citarabin, melfalan
BeEAM	bendamustin, etopozid, citarabin, melfalan
BEACOPP	bleomicin, etopozid, doksorubicin, ciklofosfamid, vinkristin, prokarbazin, prednizon
BCR	B-stanični receptor (engl. B-cell receptor)
BrECADD	brentuksimab vedotin, etopozid, ciklofosfamid, doksorubicin, dakarbazin i deksametazon
BV	brentuksimab vedotin
CMT	kombinirana modalitetna terapija (engl. Combined Modality Treatment)
COPP	ciklofosfamid, vinkristin, prokarbazin i prednizon
CT	kompjutorizirana tomografija (engl. Computed Tomography)
DHAP	cisplatina, citarabin, deksametazon
EBER	EBV kodirana RNA (engl. EBV encoded RNA)
EBNA	Epstein-Barr nuklearni antigen
EBV	Epstein-Barr virus
EFS	preživljenje bez događaja (engl. Event Free Survival)
EORTC	Europska organizacija za istraživanje i liječenje raka
ER	omjer dokaza (engl. evidence ratio)
EMA	Europska agencija za lijekove (engl. European Medicines Agency)
ESMO	Europsko društvo za medicinsku onkologiju
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration)
FDG	fluorodeoksiglukoza
GC	germinativni centar (engl. Germinal Center)
GEMOX	gemcitabine, oksaliplatina
GDP	gemcitabine, karboplatina, deksametazon

GHD	gemcitabine, vinorelbin, liposomalni doksorubicin
GLV	graft versus lymphoma
GHSB	Njemačka skupina za Hodgkinov limfom
HIV	virus humane imunodeficijencije
HL	Hodgkinov limfom
HRS	Hodgkinove i Reed-Sternbergove stanice
H-skor	polukvantitativni histološki indeks (engl. histological score)
HDT	visokodozna kemoterapija
IFN- γ	interferon- γ
IFRT	radioterapija zahvaćenog polja
IM	infektivna mononukleoza
IHK	imunohistokemija
IPS	međunarodni prognostički indeks (engl. International Prognostic Score)
ISRT	radioterapija zahvaćenog mjesta (engl. Involved Site Radiotherapy)
IQR	interkvartilni raspon
JAK/STAT	Janus kinaza/signalni transduktor i aktivator transkripcije
JAK2	Janus kinaza 2
KR	kompletna remisija
KBC	klinički bolnički centar
KROHEM	Hrvatska kooperativna udruga za hematološke bolesti
LD	limfocitna deplecija (engl. Lymphocyte-depleted)
LMP	Latentni membranski protein
LR	limfocitima bogat podtip (engl. Lymphocyte Rich)
MC	miješana celularnost (engl. Mixed Cellularity)
MHC I i II	molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti klase I ili II
MSCT	višeslojna kompjutorizirana tomografija (engl. Multi-Slice Computed Tomography)
N-AVD	nivolumab, doksorubicin, vinblastin, dakarbazin
NCCN	Nacionalna mreža za rak (engl. National Comprehensive Cancer Network)
NF- κ B	nuklearni faktor kappa B
NK stanice	prirodne stanice ubojice (engl. Natural Killer cells)
NHL	ne-Hodgkinov limfom
NS	nodularna skleroza (engl. Nodular Sclerosis)
OEPA	vinkristin, etoposid, prednizon i doksorubicin

ORR	stopa ukupnog odgovora (engl. Overall Response Rate)
OS	ukupno preživljenje (engl. Overall Survival)
PB	progresija bolesti
PD-1 i 2	receptori za ligande programirane stanične smrti
PD-L1	ligand programirane stanične smrti 1 (engl. Programmed Death-Ligand 1)
PD-L2	ligand programirane stanične smrti 2 (engl. Programmed Death-Ligand 2)
PET	pozitronska emisijska tomografija
PI3K/AKT	Fosfatidilinozitol 3-kinaza/AKT
PR	parcijalna remisija
RH	Republika Hrvatska
R/R	relapsno-refraktorna bolest
SAD	Sjedinjene Američke Države
SE	sedimentacija eritrocita
TAM	uz tumor vezani makrofazi (engl. Tumor Associated Macrophages)
T _C	CD8 ⁺ citotoksični T limfociti
T _H	pomoćne T stanice (engl. T helper cells / lymphocytes, CD4 ⁺)
TME	tumorski mikrookoliš (engl. Tumor Microenvironment)
Treg	T-regulatorne stanice

1. UVOD

1.1. Epidemiologija klasičnog Hodgkinovog limfoma

Klasični Hodgkinov limfom (kHL) je novotvorina građena od malobrojnih zloćudnih transformiranih B limfocita – Hodgkin Reed-Sternbergovih stanica (HRS) u obilnom reaktivnom mikrookolišu i po tome se, između ostalog, razlikuje od ostalih tzv. ne-Hodgkinovih limfoma (NHL). Druga osobitost kHL-a je bimodalna dobna raspodjela, s najvišom učestalošću u mlađoj odrasloj dobi i drugim vrhom u starijoj životnoj dobi. U Europi, Sjedinjenim Američkim Državama i drugim ekonomski razvijenim zemljama, na kHL otpada 10 %, a na NHL 90% svih limfoma (1). U tim je zemljama godišnja incidencija 2-3/100 000 stanovnika. U Hrvatskoj je, prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2020. godine bilo 108 novih slučajeva HL-a i incidencija je 2,7/100 000 stanovnika (2). Četiri su histološka podtipa kHL klasificirana s obzirom na varijante HRS i sastav njihova mikrookoliša: miješana celularnost (MC), nodularna skleroza (NS, limfocitima bogat podtip (LR, engl. *lymphocyte rich*) i limfocitna deplecija (LD, engl. *lymphocyte depletion*). Raspodjela podtipova kHL ovisi o životnoj dobi, spolu i socioekonomskom statusu. U razvijenim zemljama najčešće su zastupljeni NS i MC, u 70% odnosno 20-25% slučajeva, a u zemljama u razvoju najzastupljenija je MC (3). Epstein-Barr virus (EBV) može se dokazati u značajnom broju MC i LD. Nalazi se također u HRS stanicama bolesnika s kHL-om koji su zaraženi virusom humane imunodeficijencije (HIV) (4,5). U razvijenim zemljama najveća učestalost kHL-a je između 15. i 35. godine života, a drugi, manji vrh incidencije je u starijih od 65 godina (6). U adolescenata su limfomi najčešća zloćudna bolest i na njih otpada 21% malignoma dijagnosticiranih u dobnoj skupini od 15 do 19 godina, a na kHL otpada dvije trećine tih slučajeva (7). U zemljama u razvoju prvi vrh incidencije u ranoj je dječjoj dobi i češće kod muškaraca, dok je incidencija u mladim odraslih niska, potom ponovo visoka u starijih osoba (5). Podtipovi kHL pokazuju različitu raspodjelu po dobi i spolu. Podtip NS se najčešće javlja između 15. i 35. godine života, a MC bimodalno s prvim vrhom u mlađih odraslih i drugim vrhom u starijih osoba (3). Za NS je incidencija slična kod muškaraca i žena, dok su ostali podtipovi učestaliji u muškaraca (8).

1.2. Patogeneza klasičnog Hodgkinovog limfoma

1.2.1. Rizični čimbenici

Kompleksna patogeneza kHL-a uključuje međudjelovanje virusnih, imunoloških, okolišnih i genetskih čimbenika, od kojih je najčvršća povezanost s EBV. Gotovo cijela svjetska populacija, 90–95 % ljudi se tijekom života, obično u ranom djetinjstvu, inficira preko sline iz svoje najbliže okoline tim ubikvitarnim gama – Herpes virusom koji je limfotropan za B stanice (9), no samo mali broj naknadno razvije limfom. U male djece infekcija najčešće prođe asimptomatski, obilježena je serokonverzijom i kao latentna infekcija B limfocita traje cijeli život. U adolescenata primoinfekcija EBV uz serokonverziju izaziva burnu T staničnu imunološku reakciju i akutnu bolest infektivnu mononukleozu (IM), manifestiranu konstitucijskim simptomima, faringitisom, limfadenopatijom, hepatosplenomegalijom i pojavom atipičnih reaktivnih T limfocita u perifernoj krvi. Nakon preboljele IM četiri je puta veći relativni rizik od kHL, osobito EBV-pozitivnog kHL, ali je apsolutni rizik vrlo nizak (10). Zloćudne HRS potječu iz folikularnog centra B-limfocita koje nose “osakaćene” (engl. *crippled*) mutacije imunoglobulinskih gena i koje su predodređene za apoptozu. Ako su prethodno bile latentno inficirane s EBV-om, virus aktivacijom antiapoptotskih signalnih putova sprječava njihovu smrt i doprinosi razvoju kHL-a (11). Prevalencija EBV-a u podtipovima kHL nije jednaka te je najčešći u MC, a najrjeđi u NS (12,13). U zemljama u razvoju je značajno češći EBV-pozitivan kHL. Gotovo svi bolesnici zaraženi HIV-om koji obole od kHL imaju EBV-pozitivnu bolest (14,15). Imunosupresija je općenito važan rizični čimbenik za razvoj kHL-a, primjerice kod transplantiranih bolesnika ili tijekom dugotrajne imunosupresivne terapije, no taj je rizik manji nego za razvoj NHL (16,17). Epidemiološke studije upućuju na povećani rizik od kHL u bolesnika s autoimunim bolestima kao što su nodozni poliarteritis, dermatomiozitis, Sjögrenov sindrom i psorijaza, u kojih je HL dvostruko češći u odnosu na opću populaciju (18). Genetski i familijarni čimbenici su također važni - prvi srodnici bolesnika s kHL imaju tri do pet puta veći rizik od razvoja HL, a rizik je najveći među braćom i sestrama (19).

1.2.2. Molekularne promjene

Tumorski mikrookoliš (engl. *tumor microenvironment*, TME) se razlikuje među limfomima i tumorima općenito. Obilježja TME odražavaju koliko se tumorske stanice za svoj rast i preživljavanje oslanjaju na okolne, mahom imunološke stanice. Kod kHL taj je odnos osobito izražen. Na zloćudne HRS otpada samo oko 1 % tumorskog tkiva, a ostatak čini TME i u njemu obilje različitih reaktivnih imunoloških stanica (3). HRS uspijevaju preživjeti i proliferirati jer “uprežu” upalne stanice u svoju korist. Scott i Gascoyne su obrazac okupljanja upalnih stanica karakterističan za kHL nazvali „regrutiranjem“ kako bi naglasili neravnotežu u kojoj rijetke tumorske stanice dominiraju nad znatno brojnijim imunološkim okruženjem koje im je potpora umjesto prijetnje (20). Iako su HRS stanice uslijed disregulacije promijenile genski profil i izgubile većinu tipičnih B-staničnih obilježja i površinskih molekula, postoje jasni dokazi da potječu iz B limfocita germinativnog centra (GC) u kojima se vrši somatska preuredba imunoglobulinskih gena. Porijeklo HRS stanice iz GC/poslije-GC B-limfocita utvrđeno je na temelju klonalnih preuredbi varijabilnog dijela teškog lanca imunoglobulina IGHV (engl. *Immunoglobulin Heavy Chain Variable region*) u HRS stanicama (21,22).

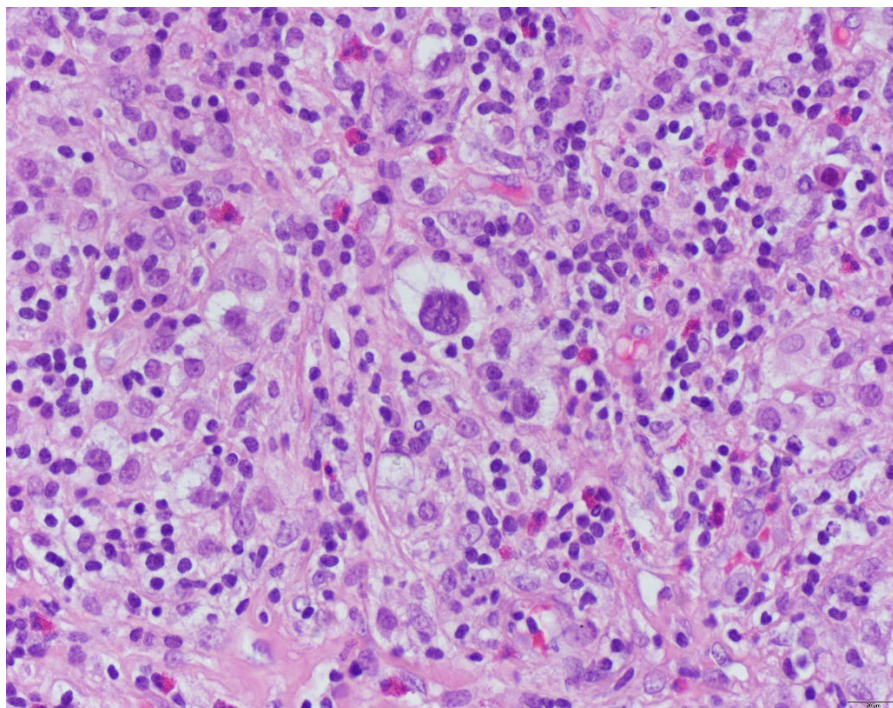
U HRS stanici sve stečene mutacije i/ili poremećeni izražaj gena uključenih u signalne puteve nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B), Janus kinaze/signalnih transduktora i aktivatora transkripcije (JAK/STAT), aktivatora proteina 1 (AP-1) i NOTCH signalnog puta pojačavaju njihovu aktivnost i doprinose izmijenjenom izražaju i lučenju citokina, kemokina i drugih čimbenika (23). HRS luče kemokine CCL5, CCL17, CCL20 i CCL22 koji kao ligandi privlače CD4⁺ T-limfocite (24). CCL5 privlači makrofage, mastocyte i eozinofile, a IL-8 neutrofile. CCL17 i CCL22 privlače CCR4-pozitivne T-regulatorne stanice (Treg) koji imaju receptor CCR4 i suprimiraju imunološki odgovor. Osim toga, IL-10 kojeg luče HRS stanice i Treg stanice inhibira funkciju infiltriranih citotoksičnih T-stanica i prirodnih stanica ubojica (NK stanica) (25,26).

U kHL-u postoje brojni mehanizmi za izbjegavanje imunološkog nadzora. Zna se da je stanični imunološki odgovor reguliran stimulacijskim i inhibitornim receptorima i ligandima na T limfocitima i antigen-prezentirajućim stanicama (APC). HRS stanica se ponaša kao APC na osebujan i sebi koristan način, što konačno rezultira supresijom T staničnog odgovora. Najčešće HRS stanica gubi ili ima vrlo nizak izražaj proteina glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *main histocompatibility complex*, MHC) razreda I ili II, čime sprječava prezentaciju vlastitih antigena T limfocitima (27,28). HRS stanica prekomjerno izražava ligande programirane stanične smrti (engl. *programmed cell death*) PD-L1 i PDL-2 jer ima

povećan broj kopija tih gena na kromosomu 9p24.1. Ligandi programirane stanične smrti vežu se za receptore programirane stanične smrti 1 (PD-1) na T-limfocitima, što djeluje kao inhibični signal koji blokira citotoksičnu reakciju i vodi „iscrpljenju“ T limfocita (29).

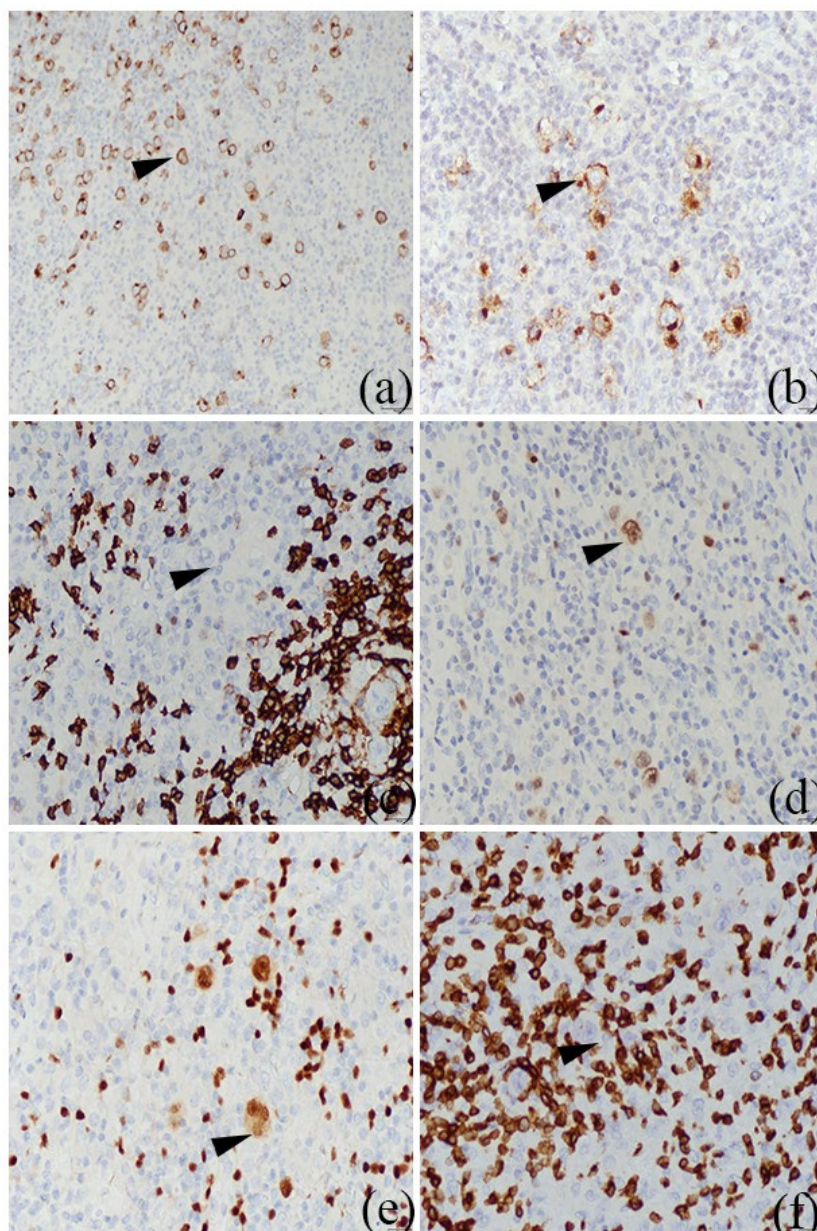
1.3. Histološke karakteristike klasičnog Hodgkinovog limfoma

Malobrojne zloćudne HRS stanice okružene su obilnim infiltratom T limfocita, B limfocita, eozinofila, plazma stanica, makrofaga i fibroblasta koji mogu stvarati tračke kolageniziranog ili retikularnog veziva (**Slika 1**).



Slika 1. Klasični Hodgkinov limfom. Malobrojne HRS okružene su reaktivnim mikookolišem kojeg sačinjavaju upalne stanice i fibroblasti (HE 400x). Izvor: uzorak iz doktorskog istraživanja.

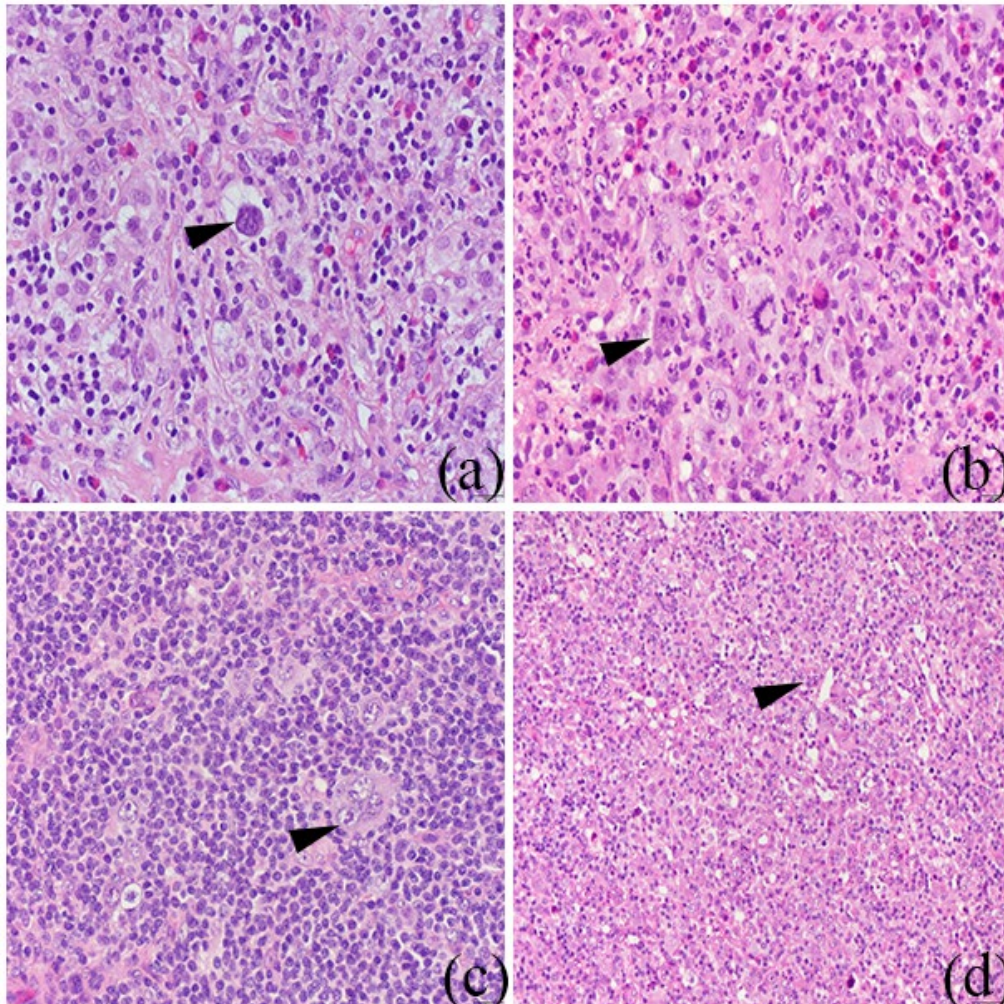
HRS je podrijetla poslijegerminativne B stanice koja je uslijed mutacija izgubila imunofenotip B stanice i stekla nove raznorodne biljege (**Slika 2**).



Slika 2. Imunofenotip HRS stanice. Tipično su pozitivni aktivacijski biljeg CD30 (a) i biljeg mijelocitne loze CD15 (b), negativan B stanični biljeg CD20 (c), slabo pozitivni B stanični biljezi MUM-1 i Pax5 (d, e) i negativan biljeg CD3 (f), inače izražen na T stanicama koje poput vjenčića okružuju HRS stanicu (imunohistokemija HRP, povećanje 100x (a) i 400x (b-f). HRS stanica je označena strelicom. Izvor: uzorci iz doktorskog istraživanja.

