

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

LUČANA VICELIĆ ČUTURA

**IMUNOHISTOKEMIJSKI IZRAŽAJ SATB1 I p16 I NJIHOVA PROGNOŠTIČKA
VRIJEDNOST U BOLESNIKA S HODGKINOVIM LIMFOM: UNICENTRIČNA
STUDIJA**

Doktorski rad

Split, 2025.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

LUČANA VICELIĆ ČUTURA

**IMUNOHISTOKEMIJSKI IZRAŽAJ SATB1 I p16 I NJIHOVA PROGNOСТИČKA
VRIJEDNOST U BOLESNIKA S HODGKINOVIM LIMFOM: UNICENTRIČNA
STUDIJA**

Doktorski rad

Split, 2025.

Rad je izrađen na Zavodu za hematologiju i na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split

Voditeljica rada, mentorica:
Izv. prof. dr. sc. Bernarda Lozić, dr. med.

ZAHVALE

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Bernardi Lozić, na motivaciji, strpljenju, podršci i prenesenom znanju tijekom svih ovih godina. Vaša pomoć omogućila mi je stvaranje čvrstih temelja za buduće znanstvene korake.

Hvala dragim kolegama doc. dr. sc. Benjaminu Benzonu i dr. Toniju Bubiću te dragim dr.sc. mag. pharm. Mireli Leskur i dr. sc. mag. mol. biol. Marineli Križanac na nesebičnoj pomoći, korisnim savjetima i sugestijama.

Neizmjernu zahvalnost dugujem mojim roditeljima, Marinki i Baldi, te sestri Antoniji na bezuvjetnoj ljubavi i neiscrпноj podršci tijekom svih godina mog školovanja.

Na kraju, posebnu zahvalnost upućujem svom suprugu Marinu- mom najvjernijem suputniku i nepokolebljivom osloncu. Hvala ti na beskrajnom strpljenju, razumijevanju i ljubavi. Tvoja vjera u mene bila je svjetlo i snaga u trenucima kada mi je to najviše trebalo.

Ovu disertaciju posvećujem svojim sinovima Ivanu i Toniju, mojim životnim doktoratima! Vi ste moja najveća životna radost, blagoslov i razlog zbog kojeg vjerujem, stvaram i ne odustajem.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Epidemiologija Hodgkinovog limfoma	2
1.2. Rizični čimbenici za razvoj Hodgkinovog limfoma	2
1.3. Klasifikacija Hodgkinovog limfoma	3
1.4. Patogeneza Hodgkinovog limfoma	7
1.5. Klinička slika i dijagnostika Hodgkinovom limfomu	8
1.6. Prognoza Hodgkinovog limfoma	10
1.7. Liječenje Hodgkinovog limfoma	12
1.7.1. Liječenje ranog povoljnog stadija klasičnog Hodgkinovog limfoma	13
1.7.2. Liječenje ranog nepovoljnog stadija klasičnog Hodgkinovog limfoma	14
1.7.3. Liječenje uznapredovalog stadija klasičnog Hodgkinovog limfoma	15
1.7.4. Liječenje relapsnog/refraktornog klasičnog Hodgkinovog limfoma	16
1.7.5. Liječenje starijih bolesnika s klasičnim Hodgkinovim limfom	18
1.7.6. Liječenje nodularne limfocitne predominacije Hodgkinovog limfoma	19
1.8. Komplikacije liječenja Hodgkinovog limfoma	20
1.8.1. Rane komplikacije liječenja	20
1.8.2. Kasne komplikacije liječenja Hodgkinovog limfoma	22
1.9. SATB1 i Hodgkinov limfom	26
1.10. p16 i Hodgkinov limfom	27
1.11. Omjer trombocita/limfocita i Hodgkinov limfom	28
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	30
2.1. Ciljevi istraživanja	31
2.2. Hipoteze	32
3. METODE I MATERIJALI ISTRAŽIVANJA	33
3.1. Ustroj istraživanja	34
3.2. Ispitanici	34
3.3. Imunohistokemijsko bojenje	35
3.4. Dijagram tijeka	39
3.5. Transkriptomska analiza	40
3.6. Statistička analiza podataka	40
4. REZULTATI	41
4.1. Kliničko-patološke karakteristike bolesnika	42
4.2. Imunohistokemijski izražaj proteina SATB1 povezan je s povoljnijom prognozom	44
4.3. Imunohistokemijski izražaj p16 nije značajan indikator dugoročne prognoze	47
4.4. Bolesnici SATB1+/p16- imaju najpovoljniju prognozu	49
4.5. Analiza javno dostupnih transkriptomskih baza podataka humanih tumora	52

4.6. Kliničko-patološke karakteristike bolesnika prema razinama omjera trombocita/limfocita (<i>platelet-lymphocyte ratio</i>, PLR).....	53
5. RASPRAVA.....	59
6. ZAKLJUČCI	66
7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU	68
8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU.....	70
9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU	72
10. LAY SUMMARY	74
11. LITERATURA	76
12. ŽIVOTOPIS.....	91

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABVD – doksorubicin, bleomicin, vinblastine, dakarbazin

AIC – Akaikieov informacijski kriterij

AL – akutna leukemija

AVD – doksorubicin, vinblastine, dakarbazin

BACOPP – bleomicin, doksorubicin, ciklofosamid, vinkristin, prokarbazin, prednizolon

Bcl-6 – protein 6 B staničnog limfoma

BCNU – visoke doze ciklofosfamida, karmustin

BEACOPP – bleomicin, etopozid, doksorubicin, ciklofosamid, vinkristin, prokarbazin, prednizolon

BEAM – karmustin, etopozid, citarabin, melfalan

BOB.1 – engl. *B-lymphocyte-specific co-activator 1*

BrECADD – BV, etopozid, ciklofosamid, doksorubicin, dakarbazin, deksametazon

BR – brentuksimab, rituksimab

BV – brentuximab vedotin

BV+DTIC – brentuximab vedotin, dakarbazin

BV-AVD – brentuximab vedotin, doksorubicin, vinblastine, dakarbazin

CAR-T – kimerični antigenski receptor na T stanicama

CBV – ciklofosamid, karmustin, etopozid

CD30+LPD – CD30+ limfoproliferativni poremećaji (engl. *CD30-positive lymphoproliferative disorders*)

CD45 – zajednički leukocitni antigen

CDK – ciklin-ovisna kinaza (engl. *cyclin-dependent kinase*)

CDKN1A – engl. *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*

CHOP – ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon

CMT – kombinirana modalitetna terapija (engl. *Combined modality treatment*)

COPP/ABVD – ciklofosamid, prokarbazin, vinkristin, prednizon/ABVD

CT – kompjuterizirana tomografija (engl. *computed tomography*)

CTCL – kožni T-stanični limfom (engl. *cutaneous T-cell lymphoma*)

DHAP – cisplatina, citarabin, deksametazon

DLBCL – difuzni B velikostanični limfom

DLI – infuzije darivateljevih limfocita (engl. *donor lymphocyte infusion*)

EBV – Epstein-Barrov virus

ECOG – engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*

EMA – engl. *European Medicines Agency*

EORTC – engl. *European Organisation for the Research and Treatment of Cancer*

FasL – Fas ligand

FDG – fluorodeoksiglukoza

FFP – period do progresije progresije boesti (engl. *freedom from progression*)

FN – febrilna neutropenija

G-CD – gemcitabine, karboplatina, deksametazon

G-CSF – čimbenik stimulacije kolonije granulocita (engl. *Granulocyte colony-stimulating factors*)

GEMOX – gemcitabine, oksaliplatina

GEO – engl. *Gene Expression Omnibus*

GHSG – engl. *German Hodgkin's Study Group*

GVD – gemcitabine, vinorelbin, liposomalni doksorubicin

GVHD – kronične bolesti presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-host disease*)

HDCT/ASCT – engl. *high- dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation*

HIV – virus humane imunodeficijencije

HLA – ljudski antigen leukocita

HL – Hodgkinov limfom

HRS – Hodgkin/Reed-Sternbergove stanice

ICE – karboplatina, etopizid, ifosfamid

IFRT – engl. *Involved-Field Radiotherapy*

IGEV – ifosfamid, gemcitabine, vinorelbin, prednizolon

IM – infektivna mononukleoza

INF – 2 α - interferon 2 α

IPS – engl. *International Prognostic Score*

IQR – interkvartilni raspon

IRS – imunoreaktivni skor

ISRT – engl. *Involved-site radiation therapy*

KBC – Klinički bolnički centar

kHL – klasični Hodgkinov limfom

KR – kompletna remisija

KTx – konvencionalna kemoterapija

LDHL – limfocitna deplecija Hodgkinovog limfoma

LMP1 – latentni membranski protein

LP stanice – limfocitno – predominatne stanice

LRHL – limfocitima bogat Hodgkinov limfom

LYRIC – engl. *Lymphoma Response to Immunomodulatory Therapy Criteria*

Lyp – limfomatoidna papuloza

MAPK/ERK – engl. *mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase*

MC – miješana celularnost

MF – engl. *mycosis fungoides*

MMR – omjer maksimalnog promjera mediastinalne mase i maksimalnog intratorakalnog promjera (engl. *mediastinal mass ratio*)

MOPP – meklooretamin, vinkristin, prokarbazin, prednizon

MRI – engl. *Magnetic resonance imaging*

MTR – omjer maksimalnog promjera mediastinalne mase i intratorakalnog promjera na razini T5/T6 (engl. *mediastinal thoracic ratio*)

N-AVD – nivolumab, doksorubicin, vinblastine, dakarbazin

NCCN – engl. *National Comprehensive Cancer Network*

NFkB – jezgrin faktor kapa B

NK-1 antagonisti – neurokininski antagonisti

NK– stanica – prirodne stanice ubojice (engl. *Natural killer stanica*)

NLPHL – nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma

NOTCH1 – engl. *Notch homolog 1*

NS – nodularna skleroza

OCT2 – engl. *Octamer transcription factor 2*

OS – ukupno preživljenje (engl. *Overall survival*)

PAX5 – engl. *Paired box protein 5*

PB – progresija bolesti

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

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

PET2 – PET nakon 2 ciklusa kemoterapije

PET/CT – pozitronska emisijska tomografija / kompjuterizirana tomografija

PFS – preživljenje bez progresije (engl. *Progression-free survival*)

PLR – omjer trombocita/limfocita (engl. *platelet/lymphocyte ration*)

PP – postotak pozitivnih stanica

pPR – retinoblastonski protein

PR – parcijalna remisija

PVAG – prednizolon, vinblastine, doksorubicin, gemcitabine

RANK – engl. *Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B*

RMA – engl. *Reduced Major Axis*

RS – Reed – Sternbergove stanice

R/R HL – relapsni/refraktorni HL

SATB1 – engl. *special AT-rich sequence-binding protein-1*

SE – sedimentacija eritrocita

SEER – engl. *Surveillance, Epidemiology, and End Results*

SI – intenziteta bojenja

SOS/VOD – sinusoidalni opstruktivni sindrom / venookluzivna bolest (engl. *Hepatic sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive diseases*)

SS – engl. *Sezary sindrom*

SsGSEA – engl. *“single-sample Gene Set Enrichment Analysis*

STAT3, STAT5, STAT6 – engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3,5,6*

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

UZV – ultrazvuk

VEPEMB – vinblastine, ciklofosamid, prednizolon, prokarbazin, etopozid, mitoksantron, bleomicin

1. UVOD

1.1. Epidemiologija Hodgkinovog limfoma

Hodgkinov limfom (HL; ranije poznat kao Hodgkinova bolest) prvi put je Thomas Hodgkin opisao 1932. godine u svom povijesnom radu pod nazivom *On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen*. HL je klonalna limfoproliferativna bolest koja je morfološki karakterizirana postojanjem mješavine velikih displastičnih malignih stanica unutar reaktivnog mikrookoliša (1,2). HL čini približno 10 % svih slučajeva limfoma u Sjedinjenim Američkim Državama (3,4). HL je 2020. godine činio 0,4 % svih novodijagnosticiranih slučajeva raka i 0,2 % svih smrtnih slučajeva povezanih s rakom (4–6). Ukupno je bilo prijavljeno 83 087 novodijagnosticiranih slučajeva HL-a 2020. godine s globalno dobno standardiziranom stopom incidencije 0,98 na 100 000 stanovnika. Međutim, zamijećena je varijacija u incidenciji s obzirom na geografsko područje. Najveća stopa incidencije je bila u Južnoj i Sjevernoj Europi, potom Australiji, Novom Zelandu i Zapadnoj Europi dok je najmanja u Istočnoj Aziji i Africi. Niža stopa incidencija u slabije razvijenim zemljama može se objasniti nedostatkom dijagnostičkih resursa dok veća stopa incidencija u razvijenim zemljama može biti povezana s okolišnim čimbenicima i metaboličkim bolestima budući da je u predhodnim studijima dokazano da je bolji životni standard u ranom djetinjstvu povezan s rizikom za pojavu HL-a. Suprotno incidenciji, veća stopa mortaliteta nađena je u slabije razvijenim zemljama Zapadne Azije, Sjeverne i Zapadne Afrike (5). HL se najčešće javlja u mlađe odrasle populacije (od 15 - 35 godina) te kod starije populacije (iznad 55 godina). Prosječna dob dijagnoze je 39 godina (7,8). 5 - godišnje preživljenje bolesnika s HL-om je 87 % (8). Unatoč činjenici da je HL bolest dobre prognoze, 10 - 20 % bolesnika će doživjeti relaps, a 5 - 10 % bolesnika će imati primarno refraktornu bolest (9). Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo 2020. godine u Hrvatskoj zabilježeno je 108 novih slučajeva HL-a s incidencijom 2,7 na 100 000 stanovnika (10).

1.2. Rizični čimbenici za razvoj Hodgkinovog limfoma

Do sada nije jasno definirana etiologija HL-a, ali postoji niz rizičnih čimbenika koji su povezani s razvojem ove maligne bolesti (8). Tako je za razvoj HL-a opisana obiteljska predispozicija, budući da je primjećeno povećanje stope rizika tri do pet puta kod bliskih srodnika bolesnika s HL-om (11). Epstein-Barrov virus (EBV) je također definiran kao rizični čimbenik za HL budući da njegova pojavnost u Hodgkin/Reed-Sternbergovim stanicama (HRS) varira ovisno o histološkom podtipu HL-a, geografskim, etničkim i rasnim čimbenicima. Pojavnost EBV-a u klasičnom HL-u (kHL) u razvijenim zemljama je u 30 - 50 % slučajeva bolesti i to češće u histološkom podtipu miješane celularnosti (MC), dok je u ekonomski

nerazvijenim zemljama prisutnost EBV-a gotovo 100 % (12–14). Povezanost HL-a i infektivne mononukleoze (IM) pokazana je u skandinavskoj studiji u kojoj je zaključeno da se HL obično javlja 2,9 godina nakon preboljele IM-e (14,15), ali ipak samo mali postotak oboljelih zaista razvije limfom. Tako je procijenjeni apsolutni rizik od razvoja HL-a nakon preboljele IM-e otprilike 1 na 1000, što znači da osim samog EBV-a u razvoju ovog limfoma imaju važnu ulogu i drugi biološki i epidemiološki čimbenici (16).

Povećan rizik za razvoj HL-a je pokazan i u bolesnika s imunodeficijencijom kao što su bolesnici sa stečenim imunodeficijencijskim sindrom kao i u bolesnika s kroničnom imunodeficijencijom uslijed transplantacije solidnih organa, transplantacije matičnih hematopoetskih stanica i imunosupresivne terapije (8,17,18). Bolesnici pozitivni na virus humane imunodeficijencije (HIV) imaju 17 puta veći rizik za razvoj HL-a (19). Također je nađena povezanost okolišnih čimbenika pušenja i debljine s povećanom rizikom za razvoj HL-a (20,21).

1.3. Klasifikacija Hodgkinovog limfoma

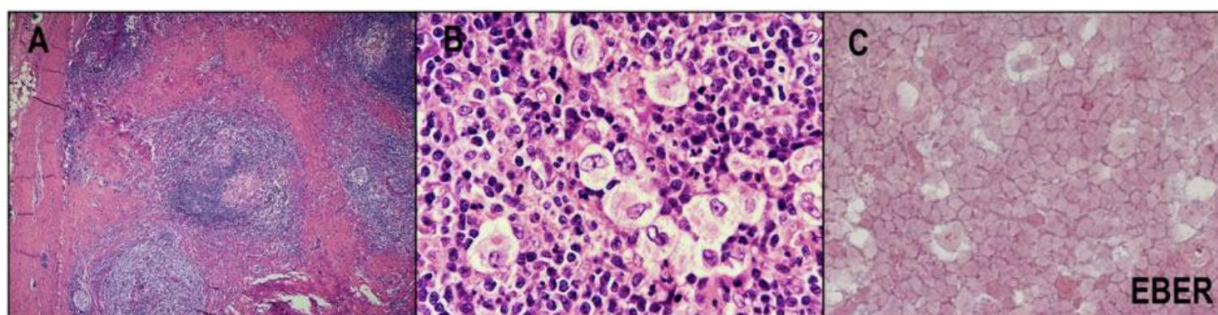
Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) dijeli HL na dvije osnovne kategorije koje prepoznaje kao zasebne bolesti na temelju morfoloških i imunohistokemijskih obilježja, iako su obje obilježene oskudnim brojem neoplastičnih stanica s bogatim reaktivnim mikrookolišem sastavljenih od uglavnom ne-malignih stanica, prvenstveno T stanica. Dijeli se na kHL i nodularnu limfocitnu predominaciju HL-a (NLPHL) (2,22). kHL čini oko 90 % svih slučajeva HL-a (23,24). Iako se prema SZO zadržao termin *nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma* (8), Međunarodna konsenzusna klasifikacija s obzirom na biološke i kliničke razlike naspram kHL-a, zamijenila je s terminom *nodularni limfocitno- predominantni B-stanični limfom* (25). Maligne stanice u HL-u čine svega 1 - 5 % tumorske mase (26).

kHL obuhvaća 4 histološka podtipa: nodularnu sklerozu (NS), miješanu celularnost (MC), HL bogat limfocitima (LRHL) te HL s limfocitnom deplecijom (LDHL). Bolest je karakterizirana prisutnošću mononuklearnih Hodgkinovih stanica i velikih, multinuklearnih Reed – Sternbergovih (RS) stanica, koje se zajednički nazivaju HRS, a nalaze se pomiješane s upalnim mikrookolišem koji uključuje male limfocite, histiocite, plazma stanice i eozinofile (8,27).

HRS stanice u kHL-u izražavaju CD30 u 100 % slučajeva, dok je CD15 izražen u većini (75 - 85 %) stanica, a njegov nedostatak može biti povezan s lošijom prognozom (2). Izražaj B staničnih antigena uglavnom je odsutan ili pokazuje vrlo slab izražaj (CD19, CD20, CD79) (2,28,29). HRS ne izražavaju CD45 (zajednički leukocitni antigen). PAX5 (B specifični

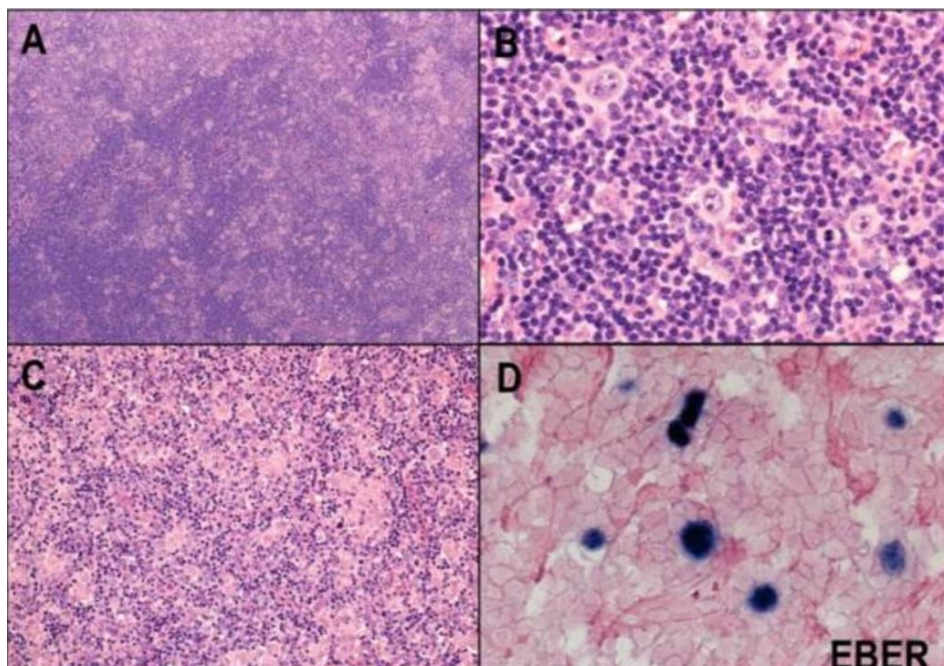
stanični transkripcijski čimbenik, engl. *Paired box protein 5*) je uglavnom izražen, ali slabije u HRS nego u reaktivnim B stanicama, a može poslužiti u razlikovanju kHL-a od ostalih T staničnih limfoma (2,30). T stanični antigeni (CD3, CD7) uglavnom nisu izraženi, dok HRS izražavaju PD - L1 (engl. *Programed Death Ligand 1*) u 73 - 96 % slučajeva i on ima ključnu ulogu u izbjegavanju imunološkog odgovora u tumorigenezi, a njegov izražaj varira ovisno o histološkom podtipu HL-a (2,31). U 20 % slučajeva je izražen BCL6 (protein 6 B staničnog limfoma) (2).

NS čini 70 % svih slučajeva kHL-a i ima bolju prognozu nego ostali podtipovi (8) te je češća u razvijenim zemljama (24). Najviše pogađa mlađu populaciju bolesnika između 15 - 35 godina (24), a incidencija je jednaka u oba spola za razliku od ostalih podtipova kHL-a koji su češći kod muškaraca (32). EBV je pozitivan u 10 - 25 % bolesnika s NS-om (33). Bolesnici s NS-om se najčešće prezentiraju medijastinalnom masom, a u polovici se javlja “*bulky*” tumorska masa (24). NS je karakterizirana kolagenim tračcima koje okružuju najmanje jedan čvor i prisutnošću tzv. “lakularnog” tipa RS stanica koje se nalaze unutar reaktivnog infiltrata eozinofila, limfocita i neutrofila (12) (**Slika 1 A - C**) .



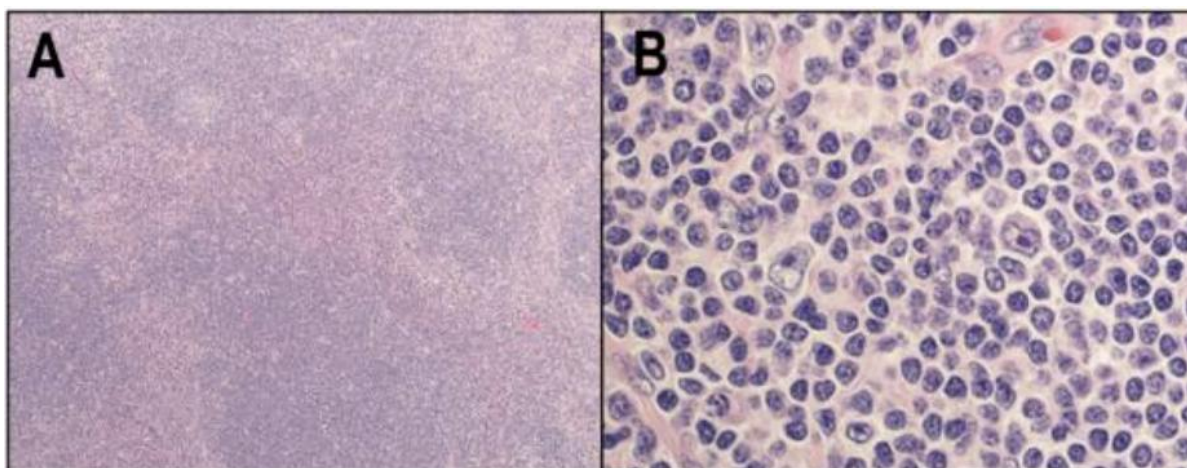
Slika 1. Histološki podtip klasičnog Hodgkinovog limfoma: nodularna skleroza (NS). **(A)** NS obilježena kolagenim tračcima koje okružuju najmanje jedan čvor (HE × 40). **(B)** Hodgkin / Reed-Sternbergove stanice (HRS) u NS imaju obilnu bistru citoplazmu i nazivaju se lakunarnim stanicama (HE × 400). **(C)** Stopa EBV-pozitivnosti kod NS je najniža među klasičnim HL. Prikazani slučaj je EBV-negativan (×400). (Preuzeto u izvornom obliku iz Satou A, Takahara T, Nakamura S. An update on the pathology and molecular features of Hodgkin lymphoma. *Cancers* (Basel). 2022;14:2647. Licenca CC BY 4.0).

MC se javlja u 20 - 25 % slučajeva kHL-a i to češće u starijih i imunokompromitiranih bolesnika, a u 75 % slučajeva je pozitivan EBV (24). MC je karakterizirana prisutnošću klasičnih RS stanica koje se nalaze u sklopu miješovitog upalnog infiltrata bez prisutne fibroze (12) (**Slika 2 A - D**).



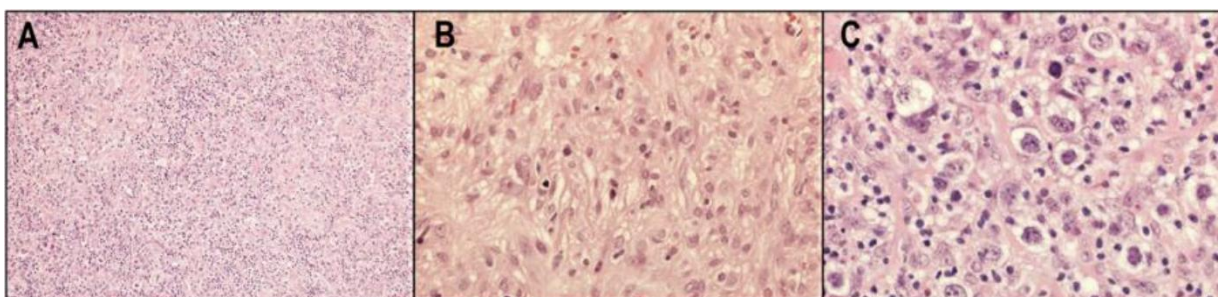
Slika 2. Histološki podtip klasičnog Hodgkinovog limfoma: miješana celularnost (MC) **(A)** MC nema zadebljalu kapsulu limfnog čvora ni široke tračke fibroze (HE $\times$ 40). **(B)** Hodgkin-Reedstenbergove stanice (HRS) u MC-i imaju klasičan izgled (HE $\times$ 400). **(C)** Stanice u pozadini mogu sadržavati obilne epiteloidne histiocite, a mogu se uočiti i epiteloidni granulomi (HE $\times$ 100) **(D)** MC je visoko povezan s EBV-om ($\times$ 400). (Preuzeto u izvornom obliku iz Satou A, Takahara T, Nakamura S. An update on the pathology and molecular features of Hodgkin lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14:2647. Licenca CC BY 4.0).

LRHL čini 5 % kHL-a, češće u mlađih bolesnika, prezentirajući se često s ranim stadijem bolesti, a u 30 - 50 % slučajeva je pozitivan EBV Ovaj tip karakteriziran je RS stanicama i nodularnim staničnim infiltratom u kojem dominiraju mali limfociti, dok su neutrofili i eozinofili malobrojni (24,34) (**Slika 3 A, B**).



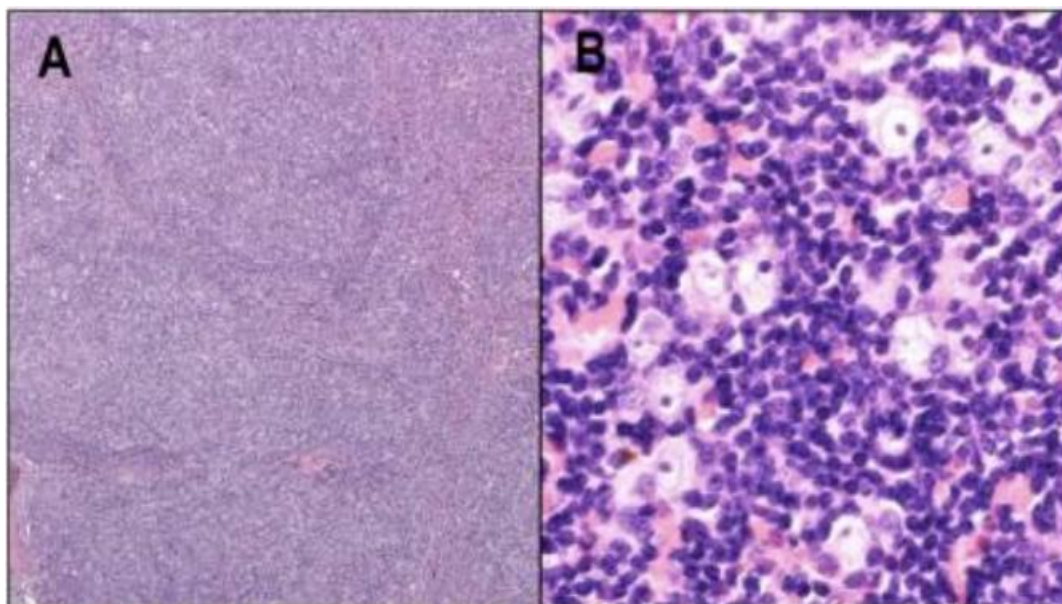
Slika 3. Histološki podtip klasičnog Hodgkinovog limfoma: limfocitima bogat Hodgkinov limfom (LRCHL) **(A)** LRCHL obično pokazuje nodularni stanični infiltrat koji može sadržavati germinalne centre (HE $\times$ 40). **(B)** LRHL obilježavaju HRS stanica i mali limfociti, bez polimorfne stanične kompozicije (HE $\times$ 400). (Preuzeto i prilagođeno iz Satou A, Takahara T, Nakamura S. An update on the pathology and molecular features of Hodgkin lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14:2647. Licenca CC BY 4.0).

LDHL čini manje od 2 % kHL-a, a češće se javlja kod imukompromitiranih bolesnika s HIV-om (24,35). Većina bolesnika s LDHL-om će se prezentirati u uznapredovalom stadiju i s B simptomima (24,36), a u 75 % će biti pozitivan EBV i imat će lošiju prognozu za razliku od ostalih podtipova. Najčešće se vide RS uz prisutnu fibrozu i upalne stanice (37) (**Slika 4 A - C**).



Slika 4. Histološki podtip klasičnog Hodgkinovog limfoma: Hodgkinov limfom s limfocitnom deplecijom (LDHL). **(A)** LDHL-ovi imaju relativno obilan broj neoplastičnih stanica i smanjen broj pozadinskih stanica (HE $\times$ 40). **(B)** LDCHL s difuznom fibrozom (HE $\times$ 400). **(C)** LDCHL s obiljem neoplastičnih stanica koje pokazuju pleomorfan izgled (HE $\times$ 400). (Preuzeto u izvornom obliku iz Satou A, Takahara T, Nakamura S. An update on the pathology and molecular features of Hodgkin lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14:2647. Licenca CC BY 4.0).

Za razliku od kHL-a, u NLPHL-u se nalaze maligne limfocitno-predominatne (LP) stanice koji izgledom podsjećaju na kokice (engl. *popcorn*) (Slika 5 A, B) koje imunofenotipski izražavaju B stanične antigene (CD20, CD79a, PAX5, OCT2, BOB.1), ali ne izražavaju CD30 ili CD15. LP stanice su tipično pozitivne na BCL6, a izražaj PD-L1 značajno varira kroz različite studije (2). NLPHL se javlja u 4. i 5. desetljeću života i češće u muškaraca. Iako se najčešće prezentira u ranom stadiju bolesti bez B simptoma, ipak će 20 - 30 % bolesnika doživjeti recidiv bolesti (2,24).



Slika 5. Nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma (NLPHL). (A) Većina slučajeva NLPHL-a pokazuje nodularni stanični infiltrat (HE × 40).

(B) NLPHL s obiljem malih reaktivnih B limfocita, epitelioidnih histiocita i među njima razasutih neoplastičnih stanica nazvanih limfocitima-predominantne (LP) stanice (HE × 400). (Preuzeto i prilagođeno iz Satou A, Takahara T, Nakamura S. An update on the pathology and molecular features of Hodgkin lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14:2647. Licenca CC BY 4.0).

1.4. Patogeneza Hodgkinovog limfoma

Zloćudna preobrazba HRS-a odvija se u zametnom središtu limfnih čvorića građenih od nakupina limfocita B. Tijekom transformacije, HRS gube fenotipske karakteristike limfocita B. Patogeneza HL-a uključuje genetsku nestabilnost, konstitutivnu aktivaciju antiapoptoskih signalnih puteva, interakciju HRS-a s tumorskim mikrookolišem te mehanizme izbjegavanja imunološkog nadzora. kHL karakteriziraju kromosomske abnormalnosti tj. prisutne su različite numeričke i strukturne kromosomske aberacije u HRS-ama (24). Tri su signalna puta uključena u proliferaciju i preživljenje HRS-a: NF- κ B, JAK-STAT i MAPK/ERK (38). U HRS-ama

transkripcijski put NF- κ B je konstitutivno aktiviran i ima središnju ulogu u rastu i preživljavanju tumorskih stanica. Važnu ulogu u tome imaju komponente NF- κ B kanonskog i nekanonskog signalnog puta (REL, p52). Postoje dva mehanizma koji posreduju aktivaciju signalnog puta NF- κ B. Prvi mehanizam obuhvaća amplifikaciju gena *NIK*, *REL* i *BCL3* koji kodiraju pozitivne regulatore NF- κ B signalnog puta. Drugi mehanizam su delecije i točkaste mutacije u genima *TNFAIP3*, *NFKBIE*, *NFKBIA*, *TRAF3* i *CYLD* koji kodiraju negativne regulatore NF- κ B (38). Pojačavanje ovog signalnog puta može biti potaknuto visokom razinom izražaja CD30, CD40, CD95 i RANK te njihovim interakcijama s pripadajućim ligandima kojim će se aktivirati nizvodni signalni put. Drugi signalni put također bitan u proliferaciji i preživljavanju HRS-a je JAK/STAT. Pokazano je da je genetski poremećen u 87 % slučajeva. U 1/3 bolesnika pronađene su ponavljajuće mutacije gena *STAT6* dok su mutacije u *STAT3* i *STAT5* rjeđe prisutne. Doprinos konstitutivnoj aktivaciji JAK/STAT signalnog puta pridonose mutacije u genima *SOCS1* i *PTPNI*, koji su inače negativni regulatori ovog signalnog puta (38). Za preživljenje i proliferaciju HRS-a važan je i signalni put, NOTCH, koji inače regulira normalni razvoj limfocita T. Interakcija HRS-a sa stanicama mikrookoliša posredovana je brojnim citokinima i čimbenicima rasta što dovodi do poremećaja imunskog odgovora. Dominantni mehanizam koji pridonosi izbjegavanju imunološkog nadzora u kHL-u, omogućavajući HRS-ama bijeg od napada citotoksičnih T-stanica i NK-stanica, je PD - 1/PD - L1 put. Patogeneza kHL-a je povezana s onkogenim djelovanjem EBV-a i izražajem proteina od kojih je najbitniji LMP1 (latentni membranski protein). LMP1 dovodi do konstitutivne aktivacije NF- κ B inhibirajući apoptozu te na taj način se omogućava preživljenje i proliferaciju tumorskih stanica (24,38). U 50 % slučajeva NLPHL ima konstitutivnu aktivaciju JAK/STAT signalnog puta koja je uzrokovana mutacijama u genu *SOCS1*. Također, aktiviran je i NF- κ B put, ali mehanizam je drugačiji od kHL-a budući da LP stanice nisu pozitivne na EBV te rijetko nose mutacije u genima *TNFAIP3* i *NFKBIA*. Za razliku od kHL-a, u NLPHL-u često se javljaju *BCL6* translokacije i ponavljajuće delecije u regiji 9p11. NLPHL obilježavaju i ponavljajuće mutacije u genima *SGK1*, *DUSP22* i *JUNB* (38).

1.5. Klinička slika i dijagnostika Hodgkinovom limfomu

kHL većinom ima tipičnu kliničku prezentaciju koja se očituje bezbolnom limfadenopatijom. Najčešće su zahvaćeni supradijafragmalni limfni čvorovi (60 - 70 % cervikalni i supraklavikularni, 15 - 20 % aksilarni limfni čvorovi), dok se u svega 15 - 20 % javlja subdijafragmalna limfadenopatija (12). Iako se ne može otkriti fizikalnim pregledom, medijastinalna limfadenopatija se javlja u više od 50 % bolesnika, a može se klinički

prezentirati kašljem, bolovima u prsima, hemoptizom i dispnejom (12,39). U 30 % bolesnika s kHL javljaju se konstitucijski “B” simptomi koji uključuju temperaturu iznad 38°C, profuzno noćno znojenje i gubitak tjelesne težine više od 10 % tijekom zadnjih 6 mjeseci prije dijagnoze. Vrlo rijetka, ali specifična klinička prezetacija za kHL je bolnost limfnih čvorova neposredno nakon konzumacije alkohola koja se javlja u manje od 10 % slučajeva, a etiologija do sada nije skroz razjašnjena. U pojedinih bolesnika javlja se generalizirani svrbež kože koji nema prognostičku značajnost. Rijetko se javljaju neurološki simptomi zbog kompresije leđne moždine, sindrom gornje šuplje vene ili hepatosplenomegalija, koji su u većini slučajeva povezani s uznapredovalim stadijem bolesti (12,39). Opisivan je i nefrotski sindrom (bolest minimalnih promjena) kao paraneoplastična manifestacija u bolesnika s kHL-om (40). NLPHL se u većini slučajeva prezentira izoliranom perifernom limfadenopatijom bez konstitucijskih simptoma. U većini se slučajeva dijagnosticira u ranom stadiju (I/II) i dobre je prognoze, dok u uznapredovalom stadiju imaju agresivniji klinički tijek (41). U laboratorijskim nalazima može se uočiti anemija koja je najčešće tipa kronične bolesti, a rijede Coombs pozitivna hemolitička anemija. Osim anemije, može se biti prisutna i eozinofilija, granulocitoza, trombocitoza, limfocitopenija. Trombocitopenija može biti posljedica aktivacije imunološkog mehanizma, hipersplenizma ili zahvaćanja koštane srži. Povišena sedimentacija eритроцита (SE) se najčešće nalazi u uznapredovalom stadiju bolesti, a povezana je s B simptomima. Rijetko se javlja hiperkalcemija koja može biti posljedica povećane produkcije kalcitriola, a rijede posljedica zahvaćanja koštane srži (12). Kod sumnje na HL, bolesnici prolaze kliničku, radiološku i patohistološku dijagnostiku. Provodi se ekstripacija cijelog limfog čvora jer je sama citološka punkcija nedostatna za dijagnozu bolesti (42). Pozitronska emisijska tomografija (PET), koja koristi analog glukoze – fluorodeoksiglukozu (FDG) obilježenu radioaktivnim fluorom (F - 18), u kombinaciji s kompjutoriziranom tomografijom (engl. *computed tomography*, CT) je standard za određivanje proširenosti/stadija bolesti kao i za procjenu odgovora na terapiju u bolesnika s HL-om. FDG - PET prikazuje fiziološke procese na temelju detekcije radioaktivne emisije. FDG kao analog glukoze je radiofarmak koji se injicira intravenski, a pojačano se nakuplja u malignim stanicama zbog povećanog iskorištavanja glukoze u tim stanicama. Pojačana glikoliza se može naći i u drugim stanjima poput infekcija gdje se također pojačano nakuplja radiofarmak, ali u manjoj mjeri nego u malignim stanicama (43). U 5 – 8 % bolesnika s HL-om je zahvaćena koštana srž, a u ranom stadiju bolesti stopa zahvaćenosti koštane srži manja od 1 %. Zahvaćenost koštane srži češća je i kod starije populacije te kod bolesnika s imunodeficijencijom i prisutnim konstitucijskim simptomima. PET - CT je osjetljivija metoda za utvrđivanje fokalnog nakupljanja glukoze u malignim stanicama unutar koštane srži, stoga

nije potrebno raditi biopsiju koštane srži (12,42–44). Za utvrđivanje stadija bolesti danas se koristi modificirana Ann Arbor klasifikacija (**Tablica 1**), a za planiranje liječenja uzimaju se u obzir i klinički rizični čimbenici (42,44).

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
1 Splenični, hilarni, celijačni ili portalni čvorovi
2 Paraaortalni, ilijačni ili mezenterični čvorovi
IV – Difuzno ili diseminirano zahvaćanje jednog ili više ekstralimfatičkih organa sa ili bez zahvaćanja limfnih čvorova
Sufiks
A – bez B simptoma
B – Prisutni konstitucijski simptomi (temperature, noćno znojenje, gubitak tjelesne težine više od 10 % , zadnjih 6 mjeseci)
“Bulky” (masivna) bolest – (medijastinalna masa zauzima $\geq 1/3$ promjera prsnog koša na CT ^a -u ili bilo koja nodalna masa > 10 cm u dijimetru)
E – Zahvaćanje ekstralimfatičnog organa izravnim širenjem iz zahvaćenog limfnog čvora

^a Kompjutorizirana tomografija od engl. *computed tomography*

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.

1.6. Prognoza Hodgkinovog limfoma

Razlikujemo rani i uznapredovali stadij bolesti. Rani stadij bolesti se dijeli na povoljni i nepovoljni s obzirom na prisutnost, odnosno odsutnost jednog ili više rizičnih čimbenika (dob bolesnika, prisutnost “bulky” tumorske mase, prisutnost B simptoma, SE i broj zahvaćenih nodalnih regija). Brojne istraživačke skupine koriste različite kombinacije ovih čimbenika rizika. Ipak, najčešće korišteni prognostički zbrojevi su EORTC (engl. *European Organisation for the Research and Treatment of Cancer*), GHSG (engl. *German Hodgkin’s Study Group*) i NCCN (engl. *National Comprehensive Cancer Network*) za rani stadij bolesti. U EORTC rizične čimbenike spada: dob ≥ 50 godina, zahvaćene > 3 limfne regije, SE ≥ 50 bez B simptoma ili ≥ 30 s B simptomima, MTR (engl. *mediastinal thoracic ratio*, omjer maksimalnog promjera medijastinalne mase i intratorakalnog promjera na razini T5/T6) > 0.35 (44) (**Tablica 2**). U GHSG rizične čimbenike spadaju: ekстранodalna bolest, > 2 limfne regije, SE ≥ 50 bez B simptoma ili ≥ 30 s B simptomima, MMR (engl. *mediastinal mass ratio*, omjer maksimalnog

promjera medijastinalne mase i maksimalnog intratorakalnog promjera) > 0.33 (45,46) (Tablica 2). U NCCN rizične čimbenike spadaju: $SE \geq 50$ ili prisutan B symptom, $MMR > 0.33$, zahvaćene ≥ 3 limfne regije, *bulky* tumorska masa > 10 cm, prisutna ektranodalna lokalizacija (47) (Tablica 2).

Tablica 2. Definicije rizičnih čimbenika kod Hodgkinovog limfoma. U bolesnika u kliničkom stadiju I–II smatra se nepovoljnim ako je prisutan barem jedan od navedenih rizičnih čimbenika.

RIZIČNI ČIMBENICI	GHSGB ^b	EORTC ^d	NCCN ^f
dob	/	≥ 50	/
SE ^a i B simptomi	≥ 50 bez B; ≥ 30 s B	≥ 50 bez B; ≥ 30 s B	≥ 50 ili prisutan B symptom
Medijastinalna masa	$MMR^c > 0.33$	$MTR^c > 0.35$	$MMR > 0.33$
Nodalna područja	> 2	> 3	≥ 3
Bulky	/	/	> 10 cm
Ektranodalna lokalizacija	da	/	da

^a Sedimentacija eritrocita

^b Od engl. *German Hodgkin's Study Group*

^c Omjer maksimalnog promjera medijastinalne mase i maksimalnog intratorakalnog promjera od engl. *mediastinal mass ratio*

^d Od engl. *European Organisation for the Research and Treatment of Cancer*,

^e Omjer maksimalnog promjera medijastinalne mase i intratorakalnog promjera na razini T5/T6 od engl. *mediastinal thoracic ratio*

^f Od engl. *National Comprehensive Cancer Network*

Izvor: Momotow J, Borchmann S, Eichenauer DA, Engert A, Sasse S. Hodgkin lymphoma—review on pathogenesis, diagnosis, current and future treatment approaches for adult patients. JCM. 2021;10:1125.

Kod uznapredovalog stadija bolesti velika tumorska masa i drugi tradicionalni prognostički parametri se čine manje prediktivnim za ishod bolesti, stoga je razvijen prognostički model IPS zbroj (engl. *International Prognostic Score*) koji uključuje sedam nezavisnih kliničkih i laboratorijskih čimbenika bitnih za predviđanje ishoda bolesti u ovom stadiju pri čemu prisutnost svakog čimbenika smanjuje petogodišnje preživljenje (3,44,48) (Tablica 3 A, B). U predterapijskoj evaluaciji potrebno je napraviti ultrazvuk (UZV) srca radi provjere ejekcijske frakcije lijevog ventrikula koja mora biti veća od 50 % ukoliko će se

ordinirat doksorubicin. Također se provjerava i plućna funkcija ukoliko se planira aplicirati terapija koja uključuje bleomicin (49).

Tablica 3. Definicije rizičnih čimbenika kod stadija III/IV Hodgkinovog limfoma

(A) *International Prognostic Score* (IPS zbroj) za uznapredovali stadij Hodgkinovog imfoma

International Prognostic Score (IPS)
Albumini u serumu < 4 g/dL
Hemoglobin < 10.5 g/dL
Muški spol
Dob > 45 godina
Stadij IV bolesti
Broj leukocita $\geq 15,000/\text{microL}$
Absolutni broj limfocita < 600/microL i/ili < 8 % od ukupnog broja leukocita

(B) Smanjenje petogodišnjeg ukupnog preživljenja u odnosu na IPS zbroj

Broj rizičnih čimbenika	5- godišnje preživljenje (%)
0	89
1	90
2	81
3	78
4	61
5 ili više	56

Izvor: Townsend W, Linch D. Hodgkin's lymphoma in adults. Lancet. 2012;380:836–47.

1.7. Liječenje Hodgkinovog limfoma

Strategija liječenja bolesnika s kHL-om uključuje različite pristupe ovisno o kliničkom stadiju bolesti, prognostičkom bodovnom sustavu i histološkom tipu. Liječenje uključuje kemoterapiju, radioterapiju i u novije vrijeme imunoterapiju (3,50). Općenito govoreći, bolesnici s ranim stadijem bolesti mogu se liječiti kombiniranom modalitetnom terapijom (engl. *Combined modality treatment*, CMT) koja uključuje kraći broj ciklusa kemoterapije nakon čega slijedi radioterapija zahvaćenog polja (engl. *Involved-Field Radiotherapy*, IFRT) ili samo kemoterapijom. Odluka između navedene dvije strategije liječenja u ranom stadiju bazira se na anamnestičkim podacima o dobi bolesnika, spolu, obiteljskoj anamnezi malignih bolesti, te prisutnosti srčanih ili drugih komorbiditeta. U brojnim studijama dokazano je da CMT u ranom stadiju bolesti pokazuje bolje preživljenje bez progresije bolesti (engl. *Progression-free survival*, PFS) u odnosu na liječenje samom kemoterapijom ali bez značajnih razlika u ukupnom preživljenju (engl. *Overall survival*, OS) (3,50,51). Bolesnici s uznapredovalim stadijem bolesti

najčešće se liječe samo kemoterapijom i to uglavnom bez primjene radioterapije. Uvođenjem novih lijekova poput brentuksimab vedotin (BV) i PD1-blokatora u standardnu terapiju možda će omogućiti izostavljanje radioterapije u ranom stadiju i smanjivanja doze kemoterapije u uznapredovalim stadijima bolesti. S obzirom na sve navedeno, ključno je istaknut važnost multidisciplinarnog pristupa u donošenju konačnih odluka o liječenju bolesnika s kHL-om. kHL je inače bolest u kojoj više od 75 % bolesnika s uznapredovalim stadijem i više od 85 % bolesnika s ranim stadijem bolesti bude izliječena uz dugotrajne remisije (3,8,50).

1.7.1. Liječenje ranog povoljnog stadija klasičnog Hodgkinovog limfoma

Pristup liječenja ranog stadija kHL-a znatno se promijenio posljednjih godina. Budući da je kHL visoko radiosenzitivna bolest, u početku je standard liječenja bila radioterapija proširenog polja koje je kasnije napušteno zbog kasnih fatalnih posljedica i učestale stope recidiva. Danas se u većini centara bolesnici s ranim povoljnim stadijem liječe kratkotrajnom kemoterapijom (2 - 4 ciklusa) i IFRT-om (20 - 35 Gy) (3,52). Navedena strategija liječenja proizlazi iz kliničkog ispitivanja HD10 studije koja je pokazala da nema značajnih razlika u PFS-u i OS-u među bolesnicima liječenima s 2 ili 4 ciklusa ABVD-a (doksorubicin, bleomicin, vinblastine, dakarbazin) uz 20 ili 30 Gy IFRT-a. Zbog navedenog se smatra da su 2 ciklusa ABVD-a s 20 Gy IFRT-a učinkovita terapija (3,50). Radioterapija ostaje predmet stručnih rasprava jer nosi određene rizike (sekundarni maligniteti, srčana i plućna toksičnost, bolesti štitnjače, fibroza karotida) pa se istražuje mogućnost njenog izostavljanja. Dosadašnje studije (RAPID, EORTC H10 i GHSG HD16) su ispitivale prognostičku vrijednost PET-a u donošenju odluke o izostavljanju radioterapije u liječenju. Rezultati nisu pokazali da izostavljanje radioterapije vođeno PET-om je jednako učinkovito za PFS u odnosu na CMT. Međutim iako CMT nije pokazala prednost u OS-u ipak rezultira boljom kontrolom bolesti pogotovo za one bolesnike koji ne postignu kompletnu remisiju (KR) nakon 2 ciklusa kemoterapije (53–55). Dakle, kod bolesnika s negativnim PET-om nakon 2-3 ciklusa ABVD-a (5 - godišnji PFS ~90 %), radioterapija se može izostaviti ako njeni rizici od dugoročnih nuspojava (npr. subkarinalni limfni čvorovi, dob < 30 godina, veliko polje zračenja), nadmašuju očekivanu korist od 5 - 10 % u PFS-u bez očekivane koristi u OS-u. U tom slučaju može se primijeniti samo 4 ciklusa ABVD-a bez radioterapije. Dok kod bolesnika s pozitivnim PET2 (PET napravljen nakon 2 ciklusa ABVD-a), preferiran je prelazak na agresivniju terapijsku opciju s 2 ciklusa eBEACOPP (bleomicin, etopozid, doksorubicin, ciklofosamid, vinkristin, prokarbazin, prednizolon) uz radioterapiju (30 Gy/15 frakcija) (51). Primjena BV-a i PD-1 blokatora u kombinaciji s AVD-om (izostavljen bleomicin) sa ili bez radioterapije u ranom stadiju bolesti

su pokazala dobru podnošljivost i učinkovitost. Trenutno je u tijeku nekoliko randomiziranih studija koje procjenjuju primjenu BV-a i PD-1 blokatore u ranom stadiju kHL-a u odnosu na PET prilagođenu kemoterapiju ili CMT-u. Ipak, u nedostatku podataka randomiziranih studija o primjeni BV-a i PD-1 blokatora, PET-om prilagođena kemoterapija ili CMT i dalje ostaje standardni pristup za rani stadij bolesti kHL-om (50,56).

1.7.2. Liječenje ranog nepovoljnog stadija klasičnog Hodgkinovog limfoma

Za liječenje bolesnika s ranim nepovoljnim stadijem kHL općenito je povijesno prihvaćena CMT-a koja uključuje 4 ciklusa kemoterapije s konsolidacijskom radioterapijom IFRT od 30 Gy. Ova opcija pokazala se jednako učinkovitom kao i intenzivnije kemoterapije, poput 6 ciklusa ABVD-a sa radioterapijom ili 4 ciklusa BEACOPP-a sa radioterapijom (EORTC/GELA - H9) (51). U ranom nepovoljnom stadiju prisutnost velike medijastinalne tumorske mase često zahtijeva šire područje primjene radioterapije što može povećati rizik od kasne toksičnosti. Studija EORTC/LYSA/FIL-H10 pokazala je da bolesnici s negativnim PET-om nakon 2 ciklusa ABVD-a, nastavkom s još 4 ciklusa bez radioterapije, imaju nizak rizik od relapsa, koji je nakon 10 godina praćenja nestao. Dok bolesnici s pozitivnim PET2 imaju bolji PFS prelaskom na eBEACOPP s radioterapijom (51). Prema sadašnjim smjernicama u liječenju ranog nepovoljnog stadija HL-a samo kemoterapijom ABVD, negativan PET2 omogućuje nastavak s još 4 ciklusa AVD-a bez radioterapije ili još 2 ciklusa ABVD-a s radioterapijom. (51). ABVD osigurava ravnotežu učinkovitosti i toksičnosti u ranom kHL-u, no studije su ispitali režim "2+2" (2 ciklusa eBEACOPP + 2 ciklusa ABVD s radioterapijom). HD14 je pokazala bolji PFS u odnosu na 4 ciklusa ABVD-a s radioterapijom ali bez razlike u OS-u. HD17 je potvrdila da se radioterapija može izostaviti kod bolesnika s dobrim odgovorom na "2+2" bez povećanog rizika od relapsa što predstavlja bolju terapijsku opciju za bolesnike podobne za navedenu strategiju (51). Razvojem novih lijekova poput BV-a i PD-1 blokatora, neke studije su ispitivale njihovu primjenu u ranom nepovoljnom stadiju HL s ciljem da se održi učinkovitost a istovremeno smanji potencijalna toksičnost terapije. BREACH studija faze II usporedila je BV-AVD (brentuksimaba vedotina plus doksorubicin, vinblastin i dakarbazin) s ABVD protokolom nakon čega slijedi radioterapija u prethodno neliječenih bolesnika, pokazavši viši postotak KR u eksperimentalnoj skupini (82.3 % vs 75.4 %) i bolji 2 - PFS (97.3 % vs 92.6 %). NIVAHHL studija ispitivala je primjenu nivolumaba uz AVD (konkomitantno ili sekvencijalno) uz izvrsne rezultate (3). Ipak, ovi lijekovi nose specifične rizike- BV može uzrokovati perifernu neuropatiju, febrilnu neutropeniju (FN) i sepse, dok PD-1 blokatori mogu uzrokovati pneumonitis, kolitis i hipotiroidizam. Njihova primjena otvara mogućnost

skraćivanja broja ciklusa kemoterapije i/ili izostavljanja radioterapije, čime se potencijalno smanjuje potreba za intenziviranjem liječenja. Međutim, potrebne su veće randomizirane studije prije njihove primjene u ranoj fazi HL-a (54). Zaključno, iako je stopa izlječenja u ranom stadiju veća od 90 %, značajan broj bolesnika razvija kasne nuspojave poput sekundarnih maligniteta, kardiovaskularnih bolesti i endokrinih disfunkcija. Stoga, izbor terapije trebao bi biti individualiziran temeljen na procjeni rizika, odgovoru na liječenje i vođen multidisciplinarnim pristupom uz aktivno sudjelovanje bolesnika u odluci (54).