Ovisno o sastavu mikrookoliša, razlikuju se četiri podtipa kHL-a (**Slika 3**). Nodularna skleroza je karakterizirana vezivnim pregrađivanjem tumora i prisutnošću lakunarnih stanica koje su varijanta HRS stanice s retrahiranom citoplazmom. Miješanu celularnost karakteriziraju klasične HRS stanice okružene upalnim infiltratom u kojem je obilje eozinofila. Limfocitima

bogati podtip karakterizira uglavnom limfocitni mikrookoliš, a limfocitnu depleciju bizarne HRS, manjak limfocita u mikrookolišu i retikularno vezivo među stanicama.



Slika 3. Podtipovi klasičnog Hodgkinova limfoma: nodularna skleroza (a), miješana celularnost (b), limfocitima bogat (c) i limfocitna deplecija (d) (HE 400x). HRS stanica označena je strelicom. Izvor: uzorci iz doktorskog istraživanja.

1.4. Klinička slika klasičnog Hodgkinovog limfoma

Kod kHL-a klinička se slika najčešće razvija sporo, iako dinamika bolesti može biti vrlo individualna. Mnogi bolesnici tjednima ili mjesecima prije postavljanja dijagnoze primjećuju neobične, tzv. “B” simptome, poput pojačanog umora, profuznog noćnog znojenja, nenamjernog gubitka tjelesne mase (većeg od 10 % tijekom šest mjeseci), povišene tjelesne

temperature ($>38^{\circ}\text{C}$) i/ili svrbeža kože (30). Svrbež, najčešće generaliziran, ne smatra se B-simptomom, a javlja u 10-15% bolesnika s kHL-om (31). B simptomi su prisutni u 40% bolesnika s kHL-om (30), a većina ipak nema B-simptome nego se prezentira asimptomatskom perifernom limfadenopatijom, ili se na radiološkoj snimci prsnog koša slučajno otkrije masa u medijastinumu (32). Povećani, uočljivi i palpabilni limfni čvorovi na vratu obično su prvi znak bolesti. Nađu se u 60% bolesnika s kHL-om, tipično kao bezbolni, konzistencijom tvrdi tumori. Otprilike je jednaka učestalost zahvaćanja medijastinalnih limfnih čvorova (33), no tada se bolest obično otkrije kad medijastinalna masa izazove nelagodu, kašalj ili pritisak u prsima. Proširenje medijastinuma limfomskom masom može biti asimptomatsko, a rjeđe izazva izljev ili izuzetno rijetko sindrom gornje šuplje vene. U ranom stadiju bolesti, opsežno proširenje limfnih čvorova u medijastinumu je prognostički nepovoljan znak. U manje od 10 % bolesnika javlja se izuzetan i specifičan simptom - bol neposredno nakon konzumacije alkohola obično na mjestu zahvaćenih limfnih čvorova ili kostiju (34). Početni laboratorijski nalazi u kHL-u su često poremećeni, a u prognostički nepovoljne spadaju anemija, leukocitoza, limfopenija i hipoalbuminemija (35). Ubrzana sedimentacija eritrocita (SE) je česta u uznapredovalom stadiju bolesti, dok u ranim stadijima (I i II stadij) predstavlja nepovoljni prognostički čimbenik. Ubrzana SE povezana je s pojavnošću B-simptoma. Anemija u kHL-u je najčešće tipa kronične bolesti, no može biti i zbog infiltracije koštane srži limfomskim stanicama, uslijede hipersplenizama ili vrlo rijetko zbog autoimune hemolize (36). Manji broj bolesnika, 5-18% već kod postavljanja dijagnoze ima zahvaćenu koštanu srž (37,38), što je ipak češće povezano s uznapredovalim stadijem bolesti (37). Pravovremeno prepoznavanje simptoma je ključno za što raniju dijagnozu i uspješno liječenje.

1.5. Dijagnostika i klasifikacija klasičnog Hodgkinovog limfoma

Kod uzimanja anamneze treba obratiti pozornost na prisustvo, trajanje i proširenost limfadenopatije, kašlja/ostalih respiratornih simptoma i B-simptoma. Evaluiraju se sva palpaciji dostupna limfatična tkiva uključujući veličinu, broj i regije uvećanih limfnih čvorova i prisutnost hepato- i/ili splenomegalije. U laboratoriju treba analizirati kompletnu krvnu sliku s diferencijalnom krvnom slikom, sedimentaciju eritrocita, serumsku biokemiju uključujući elektrolite, pokazatelje jetrene i bubrežne funkcije i albumine. Rutinski se radi serološko testiranje na viruse hepatitisa B i C i HIV. Dijagnoza se postavlja na temelju patohistološke

analize u cijelosti ekstirpiranog perifernog limfnog čvora, optimalno iz područja vrata ili pazuha s obzirom da su preponski limfni čvorovi često izmijenjeni prijašnjim upalnim reakcijama. Kad su periferni limfni čvorovi nedostupni, slikovna dijagnostika - ultrazvuk, višeslojna kompjutorizirana tomografija (engl. *Multi-Slice Computed Tomography*, MSCT) sama/u kombinaciji s pozitronskom emisijskom tomografijom (PET) - koristi za identifikaciju limfomom zahvaćenog čvora, kao i za slikovno navođenje iglene biopsije (30). Danas je za određivanje proširenosti/stadija bolesti i procjenu odgovora na terapiju kod bolesnika s kHL-om standard PET/CT pretraga u kojoj se koristi fluorodeoksiglukoza (FDG) obilježena radioaktivnim fluorom, u kombinaciji s višeslojnom (pri dijagnozi) ili niskodoznom (najčešće nakon dva ciklusa terapije) kompjutoriziranom tomografijom, tzv. CT-om (engl. *Computed Tomography*). Radiofarmak FDG se injicira intravenski i kao analog glukoze pojačano nakuplja u svim metabolički aktivnim tkivima pa tako i tumoru. PET/CT je važan za procjenu zahvaćenosti koštane srži zbog karakterističnog fokalnog nakupljanja glukoze u zloćudnim stanicama. Preporuka je da se biopsija koštane srži ne radi ako se inicijalno koristi PET/CT za procjenu proširenosti bolesti (30,39). Tumor se tipično širi limfom u susjedne regije pa hematogena diseminacija i preskakanje limfnih regija nisu tipični i uglavnom se vide u osoba s kompromitiranim imunitetom (40). Stoga se za utvrđivanje stadija bolesti danas koristi Ann Arbor klasifikacija modificirana u Cotswaldu (**Tablica 1**), a za planiranje liječenja uzimaju se u obzir i klinički rizični čimbenici (30,41).

Tablica 1. Ann Arbor klasifikacija Hodgkinova limfoma s Cotswoldskom modifikacijom

Stadij

- I – Zahvaćeni limfni čvorovi jedne regije ili limfoidne strukture (slezena, timus, Waldeyerov prsten)
- II – Zahvaćeno dvije ili više regija limfnih čvorova ili limfoidnih struktura s jedne strane ošita
- III – Zahvaćeno više regija limfnih čvorova ili limfoidnih struktura s obje strane ošita
- IV – Difuzno ili diseminirano zahvaćanje jednog/više ekstralimfatičkih organa sa/bez zahvaćanja limfnih čvorova

Modificirane karakteristike

A – bez B simptoma

B – Prisutni konstitucijski simptomi (temperatura > 38 C, noćno znojenje, gubitak tjelesne mase više od 10 % zadnjih 6 mjeseci)

X – “*Bulky*” (masivna) bolest – (medijastinalna masa zauzima $\geq 1/3$ promjera prsnog koša na CT-u, ili bilo koja nodalna masa promjera > 10 cm)

E – Zahvaćanje ekstralimfatičnog organa izravnim širenjem iz zahvaćenog limfnog čvora

Izvor: Townsend W, Linch D. Hodgkin's lymphoma in adults. Lancet. 2012; 380:836–47. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF i sur. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. J Clin Oncol 2014; 32:3059.

Dvije su osnovne kategorije HL-a koje Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) prepoznaje kao zasebne bolesti na temelju morfoloških i imunohistokemijskih obilježja. Uz do sad spominjani klasični HL koji je predmet istraživanja u ovoj disertaciji, druga kategorija HL-a je nodularna limfocitna predominacija (NLPHL) (42). Klasični HL čini oko 90 % svih slučajeva HL-a (3,43). Iako se prema SZO zadržao termin *nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma* (42), Međunarodna konsenzusna klasifikacija s obzirom na biološke i kliničke razlike naspram kHL-a, zamijenila ga je terminom *nodularni limfocitno-predominatni B-stanični limfom* (44).

1.6. Procjena prognostičkog rizika i stratifikacija liječenja klasičnog Hodgkinovog limfoma

Iako se stadiji bolesti definiraju gore navedenom Ann Arbor klasifikacijom, dodatna stratifikacija, osobito kod ranih stadija, omogućuje precizniju procjenu rizika i individualizaciju liječenja. U tom kontekstu, kHL se dijeli na rani (stadiji I i II) i uznapredovali oblik (stadiji III i IV), a rani se stadiji ovisno o postojanju nepovoljnih kriterija stratificiraju kao rani povoljni i rani nepovoljni stadij. Dva su najčešće korištena modela za procjenu nepovoljne prognoze u ranom stadiju model Europske organizacije za istraživanje i liječenje raka (EORTC) (30) i Njemačke skupine za Hodgkinov limfom (GHSG) (45). Dosadašnja istraživanja nisu dokazala superiornost ni jednog od tih modela u smislu prediktivne vrijednosti (46).

Prema EORTC kriterijima, pacijenti se svrstavaju u nepovoljnu skupinu ako je prisutan barem jedan od sljedećih čimbenika: dob iznad 50 godina, veliki medijastinalni tumor (širina

veća od jedne trećine torakalnog promjera na razini torakalnih kralješaka Th5–Th6), ubrzana SE (≥ 50 mm/h u odsustvu B- simptoma, odnosno ≥ 30 mm/h uz B- simptome), ili pak postojanje četiri ili više zahvaćenih regija limfnih čvorova (30). GHSG koristi slične kriterije, ali isključuje dob pacijenta kao prognostički kriterij, nepovoljnim se smatraju već ≥ 3 zahvaćene regije (umjesto 4), te dodatno uključuje ektranodalna zahvaćenost kao nepovoljan čimbenik (45). Ono što se provlači kao osnovna zamisao postojanja tih modela jest da se rani stadij bolesti ne smatra automatski "povoljnim" i da se takva stratifikacija, za razliku od klasične klasifikacije po Ann Arboru, koristi za *krojenje* terapijskih odluka.

S druge strane, pacijenti sa stadijem III i IV ulaze u kategoriju uznapredovale bolesti. U toj je populaciji procjena rizika vrši se po međunarodnom prognostičkom indeksu (engl. *International Prognostic Score*, IPS), tzv. Hasencleverovu indeksu (35), koji uključuje niz kliničkih i laboratorijskih parametara s prognostičkim značajem:

- albumin < 40 g/L
- hemoglobin < 105 g/L
- muški spol
- dob > 45 godina
- IV stadij bolesti
- broj leukocita $\geq 15,000/\text{mcL}$
- apsolutni broj limfocita $< 600/\text{mcL}$ i/ili udio limfocita od ukupnog broja leukocita $< 8\%$

1.7. Liječenje klasičnog Hodgkinovog limfoma

Liječenje kHL-a ovisi većinom o kliničkom stadiju, postojanju nepovoljnih prognostičkih čimbenika, dobi i komorbiditetima bolesnika. Liječenje se desetljećima temeljilo na standardnoj kemoterapijskoj shemi ABVD (engl. *Adriamycin*, *Bleomycin*, *Vinblastine*, *Dacarbazine*) koja sadrži četiri navedena kemoterapeutika (47). Bolesnici u ranijim stadijima bolesti mogu se liječiti kombiniranom modalitetnom terapijom (engl. *Combined Modality Treatment*, CMT) koja sadržava kraći broj ciklusa kemoterapije nakon koje slijedi radioterapija zahvaćenog polja (engl. *Involved-Field Radiotherapy*, IFRT), a mogu biti liječeni i samo kemoterapijom. Posljednjih nekoliko godina se za liječenje uznapredovalih stadija bolesti sve češće koristi intenzivniji kemoterapijski protokol – BEACOPP (engl. *Bleomycin*, *Etoposide*,

Adriamycin, Cyclophosphamide, Oncovin, Procarbazine, Prednisone), uz moguću deeskalaciju na manje intezivan protokol (obično ABVD) ili manji ukupni broj ciklusa ukoliko bi prvi kontrolni (tzv. *interim*) PET, koji se obično radi nakon dva ciklusa sistemskog liječenja (PET 2), ukazivao na povoljan odgovor (48). PET±CT je tako osim u dijagnostičke svrhe na početku bolesti, postao okosnica za *krojenje* i individualiziranje liječenja (49). Kod bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti radioterapija se obično ne primijenjuje nakon kemoterapije, odnosno primijenjuje se samo u određenim slučajevima, primjerice ako je postignuta samo djelomična remisija po EOT PET/CT-u (engl. *End Of Treatment PET/CT*) nakon završenog planiranog liječenja ili kod inicijalno *bulky* tumorske mase (50). Tek u novije vrijeme, u terapiji se počinje koristiti imunoterapija. Od imunoterapijskih lijekova koji se koriste u liječenju kHL-a, trenutno su u kliničkoj upotrebi dvije skupine: monoklonsko protutijelo usmjereno na CD30, konjugirano s antineoplastičnim lijekom – brentuksimab vedotin (BV) i PD-1 blokatori, koji su uvedeni nešto kasnije. BV koji je početno bio predviđen u višim terapijskim linijama, sada se u određenim indikacijama već koristi u prvoj liniji liječenja zajedno s kemoterapijom slabijeg ili jačeg intenziteta (51,52). Iako su PD-1 blokatori u istraživanjima pokazali impresivne rezultate uz kemoterapiju u prvoj liniji liječenja kHL-a (53), čak ostvarili i bolje ishode nego kombinacija iste kemoterapije i BV-a (54), njihova je formalna primjena zasad regulirana restriktivno. Naime, Američka agencija za hranu i lijekove (*U.S. Food and Drug Administration*, FDA) (55) te Europska agencija za lijekove (*European Medicines Agency*, EMA) (56,57) odobrile su njihovu uporabu tek u kasnijim linijama liječenja kHL-a, najčešće kod relapsne ili refraktorne bolesti nakon višestrukih prethodnih terapija.

1.7.1. Liječenje ranog povoljnog stadija

Rani povoljni stadij kHL-a, kako je prethodno navedeno, odnosi se stadij I ili II s ograničenim brojem zahvaćenih limfnih čvorova, bez ekstrapodalnog zahvaćanja i bez velike medijastinalne mase. Danas se u većini centara bolesnici s ranim povoljnim stadijem po (GHSG kriterijima) liječe kratkotrajnom kemoterapijom 2 ciklusa ABVD-a i IFRT-om od 20 Gy. To se temelji na rezultatima kliničkog ispitivanja HD10, koje je pokazalo da nema značajne razlike u preživljenju bez progresije (PFS) ni ukupnom preživljenju (OS) u usporedbi s intenzivnijim režimima liječenja (2 prema 4 ciklusa ABVD i 20 prema 30 Gy IFRT) (45). S druge strane, u nekim smjernicama poput smjernica Nacionalne mreže za rak (engl. *National Comprehensive*

Cancer Network, NCCN), sve više se primjenjuje PET-vođena terapija. Liječenje započinje s dva ciklusa kemoterapije po ABVD protokolu, a strategija daljnjeg liječenja ovisi o tzv. *interim* odgovoru na terapiju verificiranom PET-om (PET2) (48–50,58). *Interim* odgovor definira se pomoću ljestvice Deauville (Deauville 1–5), koja se temelji na intenzitetu nakupljanja FDG-a u odnosu na medijastinum i jetru, pri čemu vrijednosti Deauville 1–3 označavaju potpuni odgovor. Prema toj je strategiji nakon verifikacije kompletne remisije na PET2 opcija je nastaviti liječenje samo kemoterapijom ili CMT-om, odnosno zračenjem. S obzirom na to da zračenje može uzrokovati kasne komplikacije, poput oštećenja plućne i srčane funkcije, hipotireoze te povećanog rizika od sekundarnih tumora, dugo se istraživala mogućnost izostavljanja radioterapije. Poznato je da CMT liječenje, iako ne pokazuje prednost u OS-u, ipak rezultira s manjim brojem ranih progresija bolesti u bolesnika s ranim stadijem kHL-a (59). Stoga je kod mlađih bolesnika, s očekivanim velikim poljem zračenja, naročito uz ozračivanje tkiva dojke kod žena ili kod subkarinalne lokalizacije limfonoda bolesnika s kardiovaskularnim komorbiditetom, razumno odlučiti se za nastavak liječenja samo kemoterapijom. Obično se primjenjuju dva dodatna ciklusa ABVD (četiri ukupno) na temelju studija H10F i CALGB 50604 (60,61). U slučaju nepotpunog PET-2 odgovora, po smjernicama Europskog društva za medicinsku onkologiju (ESMO) i NCCN-a nastavlja se liječenje ABVD-om + ISRT (npr. kod fokalno pozitivne bolesti) ili BEACOPPesc + ISRT, uz nerijetko potrebu za dodatnom evaluacijom koja uključuje ponovnu biopsiju i, ovisno o rezultatu, nastavak liječenja po protokolu za primarno refraktornu bolest (50,60,62).

1.7.2. Liječenje ranog nepovoljnog stadija

Strategija liječenja ranog nepovoljnog stadija (stadij I i II) s prognostički nepovoljnim čimbenicima po GHSG-u ili EORTC-u također nije univerzalna i više je pristupa liječenju, naročito nakon pojave imunološki usmjerenih lijekova kao uspješnog modaliteta liječenja. Kemoterapija je, s obzirom na nedostupnost novijih lijekova, još okosnica liječenja u ovom stadiju, a liječenje PET-vođeno nakon početna dva ciklusa ABVD-a (50,60). U slučaju potpunog odgovora, opcije liječenja ponovno bi bile CMT ili nastavak samo kemoterapije. CMT pristup uključivao bi još dva ciklusa ABVD-a i radioterapiju (inicijalno) zahvaćenog mjesta (ISRT) jačine 30 Gy, prema rezultatima H10U studije (60). Ukoliko se, ovisno o karakteristikama pacijenta i anatomske lokalizaciji bolesti, odluči pristupiti samo kemoterapiji nakon postizanja potpunog odgovora davanjem 2 ciklusa ABVD-a, po RATHL i H10U

studijama, primijenila bi se dodatna 4 ciklusa AVD-a (doksorubicin, vinblastin, dakarbazin - bez bleomicina radi izbjegavanja plućne toksičnosti) (60,63). U slučaju nepostizanja kompletne remisije (KR), odnosno Deauville 4-5 odgovora na PET2, savjetuje se intenzivirati terapiju primjerice escBEACOPP-om ili novije BrECADD-om (engl. *Brentuximab vedotin, Etoposid, Cyclophosphamide, Adriamycin, Dacarbazine i Dexamethasone*) protokolom, koji kombinira monoklonsko protutijelo s kemoterapeutikom (50,52,62). Imunokemoterapija se može aplicirati i početno uz odlične rezultate, po protokolima nivolumab-AVD ili BV-AVD uz ISRT nakon 4 ciklusa. Agresivniji protokol, BrECADD se kao imunokemoterapija također može primijeniti u ovom kontekstu kad pacijent ima određene nepovoljne čimbenike - izražene B simptome, veliku medijastinalnu masu i/ili ektranodalnu bolest (50,52,53,64). Ipak, u većini zemalja u ovom stadiju, a u mnogim zemljama ni u prvoj liniji navedena terapija nije nije dostupna, osim u kliničkim studijama.

1.7.3. Liječenje uznapredovalog stadija

Liječenje uznapredovalog stadija kHL-a (stadij III i IV) dugi niz godina temeljilo se na primjeni kemoterapije, odnedavno uz dodatak imunoterapije i BV-a (51,52). Terapija zračenjem koristi se samo u određenim situacijama, primjerice kod bolesnika s velikom tumorskom masom ili kod djelomičnog odgovora na početno liječenje (65,66). Najčešći protokol koji se u svijetu koristi je ABVD jer su istraživanja pokazala da intenzivniji režimi ne donose prednost u OS-u (66,67). Ipak, kod bolesnika s visokim IPS-om rezultati liječenja ABVD-om su lošiji u pogledu PFS-a. Zbog toga su razvijeni snažniji protokoli, poput escBEACOPP-a, koji omogućuju veću stopu izlječenja (oko 80%) i bolji PFS, ali povećavaju rizik od nuspojava, poput sekundarnih maligniteta, neutropenije i neplodnosti (68). Zato je glavni izazov u liječenju uznapredovalog kHL-a pronaći ravnotežu između dugotrajne remisije i smanjenja rizika od kasnih nuspojava. U srednjoj Europi češće se koristi escBEACOPP odnosno BrECADD kao standardna terapija, a u Italiji, Velikoj Britaniji i SAD-u ABVD odnosno AVD protokoli uz dodatak imunoterapije, primjerice BV-AVD ili eventualno nivolumab-AVD, gdje je to moguće i dostupno. Uvođenje PET2 i u ovom je stadiju omogućilo *krojenje* liječenja ovisno o terapijskom odgovoru. Studija RATHL pokazala je da bolesnici s negativnim PET2 nalazom nakon dva ciklusa ABVD-a mogu sigurno nastaviti terapiju bez bleomicina, čime se smanjuje rizik od plućne toksičnosti bez smanjenja učinkovitosti (63). Kod bolesnika s pozitivnim PET2 nalazom, prelazak na escBEACOPP pokazao se sigurnim i učinkovitim, bez većeg rizika od sekundarnih maligniteta

(63). Slično tome, studija AHL2011 pokazala je da bolesnici koji imaju negativan PET2 nalaz nakon escBEACOPP-a mogu prijeći na AVD režim bez gubitka učinkovitosti, uz manju toksičnost terapije (48). Kako je već spomenuto, noviji terapijski protokoli za uznapredovali kHL uključuju primjenu BV-a i inhibitora PD-1. Rezultati studije ECHELON-1 pokazali su da BV-AVD predstavlja učinkovitu terapijsku opciju s duljim PFS-om i OS-om u odnosu na standardni ABVD protokol. Najveći je doprinos upravo u uznapredovalom stadiju (51,69). BrECADD je također noviji imunokemoterapijski protokol. Zadržava osnovnu strukturu eBEACOPP protokola, uz izostanak bleomicina i prokarbazina, a uvođenje BV-a kao učinkovite imunoterapije i dakarbazina. Studija GHSG HD21 pokazala je da BrECADD ima povoljniji sigurnosni profil i bolju učinkovitost u usporedbi s eBEACOPP-om, s trogodišnjim PFS-om od 98 % kod PET2-negativnih i 92 % kod PET2-pozitivnih bolesnika (52). Na temelju tih rezultata EMA je odobrila primjenu BV-a u prvoj liniji liječenja bolesnika s uznapredovalim stadijem Hodgkinova limfoma u kontekstu oba spomenuta protokola (BV-AVD i BrECADD) (70). Napredak u liječenju uznapredovalog stadija bolesti ne proizlazi samo iz uključivanja konjugiranog anti-CD30 protutijela u standardne kemoterapijske protokole, već i iz primjene PD-1 inhibitora, čiji je cilj dodatno poboljšati ishode liječenja. Čak su i direktno uspoređeni šest ciklusa N-AVD (nivolumab + AVD) s BV-AVD protokolom. Rezultati su pokazali viši (za sada dvogodišnji) PFS (92 % prema 83 %), veću učestalost težih hematoloških nuspojava i poremećaj funkcije štitnjače (54). Problem je dostupnost PD-1 inhibitora u prvoj liniji liječenja. FDA (55) i EMA (56,57) odobrile su njihovu uporabu u kHL-u tek kod relapsne ili refraktorne bolesti nakon višestrukih prethodnih terapija.