1.7.3. Liječenje uznapredovalog stadija klasičnog Hodgkinovog limfoma

Liječenje uznapredovalog stadija kHL značajno je napredovalo u posljednim desetljećima uz uvođenje IPS prognostičkog sustava, razvoja intenzivnih kemoterapijskih protokola i primjena konjugiranog anti CD30 antitijela, BV-a u prvoj liniji liječenja. Liječenje ovog stadija kHL-a primarno se temelji na primjeni kemoterapijskih protokola dok se CMT koristi se u odabranim slučajevima poput velike tumorske mase ili djelomičnog odgovora na početno liječenje (57–59). Najčešće primijenjivani kemoterapijski protokol za liječenje uznapredovalog kHL-a je ABVD budući da nekoliko randomiziranih kliničkih ispitivanja nije pokazalo prednost drugih, intenzivnijih protokola u OS-u (59–61). Međutim, kod bolesnika s visokim IPS zbrojem, primjena ABVD-a povezana je s lošijim PFS-om. Stoga, razvijeni su intenzivniji terapijski protokoli, poput eBEACOPP-a, koji osigurava višu stopu izlječenja (oko 80 %) i bolji PFS, ali uz povećan rizik od nuspojava, poput sekundarnih maligniteta, neutropenije i neplodnosti (51). Glavni izazov u liječenju uznapredovalog kHL-a jest uspostavljanje ravnoteže između postizanja dugotrajnih remisija i smanjenje rizika od dugoročnih nuspojava terapije. Terapijski odabir prilagođuje se individualnim čimbenicima bolesnika, uključujući opće zdravstveno stanje i prisutne komorbiditete, kao i preferencijama samog bolesnika i ustanove u kojoj se liječenje provodi (3,57). Srednja Europa sklona je korištenju eBEACOPP-a kao standardne terapije, dok se u Italiji, Velikoj Britaniji i SAD-u češće primjenjuje ABVD (62). Uvođenje PET2 omogućilo je prilagodbu liječenja. Studija RATHL pokazala je da bolesnici s negativnim PET2 ABVD-a mogu sigurno nastaviti liječenje bez bleomicina, čime se smanjuje plućna toksičnost bez gubitka učinkovitosti. U slučaju pozitivnog PET2, prelazak na BEACOPP bio je siguran i učinkovit, bez značajnog porasta rizika od sekundarnih maligniteta (3,63). S druge strane, studija AHL2011 pokazala je da bolesnici s negativnim PET2 eBEACOPP-a mogu prijeći na AVD bez gubitka učinkovitosti. Time se smanjuje toksičnost a ostaje očuvana učinkovitost terapije (51). Noviji protokoli za uznapredovali kHL uključuju BV i PD-1 inhibitore. Prema studiji ECHELON-1, BV-AVD je

postao prihvatljiva opcija s boljim PFS-om i OS-om od ABVD-a, ali uz veću stopu neutropenije i periferne neuropatije a manju stopu plućne toksičnosti zbog izostanka bleomicina iz protokola. Najveću korist od navedene terapije imaju bolesnici < 60 godina, kod stadij IV i IPS zbroja ≥ 4 (64,65). Ishodi ove studije su rezultirali time da je EMA (engl. *European Medicines Agency*) registrirala BV u prvoj liniji liječenja stadija IV HL (57). BV je istraživana i unutar eBEACOPP-a, što je dovelo do razvoja novog protokola BrECADD (BV, etopozid, ciklofosamid, doksorubicin, dakarbazin, deksametazon). Studija GHSG HD21 pokazala je da BrECADD ima bolju podnošljivost i učinkovitost od eBEACOPP-a, s 3-godišnjim PFS-om od 98 % u PET2 negativnih i 92 % u PET2 pozitivnih bolesnika (57). Liječenje uznapredovalog stadija bolesti se promijenilo ne samo zbog dodavanja anti CD30 protutijela standardnoj kemoterapiji nego dodavanjem i PD-1 blokatora s ciljem poboljšavanja ishoda liječenja bolesnika. Studija S186 usporedila je 6 ciklusa N-AVD (nivolumab + AVD) s BV-AVD-om, pokazavši bolji 1-godišnji PFS (94 % vs 86 %), ali i više težih hematoloških nuspojava i poremećaja štitnjače (57,66). Dugotrajnije praćenje potrebno je za procjenu sigurnosti novih lijekova i prognostičke vrijednosti interim PET-a, koji može biti lažno pozitivan zbog pseudo-progresije ili *flare* efekta. LYRIC kriteriji (engl. *Lymphoma Response to Immunomodulatory Therapy Criteria*), koje je definirao Cheson, pomažu u tumačenju tih rezultata. Unatoč izazovima, ovaj pristup može biti dobra opcija za starije bolesnike, kod kojih je preživljenje općenito ošije, što otežava donošenje terapijske odluke (3,57).

1.7.4. Liječenje relapsnog/refraktornog klasičnog Hodgkinovog limfoma

Otprilike 5 - 10 % bolesnika s HL-om neće odgovoriti na prvu liniju terapije dok 10 - 30 % bolesnika će doživjeti relaps nakon postignute početne KR-e (kompletna remisija) (3). Primarno refraktornu bolest definiramo kao nemogućnost postizanja KR-e na indukcijsku terapiju ili progresija koja se dogodila unutar 90 dana od završetka liječenja a takva skupina bolesnika obično imaju lošiji klinički tijek. Relaps definiramo kao pojavu ponovne bolesti na istom ili novom mjestu nakon postignute KR-e. Kod sumnje na relaps ili refraktornu bolest uvijek je potrebno napraviti biopsiju promjene radi patohistološke potvrde HL-a (3). Danas se za mlade i fit bolesnike s relapsno/refraktornim HL-om (R/R HL) preporučuje terapija spasa nakon koje slijedi HDCT/ASCT (engl. *high-dose chemotherapy (HDCT) followed by autologous stem cell transplantation*) (s radioterapijom ukoliko se ranije nije provodila) a potom terapija održavanja s BV (performans status ≤ 2 , bez komorbiditeta za ASCT). Cilj terapije spasa je postizanje KR-e nakon dva ciklusa kemoterapije prije ASCT koja se procjenjuje PET-om (Deauville skor 1 - 3). To se smatra ključnim prognostičkim čimbenikom

(5 - godišnji PFS u PET negativnih je 75 % vs 31 % u PET pozitivnih) (51). Do danas u više studija se pokazala važnost terapije spasa prije HDCT/ASCT (67,68). Najčešće korišteni protokoli su DHAP (cisplatina, citarabin, deksametazon) i ICE (karboplatina, etopozid, ifosfamid). No, učinkoviti protokoli pokazali su se još i GVD (gemcitabine, vinorelbin, liposomalni doksorubicin), IGEV (ifosfamid, gemcitabine, vinorelbin, prednizolon), GCD (gemcitabine, karboplatina, deksametazon), GEMOX (gemcitabine, oksaliplatin) (69–72). Međutim, terapije spasa su povezane s nuspojavama poput infekcija u 10 - 24 % dok mukozitisi, nefrotoksičnost, hepatotoksičnost se javlja u manje od 10 % (73). Nakon postignute KR terapijom spasa prije ASCT preporučava se visokodozna kemoterapija, od kojih je najčešće korištena BEAM (karmustin, etopozid, citarabin, melfalan) ali koriste se i drugi kondicionirani protokoli poput ciklofosfamida, BCNU (visoke doze ciklofosfamida, karmustin) CBV (ciklofosfamid, karmustin, etopozid). Preferirani izvor matičnih stanica su hematopoetske stanice mobilizirane iz periferne krvi. Prikupljanje matičnih hematopoetskih stanica najbolje je provesti nakon prvog ciklusa terapije spasa (51,73). AETHERA studija ispitala je BV kao konsolidacijsku terapiju u bolesnika s visokim rizikom relapse (primarno refraktorna bolest, trajanje KR kraće od 1 godine ili relaps s ektranodalnom bolesti ili uznapredovalim stadijem) nakon HDT/ASCT. Bolesnici su randomizirani na one koji su primali BV (16 ciklusa) ili placebo. BV je pokazao superiorniji PFS (59 % vs 41 % nakon 5 godina), ali bez razlike u OS-u. Na temelju ovih rezultata, BV je odobren kao konsolidacijska terapija za visokorizične bolesnike nakon ASCT (74). Također se terapija održavanja PD-1 inhibitorima istraživala kroz tri jednostruke studije faze II. Pembrolizumab koji se ordinirao nakon ASCT kod R/R HL rezultirao je izvrsnim rezultatima (18-mjesečni PFS 82 % i OS 100 %). Slični rezultati su se pokazali i kod korištenja nivolumaba kao monoterapije (6-mjesečni PFS 92 % i OS 100 %) ili u kombinaciji s BV (18-mjesečni PFS 94 %) ali je rezultirala i većom stopom nuspojava pogotovo kod dvojne terapije (49). Brojne studije koje su uključivale nove lijekove u inicijalnu terapiju spasa su se provodile s ciljem povećanja stope KR-a prije HDT/ASCT. Zahvaljujući uvođenjem novih lijekova poput BV (odobren 2012.) te PD-1 inhibitore (nivolumab i pembrolizumab odobreni 2017. i 2018.) s standardnom terapijom spasa u bolesnika s R/R HL, značajno je poboljšalo OS ovih bolesnika i rezultiralo postizanjem više stope KR (51). Najčešće kombinacije s BV su BV-ICE, BV-Bendamustine, BV-DHAC/DHAox s postizanjem KR u 75 - 90 % (75,76). Ukoliko su bolesnici refraktorni na BV+AVD, BrECADD ili pate od neuropatije, terapijska opcija mogla bi biti pembrolizumab u kombinaciji s kemoterapijom (npr GVD). Pembrolizumab + GVD je rezultirala stopom KR u 95 % bolesnika (77). Terapija održavanja PD-1 inhibitorima preporučava se kod bolesnika koji su refraktorni na BV ili imaju

nuspojave povezane s BV (51). U zadnjih nekoliko godina ishodi bolesnika koji dožive relaps nakon HCT/ASCT dosta su poboljšani zahvaljujući novim terapijskim mogućnostima. Tako je pokazano da korištenjem novih lijekova i/ili alogenična transplantacija matičnih krvotvornih stanica poboljšala je PFS s 43 % na 71 % (51). Alogenična transplantacije je jedina terapijska opcija s potencijalom izlječenja a njena primjena mijenja se s uvođenjem haploidentičnih donora kao i ciljane terapije. Na dugotrajne ishode nakon alogenične transplantacije utječe status bolesti prije transplantacije. Međutim, uloga alogenične transplantacije kod bolesnika s R/R HL nakon autoHCT postaje manje jasna u vrijeme novih ciljanih terapija budući da se broj alogeničnih transplantacija smanjio zadnje dvije godine. BV je poznata terapija kod bolesnika s HL-om koji su doživjeli relaps nakon transplantacije a koristi se kao terapija premošćivanja do alogenične transplantacije (73). Tako je u dosadašnjim studijama nakon neuspjelog postizanja remisije poslije transplantacije, liječenje BV-om rezultiralo KR-ijama u trećine bolesnika (3). Do sada je pokazano da može poboljšati status bolesti prije transplanacije i smanjiti stopu kronične bolesti presatka protiv primatelja (engl. *Graft-versus-host disease*, GVHD) (73). U randomiziranoj studiji pokazana je još bolja učinkovitost PD-1 inhibitora pembrolizumaba u vidu boljeg PFS u usporedbi s BV rezultirajući zaključkom da je preferirana terapijska opcija kod relapse nakon ASCT-a (3). Međutim njihova primjena se povezuje s povećanom stopom nuspojava poput akutnog GVHD-a, sinusoidalni opstruktivni sindrom/venookluzivna bolest jetre (engl. *Hepatic sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease*, SOS/VOD) tako da je potrebno dulje praćenje takvih bolesnika (73). Druge obećavajuće terapijske opcije koje se još istražuju uključuju kombinaciju BV s nivolumabom i ipilimumabom, (CAR) - T stanična terapija usmjerena na CD30 i alogene prirodne stanice ubojice (engl. *natural killer*, NK) stanice u kombinaciji s AFM13, CD30/CD16A bispecifičnim antitijelom (3,78). Relaps nakon alogenične transplantacije ima lošu prognozu. Terapijske opcije mogu biti različite a kreću se od primjene infuzije darivateljevih limfocita (engl. *donor lymphocyte infusion*, DLI), DLI u kombinaciji s bendamustinom ili BV, do nivolumaba. Ali nažalost, u nekim slučajevima jedina opcija može biti palijativna skrb (73).

1.7.5. Liječenje starijih bolesnika s klasičnim Hodgkinovim limfom

20 % bolesnika s HL predstavljaju stariji bolesnici 60 godina i više a kod kojih je lošije OS u odnosu na mlađe bolesnike. To se može povezat s često prisutnim komorbiditetima, lošijim psihofizičkim statusom, različitom biologijom bolesti (veća incidencija MC), EBV pozitivne bolest, uznapređovalim stadijem, nemogućnošću toleriranja pune doze kemoterapije te povećanom incidencijom nuspojava što u konačnici utječe na ishod same bolesti (50,54).

Studije HD10 i HD13 su ispitivale utjecaj bleomicina u ABVD protokolu kod bolesnika ≥ 60 godina sa ranim povoljnim stadijem HL-a gdje je pokazano da primjena više od 2 ciklusa bleomicina nema značajnu korist, podržavajući skraćanje terapije (79). Budući da bleomicin može uzrokovat tzv. bleomicinsku plućnu toksičnost, u starijih bolesnika treba se koristiti uz oprez, a kao rizični čimbenici mogu biti pušenje i korištenja čimbenika stimulacije kolonije granulocita (engl. *Granulocyte colony-stimulating factors*, G-CSF) tijekom terapije (80,81). U 5 - 32 % se javlja bleomicinska plućna toksičnost s stopom mortaliteta u 10 - 25 % bolesnika. Rizični čimbenik je i smanjen kreatinin klirens budući da se bleomicin izlučuje putem bubrega (50). Terapijske opcije koje se mogu koristiti za starije bolesnike s HL-om kao početna terapija su: CHOP (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon), BV+DTIC (dakarbazin), VEPEMB (vinblastine, ciklofosfamid, prednizolon, prokarbazin, etopozid, mitoksantron, bleomicin), BACOPP (bleomicin, doksorubicin, ciklofosfamid, vinkristin, prokarbazin, prednizolon), PVAG (prednizolon, vinblastine, doksorubicin, gemcitabine) (82–85). Također se pokazalo da upotreba sekvencijskog režima BV s AVD (2 ciklusa BV, potom 6 ciklusa AVD nakon koje slijedi 4 konsolidacijske doze BV) je dobro podnošljiva s povoljnim ishodima kod bolesnika koji mogu tolerirati antracikline (50). Za bolesnike s nižom ejskijskom frakcijom, može se koristiti BV+ DTIC uz kardiološko praćenje bolesnika (83,86). Od primjene PD-1 inhibitora za izdvojiti je studiju NIVINHO gdje se nivolumab primjenjivao sam ili u kombinaciji s vinblastinom a rezultirali su stopom KR u 28.6 % te 2-godišnjim OS u 78.6 %. Slični rezultati su bili s pembrolizumabom. PD-1 inhibitori se mogu primjenjivati ambulantno te imaju dobar sigurnosni profil i učinkovitost na taj način poboljšavajući kvalitetu života. No pristup ovim lijekovima i dalje predstavlja izazov (51).

1.7.6. Liječenje nodularne limfocitne predominacije Hodgkinovog limfoma

U 80 % slučajeva prezentira se ranim stadijem bolesti (12). U brojnim studijama pokazala se korist same ISRT (engl. *Involved-site radiation therapy*) kao terapijske opcije u ranom stadiju bolesti te su ishodi s ograničenom radioterapijom usporedivi s ishodima primjene opsežnije radioterapije i kombiniranih terapijskih protokola (87–89). Liječenje bolesnika s povoljnim stadijem IA može se provoditi radioterapijom IFRT 20-30 Gy ili ukoliko je potpuno kirurški uklonjen tumor, opservacija može biti opcija (3). Ostali rani povoljni stadij bez kliničkih rizičnih čimbenika obično se liječi s dva ciklusa kemoterapije nakon čega slijedi radioterapija. Ostali nepovoljni rani stadij također u većini slučajeva liječi se CMT-om. Najčešće korišten kemoterapijski protokol je ABVD (47). Uznapredovali stadij (III/IV) se javlja u 20 % bolesnika. Od kemoterapijskih protokola preporučava se R-CHOP (rituksimab, ciklofosfamid,

doksorubicin, vinkristin, prednizolon), BR (brentuksimab, rituksimab) i eBEACOPP. Za razliku od navedenih kemoterapijskih protokola, ABVD u ovom stadiju rezultira slabijom kontrolom bolesti (12,47). Budući da stanice NLPHL izražavaju CD20 antigen, proučavala se primjena rituksimaba, anti CD20 protutijela, incijalno kao monoterapija kod R/R NLPHL s stopom odgovora 94 - 100 % s trajanjem remisija u 33 - 60 mjeseci (12). Ne postoji standardizirani pristup liječenja R/R NLPHL. Izbor terapije ovisi o dobi bolesnika, predhodnom liječenju, stadiju relapsa i simptoma povezanih s limfomom. Čak i u slučaju recidiva, bolest ima indolentan tijek pa se uspješno može liječiti kemoterapijom koja uključuje anti-CD20 protutijelo i/ili radioterapijom, samom radioterapijom ili monoterapijom anti-CD20 protutijelom (47). Iako je NLPHL limfom izvrsne prognoze, u manjeg broja bolesnika može doći do histološke transformacije u difuzni B-stanični limfom (engl. *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*, DLBCL) ili kasni relaps. Zbog navedenog uvijek je bitno ponoviti biopsiju ukoliko bolesnik ne odgovori na početnu terapiju ili razvije relaps bolesti radi patohistološke potvrde dijagnoze NLPHL ili potvrde o transformaciji u drugi limfom (12).

1.8. Komplikacije liječenja Hodgkinovog limfoma

Komplikacije liječenja se mogu podijeliti na rane i kasne. Rane (akutne) nuspojave, koje nastaju kao posljedica kemoterapije i radioterapije, u većini se slučajeva mogu uspješno riješiti. S druge strane, kasne nuspojave pojavljuju se nakon duljeg vremenskog razdoblja od završetka liječenja i predstavljaju ozbiljniji problem jer doprinose skraćenju životnog vijeka bolesnika. One uključuju sekundarne zloćudne bolesti, kardiovaskularne bolesti, bolesti pluća, štitnjače, kronični umor i kognitivne smetnje (12,90).

1.8.1 Rane komplikacije liječenja

– Mučnina i povraćanje

Mučnina i povraćanje uzrokovani antineoplastičnom terapijom (kemoterapija, ciljana terapija, imunoterapija) i/ili radioterapija mogu narušiti kvalitetu života bolesnika i dovest do metaboličkih poremećaja, dehidracije, nutritivnog deficita te smanjenja funkcionalne sposobnosti bolesnika. Visoko emetogena kemoterapija u više od 90 % bolesnika izazvat će epizodu povraćanja, ali s primjenom profilaktične antiemetske terapija to se može smanjiti na 30 % (91,92). Na pojavu mučnine i povraćanja utječu različiti čimbenici, uključujući emetogeni potencijal lijeka, doza lijeka, istodobna primjena drugih lijekova, izloženost radioterapiji, kao i individune karakteristike bolesnika poput ženskog spola, mlađe životne dobi (ispod 40 godina). Razlikujemo lijekove s visokim, umjerenim, niskim i minimalnim ematogenim

potencijalom. Lijekovi s visokim ematogenim potencijalom izazvat će simptome u više od 90 % bolesnika, oni s umjerenim u 30 - 90 %, lijekovi s niskim potencijalom u 10 - 30 % a sa minimalnim u manje od 10 % bolesnika. Lijekovi s visokim ematogenim potencijalom su karmustin, cisplatina, ciklofosfamid ($> 1.5 \text{ g/m}^2$). Lijekovi s umjerenim ematogenim rizikom su karbopatina, citarabin, daunorubicin, doksorubicin, ifosfamid dok s minimalnim rizikom su lijekovi poput bleomicin, vinblastine, vinkristin. Protokoli ABVD i eBEACOPP imaju visoki ematogeni rizik. Akutna emezija se definira ukoliko se povraćanje javlja unutar 24 sata od primjenjene terapije, a odgođena ukoliko se javlja nakon toga razdoblja. Zbog toga je prevencija mučnine i povraćanja od ključne važnosti. Kod lijekova s visokim emetogenim potencijalom, rizik od emezije traje najmanje tri dana, dok kod onih s umjerenim potencijalom može trajati do dva dana nakon primjene posljednje doze kemoterapije. Stoga je tijekom cijelog razdoblja primjene citostatika nužno osigurati adekvatnu zaštitu bolesnika antiemetikima (91–93). Najčešće se koriste antagonisti 5-HT₃ (serotoninski) receptora (granisetron, ondansetron, palonosetron, dolasetron). Opcije su i antagonisti NK-1 (neurokininskih) receptora kao što je aprepitant (92,94). U prevenciji se mogu koristiti i glukokortikoidi, najčešće u kombinaciji s drugim antiemetičkim lijekovima poput benzodiazepina (olanzapin) (95,96).

– Alopecija

Lijekovi koji dovode do alopecije su najčešće antraciklini i alikilirajući lijekovi. Navedeni lijekovi oštećuju stanice folikula dlake koje se brzo dijele. Gubitak kose najčešće zahvaća vlasište i obično se javlja oko dva tjedna nakon početka kemoterapije, a najizraženije je 1 - 2 mjeseca kasnije. Alopecija je reverzibilna nakon prestanka terapije (97).

– Sindrom lize tumora

Sindrom lize tumora je hitno stanje koje se javlja u bolesnika sa zloćudnom bolesti nakon primjene početne terapije. Najčešće se pojavljuje u bolesnika s velikom tumorskom masom gdje terapija dovodi do naglog uništavanja velikog broja zloćudnih stanica. Potom dolazi do oslobađanja unutarstaničnih iona i produkata razgradnje proteina u sistemsku cirkulaciju. U bolesnika s HL-om sindrom lize tumora se povezuje s povećanom smrtnošću. Laboratorijski nalazi upućuju na hiperkalemiju, hiperfosfatemiju, hipokalcemiju i hiperuricemiju uz akutno zatajenje bubrega. Osim toga, hiperkalemija može dovesti do po život opasnih aritmija. Prevencija je ključna i uključuje primjenu lijekova za kontrolu hiperuricemije (alopurinol, rasburikaza), adekvatnu hidrataciju, praćenje diureze te korekciju elektrolitskih poremećaja kako bi se spriječila ova ozbiljna komplikacija.(98,99).

– Anemija

Anemija može biti posljedica same maligne bolesti, ali i kemoterapije, koja inhibicijom hematopoeze u koštanoj srži može imati mijelosupresivni učinak, posebno nakon ponavljanja više ciklusa terapije. Kod teške simptomatske anemije može se primijeniti transfuzija eritrocita, dok će određeni broj bolesnika pozitivno reagirati na primjenu rekombinantnog humanog eritropoetina, čime se poboljšava kvaliteta života (92).

– Neutropenija i infekcije

FN se razvije u otprilike 25 - 40 % bolesnika koji prvi put primaju mijelosupresivnu terapiju. FN je ozbiljna komplikacija liječenja, a definira se vrućicom $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$ u trajanju od najmanje jednog sata i brojem neutrofila manjim od $0,5 \times 10^9/\text{L}$ ili manjim od $1 \times 10^9/\text{L}$ s očekivanim padom od $0,5 \times 10^9/\text{L}$ tijekom slijedećih 48 sati (92). Prije ordiniranja prvog ciklusa procijenjuje se rizik od kemoterapijom inducirane febrilne neutropenije i potrebe za profilaktičkom primjenom G-CSF-a. Među rizičnim čimbenicima za razvoj teške neutropenije je starija životna dob (> 65 godina), predhodno liječenje kemoterapijom/radioterapijom, bolesti bubrega i jetre, loše opće tjelesno stanje bolesnika. Svim bolesnicima s visokim rizikom od razvoja FN-e ($\geq 20\%$) preporuča se profilaktička primjena G-CSF-a (92).

Kemoterapijski protokoli visokog rizika za razvoj FN-e su B+AVD, eBEACOPP i BrECADD (100,101). Pokazalo se da B+AVD protokol, u kojem je bleomicin izostavljen iz početne terapije, dovodi do manje učestalosti plućnih komplikacija, ali uz veću incidenciju FN-e i infekcija u usporedbi s ABVD-om. Međutim, taj se rizik može smanjiti primjenom profilakse G-CSF-om (100). Primarna profilaksa u ABVD protokolu se procijenjuje individualno ovisno o prisutnim čimbenicima rizika budući da je to protokol niskog do umjerenog rizika. Također, primjena G-CSF-a može povećati stopu bleomicinske plućne toksičnosti, što dodatno zahtijeva oprez pri odlučivanju o profilaksi (102). BrECADD je agresivni protokol namijenjen mlađim bolesnicima, s učestalošću FN-e u više od četvrtine slučajeva. Zbog toga se, kao i kod eBEACOPP protokola, profilaktički primjenjuje G-CSF uz svaki ciklus terapije (103).

1.8.2. Kasne komplikacije liječenja Hodgkinovog limfoma

HL je uvođenjem moderne radioterapije i kombinirane kemoterapije postao visoko izlječiva bolest kojim većina bolesnika postiže dugoročno preživljenje bez recidiva bolesti. Ipak, su kvaliteta i očekivano trajanje života smanjeni zbog kasnih nuspojava liječenja koje su postale značajan uzrok mortaliteta i morbiditeta u preživjelih (90).

– Sekundarni maligniteti

Povećani rizik od razvoja solidnih karcinoma nakon liječenja HL-a je odavno poznat. Ovi tumori najčešće nastaju unutar ili na rubovima područja izloženog zračenju, pri čemu je rizik najveći kada se radioterapija primjenjuje kao dio prve linije liječenja. Najčešće dijagnosticirani solidni maligniteti uključuju karcinom dojke, pluća i gastrointestinalnog trakta. Pojava ovih tumora obično se bilježi najmanje deset godine nakon početka liječenja, a povećan rizik može potrajati i do 30 godina kasnije (12).

U studijama je pokazano da je rizik za razvoj karcinoma dojke 3,2 puta povećan kod doza zračenja većih od 4 Gy, a čak osmerostruko kod doza većih od 40 Gy. Za razvoj karcinoma dojke također je bitna i dob koja obrnuto korelira s rizikom. Tako je povećan rizik ukoliko je liječenje započeto prije 30. godine života. Ukidanje rutinske aksilarne radioterapije rezultiralo je smanjenjem rizika za 2,7 puta, a očekuje se da će rizici dodatno opasti s primjenom trenutne niskodozne radioterapije (12). Gotovo je udvostručen rizik za razvoj raka dojke u žena liječenih zbog HL-a koje su imale pozitivnu obiteljsku anamnezu na tumore, u usporedbi s onima bez pozitivne obiteljske anamneze (104). Rezultati analize podataka iz baze SEER (engl. *Surveillance, Epidemiology, and End Results*) su obuhvatili 2645 žena s HL-om koje su liječene početnom kemoterapijom i radioterapijom u razdoblju 1973. - 2000., a bile su mlađe od 35. godina. Pokazano je da su imale šest puta veći rizik za razvoj karcinoma dojke u usporedbi s općom populacijom. Također su češće imale karakteristike povezane s lošijom prognozom, poput visokog stupnja maligniteta ili negativnih progesteronskih i estrogenih receptora (105). Preporuča se godišnje provođenje pregleda, uključujući mamografiju i magnetsku rezonancu, za bolesnike koji su primili radioterapiju toraksa ili aksile, počevši 8 godina nakon završetka terapije ili kada navrš 40 godina (54,106).

Rizik od razvoja karcinoma pluća povećava se uslijed radioterapije, a vjerojatno i alkilirajuće kemoterapije, pri čemu rizik raste linearno s dozom (107,108). Tako je pokazano da bolesnici koji su liječeni alkilirajućom kemoterapijom i radioterapijom toraksa, a uz to su i pušači, imaju 49 puta veći rizik za pojavu karcinoma pluća od bolesnika bez navedenih rizičnih čimbenika. U povećanom riziku su pušači, a pogotovi oni bolesnici koji nastave s pušenjem nakon postavljanja dijagnoze (12,109). Prognoza je nepovoljnija u usporedbi s bolesnicima koji razviju *de novo* karcinom pluća, s 30 - 60 % smanjenim ukupnim preživljenjem (110). Kod bolesnika s visokim rizikom od raka pluća primjena niskodoznog CT-a mogla bi omogućiti otkrivanje većeg broja bolesnika u ranoj fazi bolesti (62).

Na razvoj gastrointestinalnih tumora nakon liječenja HL-a utječu radioterapija, određeni citostatici (derivati platine, dakarbazin, prokarbazin) te vrsta terapije (najveća stopa se javlja

nakon kombiniranog režima liječenja). Takvi bolesnici imaju značajno manje preživljenje u usporedbi s bolesnicima koji razviju *de novo* karcinom (111,112).

Akutna leukemija (AL) i mijelodisplazije imaju najveći rizik od pojave unutar prvih 5 do 10 godina nakon liječenja HL-a (113). Rizik je povećan pri primjeni alkilirajućih citostatika, pri čemu je ovisan o dozi, ali i kod uporabe antraciklina, poput doksorubicina (114). OS kod sekundarne AL-e izrazito je loše, manje od godinu dana. Međutim, uvođenjem novih kemoterapijskih protokola poput ABVD-a koji su zamijenili povijesnu primjenu kemoterapijskog protokola MOPP (meklorektamin, vinkristin, prokarbazin, prednizon), dovela je do smanjenja rizika, ali ne i do njegovog nestanka (12). I dalje se koriste leukemogeni citostatici u terapiji spasa i u novim kemoterapijskim protokolima. Od kemoterapijskih protokola ističe se eBEACOPP (veće doze etopozida i doksorubicina) koji ima veći rizik za razvoj AL-e od standardnog BEACOPP i COPP/ABVD (ciklofosfamid, prokarbazin, vinkristin, prednizon/ABVD) protokola. Takav tip AL-e javlja se nešto ranije i povezan je s balansiranom translokacijom kromosoma 11. Zbog navedenog, rizik od nastanka sekundarnih AL-a će i dalje perzistirati u podskupine bolesnika liječene modernom terapijom. Ipak, najveći rizik za nastanak AL-a i mijelodisplazije imaju oni bolesnici koji su primili drugu liniju terapije i autolognu transplantaciju krvotvornih matičnih stanica (12,101). Također, pokazano je da su dob prilikom liječenja (35 - 40 godina) i prolongirana trombocitopenija rizični čimbenici za pojavu sekundarnih AL-a (114).

Od hematoloških maligniteta povećan je i rizik za razvoj non-Hodgkinovog limfoma, ali bez jasne povezanosti s vrstom početne terapije. U principu se radi o agresivnom DLBCL-u s jako lošom prognozom i njegova pojavnost je najčešća u NLPHL-u (12).

Kardiovaskularne bolesti

Rizici za razvoj kardiovaskularnih bolesti su radioterapija mediastinuma i kemoterapija koja uključuje antracikline, a obično se javlja unutar 5 - 10 godina od završetka liječenja. Pokazano je da antraciklini povećavaju rizik od valvularnih bolesti srca i kardiomiopatije, a mediastinalna radioterapija rizik od koronarne bolesti, valvularnih bolesti srca i kardiomiopatije. Neovisni prognostički čimbenici su dob, hipertenzija, hiperkolesterolemija i doza radioterapije (54,115,116). Ukoliko je liječenje uključivalo radioterapiju vrata, 10 godina nakon završetka liječenja preporuča se napraviti osnovni stres test, ehokardiogram i UZV karotida uz praćenje krvnog tlaka i kardiovaskularnih rizičnih čimbenika (106).

– Plućne bolesti

Smanjenje plućne funkcije tijekom liječenja HL-a povezano je s primjenom bleomicina i/ili medijastinalne radioterapije. Plućna disfunkcija može uzrokovati kroničnu dispneju i intoleranciju na fizički napor što može doprinijeti umoru (112). Rizični čimbenici za bleomicinsku plućnu toksičnost su starija životna dob, radioterapija, prethodna bolest pluća, pušenje, terapija G-CSF-om, bubrežna insuficijencija i kemoterapijski protokoli koji sadržavaju bleomicin (npr. ABVD). Rizik za razvoj bleomicinske plućne toksičnosti se kreće od 0 % do 46 %, dok smrtnost može doseći i do 27 % (117).

– Neplodnost i hipotireotizam

Više od 60 % bolesnika nakon radioterapije vrata razvit će hipotireoidizam. Više od 90 % muškaraca nakon eBEACOPP razvit će azospermiju, dok će se prema jednoj studiji amenoreja javiti u polovice žena. Suprotno navedenom, kemoterapijski protokol ABVD povezan je s privremenom amenorejom i azoospermijom, uz potpuni oporavak u 50 - 95 % bolesnika. Jedna od mogućnosti da se izbjegnu navedene komplikacije je primjena kemoterapijskog protokola ABVD ili pristupa prilagođenog PET-om, s obzirom na to da je terapija eBEACOPP-om izrazito gonadotoksična.

Bolesnicima u reproduktivnoj dobi može se ponuditi krioprezervacija sjemenja, dok bi bolesnice bilo poželjno uputiti ginekologu radi razmatranja opcija poput *in vitro* oplodnje, kriopohrane zrelih oocita ili tkiva jajnika. S obzirom na to da ove metode zahtijevaju određeno vrijeme, što može dovesti do odgode terapije, nužna je procjena rizika i koristi za svakog bolesnika od strane multidisciplinarnog tima (62,118).

– BV inducirana periferna neuropatija

BV inducirana periferna neuropatija se javlja kao nuspojava kemoterapijskog protokola koji sadržavaju BV poput BV-AVD u bolesnika s uznapredovalim stadijem HL-a. Prema provedenim studijama, javlja se u otprilike 67 % bolesnika, od čega je u 10 % prekinuto liječenje. Može se razviti senzorna, motorička i/ili autonomna disfunkcija perifernih živaca, što se u nekim slučajevima može prezentirati teškim oblikom. Iako je u većini slučajeva reverzibilna, ipak može perzistirati mjesecima ili godinama nakon završetka terapije, što može negativno utjecati na kvalitetu života. Jedina strategija za rješavanje ove nuspojave je prilagodba doze ili prekid liječenja. Privremeni ili trajni prekid primjene BV-a treba razmotriti multidisciplinarni tim, ovisno o težini neurološkog oštećenja, statusa bolesti i dostupnosti alternativnih antitumorskih terapija (62,119).

1.9. SATB1 i Hodgkinov limfom

SATB1 (engl. *special AT-rich sequence-binding protein-1*) je transkripcijski regulator i organizator kromatina kojeg je prvi put opisao Dickins 1992. godine (120). Gen koji kodira SATB1 je smješten na kromosomu 3p23 (121). SATB1 ima mogućnost organizacije kromatina u petlje i djeluje kao mjesto za vezivanje brojnih enzima za modifikaciju kromatina i transkripcijskih čimbenika. SATB1 može regulirati i utjecati na izražaj više od 10 % ljudskih gena, uključujući i one koji su smješteni na udaljenim kromosomima, kao i one povezane s imunološkim odgovorom, staničnim metabolizmom, diferencijacijom, apoptozom, citoskeletom, proliferacijom stanica, staničnim ciklusom, popravkom DNA te brojnim signalnim putevima (120,122). SATB1 ima sposobnost aktivacije ili supresije više gena ovisno o posttranslacijskim modifikacijama, kao i sposobnost regulacije razine histonske metilacije i acetilacije bitne za diferencijaciju i apoptozu (123). SATB1 je važan za pravilan razvoj pluća, diferencijaciju i sazrijevanje timocita i epitelnih stanica kože tijekom embriogeneze. Zadnjih godina postoji veliki interes za proučavanje prognostičke uloge SATB1 u solidnim i hematološkim malignitetima. Pokazano je da je SATB1 negativan prognostički čimbenik u velikom broju solidnih tumora, poput karcinoma dojke, želudca, gušterače, jajnika, vrata maternice te kolorektalnog karcinoma. Također, visoki izražaj SATB1 u solidnim tumorima se povezuje sa slabom diferencijacijom i agresivnim fenotipom tumora, lošom prognozom kao i mogućim utjecajem na proces epitelno-mezenhimalne tranzicije u poticanju metastaziranja. Nasuprot tome, u određenim podtipovima karcinoma pluća povišen imunohistokemijski izražaj SATB1 pokazao se kao povoljan prognostički čimbenik, dok njegov nedostatak može negativno utjecati na OS (120).

Za razliku od solidnih tumora, SATB1 ima drugačiju ulogu u hematološkim malignitetima, potiskujući progresiju leukemija i limfoma, iako i dalje postoje nejasnoće i kontradiktornosti u dosadašnjim istraživanjima (124–129). Već je dobro poznata važna uloga SATB1 u razvoju i diferencijaciji limfocita T, gdje njegov smanjen izražaj može uzrokovati ozbiljnu imunodeficijenciju (124). Zbog navedenog je više studija proučavalo prognostičku ulogu SATB1 u kožnim T- staničnim limfomima (engl. *cutaneous T-cell lymphoma*, CTCL) koji uključuju mikoze fungoides (MF), Sezary sindrom (SS), limfomatoidnu papulozu (Lyp) i kožni anaplastični limfom velikih stanica (127). Smanjen je izražaj SATB1 u SS, agresivnom obliku CTCL-a. Dokazano je da smanjen izražaj *SATB1* putem regulacije FasL-a može imati ulogu u razvoju otpornosti na apoptozu u SS-u (128,130). Suprotno navedenom povećan izražaj SATB1 je pronađen u CTCL-u uključujući MF, CD30+ limfoproliferativni poremećaj (engl. *CD30-positive lymphoproliferative disorders*, CD30+ LPD) i anaplastičnom limfomu velikih

stanica pridruženom implantatima dojke (127). Više radova govori u prilog povoljnoj prognostičkoj vrijednosti SATB1 u CTCL-u (123,130,131). Suprotno navedenom, Wang i suradnici su proučavali ulogu SATB1 u kožnih CD30+ LPD, po učestalosti drugoj najčešćoj skupini kožnih T staničnih limfoma, a koja uključuje Lyp i kožni anaplastični limfom velikih stanica. Pokazali su da povećan izražaj SATB1 dovodi do utišavanja inhibitora staničnog ciklusa p21 direktnim vezivanjem na specifični lokus promotora gena *CDKN1A* (engl. *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) što upućuje na ulogu *SATB1* kao onkogen (129). Međutim, u daljnjim studijama pokazalo se da SATB1-pozitivni slučajevi CD30+ LPD u anaplastičnim limfocitima T pokazuju Th-17 citokinski profil, značajnu epidermalnu hiperplaziju s granulocitnim infiltracijama, ali boljim odgovorom na terapiju uključujući postizanje KR na kombiniranu terapiju metotreksatom i INF-2 α . Navedeno istraživanje dodatno ukazuje na heterogenost CD30+ LPD (132). Od preostalih CD30+ hematoloških maligniteta preostaje još kHL. Prema našim saznanjima postoji istraživanje u kojem je pokazan pojačan izražaj HLA klase I u EBV+ kHL slučajevima koji obrnuto korelira s imunohistokemijskim izražajem SATB1. U svom istraživanju nisu analizirali prognostički značaj SATB1 kod bolesnika s kHL-om (133). Među ostalim limfomima, posebno se ističe DLBCL, u kojem je povećana imunohistokemijski izražaj SATB1 neovisni prognostički čimbenik povezan s kraćim OS-om i PFS-om (125).

1.10. p16 i Hodgkinov limfom

p16 je poznat kao tumorsupresorski protein i član je obitelji inhibitora ciklin-ovisnih kinaza (engl. *cyclin-dependent kinase*, CDK). Njegova ključna uloga kao negativnog regulatora staničnog ciklusa obuhvaća kontrolu apoptotskog puta, zaustavljanje staničnog ciklusa u G1-fazi te regulaciju staničnog starenja (134). *p16* gen je smješten na kromosomu 9p21 i kodira dva proteina: p16 INK4A i p14 ARF. p16 INK4A se veže na CDK4 i CDK6 te na taj način sprječava fosforilaciju retinoblastomskog proteina (pRB) koji u hipofosforiliranom stanju djeluje kao negativni regulator staničnog ciklusa stvarajući komplekse s transkripcijskim čimbenikom E2F1. Nasuprot tome, kada kompleks ciklin D1/CDK fosforilira pRB, on postaje inaktivan oslobađajući E2F1 čime se omogućava prijelaz staničnog ciklusa iz G1 u S-fazu (135). Neregulirana fosforilacija pRB-a putem CDK4/6, uslijed gubitka funkcije p16INK4A, mutacija u genu *Rb1* ili prekomjernog izražaja ciklina D1, dovodi do poremećaja njegove ključne funkcije, što rezultira nekontroliranom proliferacijom stanica i razvojem tumora. Tri različita mehanizma inaktivacija gena *p16INK4A* koja uključuju homozigotne delecije,

hipermetilacije ili mutacije mogu dovesti do utišavanja gena *p16INK4A* ili gubitka izražaja njegovog proteina (135).

Pojedine studije opisale su povezanost između gubitka p16 i ishoda bolesnika s HL-om. Calio i suradnici su u svom istraživanju pokazali da su povišene razine proteina p16 i p21 neovisni prognostički čimbenici te da imaju važnu zaštitnu ulogu u prevenciji relapsa (136). Suprotno tome, Guenova nije utvrdio statistički značajnu povezanost između prognoze i visokog izražaja p16 u kHL-u (136). S obzirom na to da je EBV prisutan u HRS-ama u 30 – 96 % slučajeva te da može utjecati na stanični ciklus i regulaciju apoptoze, brojne studije istraživale su njegovu povezanost s izražajem p16. Međutim, postoje oprečni rezultati o povezanosti EBV-a i izražaja p16 u kHL-u (137). S druge strane, prekomjerni izražaj p16 opisan je u malignim tumorima, pokazujući nekontroliranu staničnu proliferaciju, što se može objasniti negativnom povratnom spregom između pRB-a i p16INK4-a (138). U slučaju HL-a, pokazano je da je gubitak pRB-a loš prognostički čimbenik (139). Međutim, do danas nijedna studija o HL-u nije istražila povezanost između imunohistokemijskog izražaja p16 i SATB1.

U našem retrospektivnom istraživanju po prvi put smo ispitali obrasce imunohistokemijskog izražaja SATB1 i p16, njihovu povezanost s kliničko-patološkim podacima, kao i njihov mogući prognostički značaj u HL-u. Implementacija kombinacije navedenih biljega u bolesnika s HL-om u svakodnevnoj praksi mogla bi se identificirati podskupina bolesnika s najpovoljnijom prognozom bolesti što bi dalo prostora za personaliziraniji klinički pristup liječenja ove skupine bolesnika. Skupina bolesnika s najpovoljnijim ishodom mogla bi biti liječena terapijom manjeg inteziteta s kojim se ne ugrozila učinkovitost liječenja, a istovremeno bi se smanjila mogućnost pojave kasnih komplikacija liječenja.

1.11. Omjer trombocita/limfocita i Hodgkinov limfom

Iako je HL bolest dobre prognoze, određen postotak bolesnika će u jednom trenutku doživjeti relaps ili neće odgovoriti na incijalnu terapiju. Već su dobro poznati prognostički zbrojevi za rani i uznapredovali stadij bolesti koji imaju svoje prednosti i nedostatke. Stratifikacija rizika u ranom stadiju bolesti HL-a je ključna, pogotovo u eri deskalacije terapije gdje se strategija terapije vođena PET-om pokazala nedovoljnom. Klinička ispitivanja pokazala su da je 18 – 24 % bolesnika s negativnim PET2 nalazom doživjelo progresiju bolesti ili recidiv. Iz navedenog proizlazi da negativan PET2 ne jamči izlječenje te da nije dovoljan za predviđanje ishoda liječenja ako se samostalno koristi. U uznapredovalom stadiju bolesti koristi se IPS zbroj kojim se ne može identificirati bolesnike s visokim rizikom od progresije/relapsa, budući da 5

- godišnji period do progresije bolesti (engl. *freedom from progression*, FFP) iznosi više od 50 % u bolesnika s najvišim rizikom (140,141). Stoga, javlja se potreba za otkrivanjem novih prognostičkih biomarkera koji bi trebali biti lako dostupni, isplativi i neinvazivni te uz kombinaciju s PET-om poboljšati stratifikaciju rizika kojim bi se identificirala skupina bolesnika koji bi mogli imati koristi od intenziviranog režima liječenja ili one koji će vjerojatno biti izliječeni smanjenim intenzitetom terapije.

U zadnje vrijeme se sve više istražuje prognostička vrijednost staničnih komponenti periferne krvi poput omjera trombocita/limfocita (engl. *platelet/lymphocyte ration*, PLR) koji se pokazao značajnim u hematološkim malignitetima. Dosadašnjim istraživanjima je dokazano da trombociti pridonose angiogenezi tumora, kao i metastaziranju, a bitni su i u stvaranju upale povezane s tumorom. Limfopenija je pokazatelj oštećene imunološke funkcije domaćina (141). U ranom stadiju bolesti HL-a, dokazano je da $PLR \geq 266$ povezan s lošijim FFP-om (142). Također, istraživao se i u uznapredvalom stadiju HL-a gdje je također pokazano da je visok PLR (≥ 245) pokazatelj lošijeg FFP-a i PFS-a. Istraživan je i u ostalim limfomima poput DLBCL-u i T staničnim limfomima gdje se također definirao kao pokazatelj loše prognoze bolesti (141).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Ciljevi istraživanja

Glavni ciljevi istraživanja:

1. Ispitati prognostičku vrijednost imunohistokemijskog izražaja SATB1 i p16 proteina putem analize ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez progresije bolesti (PFS) u bolesnika s HL-om.
2. Identificirati podskupinu bolesnika s HL-om koji imaju najpovoljniji ishod bolesti na temelju kombinacije bijega SATB1 i p16.
3. Ispitati prognostičku vrijednost laboratorijskog omjera PLR-a putem analize OS-a i PFS-a u bolesnika s HL-om.

Sporedni ciljevi istraživanja:

1. Analizirati korelaciju imunohistokemijskog izražaja SATB1 i p16 proteina s kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika s HL-om.
2. Ispitati korelaciju imunohistokemijskog izražaja SATB1 i p16 proteina s odgovorom na prvu liniju kemoterapije u bolesnika s HL-om.
3. Ispitati korelaciju laboratorijskom omjera PLR-a s kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika s HL-om.

2.2. Hipoteze

U bolesnika s HL-om imunohistokemijski izražaj SATB1 pokazuje značajnu pozitivnu korelaciju s ukupnim preživljenjem (OS).

U bolesnika s HL-om imunohistokemijski izražaj SATB1 pokazuje značajnu pozitivnu korelaciju s preživljenjem bez progresije (PFS).

U bolesnika s HL-om imunohistokemijski izražaj p16 nema utjecaja na OS i PFS.

Postoji značajna razlika u prognozi između podskupina bolesnika kada se stratificiraju prema kombinaciji biljega SATB1 i p16.

Više vrijednosti PLR-a povezane su s kraćim ukupnim preživljenjem (OS) i kraćim preživljenjem bez progresije bolesti (PFS).

3. METODE I MATERIJALI ISTRAŽIVANJA

3.1. Ustroj istraživanja

Ovo 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, citologiju i sudsku medicinu i Kliničkom zavodu za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Split (KBC 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 (143) te uz suglasnost i odobrenje od strane Etičkog povjerenstva KBC-a Split (KLASA: 500-03/19-01/04, URBROJ: 2181-147-01/06/M.S.-19 - 2, od 31. siječnja 2019.).

3.2. Ispitanici

U studiju je uključeno ukupno 86 bolesnika s predhodno histološko potvrđenom dijagnozom HL prema WHO dijagnostičkim kriterijima od strane patologa u razdoblju od 10. siječnja 2008. do 6. prosinca 2018. godine. kHL se podijelio u sljedeće podskupine: NS (N = 60), MC (N = 20), LRHL (N = 4) i LDHL (N = 1). Imali smo samo jedan slučaj NLPHL. Od 86 ispitanika bilo je ukupno 39 muškaraca (45,3 %) i 47 žena (54,7 %). Parafinski blokovi prikupljeni su iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split. Klinički podatci o spolu, dobi, datumu dijagnoze, histološkom tipu HL, kliničkom stadiju bolesti (I - IV) po Ann Arbor klasifikaciji, laboratorijskim parametrima te prognostičkim zbrojevima EORTC i GHSG (za rani stadij bolesti I/II) te IPS zbroj (za uznapredovali stadij bolesti III/IV) incijalno pri dijagnozi prikupljeni su iz računalne povijesti bolesti Zavoda za hematologiju KBC-a Split. Predterapijska evaluacija je uključivala klinički pregled, laboratorijske nalaze, slikovnu dijagnostiku (CT pluća i abdomena) te u zadnje vrijeme PET/CT, biopsiju koštane srži i UZV srca radi procjene srčane funkcije. Iz kompletne krvne slike izračunali smo omjer PLR-a pri dijagnozi koji se dobio tako da se apolutni broj trombocita podijelio s apsolutnim brojem limfocita. Također se procijenjivala sposobnost svakog bolesnika za podnošenje terapije koristeći ECOG zbroj (engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*) (144,145). "Bulky" tumorska masa se definirala kao abdominalna ili medijastinalna masa veličine ≥ 10 cm ili veća od jedne trećine unutarnjeg poprečnog promjera prsnog koša. Bolesnici su bili liječeni sljedećim kemoterapijskim protokolima u prvoj liniji: ABVD, eBEACOPP, COPP, MOPP sa ili bez radioterapije ovisno o stadiju bolesti, ECOG zbroju i komorbiditetima. Nakon završene terapije slijedila je procjena odgovora. Odgovor na terapiju

procijenjen je kao kompletna remisija (KR) u slučaju odsutnosti bilo kakvih kliničkih, subjektivnih 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 povećanjem postojećih lezija ili pojavom novih (136). Kliničko praćenje bolesnika se provodilo prema smjernicama svaka 3 mjeseca prve dvije godine, potom svako 6 mjeseci slijedeće 3 godine i nakon toga jednom godišnje. Praćenje bolesnika se provodilo putem Dnevne bolnice hematologije ili na Poliklinici. Tijekom svakog posjeta uzimala se detaljna anamneza uz fizikalni pregled s ciljem isključenja relapsa i komplikacija povezanih s terapijom. Podaci o kliničkom tijeku bolesti i preživljenju su naknadno prikupljeni korištenjem dostupne medicinske dokumentacije Zavoda za hematologiju KBC-a Split. OS je izračunat od datuma početka liječenja do datuma smrti ili na posljednji dan praćenja kada je ishod cenzoriran kao živ ili mrtav. PFS je izračunat od datuma početka liječenja do datuma relapsa ili na posljednji dan praćenja kada je ishod cenzoriran kao relapsirao ili bez relapsa. Od inicijalno 90 bolesnika s histološki potvrđenom dijagnozom HL-a, 86 je uključeno u istraživanje.

Kriteriji uključanja:

1. Dob iznad 18 godina
2. Histološki potvrđena dijagnoza HL-a
3. Potpuna medicinska dokumentacija

Kriteriji isključenja:

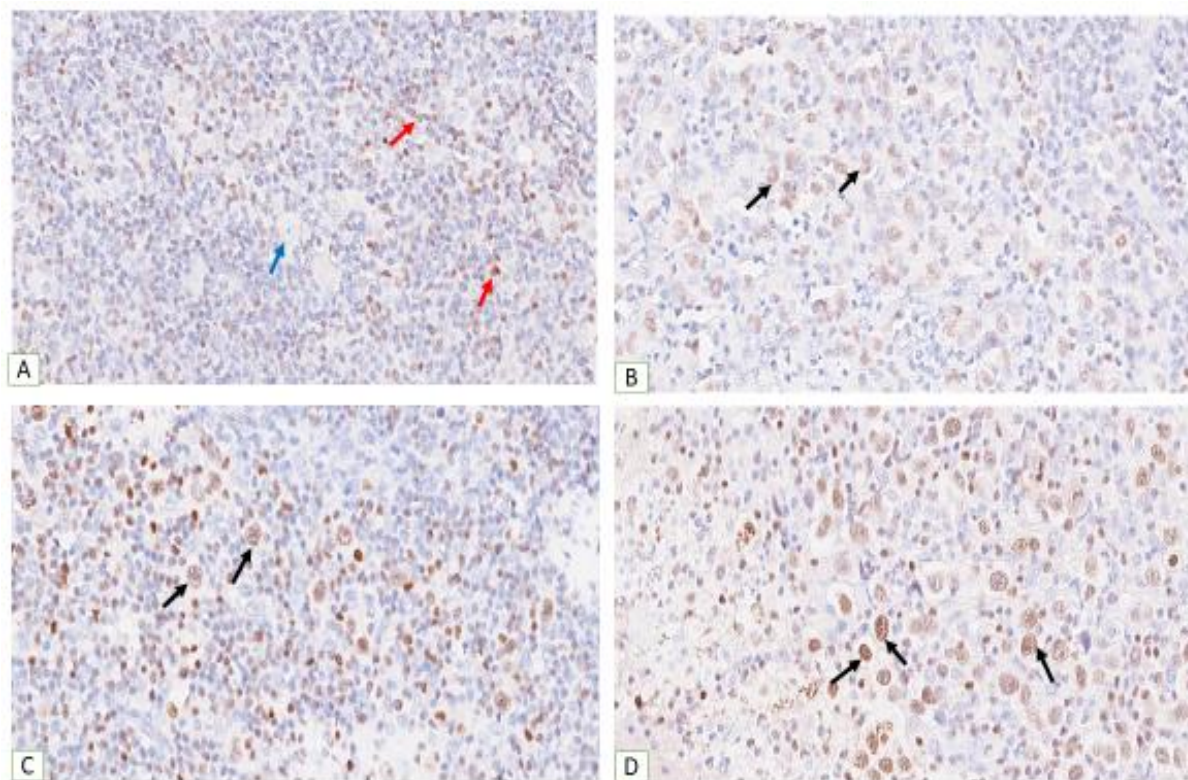
1. Sinkrona druga maligna ili hematološka bolest
2. Bolesnici prethodno liječeni kemoterapijom i/ili radioterapijom
3. Nepotpuna medicinska dokumentacija
4. Nesigurna medicinska dijagnoza limfoma