1.7.4. Liječenje relapsnog ili refraktornog kHL-a

Većina bolesnika postiže potpunu remisiju i ima povoljnu prognozu, ali 10% do 30% liječenih standardnom terapijom doživljava relaps ili refraktornu (R/R) bolest i imaju loš ishod (71). Bolesnici s progresijom bolesti obično se liječe tzv. kemoterapijom spasa (engl. *salvage chemotherapy*). U slučaju postizanja remisije nakon dva ciklusa *salvage* kemoterapije, kod transplantabilnih bolesnika provodi se liječenje visokodoznom kemoterapijom koju slijedi autologna transplantacija krvotvornih matičnih stanica HDT/ATKS (engl. *high-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation*) (50,62,72). Od HDT

protokola najčešće se koriste BEAM (karmustin, etopozid, citarabin, melfalan), BCNU (visoke doze ciklofosfamida, karmustin) (68) i kod nas u RH protokol BeEAM (bendamustin, etopozid, citarabin, melfalan) (73). Prikupljanje matičnih hematopoetskih stanica nakon mobilizacije u perifernu krv, najbolje je provesti nakon prvog ciklusa *salvage* terapije (74). Kod visokorizičnih bolesnika nakon ATKS slijedi konsolidacijska terapija s BV-om do ukupno 16 ciklusa (75).

Što se tiče inicijalne, *salvage* terapije, kod nas i u svijetu najčešće se koriste protokoli DHAP (cisplatina, citarabin, deksametazon) i ICE (karboplatina, etopozid, ifosfamid) (72,76,77). Učinkoviti su još i GVD (gemcitabine, vinorelbin, liposomalni doksorubicin), GDP (gemcitabine, karboplatina, deksametazon) i GEMOX (gemcitabine, oksaliplatina) protokol (50,77,78). Odgovor na *salvage* terapiju smatra se ključnim prognostičkim čimbenikom (5 - godišnji PFS u PET negativnih je 75 % prema 31 % u PET pozitivnih) (68). Brojne studije koje su uključivale nove lijekove u *salvage* terapiju, provodile su se s ciljem povećanja stope KR-a jer se tako poveća broj bolesnika koji mogu pristupiti HDT/ATKS. Kombinacije poput BV-ICE, BV-DHAP protokola, bendamustina i BV-a, BV-a s nivolumabom, pembrolizumaba s GVD-om te nivolumaba ili pembrolizumaba s ICE-om pokazale su visoke stope KR-a i uspješno dovele većinu bolesnika do transplantacije, u nekim slučajevima bez potrebe za kemoterapijom (79–85). Međutim, nisu svi bolesnici kandidati za ATKS, a nešto manje od polovine ih relapsira usprkos njenom provođenju (86,87). Kod nekih se bolesnika s obzirom na refraktornost na terapiju provodi alogena transplantacija, često haploidentičnim donatorom s obzirom na izraženiji GVL (engl. *Graft versus Lymphoma*) učinak (88). Toksičnost autologne, a naročito alogene transplantacije značajna je, a relapsi nažalost česti nakon transplantacije. Kako bi se spriječila ili odgodila progresija nakon ATKS, provedena je randomizirana studija faze 3 s BV-om, tzv. AETHERA studija, kojom se ispitivao učinak BV-a kao konsolidacijske terapije u bolesnika s visokim rizikom relapsa nakon HDT/ATKS. Visokorizičnim bolesnicima smatrali su oni s primarno refraktornom bolesti, KR kraćom od 1 godine ili uznapredovalim stadijem u trenutku relapsa. Bolesnici su randomizirani na one koji su nakon ATKS primali do 16 ciklusa BV-a ili placebo. Medijan PFS-a bio je značajno dulji u skupini liječenoj BV-om. Na temelju ovih rezultata, BV je odobren kao konsolidacijska terapija za visokorizične bolesnike nakon ASCT (75). Bolesnici s progresijom bolesti nakon autologne transplantacije krvotvornih matičnih stanica tradicionalno su imali vrlo nepovoljnu prognozu, no njihovi su se ishodi posljednjih godina znatno poboljšali, ponajprije zahvaljujući uvođenju imunoterapije (89). U kliničkom ispitivanju faze 2 s BV-om, provedenom u bolesnika koji nisu odgovorili na ATKS, terapijski je odgovor postignut u 3/4 bolesnika, a potpuna remisija u približno trećine

njih (90). Visoke stope odgovora zabilježene su i pri primjeni PD-1 inhibitora (91–94). U novijem randomiziranom ispitivanju uspoređena je učinkovitost PD-1 inhibitora pembrolizumaba s BV-om u liječenju R/R kHL-a. Bolesnici liječeni pembrolizumabom imali su značajno dulji PFS u odnosu na BV, što potvrđuje PD-1 inhibitore kao poželjniju terapijsku opciju za bolesnike s relapsom nakon ATKS-a ili za one koji nisu kandidati za autolognu transplantaciju (95).

1.8. Problematika recidivirajuće i refraktorne bolesti u kHL-u

R/R kHL usprkos novijim mogućnostima liječenja i dalje predstavlja jedan od većih terapijskih izazova u hematologiji. Unatoč visokoj učinkovitosti prve linije kemoterapije, između 10 % i 30 % bolesnika s kHL-om doživi relaps bolesti nakon početnog liječenja (71). Ishodi tih bolesnika i dalje su nepovoljni. Najizazovniju skupinu čine bolesnici s primarno refraktornom bolesti. Kod njih se usprkos daljnjem kemoterapijskom liječenju bilježe niske stope odgovora i izrazito ograničeno dugotrajno preživljenje bez bolesti koje je u toj skupini imalo tek oko 5 – 10 % bolesnika (96,97). Kako je ranije već navedeno, dodatak imunoterapije itekako je doprinio produljenju preživljenja. Međutim, unatoč impresivnim stopama odgovora na imunoterapiju, osobito na inhibitore PD-1, kod većine se bolesnika koji ove lijekove primaju u kasnijim linijama liječenja progresija bolesti ipak javlja unutar godinu do dvije. U studiji KEYNOTE-204, primjerice, pembrolizumab je kod R/R bolesnika (bolesnici koji su u relapsu nakon ili nisu postigli kriterije za liječenje ATKS) pokazao stopu ukupnog odgovora (ORR) od 65,6 %, uz medijan PFS-a od 13,2 mjeseca, u usporedbi s ORR od 54,2 % i PFS-om od 8,3 mjeseca kod bolesnika liječenih BV-om (95). Iako su rezultati liječenja s obje vrste navedenih imunoloških lijekova, a naročito PD-1 inhibitora značajno bolji od dotadašnjih terapija, jasno je da je učinak vremenski ograničen. Također, mogućnosti daljnjeg liječenja kod ovakve skupine bolesnika veoma su ograničene nakon ponovne progresije, koja je nažalost vrlo izgledna. Problematika liječenja R/R kHL-a kod ovih, često mladih ljudi, jasna je. Mogući razlozi uključuju, između ostalog, složenost TME-a i međudjelovanje mehanizama imunološke evazije i terapijskih intervencija. Pitanje je postoji li mogućnost dodatnog povećanja udjela preživjelih, naročito u uznapredovalim stadijima, primjerice učinkovitijom prvolinijskom terapijom i smanjenjem pojavnosti relapsa i refraktornosti ovog jedinstvenog limfoma, histološki pretežno sačinjenog od imunološki aktivnog mikrookoliša, a s gotovo uniformnom genskom promjenom u tumorskoj stanici koja dovodi do pojačanog izražaja PD liganada.

Primjena PD-1 inhibitora, konkretno nivolumaba s kemoterapijom po protokolu N-AVD ispitivana je i u prvoj liniji, kod ranog nepovoljnog stadija, s gotovo 100 %-tnim PFS-om nakon 41 mjeseca praćenja (53). Isti prvolinijski protokol kod uznapredovalog stadija nakon nešto više od dvije godine praćenja rezultirao je izvrsnim PFS-om od 92 % (54). Rano uključivanje imunoterapije stoga ne znači samo pokušaj produljenja remisije, nego i pomak prema još većem udjelu izliječenih bolesnika.

1.9. Izbjegavanje imunološkog odgovora u klasičnom Hodgkinovom limfomu

1.9.1. PD-1/PD-L1 osovina i uloga PD-L1 u promicanju regulacijskog mikrookoliša

PD-L1 je imunomodulatorni glikoprotein koji može biti izražen na antigen-prezentirajućim stanicama kao što su makrofagi, ali i na tumorskim stanicama. U različitim tipovima karcinoma, T-limfociti u TME-u luče interferon- γ (IFN- γ) koji stimuliranjem JAK-STAT i drugih signalnih puteva u tumorskim stanicama inducira PD-L1 (98). Osjetljivost kHL-a na PD-1 inhibiciju proizlazi pak iz njegove jedinstvene biologije. Za razliku od ostalih solidnih tumora kod kojih je pojačani izražaj PD-liganda uglavnom imunološki induciran, kod kHL-a je konstitutivna. Naime, HRS stanice vrlo često imaju promijenjeni broj kopija gena u području 9p24.1 odnosno gena koji kodiraju PD-L1 i PD-L2. Promjene obuhvaćaju spektar od niske polisomije do relativnog porasta broja kopija i amplifikacije, što dovodi do pojačanog izražaja PD-liganda na HRS stanicama, a jačina ekspresije ovisi o broju kopija (29,99). Roemer i suradnici u pronašlida je ova genska promjena povezana s kraćim PFS-om (99). Izmicanje HRS stanice imunološkom napadu specifičnih T limfocita objašnjava se vezanjem njenog PD-L1 na PD-1 inhibitorski receptor T limfocita, čime se ovaj inaktivira sve do evazije – iscrpljenja CD8⁺ citotoksičnih T limfocita. Takvo utišavanje specifične imunološke reakcije nalazi se u dugotrajnim upalama i nekim solidnim tumorima (100,101). Zato se obnova citotoksičnog imunološkog odgovora smatra ključnom za učinkovitost PD-1 inhibitora u solidnim tumorima (102). S druge strane, izgleda da u kHL-u iscrpljivanje citotoksičnih limfocita preko PD-L1-PD1 osovine nije glavni način kojim HRS stanica osigurava svoj opstanak. Reinke i suradnici analizirali su biopsije kHL prije i nekoliko dana nakon početka terapije PD-1 inhibitorom u prvoj liniji liječenja. Za nekoliko dana od primjene lijeka, HRS stanice gotovo su nestale i došlo je do značajne redukcije PD-L1⁺ makrofaga i Treg stanica, a da istovremeno nije bilo očekivane ekspanzije citotoksičnih limfocita (103). Citotoksični

limfociti zahtijevaju prezentaciju neoantigena na zloćudnoj stanici uz razred 1 MHC koji je na HRS stanicama reduciran ili odsutan (27,104). Reducirani izražaj molekula razreda 1 MHC povezuje se s kraćim PFS-om pacijenata s kHL-om neovisno o 9p24.1 statusu (104). U CheckMate 205 studiji kohorte pacijenata s kHL liječenih nivolumabom analizirani su uzorci tumorskog tkiva prije liječenja. Više od 90 % bolesnika koji su odgovorili na terapiju nisu u toj biopsiji izražavali razred 1 MHC na HRS stanicama, što indirektno upućuje da učinkovitost PD-1 inhibicije ne ovisi o citotoksičnosti posredovanoj T_C-om ni u R/R kHL-u (105), kao što sugeriraju opažanja Reinke i sur. Analize biopsija uzetih par dana nakon početka liječenja nivolumabom u prvoj liniji (103). Jedna novija studija pokazala je da je ekspanzija pojedinačnih, vjerojatno novopridošlih klonova pomoćničkih CD4⁺ T stanica povezana s odgovorom na PD-1 inhibitore (106). CD4⁺ limfociti prepoznaju antigene koje tumorska stanica prezentira putem molekula razreda 2 MHC-a i o toj prezentaciji također može ovisiti antitumorski učinak. Za razliku od većine solidnih tumora, HRS stanice često pokazuju izražaj molekula drugog razreda MHC-a, vjerojatno zbog svog podrijetla iz GC B limfocita. Ipak, u nekih bolesnika s kHL-om mogu biti prisutne genske promjene koje dovode do smanjenog ili negativnog njihova izražaja na HRS stanicama (28). Taylor i suradnici su uporabom različitih metoda – obične i multiplex imunohistokemije, protočne i *imaging* masene citometrije, otkrili povezanost između izražaja PD-L1 i molekula razreda 2 MHC-a, regrutiranja pomoćničkih T staničnih klonova i njihove diferencijacije u Treg stanice. Autori nisu uspjeli povezati obrazac “iscrpljenja” citotoksičnih T limfocita s izražajem PD-L1 jer su bili prostorno udaljeni od HRS stanica. Navedeni dokazi upućuju da dominantni učinak izražaja PD-L1 u kHL-u vjerojatno jest angažman pomoćničkih T limfocita s promicanjem regulatornog mikrokoliša koji štiti tumorsku stanicu (107). U kohorti bolesnika s R/R kHL-om liječenih nivolumabom, 92% bolesnika s KR imali su izražaj molekula razreda 2 MHC na HRS stanicama, a u bolesnika s potpunim imunološkim oporavkom kod kojih je prošlo >12 mjeseci od ATKs, izražaj molekula razreda 2 MHC bio je povezan s duljim PFS-om (105). Ova studija ima još jedan, za praksu važan rezultat - bolesnici s višim brojem kopija u području 9p24.1 i izraženijim PD-L1 na HRS stanicama imali su dulji PFS. To bi značilo da učinak liječenja PD-1 inhibitorima ovisi o izražaju PD-L1 i moguće o izražaju molekula razreda 2 MHC, što naglašava važnost kvantifikacije i preciznog određivanja izražaja PD-L1 u HRS stanicama. Kako je već spomenuto, PD-L1 nije izražen samo u HRS stanicama već i u stanicama tumorskog mikrokoliša, uglavnom makrofagima. Ova je činjenica osobito značajna jer njihov povećan broj predviđa lošiji klinički odgovor na kombiniranu kemoterapiju u bolesnika s uznapredovalim stadijem bolesti (108). Carey i suradnici su uporabom *multiplex*

imunofluorescencije i digitalne analize slike istražili topologiju mikrookolišne niše oko HRS stanice i pronašli da su PD-L1+ makrofagi u blizini PD-L1 pozitivnih HRS stanica, kao i CD4+ limfociti, od kojih dio izražava PD-1. Autori indirektno sugeriraju da su cilj PD-1 blokade u kHL-u upravo CD4+ T limfociti (109).

1.9.2. Epstein-Barr virus i kHL

EBV infekcija rezultira uspostavom doživotne virusne latencije u memorijskim B stanicama, koje su stabilni rezervoar za povremenu virusnu replikaciju u orofarinsu i biološki okvir u kojem, ujecajem genetskih i mikrookolišnih čimbenika može nastati zloćudna transformacija. EBV ima važnu ulogu u patogenezi kHL-a. U HRS stanicama je dokazan monoklonalni EBV genom, što ukazuje da je stanica preteča bila inficirana prije zloćudne transformacije. Ako B-limfocit stekne mutaciju imunoglobulinskog gena, fiziološki se treba eliminirati apoptozom; međutim, ako je stanica prethodno bila latentno inficirana EBV-om, virus aktivacijom antiapoptotskih signalnih putova može spriječiti apoptozu i time doprinijeti razvoju klasičnog Hodgkinova limfoma (11). Onkogeni potencijal EBV-a u HRS stanicama prvenstveno se temelji na latencijskom programu tipa II, koji uključuje izražaj Epstein-Barr nuklearnog antigena 1 (EBNA1) i latentnih membranskih proteina LMP1 i LMP2A. LMP1 je onkoprotein koji oponaša signal CD40 receptora i aktivira signalne puteve NF- κ B, JAK/STAT, fosfatidilinozitol 3-kinaza/AKT (PI3K/AKT) i AP-1, čime potiče proliferaciju i sprječava apoptozu HRS stanica. S druge strane, LMP2A imitira konstitutivnu signalizaciju B-staničnog receptora (BCR), čime održava preživljavanje i homeostazu B-staničnog fenotipa u HRS stanicama (110–112). Green i suradnici pokazali su 2010. godine da amplifikacija kromosomske regije 9p24.1 dovodi do povećanog izražaja PD-L1, pri čemu amplificirana regija obuhvaća lokus za Janus kinazu 2 (JAK2). Povećana razina i aktivnost JAK2 dodatno potiču transkripciju PD-liganada u bolesnika s kHL-om. Međutim, HRS stanice bez amplifikacije 9p24.1 također mogu izražavati PD-L1 jer postoje drugi putovi indukcije (29). U radu iz 2012. godine pokazano je da infekcija EBV-om predstavlja taj alternativni mehanizam. Analizirajući protočnim citometrom, autori su dokazali da EBV putem LMP1 može pojačati izražaj PD-L1 u EBV transformiranoj liniji limfoblastoidnih stanica. LMP1 aktivira JAK/STAT signalizacijski put i povećava aktivnost promotora PD-L1, a istodobno potiče o AP-1-ovisnu aktivaciju odgovarajućeg *enhancera*. Rezultat je pojačana transkripcija PD-L1 čak i u

odsutnosti amplifikacije 9p24.1. Tako se pojačani izražaj PD-L1 nalazi se primjerice u EBV-pozitivnoj posttransplantacijskoj limfoproliferaciji (113). EBV-pozitivni kHL ima imunofenotipski karakterističan tumorski mikrookoliš s velikim brojem CD4⁺ pomoćnih limfocita i T regulacijskih limfocita koji sačinjavaju tolerantnu i imunosupresivnu nišu. Assis i sur. pokazali su da povećani broj CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg stanica korelira s EBV-pozitivnim statusom kHL-a, ali ne utječe na preživljenje (114). Alvaro i sur. uočili su povezanost obilne infiltracije citotoksičnih T limfocita i malog broja FOXP3⁺ regulatornih stanica s nepovoljnim ishodom kHL-a (115). Više vrijednosti CD4 T limfocita i FOXP3 stanica bile su značajno povezane s duljim PFS-om i u nedavno objavljenoj studiji iz naše institucije (116). Može se zaključiti da EBV u kHL-u djeluje na više razina - izravnom aktivacijom signalnih putova u HRS stanici, povećanjem izražaja imunoinhibitora PD-L1/PD-L2, remodulacijom prezentacije neoantigena preko MHC razreda 1 i 2 (104) i stvaranjem mikrookoliša bogatog regulatornim limfocitima koji potiču imunotoleranciju.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

2.1. Ciljevi istraživanja

1. Utvrditi izražaj PD-L1 u HRS stanicama i makrofagima u tumorskom mikrookolišu kHL-a
2. Utvrditi EBV status kHL-a
3. Utvrditi povezanost PD-L1 izražaja u HRS s podtipom, kliničkim stadijem, ekstrapodalnom proširenošću bolesti, masivnom bolesti, B simptomima i EBV statusom
4. Utvrditi povezanost izražaja PD-L1 na HRS s mjerama ishoda (ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez progresije bolesti)
5. Utvrditi povezanost izražaja PD-L1 na makrofagima s mjerama ishoda

2.2. Hipoteza

U prvoj biopsiji kHL-a, integrirana procjena izražaja PD-L1 na HRS stanicama, broja i udjela PD-L1+ makrofaga i utvrđivanje EBV statusa, prognostički je i prediktivno bitna jer su visoki izražaj PD-L1 u HRS, kao i na makrofagima te pozitivan EBV status povezani s nepovoljnim kliničkim ishodom, ali otvaraju mogućnost uspješnog liječenja PD-1 inhibitorima u prvoj liniji.

3. METODE I MATERIJALI ISTRAŽIVANJA

3.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je po razini i namjeni primijenjeno, po načinu dobivanja podataka primarno, a po specifičnom ustroju retrospektivno, unicentrično i kohortno. S obzirom na intervenciju istraživanje je opservacijsko. Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti i Zavodu za hematologiju Klinike za dječje bolesti Kliničkog bolničkog centra Split. Podatci o datumu smrti prikupljeni su iz bolničkog mrtvozorstva i Matice umrlih Splitsko-dalmatinske županije. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije (117) te uz suglasnost i odobrenje od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Split (KLASA: 500-03/19-01/67, URBROJ: 2181-147-01/06/M.S.-19-2, od 30. rujna 2019.).