3.3. Imunohistokemijsko bojenje

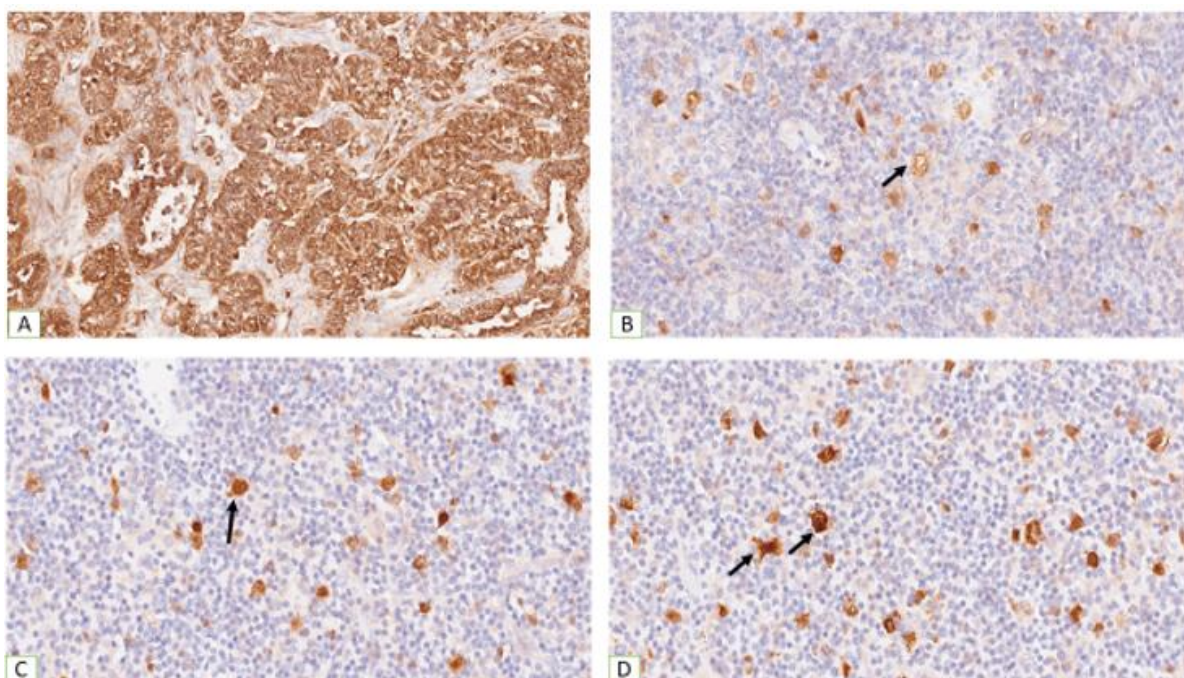
Na Zavodu za sudsku medicinu, citologiju i patologiju KBC-a Split napravljeni su rezovi tkiva debljine 4 mikrometara iz parafinskih blokova limfnih čvorova. Rezovi za imunohistokemijsku analizu fiksirani su 30 minuta na grijaćoj ploči pri 60 stupnjeva Celzija. Cijeli imunohistokemijski postupak proveden je na uređaju Ultra Benchmark (IHC/ISH modul za bojanje, Ventana, Tucson, AZ, SAD) prema uputama proizvođača. Navedeni postupci uključivali su deparafinizaciju, rehidraciju, povratak antigena kuhanjem u ultra CC1 puferu, inkubaciju s protutijelima, korištenje detekcijskog kita (UltraView Universal DAB Detection Kit, Ultra Benchmark, Tucson, Arizona, SAD) te bojenje s hematoksilinom. Za

imunohistokemijsko bojenje koristila su se sljedeća primarna protutijela: mišje monoklonalno protutijelo p16 INK 4a (klon JC8; Santa Cruz Biotechnology; razrjeđenje 1:100) i mišje monoklonalno protutijelo SATB1 (klon C6; Santa Cruz Biotechnology; razrjeđenje 1:100). Na istom Zavodu provodila se i kvalitativna evaluacija p16 i SATB1 u HRS-ama pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX46, Tokyo, Japan) na nasumično odabranih 10 vidnih polja pod ukupnim povećanjem 400x. Evaluaciju su neovisno proveli patolog, specijalizant patologije te sama pristupnica. Analizirana su samo polja s prisutnošću HRS u tumorskom mikrookolišu, dok su periferni dijelovi limfnog čvora zanemareni. Pozitivna kontrola za SATB1 bila je reaktivni mikrookoliš (limfociti) (**Slika 6 A**, crvena strelica). HRS stanice smatrane su pozitivnima na SATB1 ako je bojenje bilo prisutno u citoplazmi i/ili jezgri. Za procjenu imunohistokemijskog izražaja SATB1 koristili smo Imunoreaktivni skor (IRS) prema Stengeru, koji se dobiva množenjem intenziteta bojenja (SI) s postotkom pozitivnih stanica (PP) (146,147). Ocjenjivanje intenziteta bojenja HRS-pozitivnih stanica izvedeno je na sljedeći način: negativno – 0 bodova; slabo (blijedo žuto) – 1 bod; umjereno (žuto-smeđe) – 2 boda; i jako (tamno smeđe) – 3 boda (**Slika 6B – D**, crna strelica). Pozitivne HRS-e ocjenjivane su na sljedeći način: 0 – 9 % je 1 bod; 10 – 50 % je 2 boda; i > 50 % je 3 boda. Ako je rezultat dobiven množenjem dvaju spomenutih skorova bio 1 ili manji, to je predstavljalo negativni imunohistokemijski izražaj SATB1 ili smanjen/odsutni imunohistokemijski izražaj. Ako je rezultat bio veći od 1, to je predstavljalo pozitivan imunohistokemijski izražaj SATB1.

Humani karcinom vrata maternice korišten je kao pozitivna kontrola za p16 (**Slika 7 A**). HRS stanice smatrane su pozitivnima na p16 ako je bojenje bilo prisutno u citoplazmi i/ili jezgri (**Slika 7 B – D**). Evaluacija prisutnosti pozitivnog imunohistokemijskog izražaja p16 (INK4a) ocjenjivana je na sljedeći način: negativno (skor 0), odsutnost imunohistokemijskog izražaja ili prisutnost u manje od 10 % pozitivnih HRS stanica; nisko (skor 1), 10 % – do 29 % pozitivnih HRS stanica; umjereno (skor 2), 30 % – 59 % pozitivnih HRS stanica; i visoko (skor 3), $\geq 60\%$ pozitivnih HRS stanica (136).

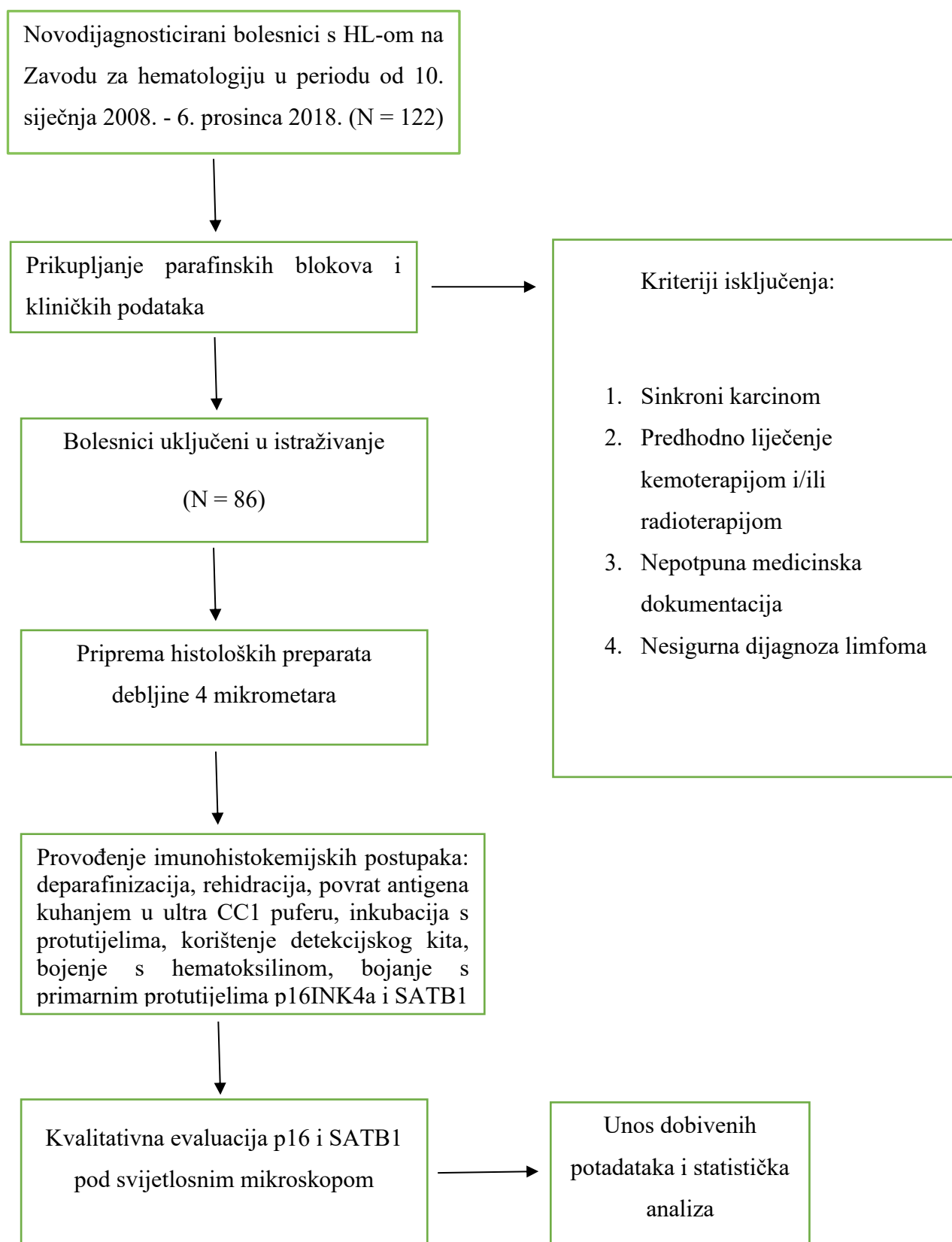


Slika 6. Imunohistokemijska analiza intenziteta bojanja SATB1 u Hodgkin/Reedstenbergovim stanicama (HRS) u vidnom polju 400x: **(A)** klasični Hodgkinov limfom (kHL) bez nuklearnog bojenja SATB1 u HRS stanicama (plava strelica) s pozitivnim unutarnjom kontrolom reaktivnim limfocitima (crvena strelica). **(B)** kHL s slabo pozitivnim bojanjem SATB1 u HRS (crna strelica). **(C)** kHL s umjereno pozitivnim bojanjem SATB1 u HRS (crna strelica). **(D)** kHL s jako pozitivnim bojanjem SATB1 u HRS (crna strelica). Slika je djelo autora.



Slika 7. (A) Imunohistokemijski izražaj p16 u humanom karcinomu vrata maternice (pozitivna kontrola), Pozitivni imunohistokemijski izražaj p16 u Hodgkin/Reedstenbergovim stanicama klasičnog Hodgkinovog limfoma u vidnom polju 400x (crna strelica): **(B), (C), (D)**. Slika je djelo autora.

3.4. Dijagram tijeka



3.5. Transkriptomska analiza

Podaci za transkriptomsku analizu preuzeti su iz baze podataka Gene Expression Omnibus (GEO), GEO Accession Viewer (nih.gov). Učitali smo ih u web platformu GenePattern pomoću GEO alata za daljnju analizu. Za definiranje genetskih potpisa korištena je baza podataka Molecular Signature Database s Gene Ontology skupovima (C5) (GSEA | MSigDB | Browse Human Gene Sets, gsea-msigdb.org.). Nadalje, provedena je analiza obogaćenja skupa gena za pojedinačne uzorke (engl. “*single-sample Gene Set Enrichment Analysis, ssGSEA*”) s rangiranom normalizacijom pomoću alata ssGSEA, čiji su izlazni podaci dodatno statistički analizirani, kako je opisano u prethodnom pododjeljku

3.6. Statistička analiza podataka

Kategorijski podaci su prikazani kao postotci (%) i brojevi; kontinuirani podaci su prikazani kao medijani i interkvartilni rasponi. Podaci o vremenu do događaja modelirani su pomoću jednadžbe eksponencijalnog opadanja do plato faze ($S(t) = [S(t_0) - S(P)] \cdot e^{-kt} + S(P)$, $S(t)$ – vjerojatnost preživljenja u trenutku t , $S(t_0)$ – vjerojatnost preživljenja na početku istraživanja, $S(P)$ – vjerojatnost preživljenja na plato fazi; k iz koje se može izračunati poluživot). Kako bi se utvrdilo može li imunohistokemijski izražaj proučavanih biljega stratificirati proučavanu kohortu, uspoređen je ništični model, u kojem jedna krivulja preživljenja opisuje sve subpopulacije, s modelom u kojem svaka subpopulacija ima svoju krivulju preživljenja. Usporedba modela provedena je korištenjem Akaikieovog informacijskog kriterija (AIC), F-testa i standardnih dijagnostičkih alata za modele. Nesigurnost u procjeni parametara izražena je kao standardna pogreška (tj. 68 % interval pouzdanosti). Za kvantifikaciju korelacije između biljega i unaprijed odabranih ekspresijskih potpisa gena korištena je ortogonalna regresija “engl. *Reduced Major Axis (RMA)*”. Korišteni su softveri GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Boston, MA, SAD) i Past4. Više od dvije neovisne varijable su analizirane koristeći ANOVA test. Korelacija se procjenjivala Spearmanovom procedurom.

4. REZULTATI

4.1. Kliničko-patološke karakteristike bolesnika

U retrospektivnu studiju uključeno je ukupno 86 bolesnika s prethodno histološki potvrđenim HL-om. Raspodjela demografskih i kliničko-patoloških varijabli prikazana je u **Tablici 4**. Omjer muškaraca i žena bio je otprilike jednak, dok je medijan dobi iznosio 41 godinu (raspon: 28 – 55 godina). Većina bolesnika imala je bolest u II stadiju, a najčešći histološki tip bila je NS. Više od polovice bolesnika imalo je B simptome, približno petina bolesnika imala je ektranodalnu ili opsežnu bolest, a tri četvrtine bolesnika imalo je ECOG zbroj 0. Približno 80 % bolesnika liječeno je ABVD protokolom, 10 % COPP protokolom, a 5 % nekim oblikom BEACOPP protokola; preostalih 5 % bolesnika liječeno je kombinacijom triju navedenih protokola. Osim kemoterapije, 42 % bolesnika primilo je i radioterapiju. Medijan praćenja iznosio je 50 mjeseci, s rasponom 1 – 197 mjeseci.

Tablica 4. Demografske i kliničko-patološke karakteristike bolesnika (N = 86)

Parametar	Vrijednost
Ukupan broj bolesnika	86
dob (godine, medijan), IQR ^a (godine)	41 (28 - 55)
spol (N %)	
žene	47, 54.7 %
muškarci	39, 45.3 %
Histološki tip (N, %)	
miješana celularnost	20, 23.3 %
nodularna skleroza	60, 69.8 %
ostali	6, 6.9 %
Klinički stadij (N, %)	
I	9, 10.5 %
II	42, 48.8 %
III	16, 18.6 %
IV	19, 22.1 %
+ ektranodalna lokalizacija (N, %)	15, 17.4 %
+ B simptomi (N, %)	54, 62.3 %
+ bulky disease (N, %)	15, 17.4 %
EORCT ^b zbroj (za stadij I & II, N, %)	
0	13, 25.5 %
1	15, 29.4 %
2	16, 31.4 %
3	7, 13.7 %
GHS ^c zbroj (za stadij I & II, N, %)	
0	12, 23.5 %
1	15, 29.4 %
2	18, 35.3 %
3	6, 11.7 %
IPS ^d zbroj (za stadij III & IV, N, %)	
1	8, 22.9 %
2	10, 28.6 %
3	12, 34.3 %
4	2, 5.7 %
5	3, 8.6 %
ECOG ^e zbroj (N, %)	
0	64, 74.4 %
1	18, 20.9 %
2	4, 4.7 %

^a Interkvartilni raspon^b Od engl. *European Organization for the Research and Treatment of Cancer*^c Od engl. *German Hodgkin's Study Group*^d Od engl. *International Prognostic Score*^e Od engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*

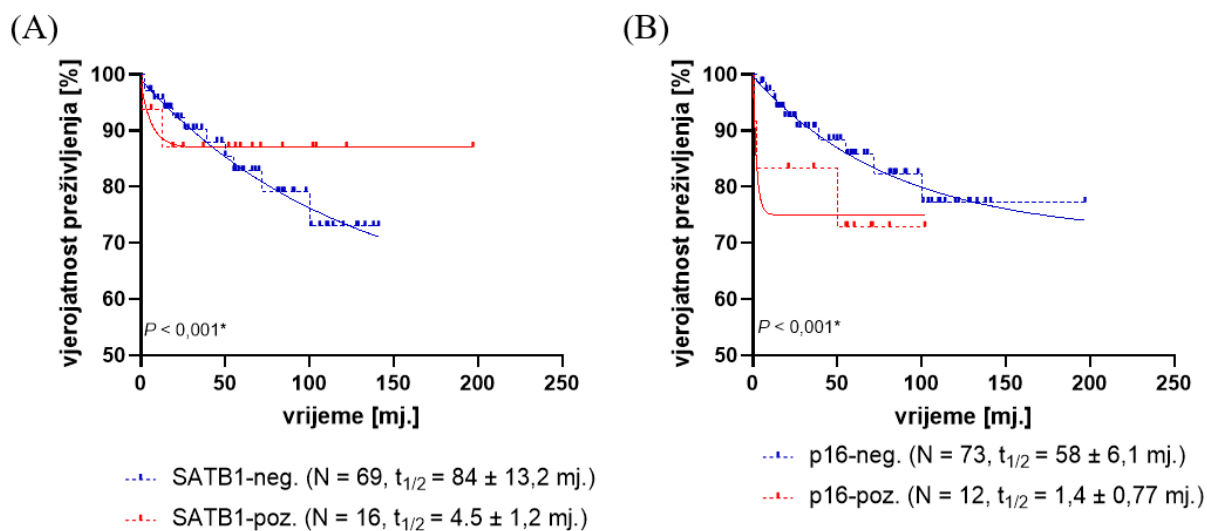
4.2. Imunohistokemijski izražaj proteina SATB1 povezan je s povoljnijom prognozom

Imunohistokemijski izražaj proteina SATB1 bio je pozitivan u 21 % (N = 16) bolesnika (**Slika 6 B-D**), a razina imunohistokemijskog izražaja SATB1 određena je prema prethodno opisanom bodovanju. Imunohistokemijski izražaj SATB1 omogućio je stratifikaciju bolesnika prema ukupnom preživljenju (OS, $P < 0.001$, $\Delta AIC = 148.9$, $ER > 100$; **Slika 8 A**) i preživljenju bez progresije bolesti (PFS, $P < 0.001$, $\Delta AIC = 194.5$, $ER > 100$; **Slika 9 A**).

Skupina bolesnika pozitivnih na imunohistokemijski izražaj SATB1 karakterizirana je poluživotom populacije od $4,5 \pm 1,2$ mjeseca te postizanjem platoa preživljenja na razini od 87 ± 1 % (**Slika 8 A**). Nasuprot tome, skupina bolesnika negativnih na SATB1 pokazala je znatno dulji poluživot populacije od $84 \pm 13,2$ mjeseca, međutim, tijekom praćenja nije opažen plato preživljenja - posljednja zabilježena vjerojatnost preživljenja iznosila je 72 % nakon 12 godina praćenja. S druge strane, ekstrapolacija iz eksponencijalnog modela s platoom predviđa postizanje stabilizacije vjerojatnosti preživljenja na razini od $58 \pm 0,4$ %.

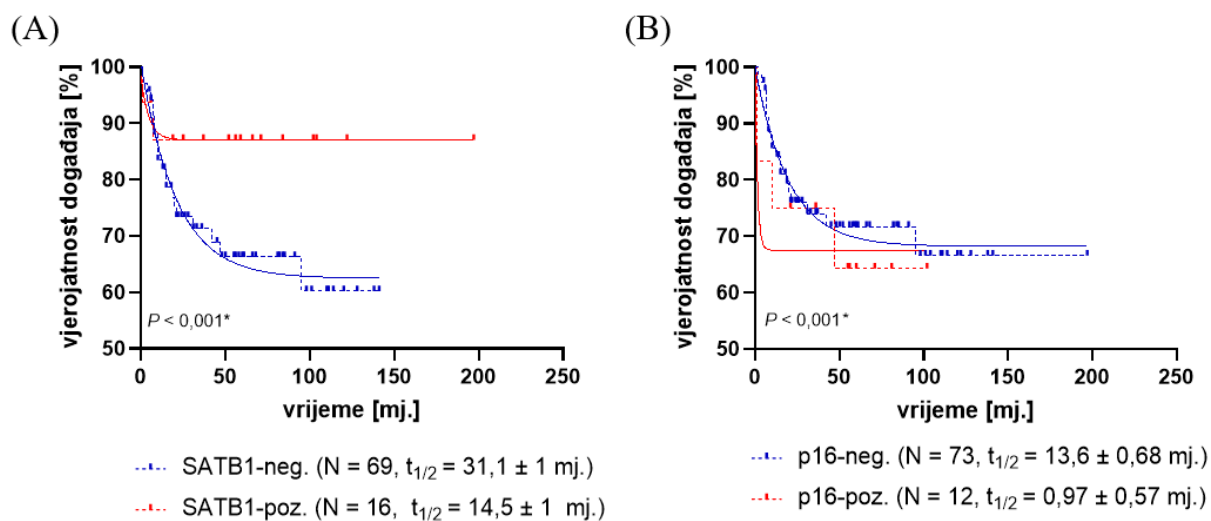
Analiza preživljenja bez progresije bolesti pokazala je da skupina bolesnika pozitivnih na imunohistokemijski izražaj SATB1 imala je stopu relapsa obilježenu poluživotom od $14,5 \pm 1$ mjeseci, a vjerojatnost relapsa se stabilizirala na platou od 87 ± 1 %. S druge strane, bolesnici negativni na SATB1 imali su sporiju stopu relapsa s poluživotom od $31,1 \pm 1$ mjesec, te su na kraju dostigli plato s vjerovatnošću relapsa od $62 \pm 0,5$ % (**Slika 9 A**).

Imunohistokemijski izražaj SATB1 nije stratificirao bolesnike ni prema jednoj drugoj kliničkoj ili patološkoj varijabli (**Tablica 5**). Također, nije dokazana korelacija s odgovorom na prvu liniju kemoterapije (**Tablica 5**).



Slika 8. Kaplan–Meierova analiza ukupnog preživljenja (OS) za **(A)** SATB1 i **(B)** p16. $t_{1/2}$, vrijeme poluživota populacije. Slika je djelo autora.

* F test



Slika 9. Kaplan–Meierova analiza vjerojatnosti događaja tj. preživljenja bez progresije bolesti (PFS) za **(A)** SATB1 i **(B)** p16. $t_{1/2}$, vrijeme poluživota populacije. Slika je djelo autora.

* F test

Tablica 5. Korelacija imunohistokemijskog izražaja SATB1 s kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika s Hodgkinovim limfom pri dijagnozi i odgovorom na prvu liniju kemoterapije.

Parametar	SATB1-	SATB1+	P vrijednost
Broj bolesnika	70	16	
dob (godine, medijan), IQR ^a (godine)	36,5 (27,5 - 52)	50,5 (30 - 64,5)	0,242*
spol (N, %)			0,011†
žene	27, 38.6 %	12, 75 %	
muškarci	43, 61.4 %	4, 25 %	
histološki tip (N, %)			0,472†
miješana celularnost	16, 22.9 %	4, 25 %	
nodularna skleroza	50, 71.4 %	10, 62.5 %	
ostalo	4, 5.7 %	2, 12.5 %	
klinički stadij (N, %)			0,092†
I	9, 12.9 %	0, 0 %	
II	42, 51.4 %	6, 37.5 %	
III	16, 14.3 %	6, 37.5 %	
IV	19, 21.4 %	4, 25 %	
+ ektranodalna lokalizacija (N, %)	11, 15.7 %	4, 25 %	0,465†
+ B simptomi (N, %)	43, 61.4 %	5, 68.8 %	0,775†
+ bulky disease (N, %)	12, 17.2 %	3, 18.8 %	0,999†
EORCT ^b zbroj (za stadij I & II, N %)			0,572 ‡
0	13, 28.9 %	0, 0 %	
1	12, 26.7 %	3, 50 %	
2	13, 28.9 %	3, 50 %	
3	7, 15.5 %	0, 0 %	
GHSG ^c zbroj (za stadij I & II, N, %)			0,398 ‡
0	12, 26.7 %	0, 0 %	
1	13, 28.9 %	2, 33.3 %	
2	14, 31.1 %	4, 66.7 %	
3	6, 13.3 %	0, 0 %	
IPS ^d zbroj (za stadij III & IV, N, %)			0,866 ‡
1	5, 20 %	3, 30 %	
2	9, 36 %	1, 10 %	
3	7, 28 %	4, 50 %	
4	2, 8 %	0, 0 %	
5	2, 8 %	1, 10 %	
ECOG ^e zbroj (N, %)			0,572 ‡
0	53, 75.7 %	11, 68.7 %	
1	13, 18.6 %	5, 31.3 %	
2	4, 5.7 %	0, 0 %	
Odgovor na prvu liniju KTx ^f . (N, %)			0,770†
KR ^g	60, 87 %	11, 85 %	
PR ^h	6, 8.7 %	0, 0 %	
PB ⁱ	3, 4.3 %	2, 15 %	

* t- test, † Fisher's exact test, ‡ Mann - Whitney test

^a Interkvartilni raspon

^b Od engl. *European Organization for the Research and Treatment of Cancer*

^c Od engl. *German Hodgkin's Study Group*

^d Od engl. *International Prognostic Score*

^e Od engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*

^f Konvencionalna kemoterapija

^g Kompletna remisija

^h Progresija bolesti

ⁱ Parcijalna remisija

4.3. Imunohistokemijski izražaj p16 nije značajan indikator dugoročne prognoze

Imunohistokemijski pozitivan izražaj p16 uočen je kod 15 % ($N = 12$) bolesnika (**Slika 7 B-D**). Stratifikacija bolesnika prema izražaju p16 pokazala je statistički značajnu povezanost s OS-om ($P < 0.001$, $\Delta AIC = 109.3$, $ER > 100$; **Slika 8 B**) i PFS-u ($P < 0.001$, $\Delta AIC = 30.65$, $ER > 100$; (**Slika 9 B**).

Skupina bolesnika s pozitivnim p16 izražajem imala je medijan preživljenja od $1,4 \pm 0,77$ mjeseci te vjerovatnost preživljenja na platou od $75 \pm 1,3$ %. Skupina bolesnika koji su bili negativni na imunohistokemijski izražaj p16 imali su značajno dulji poluživot od $58 \pm 6,1$ mjeseci, te vrlo sličnu vjerovatnost preživljenja s platoom od $71 \pm 1,4$ % (**Slika 8 B**).

Slično OS-u, bolesnici s pozitivnim imunohistokemijskim izražajem p16 imali su bržu stopu relapsa (PFS poluživot = $0,97 \pm 0,57$ mjeseci) u usporedbi s bolesnicima koji su imali negativan imunohistokemijski izražaj p16 (PFS poluživot = $13,6 \pm 0,68$ mjeseci). Međutim, vjerojatnost relapsa stabilizirala se na gotovo identičnom platou u obje skupine, iznoseći $68 \pm 0,5$ % za p16-negativne bolesnike i 67 ± 2 % za p16-pozitivne bolesnike (**Slika 9 B**).

Imunohistokemijski izražaj p16, kao ni imunohistokemijski izražaj SATB1, nije pokazao značajnu povezanost s drugim kliničkim ili patološkim parametrima (**Tablica 6**). Također, nije utvrđena korelacija između imunohistokemijskog izražaja p16 i odgovora na prvu liniju kemoterapije (**Tablica 6**).

Tablica 6. Korelacija imunohistokemijskog izražaja p16 s kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika s Hodgkinovim limfom pri dijagnozi i odgovorom na prvu liniju kemoterapije.