3.2. Ispitanici

Studija se temelji na analizi tumorskog tkiva iz ekstirpiranih i/ili bioptiranih limfnih čvorova ispitanika kojima je dijagnosticiran kHL u razdoblju od 1. siječnja 2008. do 31. prosinca 2018. godine. U tom je razdoblju u Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split dijagnosticirano 112 bolesnika s kHL-om. Četrnaest ih je isključeno iz studije zbog nepotpunog kliničkog praćenja ili nedovoljne količine tumorskog tkiva u parafinskom bloku. U studiji je 98 ispitanika koji su ispunjavali kriterije uključivanja: potvrđen patohistološki nalaz kHL-a prema SZO dijagnostičkim kriterijima (42), dostatnu količina tumorskog tkiva u parafinskom bloku i potpuno kliničko praćenje. Prema podtipu kHL bila su 73 slučaja NS, 21 MC, 3 LR i 1 LD. Od 98 ispitanika, 47 (47,9 %) je ženskog i 51 (52,1 %) muškog spola. Ostali podaci obuhvaćali su dob ispitanika, datum dijagnoze, klinički stadij bolesti (I – IV) po Cotswolds-modificiranoj Ann Arbor klasifikaciji, početne laboratorijske nalaze, rezultate slikovne dijagnostike, prisutnost ekstrapodalne bolesti, prognostičke zbrojeve EORTC i GHSG (za rani stadij bolesti I/II), vrstu liječenja, tijek i ishod terapije, datum eventualnog relapsa, datum zadnjeg praćenja, status preživljenja (živ/preminuo) te PFS i OS u mjesecima. Informacije su prikupljene iz arhiviranih i aktualnih povijesti bolesti iz dnevne bolnice i s odjela te iz računalno dokumentiranih bolesničkih podataka Zavoda za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti i Klinike za dječje bolesti KBC Split. Patohistološki nalazi i parafinski blokovi tumorskog tkiva prikupljeni su iz arhive Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC Split. Klinički stadij pri postavljanju dijagnoze procjenjivao se slikovnom

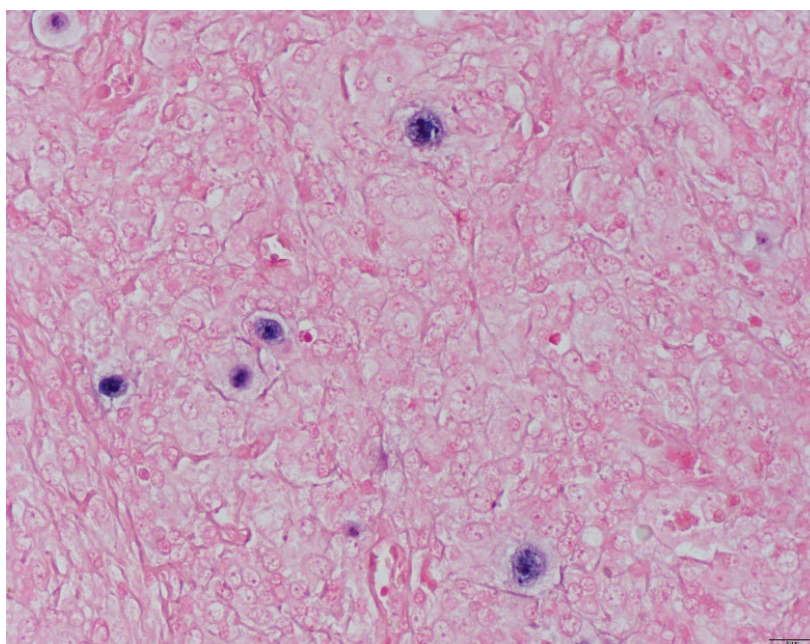
dijagnostikom, najčešće PET-CT-om ili MSCT-om pluća, abdomena i zdjelice. U određenim slučajevima, ako za određivanje proširenosti bolesti nije korišten PET-CT, radila se biopsija koštane srži za procjenu infiltriranosti limfomom. “*Bulky*” tumorska masa je abdominalna ili mediastinalna masa veličine ≥ 10 cm ili veća od jedne trećine unutarnjeg poprečnog promjera prsnog koša. Ispitanici su liječeni prema smjernicama KROHEM-a (Hrvatska kooperativna udruga za hematološke bolesti) i NCCN-a. Primarni terapijski režim bio je ABVD, uz radioterapiju po indikaciji, a najčešće s ISRT kod ispitanika s lokaliziranom bolešću (stadij I i II), *bulky* tumorom, sporom regresijom tumora ili lokaliziranom preostalom masom nakon liječenja kemoterapijom. Od siječnja 2017. do prosinca 2018. pet ispitanika s uznapredovalom bolešću liječeno je prema režimu escBEACOPP. Šest ispitanika dječje dobi liječeno je OEPA protokolom (vinkristin, etoposid, prednizon i doksorubicin), nakon čega je četvero primijenjen i COPP protokol (ciklofosamid, vinkristin, prokarbazin i prednizon). Dva ispitanika starija od 65 godina primila su četiri ciklusa COPP-a. Ispitanici s R/R kHL-om ($n = 22$) uglavnom su liječeni *salvage* kemoterapijom, uključujući DHAP ili ICE, a u slučaju postizanja remisije liječeni su dodatno visokodoznom kemoterapijom i autolognom transplantacijom matičnih stanica. Liječenje je stoga bilo u velikoj mjeri uniformno. Nitko od ispitanika nije liječen imunoterapijom. Nakon završene terapije slijedila je procjena odgovora, najčešće PET-CT-om, a dok PET-CT nije bio široko dostupan, MSCT-om. Odgovor na terapiju procijenjen je prema Lugano kriterijima (30). Kompletne remisije (KR) definirana je kao odsutnost bilo kakvih kliničkih ili radioloških znakova bolesti. Parcijalna remisija (PR) definirana je kao smanjenje mjerljivih lezija za najmanje 50 %, uz izostanak povećanja drugih limfnih čvorova, jetre ili slezene. Progresija bolesti (PB) definirana je kao povećanje postojećih lezija ili pojava novih. Kliničko praćenje provodilo se prema smjernicama, svaka 3 mjeseca prve dvije godine, potom svako 6 mjeseci sljedeće 3 godine i nakon toga jednom godišnje, prvo putem dnevne bolnice Zavoda za hematologiju, potom na poliklinici. Tijekom svakog posjeta uzimala se detaljna anamneza uz fizikalni pregled, s ciljem isključenja relapsa i komplikacija povezanih s terapijom. Kliničko praćenje zaključeno je 20. listopada 2023., a medijan trajanja praćenja iznosio je 97 mjeseci (raspon: 0,3–202 mjeseca).

3.3. Metode

U Zavodu za sudsku medicinu, citologiju i patologiju KBC-a Split iz parafinskih blokova limfnih čvorova napravljeni su rezovi tkiva debljine 3 mikrometra za *in situ* hibridizaciju (ISH) i dvostruko imunohistokemijsko bojenje.

3.3.1. *In situ* hibridizacija

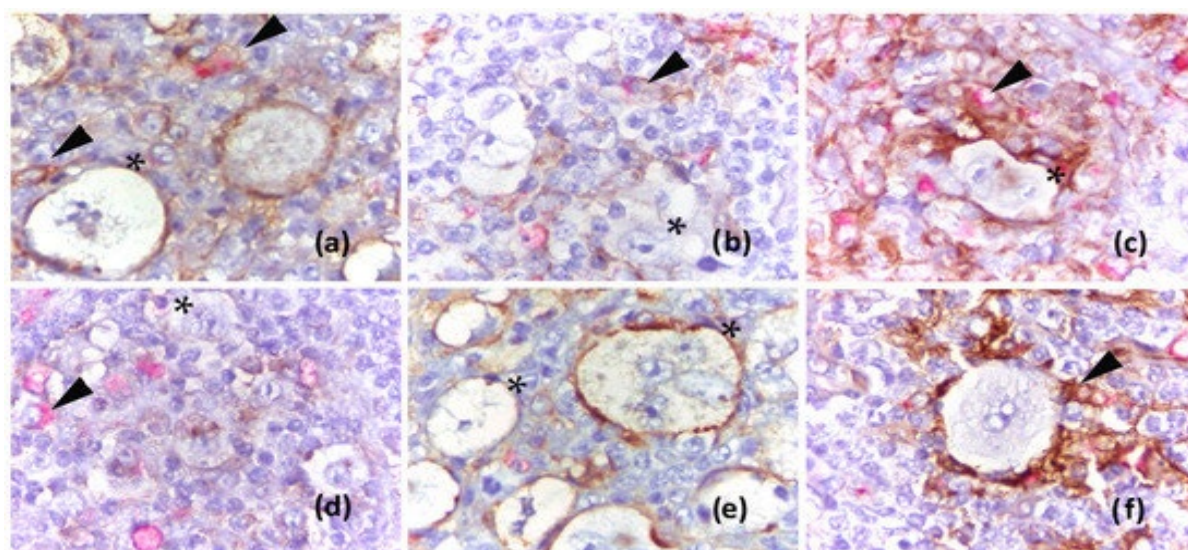
Prisutnost EBV-a u tumorskim stanicama analizirano je EBER (engl. EBV encoded RNA) *in situ* hibridizacijom, korištenjem EBER oligoprobe (INFORM EBER Probe, Ventana Roche Diagnostics) i ISH iView Blue Detection Kita (Ventana Roche Diagnostics) na stroju Ventana Ultra Benchmark (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Pozitivna reakcija bila je modro bojenje jezgre u barem jednoj HRS stanici (**Slika 4**). Pozitivna vanjska kontrola bio je EBV pozitivni nazofaringealni karcinom.



Slika 4. Klisični Hodgkinov limfom s pozitivnim EBV statusom. Modro obojenje malobrojnih HRS vizualizira prisutnost malih nekodirajućih RNA Epstein-Barr virusa u jezgri zloćudnih stanica (EBER *in situ* hibridizacija, 400x). Izvor: uzorak iz doktorskog istraživanja.

3.3.2. Dvostruko imunohistokemijsko bojenje

Za dvostruko imunohistokemijsko bojenje na istom uređaju uporabljena su primarna protutijela PD-L1 (263 Assay, Ventana Rosche, Švicarska) i CD163 (klon MRQ26, Cell Marque, Darmstadt, Njemačka) i sekundarna protutijela DAB/IHC i Fast Red/IHC (Ventana Roche, Švicarska). Pozitivna reakcija bila je crveno membransko/citoplazmatsko obojenje za CD163 i smeđe membransko obojenje za PD-L1 (**Slika 5**).



Slika 5. Tumorski mikrookoliš u klasičnom Hodgkinovom limfomu. (a) PD-L1-pozitivne HRS stanice (*) s nekoliko PD-L1+ makrofaga u blizini (crna strelica); (b) PD-L1-negativne HRS stanice i pretežno PD-L1+ makrofagi; (c) PD-L1-pozitivne HRS stanice okružene brojnim PD-L1+ makrofagima; (d) PD-L1-negativne HRS stanice i PD-L1-negativni makrofagi; (e) varijabilna PD-L1 pozitivnost u HRS stanicama; (f) Proširenje PD-L1 od PD-L1+ makrofaga do HRS stanice ukazuju na trogocitozu, brzi međustanični prijenos membranskih fragmenata između stanica; (imunobojeno za PD-L1 (smeđa) i makrofagni marker CD 163 (crvena), povećanje 1000×). Izvor: uzorci iz doktorskog istraživanja.

3.4. Mikroskopska analiza

Preparati su analizirani pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus 41 BX (Olympus, Tokio, Japan). Svaki preparat pregledan je pri povećanju od 200× i 400× kako bi se procijenilo

tumorsko tkivo, uklonila područja tehničkih artefakata i identificiralo nekoliko reprezentativnih regija za analizu. Odabrana su područja potom analizirana pri povećanju od $1000\times$ u imerzijskoj uljnoj otopini. Snimljene su mikrofotografije 10 nepreklapajućih polja digitalnom kamerom Olympus DP26 (Olympus, Tokyo, Japan) i analizirane pomoću softvera za obradu slike CellSens Standard 1.9 (Olympus, Japan). Jednostruko i dvostruko pozitivne stanice prebrojene su na mikrofotografijama. Evaluaciju su neovisno provela dva iskusna patologa te sama pristupnica.

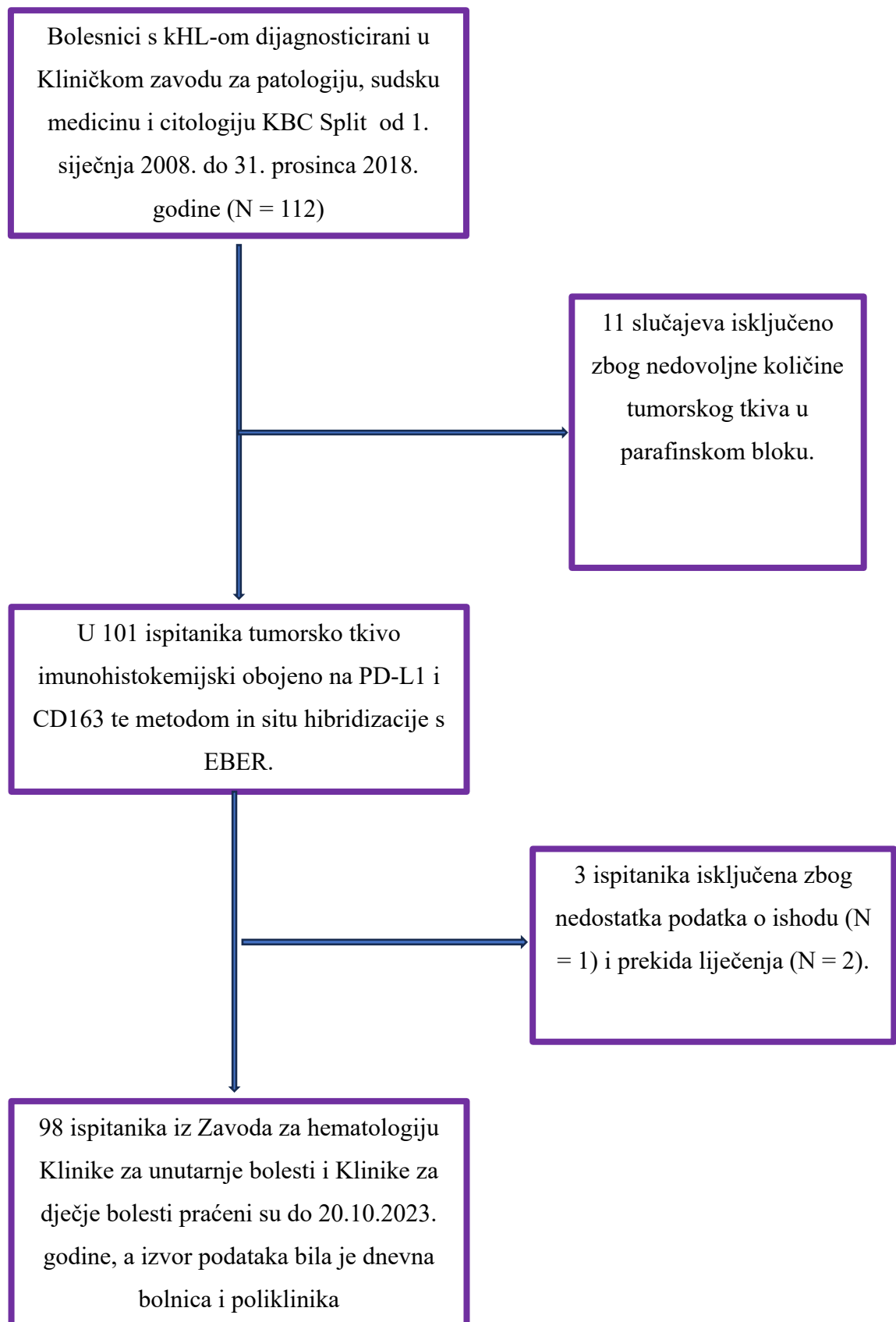
3.4.1. Analiza PD-L1 u HRS stanicama

Kvantifikacija PD-L1 na HRS stanicama provedena je po metodi Roemera i sur. (99). Analizirane su sve uočene HRS stanice, a intenzitet izražaja PD-L1 odnosno smeđeg membranskog bojenja na svakoj od njih ocjenjen je prema skali: 0 = bez bojenja, 1 = slabo bojenje, 2 = umjereno bojenje, 3 = jako bojenje. Određen je broj HRS stanica s pozitivnim bojenjem (1 do 3+) i izračunat postotak pozitivnih stanica. Na kraju, intenzitet bojenja pomnožen je s postotkom stanica prema formuli: $[1 \times (\% \text{ stanica } 1+) + 2 \times (\% \text{ stanica } 2+) + 3 \times (\% \text{ stanica } 3+)]$ i dobiven H-skor u rasponu od 0 do 300.

3.4.2. Analiza PD-L1 u makrofagima

CD163+ makrofagi (crveno membransko/citoplazmatsko bojenje za CD163) analizirani su u 10 vidnih polja i izračunat je prosječan broj makrofaga po polju (*ukupan broj makrofaga*). Makrofagi su klasificirani kao PD-L1+ ako su izražavali PD-L1 bilo kojim intenzitetom. Također su analizirani u 10 vidnih polja te je izračunat prosječni *apsolutni broj PD-L1+ makrofaga* po polju. Zatim je izračunat omjer PD-L1+ makrofaga u odnosu na ukupan broj makrofaga i izražen kao postotak (*udio PD-L1+ makrofaga*).

3.5. Dijagram tijeka istraživanja



3.6. Statistička analiza

Veličina potrebnog uzorka bila je izračunata korištenjem mrežnog alata dostupnog na adresi: <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>. Statistička analiza provedena je pomoću softvera GraphPad Prism, verzija 11.0 (GraphPad Software, Boston, MA, SAD). Kontinuirane varijable prikazane su kao medijan i interkvartilni raspon (IQR), a kategoričke varijable kao apsolutni i relativni udjeli (postoci). Razlike u kontinuiranim varijablama između skupina analizirane su testom ANOVA ili t-testom, ovisno o distribuciji podataka. Korelacije su procjenjene Kendalllovim tau koeficijentom. Preživljenje je procjenjeno Kaplan-Meierovom metodom. Dodatno, vrijeme do događaja modelirano je parametrijski, uporabom eksponencijalnog modela rasapa s platoon. Za višestruku analizu preživljenja korišten je diskretni vremenski model (logistička regresija), pri čemu je zavisna varijabla bila rizik za događaj. Usporedba modela temeljila se na omjeru dokaza (engl. *evidence ratio*, ER) dobivenom iz AIC-a, F-testu te standardnim dijagnostičkim kriterijima (R^2 , reziduali, parcijalni dijagrami reziduala itd.). Nesigurnost procjene parametara bila je izražena kao standardna pogreška, tj. 68%-tni interval pouzdanosti ili, gdje je primjerenije, 85%-tni interval pouzdanosti. P-vrijednosti interpretirane su u skladu s preporukama Američkog statističkog udruženja (ASA).

4. REZULTATI

4.1. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika

U retrospektivnu studiju uključeno je 98 ispitanika s kHL-om koji su bili dijagnosticirani i liječeni u KBC Split tijekom 10 godina. Dob ispitanika je 11 do 83 godine, medijan 32,5, IQR od 21,8–50. Među ispitanicima je 51 (52,1 %) muškaraca i 47 (47,9 %) žena. Kod tri četvrtine ispitanika dijagnosticiran je podtip NS, kod većine preostalih MC, dok su LR i LD bili rijetko zastupljeni. Trećina bolesnika imala je zahvaćeno barem jedno ektranodalno žarište. U gotovo polovine ispitanika dijagnoza je bila postavljena u uznapredovalom stadiju (III ili IV). Nešto više od polovine ispitanika imali su rani stadij (I i II, ali dominantno drugi) prije početka liječenja, od čega većina uz prognostički nepovoljne čimbenike. Polovina ispitanika prezentirali su se B simptomima, a čak četvrtina imala je opsežnu, *bulky* bolest u trenutku postavljanja dijagnoze (**Tablica 2**). Približno 87 % ispitanika liječeno je ABVD protokolom, 8 % COPP protokolom (samo ili u kombinaciji s OEPA protokolom), a 5 % escBEACOPP protokolom. Dvadeset i dva (22,4%) ispitanika doživjela su relaps (N = 10) ili imali refraktornu bolest (N = 12). Medijan praćenja bio je 97 mjeseci, raspon 0,3 – 202 mjeseca, a do kraja praćenja preminulo je 14 ispitanika. Od ispitanika s R/R bolesti, njih 9/22 (41%) je umrlo zbog progresije bolesti, a pet zbog drugih uzroka. EBV-pozitivni kHL potvrđen je EBER *in situ* hibridizacijom kod 22 (22,5%) ispitanika.

Tablica 2. Demografski, kliničko-patološki i laboratorijski pokazatelji u 98 ispitanika s klasičnim Hodgkinovim limfomom.

Parametar	Vrijednost
Ukupan broj ispitanika	98
Dob (godine) medijan (IQR)	32.5 (21.8 to 50)
Spol (N, %)	ženski 47, 47.9% muški 51, 52.1%
Podtip (N, %)	Miješana celularnost 21, 21.4% Nodularna skleroza 73, 74.5% Ostali 4, 4.1%
Klinički stadij (N, %)	I 9, 9.2% II 45, 45.9% III 20, 20.4% IV 24, 24.5%
Stadij prema stratifikaciji liječenja	rani, povoljni 23, 23.5% rani, nepovoljni 29, 29.6% uznapredovali 45, 46%
+ ekstrapodalna lokalizacija (N, %)	30, 30.6%
+ B simptomi (N, %)	53, 54.1%
+ <i>bulky</i> bolest (N, %)	26, 26.5%
H-skor izražaja PD-L1 u HRS stanicama (medijan, IQR)	80 (36.5 to 142.8)
Ukupan broj makrofaga po polju* (medijan, IQR)	6.8 (5.3 to 8.9)
Apsolutni broj PD-L1+ makrofaga po polju* (medijan, IQR)	5.4 (3.6 to 7.1)
Udio PD-L1+ makrofaga po polju* kao % (medijan, IQR)	85.9 (65.4 to 91.9)
Krvna slika	
Hemoglobin (mmol/L, medijan, IQR)	125 (111 to 134)
Leukociti ($\times 10^9/L$, medijan, IQR)	9.3 (7.2 to 12.5)
% limfocita (medijan, IQR)	15 (10.6 to 21)
% neutrofila (medijan, IQR)	72.9 (65 to 78.9)
% monocita (medijan, IQR)	6.8 (5 to 9.2)
EBV-pozitivan kHL (N, %)	22 (22.5%)

N – broj ispitanika; IQR – interkvartilni raspon; H-skor – polukvantitativni index kHL klasični Hodgkinov limfom, * vidno polje na povećanju 1000x pod imerzijom

4.2. Povezanost izražaja PD-L1 u HRS stanicama i makrofagima s kliničko-patološkim varijablama u kHL-u

U 95/98 slučajeva kHL-a, neke su HRS stanice izražavale PD-L1 barem minimalnim intenzitetom. Zbog toga smo, radi veće preciznosti za svakog ispitanika izračunali H-skor izražaja PD-L1 u HRS stanicama i na temelju toga ukupni medijan vrijednosti H-skora (**Tablica 3**).

Tablica 3. Izražaj PD-L1 u HRS stanicama i u makrofagima u tumorskom mikrookolišu kHL-a (N=98)

Varijabla	Medijan, IQR
H-skor izražaja PD-L1 u HRS stanicama	80 (36.5 - 142.8)
Ukupan broj makrofaga u polju*	6.8 (5. - 8.9)
Apsolutni broj PD-L1+ makrofaga u polju*	5.4 (3.6- 7.1)
Udio PD-L1+ makrofaga (%) u polju*	85.9 (65.4 - 91.9)

IQR – interkvartilni raspon *vidno polje na povećanju 1000x pod imerzijom

Medijan H-skora izražaja PD-L1 u HRS stanicama je 80 (IQR 36,5–142,8). Srednja vrijednost ukupnog broja makrofaga po polju povećanja 1000× je 6,8, od kojih je PD-L1+ makrofaga 5,4 i njihov udio u ukupnom broju 86%).

Kliničko-patološke varijable analizirane su s obzirom na medijan H-skora PD-L1 u HRS stanicama i samo je EBV- status kHL-a pokazao značajnu razliku (**Tablica 4**).

Tablica 4. Medijan H-skora PD-L1 u HRS stanicama prema analiziranim kliničko-patološkim varijablama.