Parametar	p16-	p16+	P vrijednost
Broj bolesnika	74	12	
dob (godine, medijan), IQR ^a (godine)	42 (28,7 – 56,8)	31,5 (20,7 - 52)	0,165*
spol (N, %)			0,999†
žene	34, 49 %	5, 41.7 %	
muškarci	40, 54 %	7, 58.3 %	
histološki tip (N, %)			0,999†
miješana celuarnost	17, 22.9 %	3, 25 %	
nodularna skleroza	52, 71.4 %	8, 62.5 %	
ostalo	5, 5.7 %	1, 12.5 %	
klinički stadij (N, %)			0,572†
I	9, 12.1 %	0, 0 %	
II	35, 47.3 %	7, 58.3 %	
III	14, 18.9 %	2, 16.7 %	
IV	16, 21.6 %	3, 16.7 %	
+ ektranodalna lokalizacija (N, %)	13, 15.7 %	2, 25 %	0,999†
+ B simptomi (N, %)	47, 63.5 %	7, 58.3 %	0,755†
+ bulky disease (N, %)	12, 16.2 %	3, 25 %	0,431†
EORCT ^b zbroj (za stadij I & II, N, %)			0,688‡
0	11, 25 %	2, 28.6 %	
1	13, 29.5 %	2, 28.5 %	
2	13, 29.5 %	3, 42.8 %	
3	7, 15.9 %	0, 0 %	
GHSG ^c zbroj (za stadij I & II, N, %)			0,945‡
0	10, 22.7 %	2, 28.6 %	
1	14, 31.8 %	1, 14.3 %	
2	14, 31.8 %	4, 57.1 %	
3	6, 13.7 %	0, 0 %	
IPS ^d zbroj (za stadij III & IV, N, %)			0,396‡
1	6, 20 %	2, 40 %	
2	9, 30 %	1, 20 %	
3	10, 33.3 %	2, 40 %	
4	2, 6.7 %	0, 0 %	
5	3, 10 %	0, 0 %	
ECOG ^e zbroj (N, %)			0,461‡
0	54, 72.9 %	10, 83.3 %	
1	16, 21.6 %	2, 16.7 %	
2	4, 5.4 %	0, 0 %	
Odgovor na prvu liniju KT ^f (N, %)			0,752†
KR ^g	61, 87.1 %	10, 83.3 %	
PR ^h	3, 4.3 %	0, 0 %	
PB ⁱ	6, 8.6 %	2, 16.7 %	

* t-test, † Fisher's exact test, ‡ Mann-Whitney

^a Interkvartilni raspon

^b Od engl. *European Organization for the Research and Treatment of Cancer*

^c Od engl. *German Hodgkin's Study Group*

^d Od engl. *International Prognostic Score*

^e Od engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*

^f Konvencionalna kemoterapija

^g Kompletna remisija

^h Progresija bolesti

ⁱ Parcijalna remisija

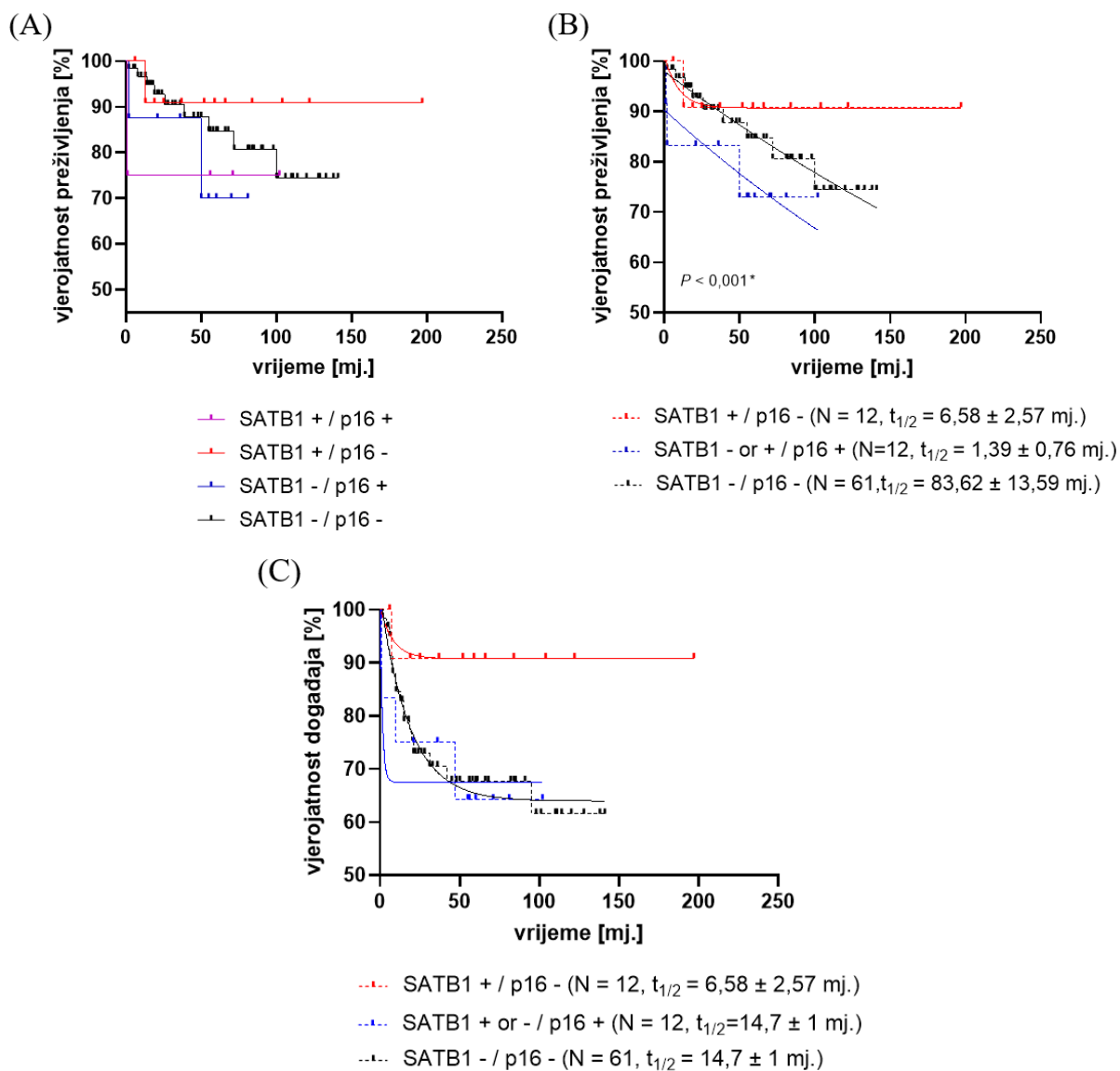
4.4. Bolesnici SATB1+/p16- imaju najpovoljniju prognozu

Kombinirana analiza imunohistokemijskog izražaja SATB1 i p16 omogućila je stratifikaciju bolesnika u četiri prognostičke skupine, redom: SATB1+/p16-, SATB1-/p16-, SATB1+/p16+, SATB1-/p16+. Zbog malog broja slučajeva u skupinama SATB1+/p16+ (N = 8) i SATB1-/p16+ (N = 4), one su grupirane u jednu p16+ kategoriju radi preciznijeg statističkog modeliranja OS-a i PFS-a.

Podjela ispitivane populacije u tri podskupine temeljene na imunohistokemijskom izražaju SATB1 i p16 rezultirala je jednostavnijim i preciznijim modelom u usporedbi s modelom koji nije uzimao u obzir te informacije u OS-u ($P < 0.001$, $\Delta AIC = 147.9$, $ER > 100$). Bolesnici iz skupine SATB1+/p16- postigli su plato preživljenja s vjerojatnošću preživljenja od $90,7 \pm 0,54$ %, što je ujedno označavalo i najpovoljniju prognozu između tri promatrane skupine (**Slika 10 A**). S druge strane, bolesnici SATB1-/p16- imali su posljednju promatranu vjerojatnost preživljenja od 74 %, dok je predviđen, ali ne i zabilježen, plato preživljenja na $60 \pm 0,5$ % (**Slika 10 B**).

Bolesnici pozitivni na imunohistokemijski izražaj p16 nisu pokazali jasno izražen plato preživljenja, tj. modeli sa i bez platoa preživljenja imali su podjednaku vjerojatnost ($P = 0.076$, $\Delta AIC = -0.03$, $ER = 1.02$) (**Tablica 7**). Kada se promatra brzina događaja, bolesnici pozitivni na imunohistokemijski izražaj p16 imali su poluživot od samo 1,4 mjeseca, dok su bolesnici negativni na oba biljega imali poluživot od $83,6 \pm 12$ mjeseci.

Kada je PFS analiziran na isti način, pokazano je da su podskupine SATB1-/p16- i p16+ slijedile istu dinamiku ($P = 0.7$, $\Delta AIC = -9.672$, $ER = 1/126$), s poluživotom od $14,7 \pm 1$ mjesec i platoonom od $63,4 \pm 0,7$ %. S druge strane, krivulja PFS-a za populaciju SATB1+/p16- bila je gotovo identična krivulji OS-a iste skupine (**Slika 10 C**).



Slika 10. Stratifikacija kohorte bolesnika prema imunohistokemijskom izražaju SATB1 i p16. **(A)** Skupina bolesnika SATB1+/p16- (N = 12) pokazala se kao ona s najboljom prognozom. **(B)** Kaplan–Meierova analiza ukupnog preživljenja (OS) za tri skupine bolesnika temeljene na imunohistokemijskom izražaju SATB1 i p16. **(C)** Kaplan–Meierova analiza preživljenja bez progresije (PFS) za tri skupine bolesnika temeljene na imunohistokemijskom izražaju SATB1 i p16. $t_{1/2}$, vrijeme poluživota populacije. Slika je djelo autora.

* F test

Tablica 7. Statistička analiza korelacije kliničko-patoloških karakteristika i tri subpopulacije bolesnika s Hodgkinovim limfom temeljenih na imunohistokemijskom izražaju SATB1 i p16.

Parametar	SATB1+/p16-	p16+	SATB1-/p16-	P vrijednost
Broj bolesnika	12	12	62	
dob (godine, medijan),	44 (30 – 64,8)	31,5 (20,8 - 52)	42 (28 – 53,8)	0,338*
IQR ^a (godine)				
spol (N, %)				0,105*
žene	9, 75 %	5, 41.7 %	25, 45.3 %	
muškarci	3, 25 %	7, 58.3 %	37, 54.7 %	
histološki tip (N, %)				0,986†
miješana celularnost	2, 16.7 %	3, 25 %	15, 24.2 %	
nodularna skleroza	9, 75 %	8, 66.7 %	43, 69.4 %	
ostalo	1, 8.3 %	1, 8.3 %	4, 6.4 %	
klinički stadij (N, %)				0,572†
I	0, 0 %	0, 0 %	9, 14.5 %	
II	5, 41.7 %	7, 58.3 %	30, 48.5 %	
III	4, 33.3 %	2, 16.7 %	10, 18.6 %	
IV	16, 25 %	3, 25 %	13, 22.1 %	
+ ekstrapodalna lokalizacija (N, %)	3, 25 %	2, 16.7 %	10, 16.1 %	0,741†
+ B simptomi (N, %)	9, 75 %	7, 58.3 %	38, 62.8 %	0,769†
+ bulky disease (N, %)	2, 16.7 %	3, 25 %	10, 16.1 %	0,741†
EORCT ^b zbroj (za stadij I & II, N, %)				0,887‡
0	0, 0 %	2, 28.6 %	11, 28.2 %	
1	3, 60 %	2, 28.6 %	10, 25.6 %	
2	2, 40 %	3, 42.86 %	11, 28.2 %	
3	0, 0 %	0, 0 %	7, 17.8 %	
GHS ^c zbroj (za stadij I & II, N %)				0,812‡
0	0, 0 %	2, 28.6 %	10, 25.6 %	
1	2, 40 %	1, 14.3 %	12, 30.7 %	
2	3, 60 %	4, 57.1 %	11, 28.2 %	
3	0, 0 %	0, 0 %	6, 15.4 %	
IPS ^d zbroj (za stadij III & IV, N, %)				0,514‡
1	1, 14.3 %	2, 40 %	5, 21.7 %	
2	1, 14.3 %	1, 20 %	8, 34.8 %	
3	4, 57.1 %	2, 40 %	6, 26.1 %	
4	0, 0 %	0, 0 %	2, 8.7 %	
5	1, 14.3 %	0, 0 %	2, 8.7 %	
ECOG ^e zbroj (N, %)				0,660‡
0	8, 66.7 %	10, 83.3 %	46, 74.2 %	
1	4, 33.3 %	2, 16.7 %	12, 19.4 %	
2	0, 0 %	0, 0 %	4, 6.5 %	
Odgovor na prvu liniju KTx ^f (N %)				0,336†
KR ^g	7, 77.8 %	10, 83.3 %	54, 88.5 %	
PR ^h	0, 0 %	0, 0 %	3, 4.9 %	
PB ⁱ	2, 22.2 %	2, 16.7 %	4, 6.6 %	

* ANOVA, †Fisher's exact tests, ‡ Kruskal Wallis test

^a Interkvartilni raspon

^b Od engl. *European Organization for the Research and Treatment of Cancer*

^c Od engl. *German Hodgkin's Study Group*

^d Od engl. *International Prognostic Score*

^e Od engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*

^f Konvencionalna kemoterapija

^g Kompletna remisija

^h Progresija bolesti

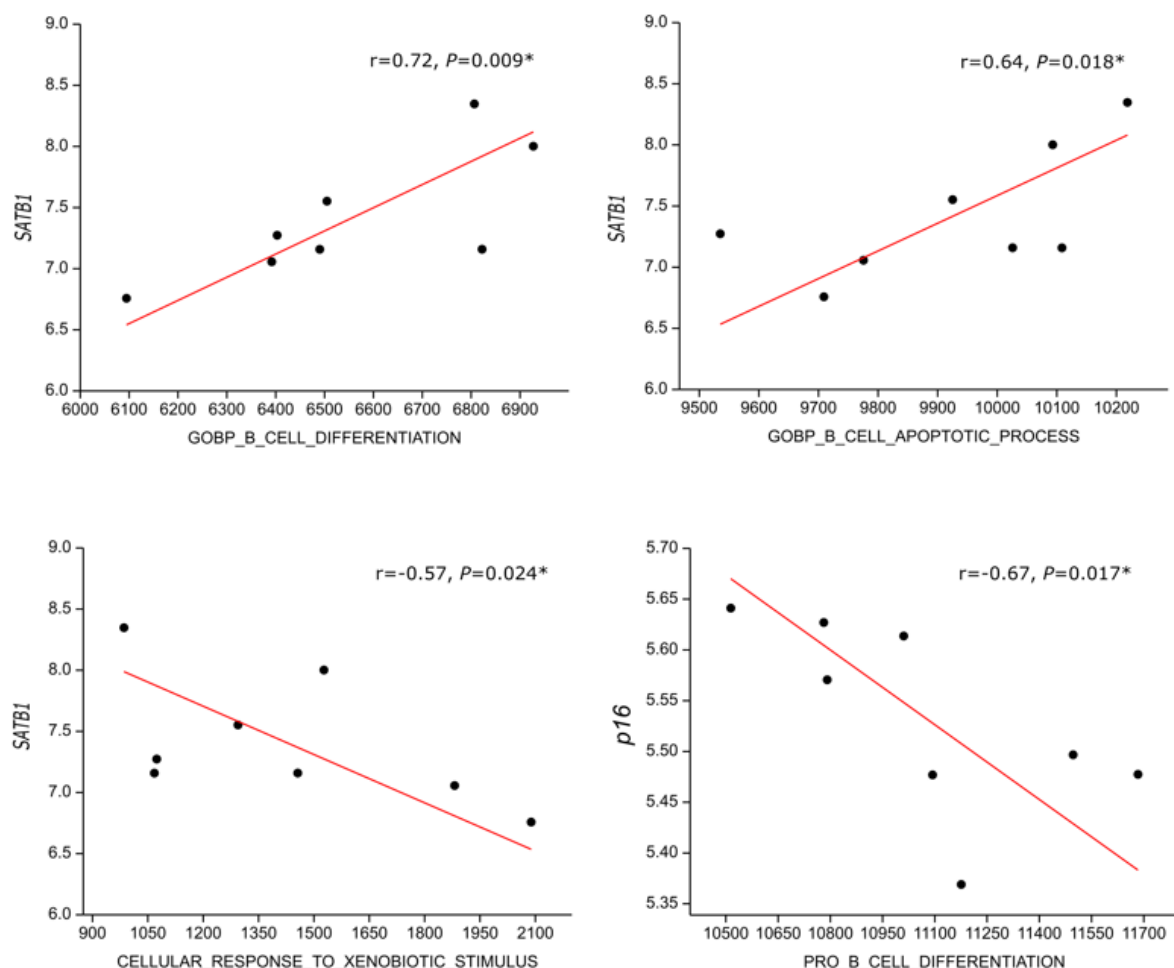
ⁱ Parcijalna remisija

4.5. Analiza javno dostupnih transkriptomskih baza podataka humanih tumora

Analiza obogaćivanja skupa gena (eng. *Gene set Enrichment Analysis*) provedena je koristeći javno dostupne transkriptomске podatke. Serija podataka s osam bolesnika oboljelih od HL-a pod oznakom GSE120124 preuzeta je iz NCBI GEO baze podataka.

Transkript *SATB1* pokazao je visoku pozitivnu korelaciju s diferencijacijom B stanica ($r = 0.72$, $P = 0.009$) i umjerenu korelaciju s genskim potpisom apoptozom B stanica ($r = 0.64$, $P = 0.018$). S druge strane, pokazao je umjerenu negativnu korelaciju s odgovorom na ksenobiotike ($r = -0.57$, $P = 0.024$), tj. s detoksifikacijskim genetskim potpisima (**Slika 11**).

Izražaj *p16* pokazao je umjerenu negativnu korelaciju s genskim potpisom diferencijacije pro - B stanica ($r = -0.67$, $P = 0.017$) (**Slika 11**).

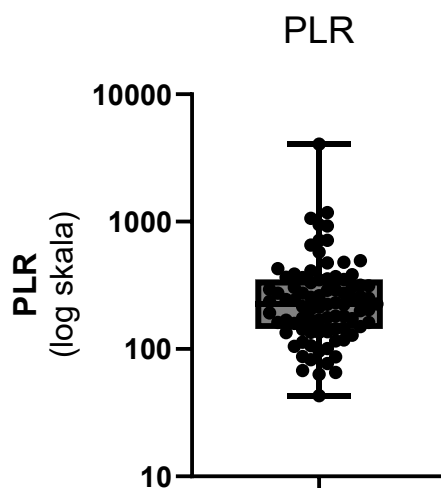


Slika 11. Korelacija genskih potpisa sa *SATB1* i *p16*. Transkript *SATB1* pokazao je pozitivnu korelaciju s genetskim potpisima diferencijacije B-stanica i apoptoze B-stanica te inverznu korelaciju s odgovorom na ksenobiotike. Izražaj *p16* pokazao je inverznu korelaciju s genskim potpisom diferencijacije pro B-stanica. Slika je djelo autora.

* F test

4.6. Kliničko-patološke karakteristike bolesnika prema razinama omjera trombocita/limfocita (*platelet-lymphocyte ratio*, PLR)

Medijan omjera trombocita/ limfocita (PLR) je 225 s rasponom od 43 do 4064, a IQR (interkvartilni raspon) je iznosio 143 - 349 (Slika 12).



Slika 12. Graf prikazuje distribuciju omjera trombocita/limfocita (PLR-a) u bolesnika s Hodgkinovim limfom. Slika je djelo autora.

U **Tablici 8** prikazani su smjer i snaga korelacija omjera trombocita i limfocita (PLR) s laboratorijskim parametrima pri postavljanju dijagnoze (vrijednosti P i r). Prema dobivenim podacima, nije utvrđena statistički značajna povezanost PLR-a sa ECOG-om ($r = 0.126$, $P = 0.246$). Nasuprot tome, utvrđena je slaba pozitivna povezanost PLR-a s LDH ($r = 0.407$, $P < 0.001$), sedimentacijom eritrocita (SE; $r = 0.336$, $P = 0.001$) i CRP-om ($r = 0.407$, $P < 0.001$). Negativna korelacija slabog intenziteta utvrđena je s kalcijem (Ca; $r = -0.355$, $P = 0.001$) i albuminima ($r = -0.270$, $P = 0.012$), dok je umjerena negativna povezanost utvrđena u slučaju hemoglobina (Hb; $r = -0.523$, $P < 0.001$).

Tablica 8. Korelacija PLR s laboratorijskim nalazima pri dijagnozi i ECOG zbroja

	PLR ^a vs. LDH ^b	PLR vs. Hb ^c	PLR vs. Ca ^d	PLR vs. SE ^e	PLR vs. CRP ^f	PLR vs. Albumini	PLR vs. ECOG ^g zbroj
Spearmanov r	0,4067	- 0,5230	- 0,3547	0,3356	0,4065	- 0,2696	0,1264
P vrijednost	< 0,001	< 0,001	0,001	0,001	< 0,001	0,012	0,246

^a Omjer trombocita i limfocita prema engl. *platelet-lymphocyte ratio*

^b Laktat dehidrogenaza

^c hemoglobin

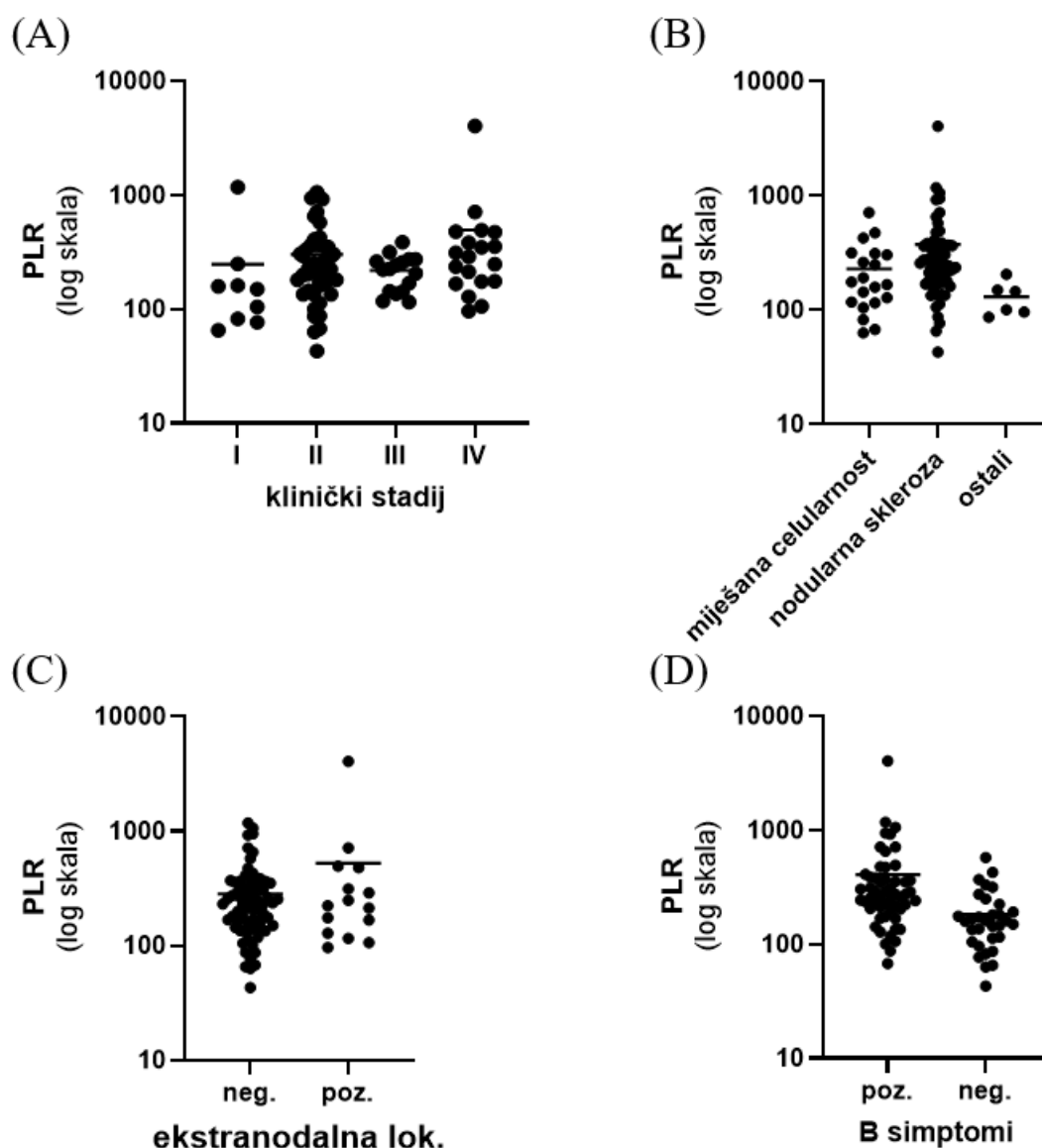
^d Kalcij

^e sedimentacija eritrocita

^f C-reaktivni protein

^g ECOG zbroj od engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*

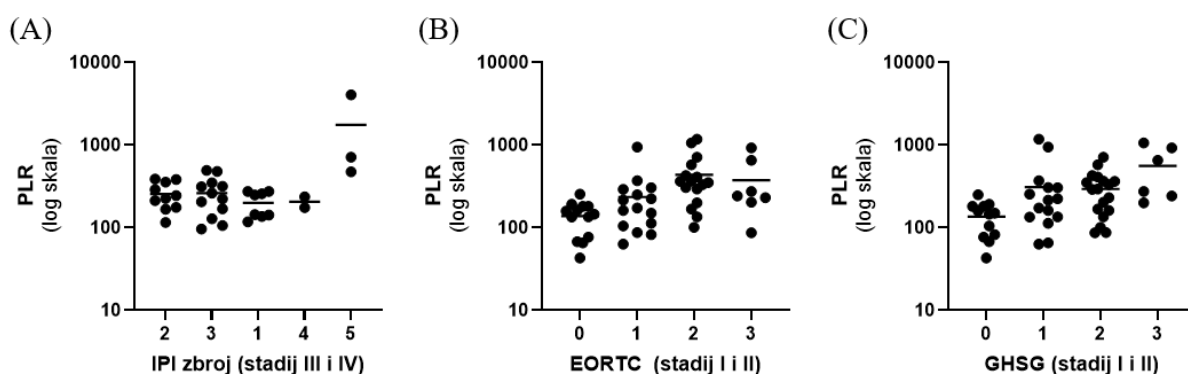
Prema dobivenim podacima, nije utvrđena statistički značajna povezanost PLR-a s kliničkim stadijem bolesti ($P = 0.133$; $r^2 = 0.06545$; $E = 1.480$). Nadalje, analiza prikupljenih podataka dokazala je povezanost PRL-a s histološkim tipom bolesti. Pa je tako medijan u NS 246.8, dok je u MC 171.9, a u preostalim histološkim tipovima 123.1 ($P = 0.017$, $r^2 = 0.09299$, $E = 7.55$). U slučaju kada je promatrana ekстранodalna lokalizacija bolesti, medijan PLR-a kod bolesnika bez ekстранodalne lokalizacije iznosio je 226,2 (prosjeak 282,8), dok je kod bolesnika s ekстранodalnom lokalizacijom medijan bio 223,8 (prosjeak 522,0). Statistička analiza nije pokazala značajnu povezanost između PLR-a i ekстранodalne lokalizacije ($E = 1.83$, $P = 0.342$, $r^2 = 0.011$). Statistička analiza korelacije PLR-a i B simptoma pokazala je da bolesnici s B simptomima imaju znatno viši medijan PLR-a (268,4) u odnosu na bolesnike bez B simptoma (160,2). Ova povezanost pokazala je visoku statističku značajnost ($P < 0.001$, $r^2 = 0.170$, $E = 1052$) (Slika 13 A - D).



Slika 13. Prikaz grupacije bolesnika prema omjeru trombocita/limfocita (PLR) s obzirom na klinički stadij bolesti, histološki tip, prisutnost/odsutnost ekstrapodalne lokalizacije bolesti i B simptome. **(A)** ANOVA analizom nije dokazana statistički značajna povezanost PLR-a s kliničkim stadijem bolesti ($P = 0.133^*$; $r^2 = 0.06545$), **(B)** ANOVA analiza je pokazala statistički značajnu povezanost PLR-a s obzirom na histološki tip bolesti ($P = 0.017^*$, $r^2 = 0.09299$), **(C)** T-testom za nezavisne uzorke nije se dokazala statistički značajna povezanost između PLR-a s ekstrapodalne lokalizacije ($P = 0.342^\dagger$, $r^2 = 0.011$), **(D)** T-testom za nezavisne uzorke pokazala je visoku statistički značajnu povezanost između PLR-a i prisutnost B simptoma ($P < 0.001^\dagger$, $r^2 = 0.170$). Slika je djelo autora.