Varijabla	H-skor, medijan	H-skor, IQR	p
<i>Histološki podtip</i>			0.10
Nodularna skleroza (N=73)	83	40 -50	
Miješana celularnost (N=21)	75	31-121	
Limfocitima bogat (N=3)	20	3-80	
Limfocitna deplecija (N=1)	216	216-216	
<i>Stadij bolesti</i>			0.28

Rani povoljni (N=23)	81	25-145	
Rani nepovoljni (N=29)	67	35-118	
Uznapredovali (N=45)	85	40-190	
<i>Ekstranodalna bolest</i>			0.35
ne (N=66)	84	40-154	
da (N=30)	77	33-142	
<i>Bulky bolest</i>			0.69
ne (N=72)	82	28-133	
da (N=26)	80	38-145	
<i>B simptomi</i>			0.42
ne	75	36-143.5	
da	85	37.5-143.5	
<i>EBV status kHL</i>			0.005
negativan (N=75)	70	34-104	
pozitivan (N=22)	136	82.5-182.3	

ANOVA test, Legenda: N – broj ispitanika; IQR – interkvartilni raspon.

Ispitanici s EBV-pozitivnim kHL-om imali su približno dvostruko veću vrijednost H-skora PD-L1 HRS stanica od ispitanika s EBV-negativnim kHL-om ($p = 0,005$). Izražaj PD-L1 na HRS stanicama nije bio povezan s brojem makrofaga ($p = 0,2329$), PD-L1+ makrofaga ($p = 0,3808$) i udjelom PD-L1+ makrofaga ($p = 0,7212$). Pearsonov test nije pokazao povezanost vrijednosti H-skora s dobi ($p = 0,16$) i razinom hemoglobina ($p = 0,78$) (nije prikazano).

Nadalje, istražena je povezanost izražaja PD-L1 u makrofagima s kliničko-patološkim varijablama (**Tablica 5**).

Tablica 5. Izražaj PD-L1 u makrofagima i povezanost s kliničko-patološkim varijablama

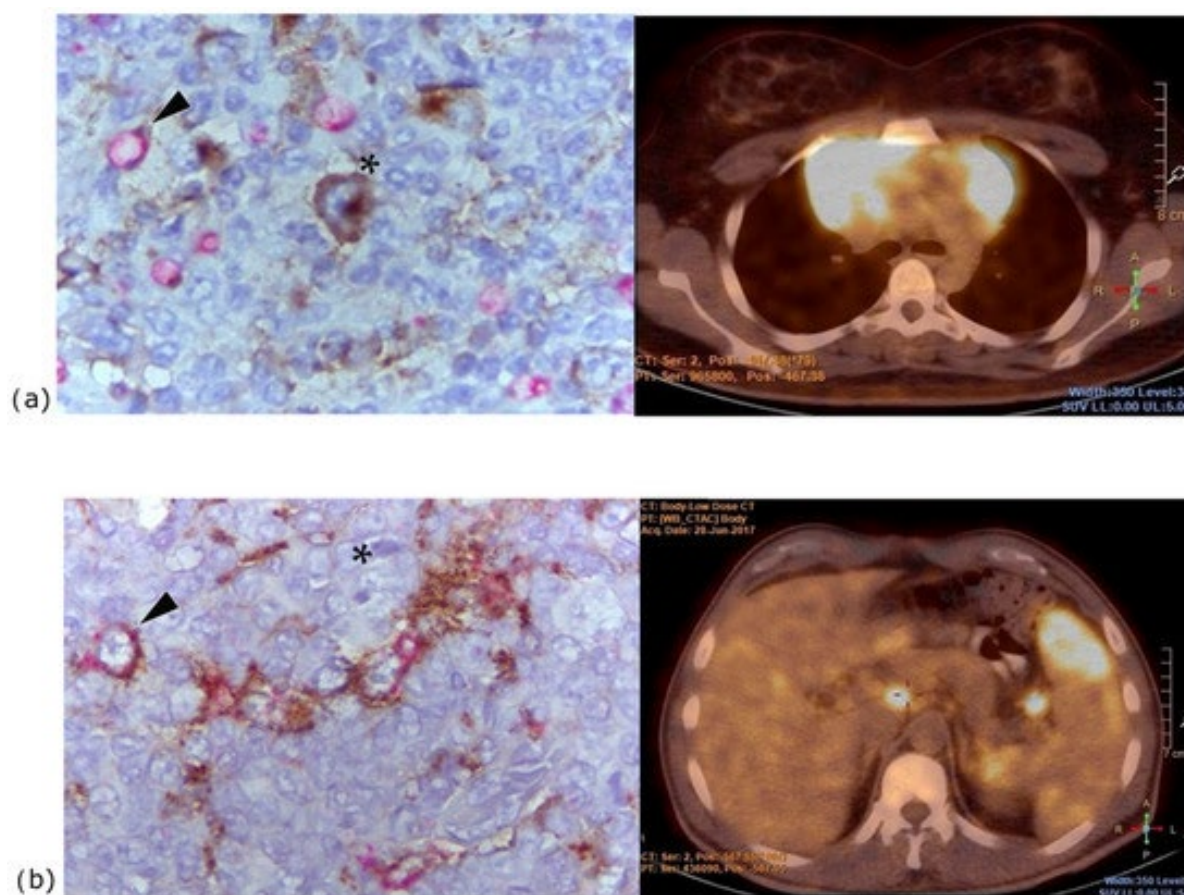
Varijabla	Makrofagi		PD-L1+ Makrofagi		Udio PD-L1+ makrofaga	
<i>Podtip</i>	N	IQR	N	IQR	%	IQR
Nodularna skleroza	6.3	4.65-7.73	4.9	3.21-6.65	85.3	63.3-91.2
Miješana celularnost	9.6	7.62-10.65	8.0	6.4-10.31	89.8	83.9-93.9

	Limfocitima bogat	5.2	4.3-6.7	4.2	1.4-4.6	68.7	32.6-80.8
	Limfocitna deplecija	8.7	8.7-8.7	4.6	4.6-4.6	52.9	52.9-52.9
<i>p</i>		0.0002		<0.0001		0.02	
Ekstranodalna bolest							
	ne	6.65	4.92 - 7.92	5.0	3.21-6.8	85.1	63.1-90.2
	da	7.48	5.3 - 9.8	6.3	4.0-8.42	88.7	76.7-94.9
<i>p</i>		0.18		0.05		0.06	
Masivna bolest (bulky)							
	ne	7.35	5.3 - 9.2	5.75	4.0-8.0	87.1	74.4-92.0
	da	6.2	4.1 - 7.78	3.9	2.87-6.4	82.3	56.2-91.7
<i>p</i>		0.07		0.04		0.04	
EBV status kHL							
	negativan	6.3	4.6 - 7.8	4.8	3.3-6.8	84	64.1-90.9
	pozitivan	8.3	6.9 - 9.8	6.8	5.6-8.9	90.7	82.2- 94.6
<i>p</i>		0.008		0.005		0.11	

Podatci su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. za usporedbe su korišteni ANOVA ili t-test. Legenda: IQR interkvartilni raspon

Najveći broj makrofaga nađen je u MC, u kojem je udio PD-L1+ makrofaga bio 89,8 % ($p = 0,02$). U NS broj je makrofaga za trećinu niži, s udjelom PD-L1+ makrofaga od 85,3 % ($p = 0,0002$). Značajno veći broj makrofaga ($p = 0,008$) i PD-L1+ makrofaga ($p = 0,005$) bio je u EBV-pozitivnom kHL nego u EBV-negativnom kHL-u, dok udio PD-L1+ makrofaga nije bio značajno različit ($p = 0,11$) (**Tablica 5**). Udio PD-L1+ makrofaga nije bio povezan s dobi ($p = 0,22$), razinom hemoglobina ($p = 0,21$), stadijem ($p = 0,11$) i B simptomima ($p = 0,17$).

Veći broj PD-L1+ makrofaga granično je povezan s ekstranodalnom bolesti ($p = 0.05$), a manji apsolutni broj i udio PD-L1 + makrofaga s *bulky* tumorom (oba $p = 0.04$) (**Slika 6**).



Slika 6. Izražaj PD-L1 na makrofagima u tumorskom mikrookolišu i PET-CT nalaz kod dva ispitanika s kHL-om. U prvog je ispitanika manji apsolutni broj i udio PD-L1+ makrofaga povezan s *bulky* tumorom u medijastinumu (a), a kod drugog ispitanika je veliki broj i udio PD-L1+ makrofaga povezan s s ektranodalnom bolešću koja je zahvatila slezenu, jetru i donji režanj lijevog pluća (b) (1000×, PD-L1 Izvor: uzorci i slikovni podatci iz doktorskog istraživanja).

4.3. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika prema bimodalnoj dobnoj raspodjeli kHL-a

Kliničko-patološke karakteristike ispitanika, uključujući izražaj PD-L1 u HRS stanicama i makrofagima, stratificirane su u dvije dobne skupine (15–35 godina i > 55 godina) s obzirom na bimodalnu dobnu raspodjelu kHL-a (**Tablica 6**). Ukupno je 63 od 98 ispitanika svrstano u navedene dobne skupine, pri čemu je oko tri četvrtine pripadalo mlađoj dobnoj skupini.

Tablica 6. Kliničko-patološke karakteristike ispitanika i izražaj PD-L1 u HRS stanicama i makrofagima u mlađoj (15-35 godina) i starijoj (>55 godina) dobnoj skupini ispitanika s kHL-om.

Varijabla		Dobna skupina (N=63)		p
		15-35 (47, 74.6%)	>55 (16, 25.4%)	
Podtip	Nodularna skleroza	43 (91.5)	8 (50)	0.001*
	Miješana celarnost	3 (6.4)	7 (43.8)	
	Ostali	1 (2.1)	1 (6.2)	
Stadij	rani povoljni	9 (19.1)	4 (25)	0.767*
	rani nepovoljni	16 (34)	4 (25)	
	uznapredovali	22 (46.8)	8 (50)	
Bulky bolest	ne	27 (57.4)	15 (93.8)	0.008*
	da	20 (42.6)	1 (6.2)	
B simptomi	ne	19 (40.4)	7 (43.8)	0.816*
	da	28 (59.6)	9 (56.2)	
Ekstranodalna bolest	ne	40 (85.1)	15 (93.8)	0.370*
	da	7 (14.9)	1 (6.2)	
EBV- status kHL	negativan	44 (93.6)	9 (56.3)	<0.001*
	pozitivan	3 (6.4)	7 (43.7)	
Relapsna bolest	ne	35 (74.5)	10 (66.7)	0.555*
	da	12 (25.5)	5 (33.3)	
Ishod	živ	40 (87)	9 (56.3)	0.009*
	mrtav	6 (13)	7 (43.7)	
Izražaj PD-L1 u HRS stanicama (medijan, IQR)		80 (35-120)	81.5 (54-137.25)	0.497 [#]
Ukupan broj makrofaga u polju' (medijan, IQR)		6.2 (4.4-7.77)	7.6 (5.76-9.68)	0.066 [#]
Apsolutni broj PD-L1+ makrofaga u polju' (medijan, IQR)		4.1 (3.1-6.6)	6.65 (4.85-8.6)	0.008 [#]
Udio PD-L+makrofaga u polju' (medijan, IQR)		0.81 (0.6-0.93)	0.88 (0.85-0.91)	0.06 [#]

* χ^2 test; # Mann-Whitney U test Legenda: IQR interkvartilni raspon; ' vidno polje na povećanju 1000x pod imerzijom

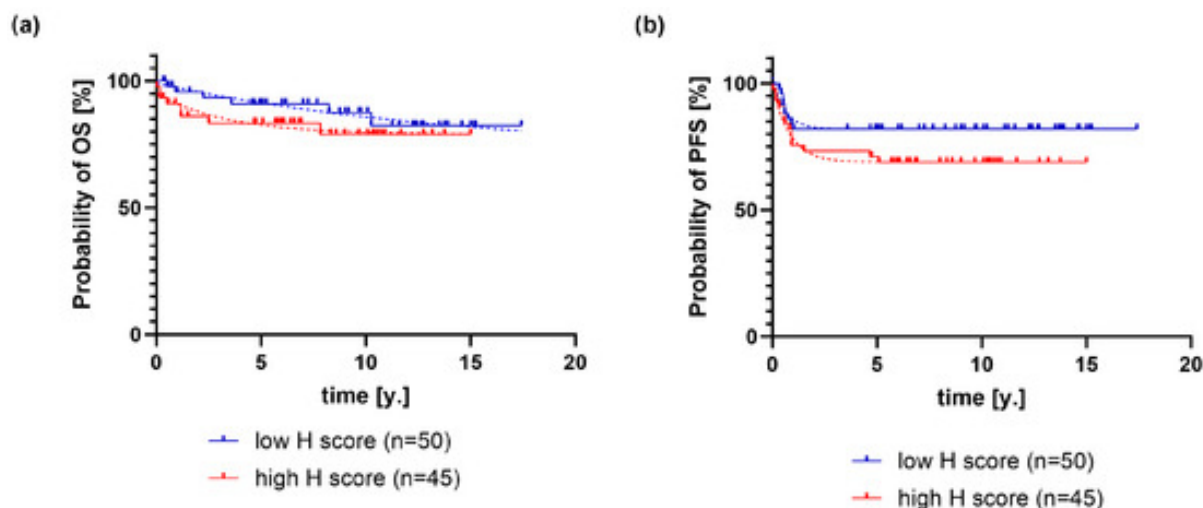
Usporedba kliničko-patoloških karakteristika po dobnim skupinama pokazala je nekoliko statistički značajnih razlika. Mlađi ispitanici značajno češće su imali NS podtip nego stariji ispitanici ($\chi^2 = 13,677$, $p = 0,001$), u kojih prevladava MC, sa 43,8 %. *Bulky* bolest je češća u mlađoj skupini nego starih, 42,6% prema 6,2% ($\chi^2 = 7,079$, $p = 0,008$).

Ispitanici iz starije dobne skupine su u usporedbi s mlađima značajno češće imali EBV-pozitivan kHL, 43,7% prema 6,4% ($\chi^2 = 12,481$, $p < 0,001$). Apsolutni broj PD-L1 + makrofaga u polju bio je statistički značajno veći u starijih nego u mlađih ispitanika, 6,65 prema 4,1 (Mann-Whitney U test; $p = 0,008$). Iako postoji trend većeg ukupnog broja makrofaga i većeg udjela PD-L1+ makrofaga u starijih ispitanika, razlike nisu dosegnule statističku značajnost.

Između dobnih skupina nije bilo statistički značajnih razlika u kliničkom stadiju, učestalosti B simptoma, prisutnosti ekстранodalne bolesti i učestalosti relapsa.

4.4. Povezanost izražaja PD-L1 u HRS stanicama s ishodom kHL-a

Za analizu ishoda ispitanici su podijeljeni u dvije skupine prema medijanu PD-L1 H-skora kao granične vrijednosti (**Slika 7**). Medijan H-skora je 80, s IQR-om od 36 do 143.



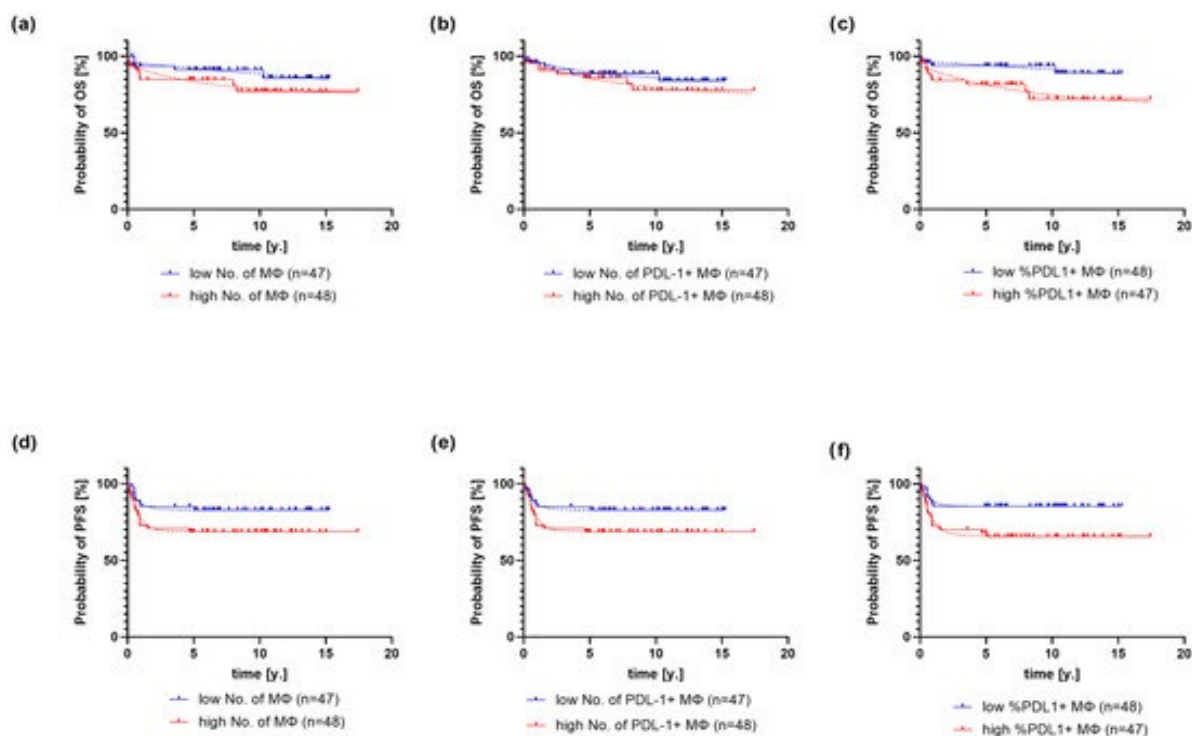
Slika 7. Klinički ishod ispitanika s kHL stratificiran prema niskim (<80) i visokim (>80) PD-L1 H-vrijednostima u HRS stanicama. Kaplan-Meierove krivulje za (a) ukupno preživljenje (OS) i (b) preživljenje bez progresije bolesti (PFS) s eksponencijalnim modelom (isprekidana linija). R² za sve krivulje je veći od 90%. Legenda: g. - godine. Izvor: vlastiti rezultati doktorskog istraživanja.

Ispitanici s višim H-skorom imali su 4,55 puta veći rizik od smrtnog ishoda (68 % CI: 4,24–5,03) u odnosu na ispitanike s nižim H-skorom ($p < 0,0001$; omjer dokaza > 100) (**Slika 7a**). Što se tiče dugoročnog preživljenja, skupina ispitanika s višim H-skorom imala je plato preživljenja od $71,73 \pm 4,67$ % (nakon $12,5 \pm 0,5$ godina), dok je skupina s nižim H-skorom imala plato od $79,02 \pm 0,77$ % (nakon $8,3 \pm 0,87$ godina) ($p < 0,0001$; omjer dokaza > 100).

Kod analize stopa relapsa, ispitanici s višim H-skorom imali su 1,38 puta veći rizik relapsa (68 % CI: 1,1–1,43) u usporedbi s ispitanicima s nižim H-skorom (**Slika 7b**), pri čemu je plato PFS-a iznosio $81,93 \pm 0,2$ % u skupini s niskim H-skorom i $68,94 \pm 0,17$ % u skupini s visokim H-skorom ($p < 0,0001$; omjer dokaza > 100).

4.5. Povezanost izražaja PD-L1u makrofagima s ishodom kHL-a

Istražena je povezanost izražaja PD-L1 na makrofagima s mjerama ishoda (OS i PFS). Prema srednjoj vrijednosti ukupnih makrofaga, apsolutnog broja PD-L1+ makrofaga i udjela PD-L1+ makrofaga u polju, formirane su po dvije skupine i uspoređene s obzirom na preživljenje (**Slika 8**).



Slika 8. Ukupno preživljavanje (OS) i preživljavanje bez progresije bolesti (PFS) ispitanika s kHL-om, stratificiranih prema ukupnom broju makrofaga (**a, d**), apsolutnom broju PD-L1+ makrofaga (**b, e**) i udjelu PD-L1+ makrofaga (**c, f**) u vidnom polju povećanja 1000x pod imerzijom. Legenda: MΦ - makrofagi, y - godina. Izvor: vlastiti rezultati doktorskog istraživanja.

Skupina ispitanika s ukupnim brojem makrofaga u polju višim od medijana imali su 6 puta veći rizik za smrtni ishod (68 % CI: 3,96–26) u odnosu na ispitanike s nižim ukupnim brojem makrofaga ($p < 0,0001$; omjer dokaza > 100) (**Slika 8a**). U analizi dugoročnog preživljenja u skupini s niskim brojem makrofaga nije uočen plato preživljenja, dok su ispitanici s visokim brojem makrofaga imali plato preživljenja od $74 \pm 1,8$ % nakon $9,5 \pm 0,8$ godina. Stoga, ne mogu se donijeti zaključci o dugoročnom preživljenju u skupini s niskim brojem makrofaga.

U analizi PFS-a ispitanici s ukupnim brojem makrofaga u polju višim od medijana pokazali su gotovo jednaku stopu relapsa kao i ispitanici s nižim brojem makrofaga. Međutim, ispitanici s brojem makrofaga nižim od medijana imali su povoljniju dugoročnu prognozu, pri čemu je njihov plato PFS-a iznosio $82,96 \pm 0,16$ % nakon $1,15 \pm 0,04$ godine, dok je u skupini s visokim ukupnim brojem makrofaga plato PFS-a iznosio $68,68 \pm 0,21$ % nakon $1,17 \pm 0,02$ godine ($p < 0,0001$; omjer dokaza > 100) (**Slika 8d**).

Prema apsolutnom broju PD-L1+ makrofaga u polju, obje skupine ispitanika imale su gotovo identične stope smrtnog rizika (omjer: $1 \pm 0,02$, $p < 0,0001$; omjer dokaza > 100). Njihovi platoi preživljenja, međutim, razlikovali su se: ispitanici s većim apsolutnim brojem PD-L1+ makrofaga dosegli su plato preživljenja od $73,61 \pm 1,7$ % nakon $9,6 \pm 0,4$ godina, dok je plato preživljenja ispitanika s nižim brojem PD-L1+ makrofaga iznosio $81,8 \pm 1,2$ % nakon $11,42 \pm 0,6$ godina ($p < 0,0001$; omjer dokaza > 100) (**Slika 8b**). U stratifikaciji ispitanika prema apsolutnom broju PD-L1+ makrofaga u polju nalaze se gotovo identične stope PFS-a, ali se platoi PFS-a razlikuju i dosegli su $82,96 \pm 0,1$ % za ispitanike s manjim i $68,66 \pm 0,26$ % za ispitanike s većim apsolutnim brojem PD-L1+ makrofaga, pri čemu su obje skupine dosegule plateau nakon $1,15 \pm 0,03$ godine ($p < 0,0001$; omjer dokaza > 100) (**Slika 8e**).

Stratifikacija ispitanika prema udjelu PD-L1+ makrofaga pruža točnije prognostičke informacije ($p < 0,0001$; omjer dokaza > 100). Naime, u analizi rizika od smrti, ispitanici s višim udjelom PD-L1+ makrofaga imali su više od 100 puta veći rizik za smrtni ishod u usporedbi s ispitanicima s nižim udjelom PD-L1+ makrofaga. Ispitanici s višim udjelom PD-L1+ makrofaga imali su plato preživljenja od $67,36 \pm 3,08$ % nakon $10,34 \pm 0,93$ godina, a ispitanici s nižim udjelom PD-L1+ makrofaga nisu dosegli plato preživljenja, pri čemu je njihova posljednja zabilježena vjerojatnost preživljenja iznosila 88,92 % (**Slika 8c**). Ispitanici s višim udjelom PD-L1+ makrofaga imali su gotovo istu stopu relapsa kao i ispitanici s nižim udjelom, ali je kod njih dugoročau prognoza povoljnija jer je plato PFS-a iznosio $85,38 \pm 0,15$ % nakon $1,07 \pm 0,2$ godine, za razliku od ispitanika s višim udjelom PD-L1+ makrofaga u kojih je iznosio $65,8 \pm 0,26$ % nakon $1,18 \pm 0,05$ godine ($p < 0,0001$; omjer dokaza > 100) (**Slika 8f**).

4.6. Modeliranje zajedničkog doprinosa kliničko-patoloških varijabli s H-skorom i izražajem PD-L1 u makrofagima na opće preživljenje i vrijeme bez progresije tumora

Prilikom modeliranja rizika smrti (OS) višestrukom regresijom pokazalo se da dodavanje PD-L1 H-skora HRS stanica i udjela PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrookolišu kao binarnih varijabli ne donosi značajno poboljšanje modela temeljenog na poznatim prediktorima, tj. dobi, stadiju bolesti, histološkom podtipu, ekстранodalnoj bolesti, EBV statusu i vremenu od dijagnoze ($\Delta AIC \approx 4$, $ER = 0,13$, $p = 0,631$) (**Tablica 7**). Slično vrijedi za modeliranje rizika relapsa (PFS) ($\Delta AIC \approx 2$, $ER = 0,37$, $p = 0,2409$) (**Tablica 8**). Glavni razlog razlike između tih analiza i univarijatne analize iz prethodnih pododjeljaka leži u povezanosti H-skora i udjela PD-L1+ makrofaga s EBV statusom i vremenom od dijagnoze; stoga se čini da ove nove varijable temeljene na izražaju PD-L1 ne donose značajno dodatno poboljšanje dosadašnjim prognostičkim modelima, iako same po sebi ostaju relevantne za predviđanje OS i PFS.

Tablica 7. Modeliranje rizika* smrtnog ishoda temeljeno na izražaju PD-L1 na makrofagima i HRS stanicama, uz klasične kliničko-patološke varijable.

Varijabla	β	85% CI β	P vrijednost
Presjek	-3,36	-4,678 do -2,051	0,0004
Dob (< ili > 45 godina) [#]	0,01	-0,5655 do 0,5851	0,9803
Stadij bolesti	0,91	0,5122 do 1,301	0,0013
Histološki podtip	0,19	-0,2604 do 0,6373	0,5433
Ekстранodalna bolest [#]	-1,58	-2,266 do -0,8897	0,0013
EBV*	0,29	-0,3625 do 0,9499	0,5172
PD-L1 u HRS stanicama (H-skor) [#]	0,0002	-0,5232 do 0,5237	0,9994
% PD-L1+ makrofaga [#]	0,35	-0,1810 do 0,8843	0,3401
Vrijeme OS (godine)	-0,12	-0,1799 do -0,06426	0,003
R² = 30,02%, AICc = 88,89			
Presjek	-3,02	-4,122 do -1,917	0,0001
Dob (< ili > 45 godina) [#]	0,08793	-0,4698 do 0,6457	0,8193
Stadij bolesti	0,8701	0,4834 do 1,257	0,0016
Histološki podtip	0,1294	-0,3057 do 0,5645	0,6668
Ekстранodalna bolest [#]	-1,52	-2,197 do -0,8428	0,0016
EBV [#]	0,3653	-0,2411 do 0,9718	0,3839
Vrijeme OS (godine)	-0,1308	-0,1851 do -0,07649	0,0008
R² = 29,19%, AICc = 84,96			

*Korišten je logit model, tj. $\text{logit}(h) = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \dots + \varepsilon$; # binarne varijable

Tablica 8. Modeliranje rizika relapsa (PFS) temeljeno na izražaju PD-L1 u makrofagima i HRS stanicama, uz kliničko-patološke varijable*.

Varijabla	β	85% CI β	P vrijednost
Presjek	-0,03167	-1,057 do 0,9934	0,9643
Dob (< ili > 45 godina) [#]	-0,2044	-0,6530 do 0,2442	0,5096
Stadij bolesti	0,4847	0,1805 do 0,7890	0,0232
Histološki podtip	0,3433	0,004227 do 0,6824	0,1451
Extranodalna bolest [#]	-0,401	-0,9224 do 0,1204	0,2669
EBV [#]	0,09112	-0,4013 do 0,5836	0,7886
PD-L1 u HRS stanicama (H-skor) [#]	0,4158	0,01113 do 0,8204	0,1393
% PD-L1+ makrofagi [#]	0,2529	-0,1472 do 0,6531	0,3609
Vrijeme PFS (godine)	-0,9314	-1,071 do -0,7921	<0,0001
Vrijeme PFS ² (godine ²)	0,04393	0,03470 do 0,05315	<0,0001
R² = 72,99%, AICc = 39,36			
Presjek	0,4594	-0,4495 do 1,368	0,4646
Dob (< ili > 45 godina) [#]	-0,2228	-0,6606 do 0,2151	0,4617
Klinička faza	0,446	0,1437 do 0,7482	0,0351
Histološki podtip	0,2901	-0,04376 do 0,6240	0,2102
Ekstranodalna bolest [#]	-0,3455	-0,8641 do 0,1732	0,3358
EBV [#]	0,3253	-0,1271 do 0,7777	0,2991
Vrijeme PFS (godine)	-0,9196	-1,057 do -0,7823	<0,0001
Vrijeme PFS ² (godine ²)	0,04215	0,03312 do 0,05119	<0,0001
R² = 71,96%, AICc = 37,49			

*Korišten je logit model, tj. $\text{logit}(h) = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \dots + \varepsilon$; # Binarne varijable

5. RASPRAVA

U kohorti ispitanika s kHL-om utvrdili smo da je izražaj PD-L1 u HRS stanicama, kvantificiran kao visoki imunohistokemijski H-skor, prognostički nepovoljan i povezan s kraćim OS i PFS. Ispitanici s EBV-pozitivnim kHL-om imali su značajno veći H-skor PD-L1 u HRS stanicama. Isto tako, veći broj makrofaga te veći broj i udio PD-L1+ makrofaga u mikrookolišu kHL-a su prognostički nepovoljni i povezani s kraćim PFS-om i OS-om. Dodatno, veći broj PD-L1+ makrofaga je značajno povezan s prisutnošću ekstrapodalne bolesti, a manji broj i udio s *bulky* tumorom. Naši rezultati pokazuju da se kod većeg H-skora PD-L1 u HRS stanicama može očekivati nepovoljniji klinički ishod i daju prilog uporištu za ranije, šire i dostupnije uvođenje PD-1 inhibitora u prvoj liniji liječenja, što zasad nije dio rutinske kliničke prakse i ograničeno je dostupno (118,119).

Rezultati drugih studija o prognostičkom značaju izražaja PD-L1 u kHL-u nisu jednoznačni, dijelom zato što su se autori fokusirali na PD-L1 u različitim staničnim populacijama, to jest HRS stanicama, svim leukocitima u tumorskom mikrookolišu, odnosno samo u makrofagima povezanim s tumorom. Osim toga, kriteriji za definiranje PD-L1-pozitivnosti variraju i često se oslanjaju na postotak pozitivnih HRS stanica, bez standardizirane kvantifikacije intenziteta izražaja. Takva metodološka heterogenost otežava izravnu usporedbu rezultata i dijelom objašnjava neujednačene zaključke o prognostičkom značenju izražaja PD-L1 u kHL-u.

U HRS stanicama je zbog konstitutivne amplifikacije lokusa 9p24.1 povećan izražaj PD-L1 (29). Roemer i suradnici su istraživali molekularnu i imunohistokemijsku karakterizaciju tog odnosa i utvrdili da je amplifikacija lokusa 9p24.1 povezana s povišenim izražajem PD-L1 i kraćim PFS-om (99). U drugom radu, autori navode važan rezultat da je veći broj kopija navedenog lokusa u kombinaciji s povišenim izražajem PD-L1 na HRS stanicama, bio povezan s duljim PFS-om bolesnika s R/R kHL-om liječenih PD-1 blokatorom (105).

Hollander i suradnici su, osim izražaja PD-L1 i PD-L2 na HRS stanicama, imunohistokemijski analizirali izražaj PD-L1 i PD-1 na leukocitima i ispitali povezanost s ishodom. Pri tome su koristili različite *cutoff* vrijednosti za analizirane pokazatelje i izabrali one koji su pokazali statistički najsnažniju diskriminaciju među skupinama. Primjerice, za visoki ili niski udio PD-L1 na leukocitima je *cutoff* iznosio 5 %, a za PD-L1 na HRS stanicama čak 90 %. Rezultati su pokazali da je veći izražaj PD-L1 na leukocitima bio povezan s kraćim preživljenjem bez događaja (EFS) i kraćim OS. Za razliku od naših rezultata i indirektnih dokaza Roemera i suradnika, Hollander i suradnici nisu dokazali povezanost izražaja PD-liganda na HRS stanicama s ishodom (120). Treba reći da u našem radu diskriminacijska

vrijednost nije bila određena udjelom PD-L1 pozitivnih HRS stanica jer je u 97 % analiziranih slučajeva nađena barem po koja takva, nego je pozitivnost definirana medijanom kvalitativno-kvantitativno izračunatog H-skora.

Paydas i suradnici smatrali su pozitivnim izražaj PD-L1 u kHL ako je bio vidljiv u više od 5 % HRS stanica, bez obzira na intenzitet imunohistokemijskog bojenja. Pokazali su da izolirani izražaj PD-1 ili PD-L1 nije povezan s ishodom, ali je njihova koekspresija na HRS stanicama ili u tumorskom mikrookolišu, povezana s nepovoljnijim PFS i OS (121). Više autora nisu utvrdili prognostički značaj izražaja PD-liganada na HRS stanicama, ali su dokazali da je jači izražaj PD-1 i/ili PD-liganda na stanicama tumorskog mikrookoliša povezan s nepovoljnim kliničkim ishodom (120,122,123). Tako su Koh i suradnici utvrdili negativnu povezanost izražaja PD-1 s OS (122). Kao što je rečeno, Hollander i suradnici su analizirali izražaj PD-L1 na svim leukocitima, bez posebne analize makrofaga, i utvrdili povezanost s lošijim EFS i OS (120). Karithala i suradnici su utvrdili nepovoljan prognostički značaj visokog udjela PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrookolišu (123).

Kod lošijeg ishoda bolesnika s kHL liječenih standardnom kemoterapijom, važnu ulogu ima ne samo ukupni broj makrofaga povezanih s tumorom (124), nego i PD-L1+ makrofagi koji sudjeluju u modulaciji kliničkog tijeka bolesti, odnosno razvoju terapijske rezistencije (120,123). Kako izvještavaju Carey i suradnici u svojoj topološkoj analizi, u pravilu se PD-L1+ makrofagi okupljaju u neposrednoj blizini PD-L1-pozitivnih HRS stanica, potaknuti djelovanjem proinflamatornih i imunosupresivnih citokina. Obje stanične populacije blisko kontaktiraju s T-limfocitima koji jako izražavaju PD-1 (109). U našem istraživanju zamijetili smo prostorno okupljanje PD-L1+ makrofaga u neposrednoj blizini HRS stanica i PD-L1+ membranske izdanke od makrofaga prema bliskoj HRS stanici, što upućuje na eventualnu trogocitozu. Trogocitoza je brzi međustanični prijenos malih membranskih fragmenata s pripadajućim proteinskim sadržajem, pri čemu se fragmenti odvajaju od donorske stanice te ugrađuju u membranu primateljske stanice ili bivaju internalizirani (125). Kawashima i suradnici su dokazali da makrofagi u neposrednoj blizini HRS stanica mogu steći izražaj PD-liganada upravo putem trogocitoze (126). Zeng i suradnici opisuju da PD-1+ T-limfociti u blizini PD-L1-pozitivnih HRS stanica ili makrofaga mogu na isti način steći PD-L1, čime se dodatno pojačava lokalna imunosupresija (127). Iako točan mehanizam tog procesa nije u potpunosti razjašnjen, navedeni nalazi snažno upućuju na važnu ulogu međustanične razmjene membrana u oblikovanju lokalnog imunološkog mikrookoliša.

U našem uzorku među histološkim podtipovima je najzastupljeniji NS, sa 75% što je u skadu s raspodjelom podtipova u drugim razvijenim zemaljama (3). Treba reći da je u

uzastopnim kohortama ispitanika s kHL iz našeg centra analiziranim od 1980-1990 i 1991-2018 rastao udio NS, s 48 % na 68,1% i sad 75% uz stabilan broj EBV-pozitivnih kHL, što govori o poboljšanju socioekonomskog standarda naše populacije (116,128,129).

Unatoč histološkim osobitostima podtipova NS i MC, nije bilo značajne razlike u izražaju PD-L1 na HRS stanicama i makrofagima. To je u skladu s drugim studijama koje nisu pronašle povezanost između izražaja PD-L1 i podtipa kHL.

Bimodalna raspodjela kHL po dobi je karakteristična za razvijene zemlje. U našoj kohorti je najveća učestalost kHL-a bila između 15. i 35. godine života (6). Čak 54% ispitanika imali su u vrijeme dijagnoze B simptome, dok globalni epidemiološki podaci govore o 40 % (30). Udio ispitanika dijagnosticiranih u III i IV kliničkom stadiju bolesti od 45%, gotovo je identičan onome iz SAD-a (130). U usporedbi s literaturnim podacima iz Europe, Amerike i Azije, bio je viši postotak ispitanika s *bulky* medijastinalnim tumorom, 26,5 % prema 18–25% (131–133). Prema našem saznanju, prvi smo ukazali na povezanost broja PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrokolišu s *bulky* medijastinalnom bolesti, odnosno ektranodalnim zahvaćanjem kHL-a. Veći broj PD-L1+ makrofaga bio je povezan s ektranodalnim zahvaćanjem, a *bulky* tumori s manjim brojem i udjelom PD-L1+ makrofaga. Analizirajući razlike s obzirom na bimodalnu dobnu raspodjelu kHL-a, utvrdili smo da je kod mlađih ispitanika statistički značajno manji broj PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrokolišu, a *bulky* bolest značajno češća nego u starijoj skupini, 42,6 % prema 6,2 %. Za razliku od toga, medijan izražaja PD-L1 na HRS stanicama bio je gotovo identičan u obje dobne skupine. Negativna korelacija između PD-L1+ makrofaga i *bulky* tumorske mase čini se posebno poticajnom za daljnje istraživanje o djelovanju makrofaga u kHL. Stariji ispitanici imali su značajno češće EBV pozitivan status kHL, 43,7 % prema 6,4 %.

Ukupno je 22,5 % ispitanika imalo EBV-pozitivan kHL, što je u skladu s podacima iz drugih razvijenih zemalja (134). Od svih kliničko-patoloških varijabli u našem uzorku, samo je EBV status bio povezan s izražajem PD-L1 na HRS stanicama. EBV pozitivni status bio je povezan s višim PD-L1 na HRS te povećanim brojem makrofaga i PD-L1+ makrofaga. Na konstitutivni izražaj PD-L1 u HRS utječe povećanje broja kopija u regiji 9p24.1 koja obuhvaća i lokus za JAK2, a njegova povećana aktivnost preko JAK/STAT signalnog puta potiče transkripciju PD-liganada. Međutim, EBV infekcija putem onkoproteina LMP1 aktivira JAK/STAT signalizaciju i AP-1 koji može potaknuti pojačanu transkripciju PD-L1 bez amplifikacije lokusa 9p24.1 (113). U upali i tumoru CD163+ makrofagi imaju povišen izražaj PD-L1, primjerice u tonzilama tijekom primarne EBV infekcije (135). U meta-analizi

limfoproliferativnih bolesti utvrđen je veći izražaj PD-L1 u tumorskim stanicama EBV-pozitivnih slučajeva (136). Međutim, u kHL-u rezultati nisu tako jednoznačni. U istraživanju Roemera i suradnika, EBV-pozitivni kHL češće ima visoki H-skor PD-L1, ali je raspodjela genetskih promjena u regiji 9p24.1 slična kod EBV-pozitivnih i EBV-negativnih ispitanika (99). Navedeni rezultati su slični našima u kojima je pozitivan EBV status kHL bio povezan s višim izražajem PD-L1 na HRS stanicama, a potkrijepljuju i rezultate Greena i suradnika da EBV može inducirati prepisivanje PD-L1 i u diploidnoj regiji 9p24.1 (113). Međutim, ima studija koje nisu utvrdile povezanost izražaja PD-1 i PD-L1 s EBV statusom kHL, analiziranim EBER in situ hibridizacijom (121). Dvije studije kHL s velikim brojem EBV-pozitivnih slučajeva - argentinska pedijatrijska studija Jimeneza i suradnika i južnoafrička studija Antela i suradnika na populaciji s visokom incidencijom HIV-a nisu utvrdile povezanost EBV statusa kHL s izražajem PD-L1 (137,138).

U kliničkoj praksi, unatoč visokoj učinkovitosti prve linije kemoterapije, određeni broj bolesnika s kHL razvije relaps ili je bolest refraktorna, a njena dugotrajna terapijska kontrola postaje vrlo ograničena (139). U hematologiji je stoga R/R kHL i dalje značajan terapijski izazov u kojem bi imunoterapija donijela produljenje preživljenja kad bi bila uključena pravovremeno, a ne kao kasnija linija liječenja progresije bolesti. Nameće se pitanje bi li prvolinijska imunoterapija smanjila broj relapsa i terapijsku rezistenciju kHL-a, tog jedinstvenog „imunološkog tumora“ i povećala udio preživjelih, većinom mladih bolesnika. Novija klinička ispitivanja pokazala su ohrabrujuće rezultate primjene inhibitora PD-1 i u prvoj liniji liječenja. Prema ispitivanjima NIVAHL i KEYNOTE-C11, inhibitori PD-1, samostalno ili u kombinaciji s kemoterapijom, dovode do vrlo visokih stopa KR i PFS-a (53,54,140). Dodatno, u ponovnim bioptičkim uzorcima bolesnika s R/R bolešću, veći je izražaj PD-L1 na HRS stanicama i makrofagima nego u inicijalnoj dijagnostičkoj biopsiji (141,142), možda zato što promjene u tumorskom mikrookolišu inducirane konvencionalnom kemoterapijom pridonose pojačanom izražaju PD-L1-a (141). U zanimljivom istraživanju Reinke i suradnici analizirali su kHL biopsije nekoliko dana nakon primjene PD-1 inhibitora u prvoj liniji i utvrdili potpuni nestanak HRS stanica uz istovremeno smanjenje broja Treg limfocita i PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrookolišu (103). Ovi rezultati upućuju na to da TME kao dominantna potpora zloćudnim HRS stanicama može znatno oslabjeti s nestankom HRS stanica nakon prvolinijske terapije PD-1 inhibitorima. Autori razmatraju da je to izazvano povlačenjem čimbenika koji podržavaju preživljenje stanica, a ne zbog klasične aktivacije specifičnog imunološkog odgovora (103). Uključivanje PD-1 inhibitora u prvu liniju terapije

moglo bi povećati učinkovitost liječenja i smanjiti potrebu za konvencionalnom kemoterapijom i radioterapijom kod odabranih bolesnika.

Ovo je prva studija u kojoj su istodobno analizirani broj i udio PD-L1+ makrofaga i H-skor PD-L1 u HRS stanicama, pri čemu je histološka analiza, provedena na velikom povećanju uz imerziju i u više vidnih polja, omogućila veću preciznost i reprezentativnost mjerenja, bez smanjenja broja analiziranih stanica u usporedbi s drugim imunohistokemijskim studijama. Prema našim rezultatima, integrirana procjena izražaja PD-L1 na HRS stanicama i makrofagima u dijagnostičkim biopsijama kHL-a ima prognostičku i prediktivnu vrijednost i može pridonijeti racionalnom uključivanju blokatora PD-1 u prvu liniju liječenja kHL-a.

6. ZAKLJUČCI

1. Izražaj PD-L1 u HRS stanicama, s različitim udjelom tumorskih stanica i intenzitetom bojenja, bio je prisutan u većini analiziranih slučajeva. Medijan H-skora je 80 (IQT 36.5 do 142.8).
2. EBV pozitivan status kHL-a utvrđen je u 22,5% ispitanika.
3. Veći H-skor PD-L1 u HRS stanicama povezan je s EBV-pozitivnim kHL ($p=0,005$). Ispitanici s EBV-pozitivnim kHL imali su veći ukupni broj makrofaga i apsolutni broj broj PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrookolišu ($p=0,008$ odnosno $p=0,005$).
4. *Bulky* bolest bila je povezana sa značajno nižim apsolutnim brojem i udjelom PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrookolišu ($p=0,04$ oba).
5. Ispitanici s vrijednošću iznad medijana PD-L1 H-skora imali su smrtni ishod 4,55 puta češće i doživjeli relaps 1,38 puta češće od ispitanika s vrijednošću ispod medijana PD-L1 H-skora (oba $p < 0,0001$).
6. Ispitanici s visokim udjelom PD-L1+ makrofaga imali su 100 puta veću stopu od smrtnog ishoda nego ispitanici s niskim udjelom PD-L1+ makrofaga ($p < 0,0001$).
7. Ispitanici iz dobne skupine od 15-35 godina imali su značajno manji apsolutni broj PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrookolišu i češće prezentirali *bulky* bolest (oba $p=0,008$). Ispitanici > 55 godina češće imaju podtip MC ($p=0,001$) i EBV- pozitivan kHL $p < 0,001$).