* ANOVA, † T-testom za nezavisne uzorke

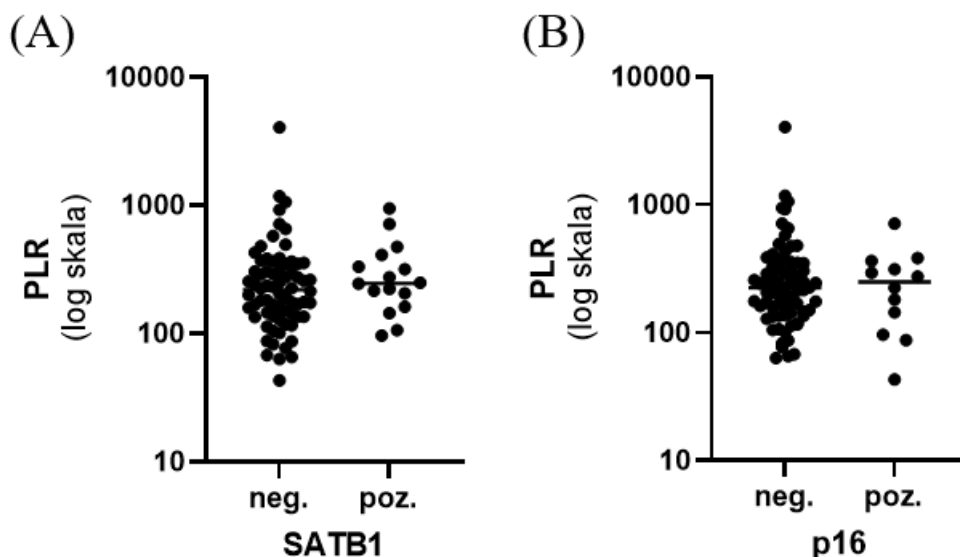
Nadalje, analiza podataka pokazala je povezanost PRL-a s *International Prognostic Index* (IPI) zbrojem (za uznapredovali stadij bolesti), dok je najveća razlika postignuta za IPI zbroj 5 ($P < 0.001$, $r^2 = 0.4750$, $E = 389.5$) (**Slika 14 A**). Za rani stadij bolesti prema EORTC-u, PLR raste linearno do zbroja 2 na kojem se postiže plato (medijani redom: 145.5 (0), 173.1 (1), 357.9 (2), 241.3 (3); $P < 0.001$, $r^2 = 0.3013$, $E = 271.1$) (**Slika 14 B**). Kod GHSG zbroja uočen je linearni porast PLR-a s medijanima za rani stadij bolesti: 147.6 (niski rizik), 215.3 (srednji rizik), 291.9 (visoki rizik), 465.4 (vrlo visoki rizik) ($P = 0.002$, $r^2 = 0.2563$, $E = 55.19$) (**Slika 14 C**).



Slika 14. Prikaz korelacije omjera trombocita/limfocita (PLR) bolesnika s obzirom na IPI zbroj (engl. *International Prognostic Index*) za uznapredovali stadij bolesti te EORTC (engl. *European Organisation for the Research and Treatment of Cancer*) i GHSG (engl. *German Hodgkin Study Group*) zbroj za rani stadij bolesti. **(A)** ANOVA analizom dokazana je povezanost PRL-a s IPI zbrojem u uznapredovalom stadiju bolesti, najveća razlika postignuta za IPI zbroj 5 ($P < 0.001^*$, $r^2 = 0.4750$), **(B)** Za rani stadij bolesti ANOVA analizom dokazano je da PLR raste linearno s obzirom na EORTC zbroj do zbroja 2 na kojem se postiže plato ($P < 0.001^*$, $r^2 = 0.3013$), **(C)** Za rani stadij bolesti ANOVA analizom dokazano je linearni porast PLR s obzirom na GHSG zbroj ($P = 0.002^*$, $r^2 = 0.2563$). Slika je djelo autora.

* ANOVA

Analiza podataka nije pokazala statistički značajnu povezanost između PLR-a s imunohistokemijskim izražajem SATB1 budući da je medijan PLR-a kod bolesnika negativnih na SATB1 iznosio 219,2 (prosjeak 325,6), dok je medijan za bolesnike pozitivne na imunohistokemijski izražaj SATB1 iznosio 246,8 (prosjeak 319,8) ($P = 0.420$, $r^2 = 0.007732$, $E = 1/2.097$) (**Slika 15 A**). Slično izračunu za SATB1, kod bolesnika negativnih na imunohistokemijski izražaj p16, uočen je medijan PLR-a od 225,0 (prosjeak 335,0), dok je pozitivna skupina imala medijan 249,4 (prosjeak 260,0) što nije rezultiralo statistički značajnom povezanošću ($P = 0.545$, $r^2 = 0.004357$, $E = 1/2.426$) (**Slika 15 B**).



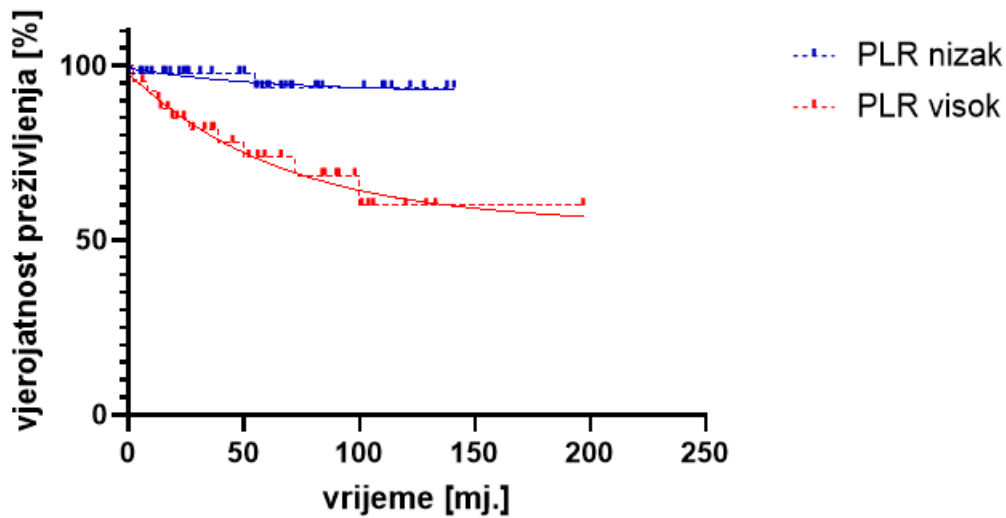
Slika 15. T-testom za nezavisne uzorke nije se dokazala statistički značajna povezanost između omjera trombocita/limfocita (PLR) i imunohistokemijskog izražaja **(A)** SATB1 ($P = 0.420^*$, $r^2 = 0.007732$) i **(B)** p16 ($P = 0.545^*$, $r^2 = 0.004357$). Slika je djelo autora.

* T-test za nezavisne uzorke

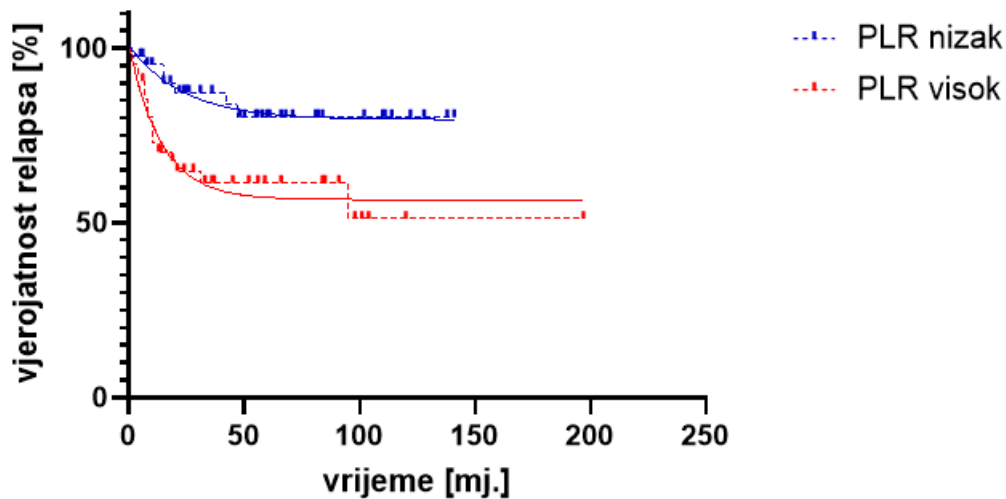
PLR se pokazao kao značajan čimbenik stratifikacije promatrane populacije s obzirom na smrtnost ($P < 0.001$; $\Delta AIC > 100$, $E > 100$). Posljednja zabilježena vjerojatnost preživljenja u skupini bolesnika s niskim PLR-om iznosila je 95 % dok je predviđena vjerojatnost platoa preživljenja iznosila $79 \% \pm 0,3782$. U skupini s visokim PLR-om plato preživljenja opažen je na $56 \% \pm 1,074$. Što se tiče stope umiranja, utvrđeno je da su bolesnici s visokim PLR-om umirali dvostruko brže od bolesnika s niskim PLR-om do postizanja platoa (**Slika 16 A**).

PLR je također omogućio stratifikaciju populacije s obzirom na stopu relapsa kod bolesnika s HL-om ($P < 0.001$; $\Delta AIC > 100$; $E > 100$). Što se tiče PFS-a, skupina bolesnika s niskim PLR-om imala je stopu relapsa obilježenu poluživotom od $41,27 \pm 16,8$ mjeseci, a vjerojatnost relapsa stabilizirala se na platou od $92,34 \pm 1,14$ %. S druge strane, bolesnici s visokim PLR-om imali su sporiju stopu relapsa s poluživotom od $46,6 \pm 5,97$ te su na kraju postigli plato vjerojatnosti relapsa od $54,43 \pm 2,38$ %. Bolesnici s visokim PLR-om relapsirali su 1,12 puta brže od bolesnika s niskim PLR-om do postizanja platoa (**Slika 16 B**).

(A)



(B)



Slika 16. Kaplan–Meierova analiza ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez progresije bolesti (PFS) za omjer trombocita/limfocita (PLR): **(A)** PLR se pokazao kao značajan čimbenik stratifikacije promatrane populacije s obzirom na smrtnost ($P < 0.001^*$; $\Delta\text{AIC} > 100$, $E > 100$); **(B)** PLR je također omogućio stratifikaciju populacije s obzirom na stopu relapsa kod bolesnika s HL-om ($P < 0.001^*$; $\Delta\text{AIC} > 100$; $E > 100$). Slika je djelo autora.

* F test

5. RASPRAVA

Iako većina bolesnika s HL-om ima dobru dugogodišnju prognozu, 5 – 10 % bolesnika razvija refraktornu bolest, dok 10 – 30 % bolesnika doživljava relaps, što predstavlja značajan terapijski izazov (3). Jedan od ključnih izazova u liječenju HL-a je kasna toksičnost uzrokovana kombinacijom kemoterapije i radioterapije što značajno pridonosi morbiditetu ovih bolesnika. Među najozbiljnije komplikacije spadaju hematološki maligniteti i sekundarni solidni tumori poput karcinoma pluća i dojke. Osim toga, kasne komplikacije uključuju i kardiovaskularne i plućne bolesti, neplodnost i poremećaj funkcije štimnjače (62). Zbog navedenog, postoji potreba za preciznijom stratifikacijom rizika i identifikacijom novih prognostičkih čimbenika kako bi se smanjila toksičnosti liječenja uz očuvanje terapijske učinkovitost. Cilj ove studije bio je istražiti imunohistokemijski izražaj SATB1 i p16 te omjer PLR u bolesnika s HL-om te utvrditi njihovu prognostičku vrijednost kroz analizu OS-a i PFS-a i moguću povezanosti s kliničko-patološkim karakteristikama bolesnika. U našoj jedinstvenoj unicetričnoj studiji bolesnika s HL-om, utvrdili smo da je imunohistokemijski izražaj SATB1 povezan s povoljnijom OS-om i PFS-om.

Prema dostupnim podacima, samo jedna studija je istraživala SATB1 u kHL-u utvrdivši negativnu korelaciju inteziteta imunohistokemijski nuklearnog izražaja i postotka pozitivnih tumorskih stanica na SATB1 s pojačanim izražajem HLA klase I u EBV+kHL-u (133). Izražaj HLA I u HL-u još uvijek nije dovojno istražen, ali se povezuje s MC i prisutnošću EBV-a (148).

Neke studije su pokazale inhibitornu ulogu SATB1 na izražaj PD-1 na T stanicama pri čemu je u MF uočena obrnuta korelacija SATB1 i PD-1. Visok izražaj SATB1 bio je povezan s epidermalnom hiperplazijom, infiltracijom eozinofila, manjom transformacijom velikih stanica i povoljnom prognozom u slučajevima MF. Međutim, još uvijek nije dokazano može li SATB1 regulirat PD-1 u malignim T stanicama (127). HRS stanice koriste imunosupresivne mehanizme preživljenja kako bi izbjegle imunološki odgovor unatoč prisutnosti brojnih imunoloških stanica u tumorskom mikrokolišu. One proizvode molekule koje smanjuju učinkovitost T-stanica posredovanog antitumorskog odgovora. Prekomjerni izražaj PD-L1 na HRS stanicama i PD-1 na T stanicama može dovesti do iscrpljivanja T stanica, smanjenja citotoksične aktivnosti i omogućiti preživljenje HRS stanica (149). Vezivanjem PD-1 za PD-L1 /PD-L2, aktivne imunološke stanice se inhibiraju, dok njegova blokada pojačava antitumorski T-stanični odgovor i smanjuje rast tumora, potencijalno poboljšavajući ishode liječenja u R/R kHL. Veći izražaj PD-L1 povezan je s višom stopom relapsa u kHL, što upućuje na njegovu lošu prognostičku vrijednost u kHL (149) Na temelju predhodno navedenog, SATB1 u HL mogao bi suprimirati izražaj PD-1, sprječavati iscrpljenost T-stanica i održavati

njihov aktivacijski status, a time bi bilo i smanjeno vezivanje za PD-L1. Visoki imunohistokemijski izražaj SATB1 bi mogao poticati proliferaciju i funkcionalnost T-stanica, jačajući antitumorski odgovor, dok bi niski imunohistokemijski izražaj SATB1 rezultirao povećavanjem izražaja PD-1, iscrpljivanjem T-stanica i slabljenjem imunološkog odgovora, što bi moglo biti povezano s lošijom prognozom.

Zbog ključne uloge SATB1 u razvoju T-stanica, nekoliko studija istraživalo je njegovu prognostičku ulogu u CTCL-u (127). Povećan izražaj SATB1 je pronađen u CTCL uključujući MF, CD30+ LPD i implantatima dojke udružen anaplastični limfom velikih stanica (127). Grzanka i suradnici su utvrdili da bolesnici s umjerenim do visokim izražajem SATB1 u MF imaju sporiju progresiju bolesti i bolje OS sukladno našem istraživanju. Kako bi se istražila uloga SATB1 u apoptozi, korišten je stanični model JURKAT stanica koje potječu od imortaliziranih T-limfocita i u kojima smanjen izražaj SATB1 uzrokuje otpornost na apoptozu (123,130,131). Ipak prognostička vrijednost SATB1 nije u potpunosti jasna, budući da su Jankowska i suradnici utvrdili njegov viši izražaj u infiltrativnim kožnim lezijama i u bolesnika s zahvaćanjem limfnih čvorova, ali bez utjecaja na OS u MF-u (126). U SS-u je zabilježen smanjen izražaj SATB1, dok omjer izražaja miR-155/SATB1 igra ključnu ulogu u otpornosti na apoptozu, ne samo u malignim T-stanicama, već i u regulaciji stanične smrti u hematološkim i solidnim tumorima (150). Fredholm i suradnici su dokazali da smanjen izražaj SATB1 korelira s uznapredovalim stadijem MF-a pri čemu miR-155 potiskuje SATB1 i potiče aktivaciju STAT5. Stoga represija SATB1 se može spriječiti inhibicijom miR-155, STAT5 ili JAK3. Budući da SATB1 selektivno inhibira Th2 citokine IL-5 i IL-9, njegov nizak izražaj može doprinijeti malignoj upali u CTCL. Gubitak SATB1 dovodi do povećane proizvodnje IL-5 i IL-9 u malignim T stanicama, povezanih s eozinofilijom i preživljavanjem tumorskih stanica, što potvrđuje njegovu ulogu u sprječavanju razvoja tumora u MF-u (130). U HL-u deregulirana miR-155 sudjeluje u poremećaju razvoja B stanica i hiperaktivnosti NF- κ B signalnog puta. S obzirom na negativnu regulaciju miR-155 na SATB1 u MF, pretpostavljamo da bi poremećena regulacija omjera miRNA-155/SATB1 u HL-u mogla predstavljati još jedan mehanizam preživljenja HRS stanica. Bilo bi korisno istražiti kako SATB1 u HL-u utječe na izražaj citokina (IL-5, IL-9, IL-8, CCL5, CCL28), prisutnost EBV-a i izražaj STAT3, s obzirom na njegov pojačan izražaj u EBV-pozitivnim slučajevima HL-a (151). S druge strane Wang i suradnici su proučavali ulogu SATB1 u CD30+ LPD koja uključuje Lyp i kožni anaplastični limfom velikih stanica. Pokazali su da povećan izražaj SATB1 utišava p21 vezivanjem na promotor gena *CDKN1A*, sugerirajući ulogu onkogenog kod njegovog istoimenog gena *SATB1* (129). Međutim, Sun i suradnici su otkrili da je SATB1 pojačano izražen u gotovo svim slučajevima LyP, inače

indoletne bolesti, te u 38 % kožnih anaplastičnog limfoma velikih stanica. SATB1+ slučajevi CD30+ LPD u anaplastičnim T stanicama pokazuju Th-17 citokinski profil, epidermalnu hiperplaziju s granulocitnim infiltratima i boljim terapijskim odgovorom, što ukazuje na heterogenost CD30+ LPD (132). Gao i suradnici utvrdili su da razlike u izražaju SATB1 među podtipovima limfoma sugeriraju njegovu potencijalnu ulogu kao biomarkera za diferencijaciju kliničkih varijanti CTCL-a. Istraživanje je pokazalo da kolokalizacija SATB1 i CD30 u istim stanicama korelira s CD30+ LPD koji imaju bolju prognozu, bolji odgovor na terapiju i spontanu regresiju, dok nedostatak kolokalizacije ili potpuni gubitak SATB1 upućuje na agresivniji oblike bolesti tj. transformaciju velikih stanica MF koja zahtijeva intenzivniji terapijski pristup. U istraživanju je pokazano da različiti podtipovi CTCL-a imaju varijabilni izražaj SATB1, pri čemu je njegova prisutnost povezana s određenim kliničkim i biološkim karakteristikama tumora (127).

Moguća je povezanost imunofenotipa malignih stanica i SATB1. Specifično, izražaj CD30 ograničen je na tri hematološke bolesti, uključujući kHL, anaplastični limfom velikih stanica (ALCL) i CD30+ LPD, u kojima je izražaj SATB1 povezan s boljim odgovorom na terapiju (132). Nasuprot tome, tumorske stanice u DLBCL izražavaju uobičajene B-stanične antigene (CD20, CD79a, CD19), dok se CD30 izražava u samo 25 % slučajeva, a upravo u DLBCL-u je SATB1 pokazan kao negativan prognostički čimbenik (125). SATB1 se smatra ključnim regulatorom izražaja različitih gena tijekom razvoja limfocita, osobito T-stanica te potiče limfopoezu što sugerira njegovu povezanost s razvojem ALL. SATB1 je povezan i s histonskom deacetilazom, važnom za razvoj limfocita, te regulira gene uključene u njihovu diferencijaciju. Pokazano je da SATB1 igra ulogu u leukemogenezi, uključujući AML. U AML-u je pokazano da je povećan izražaj SATB1 u bolesnika koji postignu KR na inicijalnu terapiju pa bi se mogao smatrat prediktorom dobrog odgovora. Nedostatak izražaja gena *SATB1* potiče staničnu proliferaciju u AML preko aktivacije NF-κB signalnog puta (124). Jedan od mogućih mehanizama djelovanja *SATB1* i njegovog istoimenog proteina u HL-u mogao bi biti putem NF-κB signalnog puta koji je poznati negativni prediktor apoptoze u HL (8). Izgleda da uloga SATB1 u malignomima je složena i specifična za određeni tip tumora što znači da može biti i negativni i pozitivni biljeg u različitim vrstama karcinoma.

p16 je dobro poznat tumorski supresorski protein koji sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa i apoptoze. U našem istraživanju, 15 % uzoraka bolesnika s HL-om imalo je pozitivan imunohistokemijski izražaj p16. Irshad i suradnici su u svom radu imali pozitivan imunohistokemijski izražaj p16 u 52,3 % slučajeva HL-a, a Zhao i suradnici u 71,7 % bolesnika s HL-om, što je značajno više u usporedbi s našim istraživanjem (152,153). Suprotno našem

istraživanju, Calio i suradnici pokazali su da su bolesnici s HL-om s odsutnim ili niskim izražajem p21 i p16 češće doživljavaju relaps ili ne odgovaraju na terapiju, što su povezali s inaktivacijom tumorsupresorskih puteva, uz dobro poznatu ulogu EBV-a u inhibiciji izražaja p16 (136). Iako postoje kontradiktornosti o povezanosti EBV i p16, neke studije su pokazale pozitivnu korelaciju između p16 i EBV. To se može objasniti činjenicom da EBV može kodirati antigene koji potiču ulazak u stanični ciklus inaktiviranjem pRb, a inaktivacija pRb može dovesti do prekomjernog izražaja p16 (137). Prekomjerman izražaj p16 povezan je s lošom prognozom kod nekih solidnih tumora poput raka debelog crijeva i dojke (154,155) što naglašava potrebu za oprezom pri korištenju p16 kao prognostičkog biljega. Inaktivacija p16-RB signalnog puta uzrokovana gubitkom pRb-a može dovesti do povećanog izražaja p16 (138). Do danas je pokazano da je gubitak pRb-a u HL-u loš prognostički čimbenik koji utječe na OS i postizanje KR (139). Stoga bi gubitak pRb-a mogao biti jedan od mehanizama u HL-u koji dovodi do prekomjernog izražaja p16 (138,139). Naše trenutno istraživanje sugerira da p16, sam po sebi, nije prikladan kao biljeg preživljenja pa tako imunohistokemijski izražaj p16 i SATB1, nisu bili povezani s kliničko-patološkim karakteristikama ni s odgovorom na prvu liniju terapije.

Nadalje, u našoj studiji medijan dobi bolesnika iznosio je 41 godinu što je u skladu s dostupnim podacima koji govore u prilog pojavnosti bolesti u mlađoj populaciji (8). Omjer muškaraca i žena je približno jednak što je u skladu s predhodnim istraživanjima s obzirom da je NS najčešći podtip kHL-a (32) i da njegova distribucija odgovara obrascima u ekonomsko razvijenim zemljama (8,139,156). Budući da je u našoj studiji zabilježen samo jedan slučaj NLPHL-a, ne možemo izvesti konkretne zaključke o ovom tipu bolesti. U našoj studiji 48,8 % bolesnika je bilo u kliničkom stadiju II što se podudara s rezultatima istraživanja Shamoon i suradnika kao i podacima SEER (engl. Surveillance, Epidemiology, and End Results program) programa, gdje je polovica ispitanih bolesnika imala bolest u II stadiju (157,158).

Zaključno, bolesnici su stratificirani na temelju kombinacije dvaju imunohistokemijskih biljega, pri čemu je skupina SATB1+/p16- pokazala najbolju prognozu za HL. Naši rezultati se podudaraju i s rezultatima analize obogaćenja skupa gena na podacima iz NCBI GEO baze koja je provedena na osam bolesnika s HL-om. Transkript *SATB1* pozitivno je korelirao s diferencijacijom i apoptozom B-stanica, a negativno s odgovorom na ksenobiotike. Izražaj *p16* obrnuto je korelirao s diferencijacijom pro-B stanica. Kombinaciji navedenih imunohistokemijskih biljega može se pridodati još i PLR omjer koji se izračuna iz kompletne krvne slike. Iako su više razine PLR-a povezane s lošijim PFS-om i OS-om, nisu pokazale statistički značajnu povezanost s biljezima SATB1 i p16. U studijama se do sada pokazalo da

u PET negativnih bolesnika u ranom stadiju bolesti izostavljanje radioterapije nije imalo benefita u PFS-u u odnosu na CMT. Ipak, postoji stalni rizik od sekundarnih maligniteta kod modernih tehnika radioterapije, ali bez benefita u OS-u (51). Potrebno je postići ravnotežu između smanjenja potencijalnog rizika relapsa i kasnih nuspojava liječenja. Stoga kombinacija PET2, imunohistokemijskih biljega (SATB1 i p16) i PLR omjera mogla bi pomoć u identificiranju bolesnika s najboljom prognozom, omogućavajući donošenje lakše odluke o izostavljanju radioterapije kada njezin rizik nadmašuje očekivanu korist od 5 - 10 % u PFS-u. Prema smjernicama KROHEM-a (159) koje koristimo u Hrvatskoj, rani povoljni stadij se liječi s 2 ciklusa ABVD-a u kombinaciji s radioterapijom 20 Gy. Bolesnicima s ranim povoljnim stadijem i rizikom za dugoročne posljedice radioterapije (npr. subkarinalni limfni čvorovi, žene < 30 godina, veliko polje zračenja), uz povoljni imunohistokemijski profil SATB1+/p16- i nizak PLR omjer, prihvatljiva terapijska opcija bi mogla biti 4 ciklusa ABVD-a uz izostanak radioterapije. S druge strane, kod nepovoljnog ranog stadija, uz povoljni imunohistokemijski i PRL profil i visok rizik radioterapije, može se primijeniti "2+2" strategija (2 ABVD + 2 eBEACOPP) bez radioterapije. Ako se izabere inicijalno ABVD protokol bez planirane radioterapije, prihvatljiva terapijska opcija bi mogla biti da nakon 2 ciklusa ABVD-a može se nastaviti s još 4 ciklusa AVD-a s ciljem smanjenja nuspojava plućne toksičnosti izostankom bleomicina (51).

U posljednjim godinama, primjena ABVD-a kao terapije za liječenje uznapredovalog stadija HL-a dovedena je u pitanje budući da bolesnici s visokim IPS zbrojem često imaju lošiji PFS. Čak ni eskalacija terapije kod bolesnika s pozitivnim interim PET nalazima ne dovodi do značajnog poboljšanja PFS-a. Zbog toga su uvedeni agresivniji protokoli koji bi trebali osigurati bolji PFS, no nažalost, povezani su s povećanim rizicima za sekundarne malignitete u dugoročnom razdoblju (51). Zbog toga bi kombinacija interim PET-a i imunohistokemijskih biljega SATB1 i p16 te laboratorijskog omjera PLR-a pri dijagnozi u uznapredovalom stadiju bolesti, mogla biti korisna u predviđanju ishoda i donošenju odluka o smanjenju broja ciklusa kemoterapije ili prelasku na manje toksičan režim liječenja, osobito u slučaju lažno pozitivnih PET/CT nalaza. Definiranjem početne podskupine bolesnika s najboljom prognozom na temelju imunohistokemijskog izražaja SATB1+/p16- i nižeg PLR omjera omogućuje se lakši odabir manje intenzivne terapije prema ABVD ili BV-AVD protokolu, posebno za one koji nisu kandidati za intenzivniju kemoterapiju. Ako se odlučimo za ABVD, a PET2 je negativan (Deauville score 1-3), prelazimo na 4 dodatna ciklusa AVD. Ako smo inicijalno odabrali BV-AVD, to činimo pod uvjetom da bolesnik nema polineuropatiju kao komorbiditet. Ako uzmemo u obzir prognostičke čimbenike za uznapredovali stadij, nepovoljni imunohistokemijski profil

SATB1/p16 i visoki PLR omjer koji ukazuju na nepovoljan ishod, liječenje se usmjerava prema agresivnijim protokolima poput eBEACOPP-a. Nažalost, kemoterapijski protokol BrECADD-a koji ima jednaku učinkovitost, a manje nuspojava od eBEACOPP protokola ne možemo koristiti zasad u Hrvatskoj budući da BV nije odobren u nevedenoj kombinaciji terapije (159). Zbog toga je jako bitno incijalno što preciznije odredit prognostičke čimbenike da bi smo izbjegli nepotrebne kasne toksičnosti terapije.