7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Programirani ligand smrti 1 (PD-L1) na tumorskim stanicama, uključujući Hodgkinove i Reed-Sternbergove (HRS) stanice u klasičnom Hodgkinovom limfomu (kHL), suprimira odgovor tumorskog imunog mikrokoliša. Analizirali smo izražaj PD-L1 u HRS stanicama i makrofagima i usporedili s kliničko-patološkim značajkama kHL i mjerama ishoda. Prisutnost Epstein-Barr virusa (EBV) u HRS stanicama analizirana je *in situ* hibridizacijom pomoću EBER probe, a izražaj PD-L1 u HRS i makrofagima dvostrukim imunohistokemijskim bojenjem na PD-L1 i makrofagnim biljekom CD163. U deset polja povećanja 1000x izračunat je H-skor izražaja PD-L1 u HRS stanicama, a izbrojan ukupan broj makrofaga, apsolutni broj i udio PD-L1+ makrofaga. Pozitivan EBV status kHL utvrđen je u 22,5% ispitanika. Medijan PD-L1 H-skora HRS stanica bio je 80 (IQT 36.5 do 142.8), a vrijednost iznad medijana povezana s pozitivnim EBV statusom kHL-a. Ispitanici s EBV-pozitivnim kHL imali su veći ukupni broj makrofaga i apsolutni broj PD-L1+ makrofaga ($p=0,008$ i $p=0,005$). Masivna bolest bila je povezana s nižim apsolutnim brojem i udjelom PD-L1+ makrofaga (oba $p = 0,04$). Ispitanici s vrijednošću iznad medijana PD-L1 H-skora imali su smrtni ishod 4,55 puta češće i doživjeli recidiv 1,38 puta češće od ispitanika s vrijednošću ispod medijana PD-L1 H -skora (oba $p < 0,0001$). Ispitanici s visokim udjelom PD-L1+ makrofaga imali su 100 puta veću stopu od smrtnog ishoda nego ispitanici s niskim udjelom PD-L1+ makrofaga ($p < 0,0001$). Ispitanici iz dobne skupine od 15-35 godina imaju manji apsolutni broj PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrokolišu i češće *bulky* bolest (oba $p=0,008$). Ispitanici > 55 godina češće imaju podtip miješane celularnosti (MC) i EBV- pozitivan kHL (oba $p < 0,001$). Visoki izražaj PD-L1 u HRS stanicama i makrofagima povezni su s lošijim ishodima. Integrirana procjena izražaja PD-L1 na HRS stanicama i makrofagima u dijagnostičkim biopsijama kHL-a ima prognostičku i prediktivnu vrijednost

8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Programirani ligand smrti 1 (PD-L1) na tumorskim stanicama, uključujući zloćudne Hodgkinove i Reed-Sternbergove stanice (HRS) u klasičnom Hodgkinovom limfomu (kHL) blokira imunološki odgovor u tumorskom mikrokolišu vezanjem na PD-1 na citotoksičnim limfocitima. Analizirali smo izražaj PD-L1 u makrofagima i HRS stanicama u 98 ispitanika i usporedili s kliničko-patološkim značajkama, Epstein-Barr virus (EBV) statusom tumora i mjerama ishoda. 22,8 % ispitanika imalo je Epstein-Barr virus pozitivnu bolest. EBV pozitivni kHL značajno češće ima visoku vrijednost H-skora PD-L1 u HRS stanicama. Manji apsolutni broj i udio PD-L1+ makrofaga u tumorskom mikrokolišu značajno je povezan s tzv. masivnom bolešću. Ispitanici s visokim H-skorom PD-L1 u HRS stanicama, kao i ispitanici s visokom proporcijom PD-L1+ makrofaga imaju značajno veći rizik od relapse bolesti i smrti.

9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

Title: THE SIGNIFICANCE OF PROGRAMMED CELL DEATH LIGAND 1 EXPRESSION IN CLASSICAL HODGKIN'S LYMPHOMA

Summary

Programmed death ligand 1 (PD-L1) on tumor cells, including Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells in classical Hodgkin's lymphoma (cHL), suppresses the immune response. We analyzed the expression of PD-L1 in HRS cells and tumor-associated macrophages in 98 cases of cHL and correlated it with clinicopathological variables and outcome. In situ hybridization for EBV-encoded RNA (EBER) and double immunohistochemistry using PD-L1 and CD163 were performed. At a magnification of 1000x under immersion, 10 fields were analyzed microscopically and PD-L1 expression in HRS cells was calculated for each case as H-score. In the same fields, the total number of CD163+ macrophages was counted, as well as the absolute number and percentage of CD163+ PD-L1+ macrophages. 22.8% of cHL patients were EBV-positive. The median H-score was 80 (IQT 36.5-142.8), and values above the median were more common in EBV-positive cHL. Patients with EBV-positive cHL had higher total macrophage counts and absolute PD-L1+ macrophage counts ($p=0.008$ and $p=0.005$, respectively). Younger patients had lower absolute PD-L1+ macrophage counts and more bulky disease (both $p=0.008$, both). Patients with H-scores above the median PD-L1 H-scores died 4.55 times more often and relapsed 1.38 times more often than patients with low H-scores (both $p<0.0001$). Patients with high PD-L1+ macrophage counts died at a 100-fold higher rate than those with low counts ($p<0.0001$). High expression of PD-L1 in HRS cells and macrophages is associated with worse outcomes.

10. LAY SUMMARY

Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expressed on tumor cells, including malignant Hodgkin and Reed–Sternberg (HRS) cells in classical Hodgkin lymphoma, blocks the immune response in the tumor microenvironment by binding to PD-1 on cytotoxic lymphocytes. We analyzed PD-L1 expression in macrophages and HRS cells in 98 patients and correlated the findings with clinicopathological characteristics, Epstein–Barr virus (EBV) tumor status, and outcome measures. 22.8% of patients had EBV-positive disease. EBV-positive Hodgkin lymphoma significantly more frequently exhibited high PD-L1 H-scores in HRS cells. A lower absolute number and proportion of PD-L1–positive macrophages in the tumor microenvironment were significantly associated with so-called bulky disease. Patients with a high PD-L1 H-score in HRS cells, as well as patients with a high proportion of PD-L1–positive macrophages, had a significantly increased risk of disease relapse and death.

11. LITERATURA

1. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2011 Nov;105(11):1684–92.
2. Šekerija M, Bubanović L, Lončar J, Čukelj P, Veltruski J, Mikolaj L i sur. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj. *Bilten* 45. 2020;45:1–34.
3. Weltgesundheitsorganisation. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. 585 p. (World Health Organization classification of tumours).
4. Weinreb M, Day PJ, Niggli F, Powell JE, Raafat F, Hesseling PB, et al. The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease from different geographical areas. *Arch Dis Child*. 1996 Jan 1;74(1):27–31.
5. Ferreira JMDO, Klumb CE, Reis RDS, Santos MDO, Oliveira JFP, De Camargo B, et al. Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: First report from Brazil. *Cancer Epidemiol*. 2012 Aug;36(4):e221–6.
6. Edwards BK RL. SEER cancer statistics review: 1973-1994. Bethesda: National Cancer Institute; 1997. Report No.: NIH publ no. 97-2789.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7–34.
8. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):265–76.
9. Gares V, Panico L, Castagne R, Delpierre C, Kelly-Irving M. The role of the early social environment on Epstein Barr virus infection: a prospective observational design using the Millennium Cohort Study. *Epidemiol Infect*. 2017 Dec;145(16):3405–12.
10. Hjalgrim H. Risk of Hodgkin's Disease and Other Cancers After Infectious Mononucleosis. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Sept 20;92(18):1522–8.

11. Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann M, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 2006 Apr 15;118(8):1853–61.
12. Bolanos R, Hwang A, Aparicio J, Chao C, Qurashi N, Flowers C, et al. Epstein-Barr virus prevalence in classical Hodgkin lymphoma tumors by race/ethnicity in a multiethnic U.S. population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2020 June 1;29(6_Supplement_2):B092–B092.
13. Lam E, Wan JY, Aparicio J, Pullarkat S, Colombo A, Song JY, et al. EBV Prevalence and Overall Survival in the *M*ulti *e*thnic *S*tudy of *H*odgkin Lymphoma (MESH). *Blood*. 2023 Nov 2;142(Supplement 1):6188–6188.
14. Westmoreland KD, Stanley CC, Montgomery ND, Kaimila B, Kasonkanji E, El-Mallawany NK, et al. Hodgkin lymphoma, HIV, and Epstein–Barr virus in Malawi: Longitudinal results from the Kamuzu Central Hospital Lymphoma study. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 May;64(5):e26302.
15. Alibrahim MN, Gloghini A, Carbone A. Immune Deficiency/Dysregulation-Associated EBV-Positive Classic Hodgkin Lymphoma. *Cancers*. 2025 Apr 25;17(9):1433.
16. Tinguely M, Vonlanthen R, Müller E, Dommann-Scherrer CC, Schneider J, Laissue JA, et al. Hodgkin's disease-like lymphoproliferative disorders in patients with different underlying immunodeficiency states. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 1998 Apr;11(4):307–12.
17. Garnier JL, Lebranchu Y, Dantal J, Bedrossian J, Cahen R, Assouline D, et al. Hodgkin's disease after transplantation. *Transplantation*. 1996 Jan;61(1):71–6.
18. Fallah M, Liu X, Ji J, Försti A, Sundquist K, Hemminki K. Hodgkin lymphoma after autoimmune diseases by age at diagnosis and histological subtype. *Ann Oncol*. 2014 July;25(7):1397–404.
19. Goldin LR, Pfeiffer RM, Gridley G, Gail MH, Li X, Mellemkjaer L, et al. Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors. *Cancer*. 2004 May;100(9):1902–8.

20. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer*. 2014 Aug;14(8):517–34.
21. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, et al. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*. 2000 Feb 15;95(4):1443–50.
22. Liso A. Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006 Aug 1;108(3):1013–20.
23. Liu WR, Shipp MA. Signaling pathways and immune evasion mechanisms in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2017 Nov 23;130(21):2265–70.
24. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002 June 15;99(12):4283–97.
25. Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, Pinto A, Gloghini A, Carbone A, et al. Expression of CCR5 receptors on Reed–Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: Involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int J Cancer*. 2008 Feb 15;122(4):769–76.
26. Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, Iida S, et al. Specific Recruitment of CC Chemokine Receptor 4–Positive Regulatory T Cells in Hodgkin Lymphoma Fosters Immune Privilege. *Cancer Res*. 2006 June 1;66(11):5716–22.
27. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, Giulino-Roth L, Tam W, Liu Y, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2015 Feb 12;125(7):1061–72.
28. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature*. 2011 Mar 1;471(7338):377–81.
29. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and

further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010 Oct 28;116(17):3268–77.

30. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol*. 2014 Sept 20;32(27):3059–67.
31. Gobbi PG, Cavalli C, Gendarini A, Crema A, Ricevuti G, Federico M, et al. Reevaluation of prognostic significance of symptoms in Hodgkin's disease. *Cancer*. 1985 Dec 15;56(12):2874–80.
32. Shimabukuro-Vornhagen A, Haverkamp H, Engert A, Balleisen L, Majunke P, Heil G, et al. Lymphocyte-Rich Classical Hodgkin's Lymphoma: Clinical Presentation and Treatment Outcome in 100 Patients Treated Within German Hodgkin's Study Group Trials. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 20;23(24):5739–45.
33. Mauch PM, Kalish LA, Kadin M, Coleman CN, Osteen R, Hellman S. Patterns of presentation of Hodgkin disease. Implications for etiology and pathogenesis. *Cancer*. 1993 Mar 15;71(6):2062–71.
34. Atkinson K, Austin DE, McElwain TJ, Peckham MJ. Alcohol pain in Hodgkin's disease. *Cancer*. 1976 Feb;37(2):895–9.
35. Hasenclever D, Diehl V, Armitage JO, Assouline D, Björkholm M, Brusamolino E, et al. A Prognostic Score for Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*. 1998 Nov 19;339(21):1506–14.
36. Sierra RD. Coombs-positive hemolytic anemia in Hodgkin's disease: case presentation and review of the literature. *Mil Med*. 1991 Dec;156(12):691–2.
37. Munker R, Hasenclever D, Brosteanu O, Hiller E, Diehl V. Bone marrow involvement in Hodgkin's disease: an analysis of 135 consecutive cases. German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 1995 Feb;13(2):403–9.

38. Subramanian R, Basu D, Badhe B, Dutta TK. Role of bone marrow trephine biopsy in the diagnosis of marrow involvement in Hodgkin's disease. *Indian J Pathol Microbiol.* 2007 July;50(3):640–3.
39. Barrington SF, Mikhaeel NG. When should FDG - PET be used in the modern management of lymphoma? *Br J Haematol.* 2014 Feb;164(3):315–28.
40. Rosenberg SA, Kaplan HS. Evidence for an orderly progression in the spread of Hodgkin's disease. *Cancer Res.* 1966 June;26(6):1225–31.
41. Townsend W, Linch D. Hodgkin's lymphoma in adults. *The Lancet.* 2012 Sept;380(9844):836–47.
42. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBDO, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia.* 2022 July;36(7):1720–48.
43. Satou A, Takahara T, Nakamura S. An Update on the Pathology and Molecular Features of Hodgkin Lymphoma. *Cancers.* 2022 May 26;14(11):2647.
44. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood .* 2022;140(11):1229-1253. *Blood.* 2023 Jan 26;141(4):437–437.
45. Engert A, Plütschow A, Eich HT, Lohri A, Dörken B, Borchmann P, et al. Reduced Treatment Intensity in Patients with Early-Stage Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2010 Aug 12;363(7):640–52.
46. Klimm B, Goergen H, Fuchs M, Von Tresckow B, Böll B, Meissner J, et al. Impact of risk factors on outcomes in early-stage Hodgkin's lymphoma: an analysis of international staging definitions. *Ann Oncol.* 2013 Dec;24(12):3070–6.
47. Bonadonna G, Zucali R, Monfardini S, De Lena M, Uslenghi C. Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP. *Cancer.* 1975 July;36(1):252–9.
48. Casasnovas RO, Bouabdallah R, Brice P, Lazarovici J, Ghesquieres H, Stamatoullas A, et al. PET-adapted treatment for newly diagnosed advanced Hodgkin lymphoma

- (AHL2011): a randomised, multicentre, non-inferiority, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2019 Feb;20(2):202–15.
49. Borchmann P, Goergen H, Kobe C, Lohri A, Greil R, Eichenauer DA, et al. PET-guided treatment in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma (HD18): final results of an open-label, international, randomised phase 3 trial by the German Hodgkin Study Group. *The Lancet.* 2017 Dec;390(10114):2790–802.
 50. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Hodgkin Lymphoma [Internet]. NCCN; 2025. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/hodgkins.pdf
 51. Straus DJ, Długosz-Danecka M, Connors JM, Alekseev S, Illés Á, Picardi M, et al. Brentuximab vedotin with chemotherapy for stage III or IV classical Hodgkin lymphoma (ECHELON-1): 5-year update of an international, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2021 June;8(6):e410–21.
 52. Borchmann P, Ferdinandus J, Schneider G, Moccia A, Greil R, Hertzberg M, et al. Assessing the efficacy and tolerability of PET-guided BrECADD versus eBEACOPP in advanced-stage, classical Hodgkin lymphoma (HD21): a randomised, multicentre, parallel, open-label, phase 3 trial. *The Lancet.* 2024 July;404(10450):341–52.
 53. Bröckelmann PJ, Bühnen I, Meissner J, Trautmann-Grill K, Herhaus P, Halbsguth TV, et al. Nivolumab and Doxorubicin, Vinblastine, and Dacarbazine in Early-Stage Unfavorable Hodgkin Lymphoma: Final Analysis of the Randomized German Hodgkin Study Group Phase II NIVAHL Trial. *J Clin Oncol.* 2023 Feb 20;41(6):1193–9.
 54. Herrera AF, LeBlanc M, Castellino SM, Li H, Rutherford SC, Evens AM, et al. Nivolumab+AVD in Advanced-Stage Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2024 Oct 17;391(15):1379–89.
 55. FDA: Nivolumab (Opdivo) – Hodgkin Lymphoma Approval [Internet]. 2016 [cited 2025 Oct 18]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/nivolumab-opdivo-hodgkin-lymphoma>

56. EMA: Keytruda – EPAR – Product Information [Internet]. European Medicines Agency; 2025 [cited 2025 Oct 17]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda>
57. EMA: Opdivo - EPAR – Product Information [Internet]. 2025 [cited 2025 Oct 17]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/opdivo>
58. Amitai I, Gurion R, Vidal L, Dann EJ, Raanani P, Gafter-Gvili A. PET-adapted therapy for advanced Hodgkin lymphoma – systematic review. *Acta Oncol.* 2018 June 3;57(6):765–72.
59. Raemaekers JMM, André MPE, Federico M, Girinsky T, Oumedaly R, Brusamolino E, et al. Omitting Radiotherapy in Early Positron Emission Tomography–Negative Stage I/II Hodgkin Lymphoma Is Associated With an Increased Risk of Early Relapse: Clinical Results of the Preplanned Interim Analysis of the Randomized EORTC/LYSA/FIL H10 Trial. *J Clin Oncol.* 2014 Apr 20;32(12):1188–94.
60. André MPE, Girinsky T, Federico M, Reman O, Fortpied C, Gotti M, et al. Early Positron Emission Tomography Response–Adapted Treatment in Stage I and II Hodgkin Lymphoma: Final Results of the Randomized EORTC/LYSA/FIL H10 Trial. *J Clin Oncol.* 2017 June 1;35(16):1786–94.
61. Straus DJ, Jung SH, Pitcher B, Kostakoglu L, Grecula JC, Hsi ED, et al. CALGB 50604: risk-adapted treatment of nonbulky early-stage Hodgkin lymphoma based on interim PET. *Blood.* 2018 Sept 6;132(10):1013–21.
62. Eichenauer DA, Aleman BMP, André M, Federico M, Hutchings M, Illidge T, et al. Hodgkin lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 2018 Oct 1;29:iv19–29.
63. Johnson P, Federico M, Kirkwood A, Fosså A, Berkahn L, Carella A, et al. Adapted Treatment Guided by Interim PET-CT Scan in Advanced Hodgkin’s Lymphoma. *N Engl J Med.* 2016 June 23;374(25):2419–29.
64. Fornecker LM, Lazarovici J, Aurer I, Casasnovas RO, Gac AC, Bonnet C, et al. Brentuximab Vedotin Plus AVD for First-Line Treatment of Early-Stage Unfavorable

- Hodgkin Lymphoma (BREACH): A Multicenter, Open-Label, Randomized, Phase II Trial. *J Clin Oncol*. 2023 Jan 10;41(2):327–35.
65. Engert A, Haverkamp H, Kobe C, Markova J, Renner C, Ho A, 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. *The Lancet*. 2012 May;379(9828):1791–9.
66. Gordon LI, Hong F, Fisher RI, Bartlett NL, Connors JM, Gascoyne RD, et al. Randomized Phase III Trial of ABVD Versus Stanford V With or Without Radiation Therapy in Locally Extensive and Advanced-Stage Hodgkin Lymphoma: An Intergroup Study Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2496). *J Clin Oncol*. 2013 Feb 20;31(6):684–91.
67. Merli F, Luminari S, Gobbi PG, Cascavilla N, Mammi C, Ilariucci F, et al. Long-Term Results of the HD2000 Trial Comparing ABVD Versus BEACOPP Versus COPP-EBV-CAD in Untreated Patients With Advanced Hodgkin Lymphoma: A Study by Fondazione Italiana Linfomi. *J Clin Oncol*. 2016 Apr 10;34(11):1175–81.
68. Rossi C, Manson G, Marouf A, Cabannes-Hamy A, Nicolas-Virelizier E, Maerevoet M, et al. Classic Hodgkin Lymphoma: The LYSA pragmatic guidelines. *Eur J Cancer*. 2024 Dec;213:115073.
69. Connors JM, Jurczak W, Straus DJ, Ansell SM, Kim WS, Gallamini A, et al. Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018 Jan 25;378(4):331–44.
70. European Medicines Agency. Adcetris — EMA [Internet]. 2025 [cited 2025 Oct 31]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/adcetris>
71. Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2025 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2024 Dec;99(12):2367–78.
72. Aurer Igor, Dreta Barbara, Ivić Marija, Međugorac Marin, Miljak Antonija. Četvrti Hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma. *Bilt Krohema*. 2022;14:8–11.

73. Zekanović Ivan, Duraković Nadira, Morić Perić Martina, Bašić-Kinda Sandra, Sertić Dubravka, Serventi Seiwerth Ranka. Use of bendamustine instead of carmustine in autologous stem cell transplantation conditioning – toxicity and infectious complications comparison. *Liječnički Vjesnik*. 2018 Dec 1;140(11–12):303–6.
74. Martínez C, Bazarbachi A, Sureda A. Classical Hodgkin's Lymphoma. In: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, Kröger N, Carreras E, editors. *The EBMT Handbook* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2024 [cited 2025 Nov 1]. p. 799–808. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-44080-9_89
75. Moskowitz CH, Nademanee A, Masszi T, Agura E, Holowiecki J, Abidi MH, et al. Brentuximab vedotin as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with Hodgkin's lymphoma at risk of relapse or progression (AETHERA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2015 May;385(9980):1853–62.
76. Abalı H, Ürün Y, Öksüzoğlu B, Budakoğlu B, Yıldırım N, Güler T, et al. Comparison of ICE (Ifosfamide-Carboplatin-Etoposide) Versus DHAP (Cytosine Arabinoside-Cisplatin-Dexamethasone) as Salvage Chemotherapy in Patients with Relapsed or Refractory Lymphoma. *Cancer Invest*. 2008 Jan;26(4):401–6.
77. Crump M, Kuruvilla J, Couban S, MacDonald DA, Kukreti V, Kouroukis CT, et al. Randomized Comparison of Gemcitabine, Dexamethasone, and Cisplatin Versus Dexamethasone, Cytarabine, and Cisplatin Chemotherapy Before Autologous Stem-Cell Transplantation for Relapsed and Refractory Aggressive Lymphomas: NCIC-CTG LY.12. *J Clin Oncol*. 2014 Nov 1;32(31):3490–6.
78. Bartlett NL, Niedzwiecki D, Johnson JL, Friedberg JW, Johnson KB, Van Besien K, et al. Gemcitabine, vinorelbine, and pegylated liposomal doxorubicin (GVD), a salvage regimen in relapsed Hodgkin's lymphoma: CALGB 59804. *Ann Oncol*. 2007 June;18(6):1071–9.
79. Moskowitz AJ, Schöder H, Yahalom J, McCall SJ, Fox SY, Gerecitano J, et al. PET-adapted sequential salvage therapy with brentuximab vedotin followed by augmented ifosfamide, carboplatin, and etoposide for patients with relapsed and refractory Hodgkin's

- lymphoma: a non-randomised, open-label, single-centre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2015 Mar;16(3):284–92.
80. Moskowitz AJ, Shah G, Schöder H, Ganesan N, Drill E, Hancock H, et al. Phase II Trial of Pembrolizumab Plus Gemcitabine, Vinorelbine, and Liposomal Doxorubicin as Second-Line Therapy for Relapsed or Refractory Classical Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2021 Oct 1;39(28):3109–17.
 81. LaCasce AS, Bociek RG, Sawas A, Caimi P, Agura E, Matous J, et al. Brentuximab vedotin plus bendamustine: a highly active first salvage regimen for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018 July 5;132(1):40–8.
 82. Herrera AF, Moskowitz AJ, Bartlett NL, Vose JM, Ramchandren R, Feldman TA, et al. Interim results of brentuximab vedotin in combination with nivolumab in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018 Mar 15;131(11):1183–94.
 83. Marie José Kersten, Julia Driessen, Josée M. Zijlstra, Wouter J. Plattel, Franck Morschhauser, Pieterella J. Lugtenburg, et al. Combining brentuximab vedotin with dexamethasone, high-dose cytarabine and cisplatin as salvage treatment in relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: the phase II HOVON/LLPC Transplant BRaVE study. *Haematologica*. 2020 Apr 9;106(4):1129–37.
 84. Mei MG, Lee HJ, Palmer JM, Chen R, Tsai NC, Chen L, et al. Response-adapted anti-PD-1–based salvage therapy for Hodgkin lymphoma with nivolumab alone or in combination with ICE. *Blood*. 2022 June 23;139(25):3605–16.
 85. Bryan LJ, Casulo C, Allen PB, Smith SE, Savas H, Dillehay GL, et al. Pembrolizumab Added to Ifosfamide, Carboplatin, and Etoposide Chemotherapy for Relapsed or Refractory Classic Hodgkin Lymphoma: A Multi-institutional Phase 2 Investigator-Initiated Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2023 May 1;9(5):683.
 86. Josting A, Kàtay I, Rueffer U, Winter S, Tesch H, Engert A, et al. Favorable outcome of patients with relapsed or refractory Hodgkin’s disease treated with high-dose chemotherapy and stem cell rescue at the time of maximal response to conventional salvage therapy (Dexa-BEAM). *Ann Oncol*. 1998 Mar;9(3):289–95.

87. Brice P, Bouabdallah R, Moreau P, Divine M, André M, Aoudjane M, et al. Prognostic factors for survival after high-dose therapy and autologous stem cell transplantation for patients with relapsing Hodgkin's disease: analysis of 280 patients from the French registry. *Bone Marrow Transplant*. 1997 July 1;20(1):21–6.
88. Castagna L, Busca A, Bramanti S, Raiola Anna M, Malagola M, Ciceri F, et al. Haploidentical related donor compared to HLA-identical donor transplantation for chemosensitive Hodgkin lymphoma patients. *BMC Cancer*. 2020 Dec;20(1):1140.
89. Bazarbachi A, Boumendil A, Finel H, Khvedelidze I, Romejko-Jarosinska J, Tanase A, et al. The outcome of patients with Hodgkin lymphoma and early relapse after autologous stem cell transplant has improved in recent years. *Leukemia*. 2022 June;36(6):1646–53.
90. Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, et al. Results of a Pivotal Phase II Study of Brentuximab Vedotin for Patients With Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012 June 20;30(18):2183–9.
91. Armand P, Zinzani PL, Lee HJ, Johnson NA, Brice P, Radford J, et al. Five-year follow-up of KEYNOTE-087: pembrolizumab monotherapy for relapsed/refractory classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2023 Sept 7;142(10):878–86.
92. Ansell SM, Bröckelmann PJ, Von Keudell G, Lee HJ, Santoro A, Zinzani PL, et al. Nivolumab for relapsed/refractory classical Hodgkin lymphoma: 5-year survival from the pivotal phase 2 CheckMate 205 study. *Blood Adv*. 2023 Oct 24;7(20):6266–74.
93. Shi Y, Su H, Song Y, Jiang W, Sun X, Qian W, et al. Safety and activity of sintilimab in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma (ORIENT-1): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2019 Jan;6(1):e12–9.
94. Song Y, Gao Q, Zhang H, Fan L, Zhou J, Zou D, et al. Treatment of relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma with the anti-PD-1, tislelizumab: results of a phase 2, single-arm, multicenter study. *Leukemia*. 2020 Feb;34(2):533–42.
95. Kuruvilla J, Ramchandren R, Santoro A, Paszkiewicz-Kozik E, Gasirowski R, Johnson NA, et al. Pembrolizumab versus brentuximab vedotin in relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma (KEYNOTE-204): an interim analysis of a multicentre, randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2021 Apr;22(4):512–24.

96. Longo DL, Duffey PL, Young RC, Hubbard SM, D C Ihde, Glatstein E, et al. Conventional-dose salvage combination chemotherapy in patients relapsing with Hodgkin's disease after combination chemotherapy: the low probability for cure. *J Clin Oncol*. 1992 Feb;10(2):210–8.
97. Bonfante V, Santoro A, Viviani S, Devizzi L, Balzarotti M, Soncini F, et al. Outcome of patients with Hodgkin's disease failing after primary MOPP-ABVD. *J Clin Oncol*. 1997 Feb;15(2):528–34.
98. Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, et al. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2015 Apr;112(9):1501–9.
99. Roemer MGM, Advani RH, Ligon AH, Natkunam Y, Redd RA, Homer H, et al. *PD-L1* and *PD-L2* Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol*. 2016 Aug 10;34(23):2690–7.
100. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2016 May 20;34(1):539–73.
101. McLane LM, Abdel-Hakeem MS, Wherry EJ. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2019 Apr 26;37(1):457–95.
102. Huang AC, Orlowski RJ, Xu X, Mick R, George SM, Yan PK, et al. A single dose of neoadjuvant PD-1 blockade predicts clinical outcomes in resectable melanoma. *Nat Med*. 2019 Mar;25(3):454–61.
103. Reinke S, Bröckelmann PJ, Iaccarino I, Garcia-Marquez M, Borchmann S, Jochims F, et al. Tumor and microenvironment response but no cytotoxic T-cell activation in classic Hodgkin lymphoma treated with anti-PD1. *Blood*. 2020 Dec 17;136(25):2851–63.
104. Roemer MGM, Advani RH, Redd RA, Pinkus GS, Natkunam Y, Ligon AH, et al. Classical Hodgkin Lymphoma with Reduced β 2M/MHC Class I Expression Is Associated with Inferior Outcome Independent of 9p24.1 Status. *Cancer Immunol Res*. 2016 Nov 1;4(11):910–6.

105. Roemer MGM, Redd RA, Cader FZ, Pak CJ, Abdelrahman S, Ouyang J, et al. Major Histocompatibility Complex Class II and Programmed Death Ligand 1 Expression Predict Outcome After Programmed Death 1 Blockade in Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2018 Apr 1;36(10):942–50.
106. Cader FZ, Hu X, Goh WL, Wienand K, Ouyang J, Mandato E, et al. A peripheral immune signature of responsiveness to PD-1 blockade in patients with classical Hodgkin lymphoma. *Nat Med*. 2020 Sept;26(9):1468–79.
107. Taylor JG, Truelove E, Clear A, Calaminici M, Gribben JG. PDL1 shapes the classical Hodgkin lymphoma microenvironment without inducing T-cell exhaustion. *Haematologica*. 2022 July 14;108(4):1068–82.
108. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin’s Lymphoma. *N Engl J Med*. 2010 Mar 11;362(10):875–85.
109. Carey CD, Gusenleitner D, Lipschitz M, Roemer MGM, Stack EC, Gjini E, et al. Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2017 Nov 30;130(22):2420–30.
110. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2001 Oct;1(1):75–82.
111. Klein E, Teramoto N, Gogolák P, Nagy N, Björkholm M. LMP-1, the Epstein–Barr virus-encoded oncogene with a B cell activating mechanism similar to CD40. *Immunol Lett*. 1999 May;68(1):147–54.
112. Portis T, Dyck P, Longnecker R. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):4166–78.
113. Green MR, Rodig S, Juszczynski P, Ouyang J, Sinha P, O’Donnell E, et al. Constitutive AP-1 Activity and EBV Infection Induce PD-L1 in Hodgkin Lymphomas and Posttransplant Lymphoproliferative Disorders: Implications for Targeted Therapy. *Clin Cancer Res*. 2012 Mar 15;18(6):1611–8.

114. Assis MCG, Campos AHFM, Oliveira JSR, Soares FA, Silva JMK, Silva PB, et al. Increased expression of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells correlates with Epstein–Barr virus and has no impact on survival in patients with classical Hodgkin lymphoma in Brazil. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(5):3614–9.
115. Álvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, Bosch R, García JF, Jaén J, et al. Outcome in Hodgkin’s Lymphoma Can Be Predicted from the Presence of Accompanying Cytotoxic and Regulatory T Cells. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 15;11(4):1467–73.
116. Pavlović A, Miljak A, Brzica K, Glavina Durdov M. The Abundance of FOXP3, FOXP3/CD4 and CD8 Cells in the Microenvironment of Nodular Sclerosis and Mixed Cellularity Subtypes Is Associated with the Epstein–Barr Virus Status of Classic Hodgkin Lymphoma. *Biomedicines*. 2024 July 27;12(8):1680.
117. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013 Nov 27;310(20):2191.
118. Zeng Y, He G, Zhang Z, Zhu M. Advances in PD-1/PD-L1 inhibitor combinations with standard therapies for hematological malignancies. *Acad Oncol* [Internet]. 2025 Dec 25 [cited 2026 Jan 9];2(4). Available from: https://www.academia.edu/145575641/Advances_in_PD_1_PD_L1_inhibitor_combinations_with_standard_therapies_for_hematological_malignancies
119. Desai SH, Moskowitz AJ, Merryman RW, Shah HR, Pederson LD, Geyer S, et al. PD-1-based combinations before autologous transplant are associated with improved outcomes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood J*. 2025 Dec 17;blood.2025030151.
120. Hollander P, Kamper P, Smedby KE, Enblad G, Ludvigsen M, Mortensen J, et al. High proportions of PD-1+ and PD-L1+ leukocytes in classical Hodgkin lymphoma microenvironment are associated with inferior outcome. *Blood Adv*. 2017 Aug 8;1(18):1427–39.
121. Paydas S, Bağır E, Seydaoglu G, Ercolak V, Ergin M. Programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and EBV-encoded RNA (EBER) expression in Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol*. 2015 Sept;94(9):1545–52.

122. Koh YW, Jeon YK, Yoon DH, Suh C, Huh J. Programmed death 1 expression in the peritumoral microenvironment is associated with a poorer prognosis in classical Hodgkin lymphoma. *Tumor Biol.* 2016 June;37(6):7507–14.
123. Karihtala K, Leivonen SK, Brück O, Karjalainen-Lindsberg ML, Mustjoki S, Pellinen T, et al. Prognostic Impact of Tumor-Associated Macrophages on Survival Is Checkpoint Dependent in Classical Hodgkin Lymphoma. *Cancers.* 2020 Apr 4;12(4):877.
124. Guo B, Cen H, Tan X, Ke Q. Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma. *BMC Med.* 2016 Dec;14(1):159.
125. Bettadapur A, Miller HW, Ralston KS. Biting Off What Can Be Chewed: Trogocytosis in Health, Infection, and Disease. Ottemann KM, editor. *Infect Immun.* 2020 June 22;88(7):e00930-19.
126. Kawashima M, Carreras J, Higuchi H, Kotaki R, Hoshina T, Okuyama K, et al. PD-L1/L2 protein levels rapidly increase on monocytes via trogocytosis from tumor cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia.* 2020 Sept;34(9):2405–17.
127. Zeng Q, Schwarz H. The role of trogocytosis in immune surveillance of Hodgkin lymphoma. *OncoImmunology.* 2020 Jan;9(1):1781334.
128. Glavina-Durdov M, Jakic-Razumovic J, Capkun V, Murray P. Assessment of the prognostic impact of the Epstein–Barr virus-encoded latent membrane protein-1 expression in Hodgkin’s disease. *Br J Cancer.* 2001 May 5;84(9):1227–34.
129. Pavlovic A, Glavina Durdov M, Capkun V, Jakelic Pitesa J, Bozic Sakic M. Classical Hodgkin Lymphoma with Positive Epstein-Barr Virus Status is Associated with More FOXP3 Regulatory T Cells. *Med Sci Monit.* 2016 July 5;22:2340–6.
130. National Cancer Institute. SEER Stat Fact Sheets: Hodgkin Lymphoma [Internet]. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health; 2024 [cited 2026 Jan 5]. Available from: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/hodg.html?utm_source=chatgpt.com

131. Avigdor A, Trinchese F, Gavini F, Bent-Ennakhil N, Dalal M, Zomas A, et al. First-line treatment of stage IIB to stage IV classical Hodgkin lymphoma in Italy, Israel, and Spain: Patient characteristics, treatment patterns, and clinical outcomes. *eJHaem*. 2022 May;3(2):415–25.
132. Suttantapidok S, Kungwankiattichai S, Owattanapanich W. Treatment outcomes of ABVD in classical Hodgkin lymphoma patients from Thailand without procarbazine access. *Sci Rep*. 2025 July 1;15(1):22211.
133. Hughes-Davies L, Tarbell NJ, Coleman CN, Silver B, Shulman LN, Linggood R, et al. Stage IA–IIB Hodgkin’s disease: Management and outcome of extensive thoracic involvement. *Int J Radiat Oncol*. 1997 Sept;39(2):361–9.
134. Jarrett AF, Armstrong AA, Alexander E. Epidemiology of EBV and Hodgkin’s lymphoma. *Ann Oncol*. 1996;7:S5–10.
135. Moyano A, Ferressini N, De Matteo E, Preciado MV, Chabay P. PD-L1 is upregulated in CD163+ tonsillar macrophages from children undergoing EBV primary infection. *Front Immunol*. 2022 Nov 14;13:940910.
136. Yu J, Jin S, Yin X, Du H. Expression of the immune checkpoint molecules PD-L1 and PD-1 in EBV-associated lymphoproliferative disorders: A meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2023 Nov 10;27(1):7.
137. Jimenez O, Colli S, Garcia Lombardi M, Preciado MV, De Matteo E, Chabay P. Epstein–Barr virus recruits PDL1-positive cells at the microenvironment in pediatric Hodgkin lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2021 June;70(6):1519–26.
138. Antel K, Chetty D, Oosthuizen J, Mohamed Z, Van Der Vyver L, Verburgh E. CD68-positive tumour associated macrophages, PD-L1 expression, and EBV latent infection in a high HIV-prevalent South African cohort of Hodgkin lymphoma patients. *Pathology (Phila)*. 2021 Aug;53(5):628–34.
139. Moskowitz AJ, Perales M, Kewalramani T, Yahalom J, Castro-Malaspina H, Zhang Z, et al. Outcomes for patients who fail high dose chemoradiotherapy and autologous stem cell rescue for relapsed and primary refractory Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2009 July;146(2):158–63.

140. Winter JN, Nahar A, Kim E, Marinello P. Sequential pembrolizumab (pembro) and chemotherapy (chemo) in newly diagnosed, early unfavorable, or advanced-stage classical Hodgkin lymphoma (cHL): The phase 2 KEYNOTE-C11 study. *J Clin Oncol*. 2022 June 1;40(16_suppl):TPS7584–TPS7584.
141. Armand P, Chen YB, Redd RA, Joyce RM, Bsai J, Jeter E, et al. PD-1 blockade with pembrolizumab for classical Hodgkin lymphoma after autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2019 July 4;134(1):22–9.
142. Hollander P, Amini RM, Ginman B, Molin D, Enblad G, Glimelius I. Expression of PD-1 and PD-L1 increase in consecutive biopsies in patients with classical Hodgkin lymphoma. Bertolini F, editor. *PLOS ONE*. 2018 Sept 27;13(9):e0204870.

OSOBNİ PODACI

Ime i Prezime: Antonija Miljak

Datum i mjesto rođenja: 29. svibnja 1987., Split

E-mail: antonija.miljak003@gmail.com

OBRAZOVANJE

1994.-2002. Osnovna škola „Jesenice“, Dugi Rat

1996.-2006. Opća gimnazija „Jure Kaštelan“, Omiš

2006.-2012. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2017. – danas Doktorski studij Biologija novotvorina (BN), Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2019./2020. Poslijediplomski specijalistički studij Hematologija, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

RADNO ISKUSTVO

2012.-2013. pripravnički staž pri Kliničkoj bolnici „Dubrava“ u Zagrebu

2014. liječnica pri Domu zdravlja Splitsko-dalmatinske županije

2014. - 2016. liječnica u Centru za transfuzijsku medicinu KBC Split

2016. – 2021. specijalizacija iz hematologije, Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Split

2021.- danas specijalistica hematologije, Zavod za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Split

VJEŠTINE

Rad na računalu: aktivno i svakodnevno korištenje MS Office paketa

Strani jezici: Engleski (C1 – čitanje, pisanje, govor), Talijanski (B1 – čitanje, pisanje, govor), Francuski (A2 – čitanje, pisanje)

ČLANSTVO U ZNANSTVENIM I STRUČNIM DRUŠTVIMA

2014.- Hrvatska liječnička komora

2016.- član KROHEM-a (Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti)

ČLANICA SAVJETODAVNOG ODBORA

- 04/2023. Liječenje mogamulizumabom u mycosis fungoides i Sezaryjevu sindromu
- 05/2023. Fosfomicin u liječenju teških infekcija
- 11/2023. Brentuksimab vedotin u liječenju klasičnog Hodgkinovog limfoma
- 02/2025. Zanubrutinib u liječenju relapsnog/refraktornog marginalnog zona limfoma

KLINIČKA ISPITIVANJA

- 2021. - 2023. podistraživač za KBC Split u otvorenom istraživanju faze 2 o toleranciji i učinkovitosti Navitoclaxa samostalno ili u kombinaciji s Ruxolitinibom kod bolesnika s mijelofibrozom (REFINE)
- 2020. - danas glavni ispitivač za Klinički bolnički centar Split u LUPIAE STUDY – Pprema personaliziranoj medicini za bolesnike s refraktornim/relapsnim folikularnim limfomom: Cantera/Lupiae registar“.
- 2024. - 2026. glavni ispitivač u multicentričnom, randomiziranom, otvorenom ispitivanju faze 3 o kemoterapijsko-imunoterapijskom liječenju prethodno neliječenog folikularnog limfoma (EPCORE FL-2).

ODABRANA SUDJELOVANJA NA KONGRESIMA I RADIONICAMA

- 11/2017. *Central European Hematology Forum*, Warsaw, Poland. Aktivno sudjelovanje s prikazom slučaja: “Ibrutinib in SLL/CLL treatment” – međunarodna razina

- 03/2019. 8. kongres Hrvatskog društva za hematologiju, Split. Aktivno sudjelovanje s prikazom slučaja: “Ibrutinib u liječenju CLL / SLL” – nacionalna razina
- 11/2021. Virtualna panel diskusija: “Važnost MRD negativnosti u CLL”. Panelist – nacionalna razina
- 03/2022. Kongres „Emergencies in Internal Medicine“, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu. Aktivno sudjelovanje s predavanjem: “Trombocitopenije” – nacionalna razina
- 05/2022. Panel diskusija: “Izazovi u liječenju DLBCL u kliničkoj praksi”. Panelist – nacionalna razina
- 11/2022. *CLL Centre of Excellence Programme*, Leeds, UK. Aktivno sudjelovanje – međunarodna razina
- 02/2023. Panel diskusija: „Sva lica DLBCL-a“. Panelist – nacionalna razina
- 03/2023. 7. Roche Hematology Forum. Panel diskusija: “Treatment of DLBCL – yesterday, today and tomorrow” – panelist – nacionalna razina
- 10/2023. 13. Kongres Hrvatskog društva internista posvećen krvarenju i trombozama. Pozvano predavanje: “Trombocitopenije” – nacionalna razina
2024. 5th EHA-Balkan Hematology Day. Pozvano predavanje: “The relationship between experience and outcome in recently opened autologous transplantation center Split” – međunarodna razina
- 10/2024. 14. Kongres Hrvatskog društva internista posvećen neželjenim događajima i komplikacijama. Pozvano predavanje: “Febrilna neutropenija” – nacionalna razina
- 11/2024. Ekspertni sastanak: “Različite perspektive u liječenju CLL”. Pozvani govornik – nacionalna razina

OBJAVLJENI ZNANSTVENI I STRUČNI RADOVI

Galušić D, Petrić M, Vicelić Čutura L, Miljak A, Blaslov V. Primary prophylaxis of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders—clinical experience in University Hospital of Split. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019;19:S242–S243. doi:10.1016/j.clml.2019.07.141

Petrić M, Miljak A, Miličević T, Radman M. A rare case of hypocalcemia induced by Nilotinib. *Endocr Oncol Metab*. 2017;3:32–35. doi:10.21040/eom/2017.3.1.5

Galušić D, Lucijanić M, Livun A, Radman M, Blaslov V, Vicelić Čutura L, Petrić M, Miljak A, Lucijanić J, Drmić Hofman I, Kušec R. Higher AURKA and PLK1 expression are associated with inferior overall survival in patients with myelofibrosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2020;81:102396. doi:10.1016/j.bcmd.2019.102396

Miljak A. Trombocitopenija. U: Marasović Krstulović D, ur. *Hitna stanja u internističkoj praksi: odabrane teme – tečaj kontinuirane medicinske edukacije*. Zagreb: Medicinska Naklada; 2022. ISBN 978-953-368-036-1. [na hrvatskom]

Aurer I, Dreta B, Mitrović Z, Hude Dragičević I, Milunović V, Ivić M, Međugorac M, Miljak A, Dujmović D, Mišura Jakobac K, Rinčić G, Galušić D, Franjić N, Matijaca H, Mrđenović S. Preporuke za sustavno liječenje limfoma – Verzija 4. Dogovoreno na 4. Lymphoma Consensus Meeting, Zagreb, 25.–26.09.2022; usvojeno na KroHem sastanku, Osijek, 3.–5.11.2022. Dostupno na: <https://krohem.hr> [na hrvatskom]

Pavlović A, Miljak A, Brzica K, Glavina Durdov M. The abundance of FOXP3, FOXP3/CD4 and CD8 cells in the microenvironment of nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes is associated with the Epstein–Barr virus status of classic Hodgkin lymphoma. *Biomedicines*. 2024;12(8):1680. doi:10.3390/biomedicines12081680

Vicelić Čutura L, Vujčić M, Galušić D, Blaslov V, Petrić M, Miljak A, Lozić M, Benzon B, Vukojević K, Bubić T, Kunac N, Zjačić Puljiz D, Delić Jukić IK, Križanac M, Lozić B. SATB1 and p16 expression and prognostic value in Croatian Hodgkin lymphoma patients: a unicentric study. *Cells*. 2024;13(16):1323. doi:10.3390/cells13161323

Miljak A, Pavlović A, Benzon B, Vicelić Čutura L, Galušić D, Vujčić M, Blaslov V, Glavina Durdov M. High PD-L1 expression in HRS cells and macrophages in tumor immune

microenvironment is associated with adverse outcome and EBV positivity in classical Hodgkin lymphoma. *Int J Mol Sci.* 2025;26(12):5592. doi:10.3390/ijms26125592

Galušić D, Vicelić Čutura L, Miljak A, Kunac N, Blaslov V, Petrić M i sur. Aggressive Primary Adrenal Lymphoma Presenting as Poorly Differentiated Carcinoma: A Case Report. *Acta clinica Croatica* [Internet]. 2025 [pristupljeno 02.02.2026.];64.(3):650-653. <https://doi.org/10.20471/acc.2025.64.03.25>

Mandac Smoljanovic I, Aurer I, Bulj N, Dreta B, Miljak A, Petričević F, Ivić M, Basić-Kinda S, Zatezalo V, Madunić S, Carzavec D, Sinčić-Petričević J, Grohovac D, Jakšić O, Krečak I, Morić-Perić M, Cocha B, Bernes P, Živković N, Pejso V. Efficacy, toxicity and effect of pretreatment cardiologic consultation on outcomes of Ibrutinib therapy for chronic lymphocytic leukemia—A KroHem study. *Cancers.* 2025;17(14):2302.