6. ZAKLJUČCI

- 1) SATB1 je pokazao značajnu pozitivnu korelaciju s boljim OS-om i PFS-om, dok imunohistokemijski izražaj p16 nije imao utjecaj na isto.
- 2) Bolesnici su stratificirani prema kombinaciji dvaju biljega, pri čemu je skupina SATB1+/p16- pokazala najbolju prognozu za HL-a, što potvrđuje njihovu potencijalnu prognostičku vrijednost.
- 3) Imunohistokemijski izražaj SATB1 i p16 nisu stratificirali bolesnike prema kliničko-patološkim varijablama.
- 4) Nije se pokazala korelacija SATB1 i p16 s odgovorom na prvu liniju kemoterapije.
- 5) PLR ne pokazuje statistički značajnu povezanost s SATB1 i p16.
- 6) PLR je stratificirao našu populaciju s obzirom na smrtnost i stopu relapse.
- 7) Bolesnici s visokim PLR-om dvaput su brže umirali od bolesnika s niskim PLR-om do platoa.
- 8) Bolesnici s visokim PLR-om su 1,12 puta brže relapsirali od bolesnika s niskim PLR-om do platoa.
- 9) Nema statistički značajne povezanosti PLR sa ECOG-om, ektranodalnom lokalizacijom, kliničkim stadijem dok postoji pozitivna korelacija s B simptomima.
- 10) Od laboratorijskih parametara postoji slaba pozitivna povezanost PLR s LDH, SE, CRP, te slaba ali negativna povezanost PLR s Ca i albuminima dok negativna ali umjerena povezanost je PLR s Hb.
- 11) Od prognostičkih parametara, postoji povezanost PLR s IPI zbrojem (za uznapredovali stadij bolesti) ali veća razlika se temelji na IPI zbroja 5.
- 12) Za rani stadij bolesti prema EORTC zbroju PLR raste linearno do zbroja 2 nakon čega dolazi do platoa dok PLR s GHSG zbrojem za rani stadij bolesti pokazuje linearni rast.

7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Ciljevi: HL (Hodgkinov limfom) je klonalna limfoproliferativna bolest koja je morfološki karakterizirana postojanjem mješavine velikih displastičnih malignih stanica unutar reaktivnog mikrookoliša. Većina bolesnika s HL-om ima dobru dugogodišnju prognozu, ipak 5 – 10 % bolesnika razvija refraktornu bolest, dok 10 – 30 % bolesnika doživljava relaps, što predstavlja značajan terapijski izazov. Jedan od ključnih izazova u liječenju HL-a je pojava kasnih komplikacija liječenja koje značajno pridonose morbiditetu ovih bolesnika. Cilje naše studije je bio ispitati prognostičku vrijednost imunohistokemijskog izražaja SATB1 i p16 proteina te laboratorijskog omjera trombocita i limfocita (PLR) putem analize ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez progresije bolesti (PFS) u bolesnika s HL-om. Sporedni ciljevi uključuju analizu korelacije izražaja SATB1 i p16 te PLR –a s kliničko-patološkim značajkama.

Materijali i metode: retrospektivna studija je obuhvatila ukupno 86 bolesnika s HL-om koji su dijagnosticirani između 2008 - 2018. godine a liječeni su u Zavodu za hematologiju KBC-a Split. Nakon provedenog imunohistokemijskog bojenja na p16 INK 4a i SATB1 provodila se kvalitativna evaluacija tih biljega u HRS pod svjetlosnim mikroskopom na nasumično odobranih 10 vidnih polja pod povećanjem 400x. Iz laboratorijskih nalaza pri dijagnozi izračunao se PLR omjer.

Rezultati: Imunohistokemijska analiza pokazala je pozitivan izražaj SATB1 u 21 % (N = 16) bolesnika, dok je p16 bio pozitivan u 15 % (N = 12) bolesnika. SATB1 je pokazao značajnu pozitivnu korelaciju s boljim OS-om i PFS-om, dok izražaj p16 nije imao utjecaj. Skupina SATB1+/p16- pokazala je najbolju prognozu za HL. Imunohistokemijski izražaj SATB1 i p16 nije povezan s kliničko - patološkim varijablama, niti s odgovorom na prvu liniju kemoterapije. Bolesnici s visokim PLR-om dvaput su brže umirali od bolesnika s niskim PLR-om do platoa te su 1,12 puta brže relapsirali od bolesnika s niskim PLR-om do platoa. PLR ne pokazuje statistički značajnu povezanost s SATB1 i p16.

Zaključak: upotreba kombinacije imunohistokemijskih biljega SATB1 i p16 te laboratorijskog PLR omjera pri dijagnozi mogla bi služiti kao prognostički parametar u bolesnika s HL, omogućujući personaliziraniji pristup liječenju s ciljem smanjivanja kasnih komplikacija liječenja uz očuvanje terapijske učinkovitosti.

8. LAIČKI SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Ciljevi: HL (Hodgkinov limfom) je zloćudna bolest limfnog tkiva s dobrom dugogodišnjom prognozom. Ipak, kod manjeg broja bolesnika bolest ne reagira na terapiju, ili se javi povratak bolesti nakon liječenja, što predstavlja značajan terapijski izazov. Jedan od ključnih izazova u liječenju HL-a je pojava kasnih komplikacija liječenja. Ciljeve naše studije je bio ispitati prognostičku vrijednost imunohistokemijskog izražaja SATB1 i p16 proteina te laboratorijskog omjera trombocita/limfocita (PLR) putem analize ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez progresije bolesti (PFS) u bolesnika s HL-om.

Materijali i metode: studija je obuhvatila ukupno 86 bolesnika s HL-om koji su dijagnosticirani između 2008 - 2018. godine, a liječeni su u Zavodu za hematologiju KBC-a Split. Nakon provedenog imunohistokemijskog bojenja na p16 INK 4a i SATB1 provodila se evaluacija tih biljega u zloćudnim stanicama pod svjetlosnim mikroskopom. Iz laboratorijskih nalaza pri dijagnozi izračunao se PLR omjer.

Rezultati: SATB1 je povezan s boljim OS-om i PFS-om, dok izražaj p16 nije bio povezan s preživljenjem. Skupina bolesnika sa SATB1 pozitivnim i p16 negativnim tumorima pokazala je najbolju prognozu za HL. Bolesnici s visokim PLR-om dvaput su brže umirali od bolesnika s niskim PLR-om i 1,12 puta brže imali povratak bolesti od bolesnika s niskim PLR-om. PLR nije značajno povezan s SATB1 i p16.

Zaključak: upotreba kombinacije imunohistokemijskih biljega SATB1 i p16 te laboratorijskog PLR omjera pri dijagnozi mogla bi služiti kao prognostički pokazatelj u bolesnika s HL, omogućujući personaliziraniji pristup liječenju s ciljem smanjivanja kasnih komplikacija liječenja uz očuvanje terapijske učinkovitosti

9. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU

Title: IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF SATB1 AND p16 AND THEIR PROGNOSTIC VALUE IN PATIENTS WITH HODGKIN LYMPHOMA: A UNICENTRIC STUDY

Objective: Hodgkin lymphoma (HL) is a clonal lymphoproliferative disease morphologically characterized by a mixture of large dysplastic malignant cells within a reactive microenvironment. While most HL patients have a favorable long-term prognosis, 5 – 10 % develop refractory disease, and 10 – 30 % experience relapse, posing a significant therapeutic challenge. One of the key challenges in HL treatment is the occurrence of late complications, which substantially contribute to patient morbidity. The aim of our study was to evaluate the prognostic value of immunohistochemical expression of SATB1 and p16 proteins, as well as platelet to lymphocyte ration (PLR) by analyzing overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in HL patients. Secondary objectives included analyzing the correlation of SATB1 and p16 expression and PLR with clinicopathological features.

Materials and methods: This retrospective study included a total of 86 patients with HL diagnosed between 2008 - 2018, who were treated at the Department of Hematology, University Hospital of Split. After immunohistochemical staining with p16 and SATB1, a qualitative evaluation of p16 and SATB1 expression in HRS cells was conducted under a light microscope, examining 10 randomly selected fields at 400x magnification. The PLR ratio was calculated from laboratory findings at diagnosis.

Results: Immunohistochemical analysis showed positive SATB1 expression in 21 % (N = 16) of patients, while p16 was positive in 15 % (N = 12) of patients. SATB1 showed a significant positive correlation with better OS and PFS, while p16 expression had no impact. The SATB1+/p16- group of patients had the best prognosis for HL. Immunohistochemical expression of SATB1 and p16 did not correlate with clinical-pathological variables, nor with response to first-line chemotherapy. Patients with high PLR had a twofold higher mortality rate compared to those with low PLR until plateau, and relapsed 1.12 times faster than those with low PLR until plateau. PLR did not show a statistically significant correlation with SATB1 and p16.

Conclusion: The use of a combination of immunohistochemical markers SATB1 and p16, along with the laboratory PLR ratio at diagnosis, could serve as a prognostic parameter in patients with HL, allowing for a more personalized approach to treatment with the aim of reducing late treatment complications while maintaining therapeutic efficacy.

10. LAY SUMMARY

Title: IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF SATB1 AND p16 AND THEIR PROGNOSTIC VALUE IN PATIENTS WITH HODGKIN LYMPHOMA: A UNICENTRIC STUDY

Objectives: Hodgkin lymphoma (HL) is a malignant disease of lymphoid tissue with a favorable long-term prognosis. However, in a small number of patients, the disease does not respond to therapy or relapses after treatment, which poses a significant therapeutic challenge. One of the key challenges in the treatment of HL is the occurrence of late treatment-related complications.

The aim of our study was to investigate the prognostic value of the immunohistochemical expression of SATB1 and p16 proteins, as well as the platelet-to-lymphocyte ratio (PLR), by analyzing overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients with HL.

Materials and methods: The study included a total of 86 patients with HL diagnosed between 2008 and 2018 who were treated at the Department of Hematology, University Hospital Center Split. After performing immunohistochemical staining for p16 and SATB1, the expression of these markers was evaluated in malignant cells using a light microscope. PLR was calculated from laboratory findings obtained at diagnosis.

Results: SATB1 was associated with better OS and PFS, while p16 expression had no impact on survival. Patients with SATB1 positive and p16 negative tumors had the best prognosis for HL. Patients with a high PLR died twice as fast as those with a low PLR and experienced disease relapse 1.12 times faster than patients with a low PLR. PLR did not show a significant association with SATB1 or p16.

Conclusion: The use of a combination of immunohistochemical markers SATB1 and p16, along with the laboratory PLR ratio at the time of diagnosis, could serve as a prognostic factor in HL patients, enabling a more personalized treatment approach aimed at reducing late treatment-related complications while maintaining therapeutic efficacy.

11. LITERATURA

1. Hodgkin. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans.* 1832;17:68–114.
2. Takahara T, Satou A, Tsuzuki T, Nakamura S. Hodgkin lymphoma: biology and differential diagnostic problem. *Diagnostics (Basel).* 2022;12:1507.
3. Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2025 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2024;99:2367–78.
4. Aslani A, Morsali S, Mousavi SE, Choupani S, Yekta Z, Nejadghaderi SA. Adult Hodgkin lymphoma incidence trends in the United States from 2000 to 2020. *Sci Rep.* 2024;14:20500.
5. Huang J, Pang WS, Lok V, Zhang L, Lucero-Prisno DE, Xu W, et al. Incidence, mortality, risk factors, and trends for Hodgkin lymphoma: a global data analysis. *J Hematol Oncol.* 2022;15:57.
6. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209–49.
7. Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK. Cancer survival and incidence from the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program. *The Oncologist.* 2003;8:541–52.
8. Munir F, Hardit V, Sheikh IN, AlQahtani S, He J, Cuglievan B, et al. Classical Hodgkin lymphoma: from past to future-a comprehensive review of pathophysiology and therapeutic advances. *Int J Mol Sci.* 2023;24:10095.
9. Randall MP, Spinner MA. Optimizing treatment for relapsed/refractory classic Hodgkin lymphoma in the era of immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2023;15:4509.
10. Šekerija M, Bubanović Lj, 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.
11. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Highly increased familial risks for specific lymphoma subtypes. *Br J Haematol.* 2009;146:91–4.
12. Press OW. Hodgkin lymphoma. U: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi M, Press OW, Burns LJ, et al., urednici. *Williams hematology.* Deveto izdanje. New York: McGraw-Hill Education; 2016. str. 1604–18.
13. Leoncini L, Spina D, Nyong'o A, Abinya O, Minacci C, Disanto A i sur. Neoplastic cells of Hodgkin's disease show differences in EBV expression between Kenya and Italy. *Int J Cancer.* 1996;65:781–4.

14. Maggioncalda A, Malik N, Shenoy P, Smith M, Sinha R, Flowers CR. Clinical, molecular, and environmental risk factors for Hodgkin lymphoma. *Adv Hematol*. 2011;2011:1–10.
15. Hjalgrim H, Smedby KE, Rostgaard K, Molin D, Hamilton-Dutoit S, Chang ET i sur. Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*. 2007;67:2382–8.
16. Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, Hamilton-Dutoit S, Frisch M, Zhang JS i sur. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med*. 2003;349:1324–32.
17. Quinlan SC, Landgren O, Morton LM, Engels EA. Hodgkin lymphoma among US solid organ transplant recipients. *Transplantation*. 2010;90:1011–5.
18. Zambelli A, Lilleri D, Baldanti F, Scelsi M, Villani L, Da Prada GA. Hodgkin's disease as unusual presentation of post-transplant lymphoproliferative disorder after autologous hematopoietic cell transplantation for malignant glioma. *BMC Cancer*. 2005;5:109.
19. Clifford GM, Polesel J, Rickenbach M, Dal Maso L, Keiser O, Kofler A i sur. Cancer risk in the Swiss HIV cohort study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97:425–32.
20. Serghianis TN, Kanavidis P, Michelakos T, Petridou ET. Cigarette smoking and risk of lymphoma in adults: a comprehensive meta-analysis on Hodgkin and non-Hodgkin disease. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22:131–50.
21. Strongman H, Brown A, Smeeth L, Bhaskaran K. Body mass index and Hodgkin's lymphoma: UK population-based cohort study of 5.8 million individuals. *Br J Cancer*. 2019;120:768–70.
22. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E i sur. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia*. 2022;36:1720–48.
23. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R i sur. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375–90.
24. Satou A, Takahara T, Nakamura S. An update on the pathology and molecular features of Hodgkin lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2022;14:2647.
25. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC i sur. The International Consensus Classification of mature lymphoid neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*. 2022;140:1229–53.

26. Gopas J, Stern E, Zurgil U, Ozer J, Ben-Ari A, Shubinsky G i sur. Reed-Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma present features of cellular senescence. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2457.
27. Weniger MA, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Leukemia.* 2021;35:968–81.
28. Zukerberg LR, Collins AB, Ferry JA, Harris NL. Coexpression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Am J Pathol.* 1991;139:475–83.
29. Schmid C, Pan L, Diss T, Isaacson PG. Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Am J Pathol.* 1991;139:701–7.
30. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:151–74.
31. Venkataraman G, Song JY, Tzankov A, Dirnhofer S, Heinze G, Kohl M i sur. Aberrant T-cell antigen expression in classical Hodgkin lymphoma is associated with decreased event-free survival and overall survival. *Blood.* 2013;121:1795–804.
32. 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;107:265–76.
33. Weiss LM. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. *Curr Oncol Rep.* 2000;2:199–204.
34. Shimabukuro-Vornhagen A, Haverkamp H, Engert A, Balleisen L, Majunke P, Heil G i sur. 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;23:5739–45.
35. Benharroch D, Levy A, Gopas J, Sacks M. Lymphocyte-depleted classic Hodgkin lymphoma-a neglected entity? *Virchows Arch.* 2008;453:611–6.
36. Slack GW, Ferry JA, Hasserjian RP, Sohani AR, Longtine JA, Harris NL i sur. Lymphocyte depleted Hodgkin lymphoma: an evaluation with immunophenotyping and genetic analysis. *Leuk Lymphoma.* 2009;50:937–43.
37. Klimm B, Franklin J, Stein H, Eichenauer DA, Haverkamp H, Diehl V i sur. Lymphocyte-depleted classical Hodgkin's lymphoma: a comprehensive analysis from the German Hodgkin study group. *J Clin Oncol.* 2011;29:3914–20.
38. Bienz M, Ramdani S, Knecht H. Molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma: past, present, future. *Int J Mol Sci.* 2020;21:6623.
39. Gobbi PG, Ferreri AJM, Ponzoni M, Levis A. Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;85:216–37.
40. Dabbs DJ, Striker LM, Mignon F, Striker G. Glomerular lesions in lymphomas and leukemias. *Am J Med.* 1986;80:63–70.

41. Wang H, Balakrishna JP, Pittaluga S, Jaffe ES. Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. *Br J Haematol*. 2019;184:45–59.
42. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E i sur. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32:3059–68.
43. Barrington SF, Mikhaeel NG. When should FDG-PET be used in the modern management of lymphoma? *Br J Haematol*. 2014;164:315–28.
44. Townsend W, Linch D. Hodgkin's lymphoma in adults. *Lancet*. 2012;380:836–47.
45. Cuccaro A, Bartolomei F, Cupelli E, Galli E, Giachelia M, Hohaus S. Prognostic factors in Hodgkin lymphoma. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6:e2014053.
46. Follows GA, Ardeshtna KM, Barrington SF, Culligan DJ, Hoskin PJ, Linch D i sur. Guidelines for the first line management of classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2014;166:34–49.
47. Momotow J, Borchmann S, Eichenauer DA, Engert A, Sasse S. Hodgkin Lymphoma—review on pathogenesis, diagnosis, current and future treatment approaches for adult patients. *JCM*. 2021;10:1125.
48. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors project on advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1998;339:1506–14.
49. Eichenauer DA, Aleman BMP, André M, Federico M, Hutchings M, Illidge T i sur. Hodgkin lymphoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29:iv19–29.
50. Burton C, Allen P, Herrera AF. Paradigm shifts in Hodgkin lymphoma treatment: from frontline therapies to relapsed disease. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2024;44:e433502.
51. Rossi C, Manson G, Marouf A, Cabannes-Hamy A, Nicolas-Virelizier E, Maerevoet M i sur. Classic Hodgkin lymphoma: The LYSA pragmatic guidelines. *Eur J Cancer*. 2024;213:115073.
52. Specht L. Radiotherapy for Hodgkin lymphoma: reducing toxicity while maintaining efficacy. *Cancer J*. 2018;24:237–43.
53. Hay AE, Klimm B, Chen BE, Goergen H, Shepherd LE, Fuchs M i sur. An individual patient-data comparison of combined modality therapy and ABVD alone for patients with limited-stage Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol*. 2013;24:3065–9.
54. Al-Juhaishi T, Ahmed S. Management of limited-stage Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2023;2023:500–9.

55. Blum KA. Controversies in the management of early-stage Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021;2021:234–9.
56. Keller FG, Kahl B, Friedberg JW. Current directions in the treatment of classical Hodgkin lymphoma. *eJHaem*. 2023 Nov;4:908–11.
57. Dann EJ, Casasnovas RO. Treatment strategies in advanced-stage Hodgkin lymphoma. *Cancers*. 2024;16:2059.
58. Engert A, Haverkamp H, Kobe C, Markova J, Renner C, Ho A i sur. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 2012;379:1791–9.
59. Gordon LI, Hong F, Fisher RI, Bartlett NL, Connors JM, Gascoyne RD i sur. 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;31:684–91.
60. Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, Nissen N, Cooper MR, Henderson ES i sur. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Engl J Med*. 1992;327:1478–84.
61. Merli F, Luminari S, Gobbi PG, Cascavilla N, Mammi C, Ilariucci F i sur. 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;34:1175–81.
62. Milunović V. How I follow Hodgkin lymphoma in first complete (metabolic) remission? *Medicina*. 2024;60:344.
63. Johnson P, Federico M, Kirkwood A, Fosså A, Berkahn L, Carella A i sur. Adapted treatment guided by interim PET-CT scan in advanced Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2016;374:2419–29.
64. Straus DJ, Długosz-Danecka M, Connors JM, Alekseev S, Illés Á, Picardi M i sur. 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;8:e410–21.
65. Straus DJ, Długosz-Danecka M, Alekseev S, Illés Á, Picardi M, Lech-Maranda E i sur. Brentuximab vedotin with chemotherapy for stage III/IV classical Hodgkin lymphoma: 3-year update of the ECHELON-1 study. *Blood*. 2020;135:735–42.

66. Herrera AF, LeBlanc ML, Castellino SM, Li H, Rutherford SC, Evens AM i sur. SWOG S1826, a randomized study of nivolumab(N)-AVD versus brentuximab vedotin(BV)-AVD in advanced stage (AS) classic Hodgkin lymphoma (HL). JCO. 2023;41:LBA4–LBA4.
67. Moskowitz CH, Nimer SD, Zelenetz AD, Trippett T, Hedrick EE, Filippa DA i s. A 2-step comprehensive high-dose chemoradiotherapy second-line program for relapsed and refractory Hodgkin disease: analysis by intent to treat and development of a prognostic model. Blood. 2001;97:616–23.
68. Abali H, Urün Y, Oksüzoğlu B, Budakoğlu B, Yildirim N, Güler T i sur. 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;26:401–6.
69. Bartlett NL, Niedzwiecki D, Johnson JL, Friedberg JW, Johnson KB, van Besien K i sur. Gemcitabine, vinorelbine, and pegylated liposomal doxorubicin (GVD), a salvage regimen in relapsed Hodgkin's lymphoma: CALGB 59804. Ann Oncol. 2007;18:1071–9.
70. Santoro A, Magagnoli M, Spina M, Pinotti G, Siracusano L, Michieli M, et al. Ifosfamide, gemcitabine, and vinorelbine: a new induction regimen for refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma. Haematologica. 2007 Jan;92(1):35–41.
71. Crump M, Kuruvilla J, Couban S, MacDonald DA, Kukreti V, Kouroukis CT i sur. 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;32:3490–6.
72. Gutierrez A, Rodriguez J, Martinez-Serra J, Gines J, Paredes P, Garcia F i sur. Gemcitabine and oxaliplatin: an effective regimen in patients with refractory and relapsing Hodgkin lymphoma. Onco Targets Ther. 2014;7:2093-100.
73. Martinez C, Bazarbachi A, Sureda A. Classical Hodgkin's lymphoma. U: Sureda A, Corbacioglu S, Greco R, urednici. The EBMT handbook: hematopoietic cell transplantation and cellular therapies. Osmo izdanje. Cham: Springer Nature; 2024. str. 799-807.
74. Moskowitz CH, Nademanee A, Masszi T, Agura E, Holowiecki J, Abidi MH i sur. 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. Lancet. 2015;385:1853–62.
75. Moskowitz AJ, Schöder H, Yahalom J, McCall SJ, Fox SY, Gerecitano J i sur. 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;16:284–92.

76. LaCasce AS, Bociek RG, Sawas A, Caimi P, Agura E, Matous J i sur. Brentuximab vedotin plus bendamustine: a highly active first salvage regimen for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2018;132:40–8.

77. Moskowitz AJ, Shah G, Schöder H, Ganesan N, Drill E, Hancock H i sur. 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;39:3109–17.

78. Grover NS, Dittus C, Thakkar A, Beaven AW. The optimal management of relapsed and refractory Hodgkin lymphoma: post–brentuximab and checkpoint inhibitor failure. *Hematology.* 2023;2023:510–8.

79. Böll B, Goergen H, Behringer K, Bröckelmann PJ, Hitz F, Kerkhoff A i sur. Bleomycin in older early-stage favorable Hodgkin lymphoma patients: analysis of the German Hodgkin Study Group (GHSG) HD10 and HD13 trials. *Blood.* 2016;127:2189–92.

80. Andersen MD, Kamper P, d’Amore A, Clausen M, Bentzen H, d’Amore F. The incidence of bleomycin induced lung toxicity is increased in Hodgkin lymphoma patients over 45 years exposed to granulocyte-colony stimulating growth factor †. *Leuk Lymphoma.* 2019;60:927–33.

81. Sun HL, Atenafu EG, Tsang R, Kukreti V, Marras TK, Crump M i sur. Bleomycin pulmonary toxicity does not adversely affect the outcome of patients with Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2017;58:2607–14.

82. Kolstad A, Nome O, Delabie J, Lauritzsen GF, Fossa A, Holte H. Standard CHOP-21 as first line therapy for elderly patients with Hodgkin’s lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2007;48:570–6.

83. Friedberg JW, Forero-Torres A, Bordoni RE, Cline VJM, Patel Donnelly D, Flynn PJ i sur. Frontline brentuximab vedotin in combination with dacarbazine or bendamustine in patients aged ≥60 years with HL. *Blood.* 2017;130:2829–37.

84. Levis A, Anselmo AP, Ambrosetti A, Adamo F, Bertini M, Cavalieri E i sur. VEPEMB in elderly Hodgkin’s lymphoma patients. Results from an Intergruppo Italiano Linfomi (IIL) study. *Ann Oncol.* 2004;15:123–8.

85. Halbsguth TV, Nogová L, Mueller H, Sieniawski M, Eichenauer DA, Schober T, et al. Phase 2 study of BACOPP (bleomycin, adriamycin, cyclophosphamide, vincristine,

procarbazine, and prednisone) in older patients with Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2026–32.

86. Friedberg JW, Forero-Torres A, Holkova B, Goldschmidt JH, Boccia RV, Bordoni R, et al. Long-term follow-up of brentuximab vedotin $\pm$ dacarbazine as first line therapy in elderly patients with Hodgkin lymphoma. *JCO*. 2018;36:7542.

87. Schlembach PJ, Wilder RB, Jones D, Ha CS, Fayad LE, Younes A i sur. Radiotherapy alone for lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *Cancer J*. 2002;8:377–83.

88. Wilder RB, Schlembach PJ, Jones D, Chronowski GM, Ha CS, Younes A i sur. European Organization for Research and Treatment of Cancer and Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte very favorable and favorable, lymphocyte-predominant Hodgkin disease. *Cancer*. 2002;94:1731–8.

89. Nogová L, Reineke T, Eich HT, Josting A, Müller-Hermelink HK, Wingbermühle K i sur. Extended field radiotherapy, combined modality treatment or involved field radiotherapy for patients with stage IA lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma: a retrospective analysis from the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Ann Oncol*. 2005;16:1683–7.

90. Laddaga FE, Moschetta M, Perrone T, Perrini S, Colonna P, Ingravallo G i sur. Long-term Hodgkin lymphoma survivors: a glimpse of what happens 10 years after treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2020;20:e506–12.

91. Navari RM, Aapro M. Antiemetic prophylaxis for chemotherapy-induced nausea and vomiting. *N Engl J Med*. 2016;374:1356–67.

92. Scialdone L. Overview of supportive care in patients receiving chemotherapy: antiemetics, pain management, anemia, and neutropenia. *J Pharm Pract*. 2012;25:209–21.

93. Berger MJ, Ettinger DS, Aston J, Barbour S, Bergsbaken J, Bierman PJ i sur. NCCN guidelines insights: antiemesis, version 2.2017. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15:883–93.

94. Gralla RJ, de Wit R, Herrstedt J, Carides AD, Ianus J, Guoguang-Ma J i sur. Antiemetic efficacy of the neurokinin-1 antagonist, aprepitant, plus a 5HT3 antagonist and a corticosteroid in patients receiving anthracyclines or cyclophosphamide in addition to high-dose cisplatin: analysis of combined data from two Phase III randomized clinical trials. *Cancer*. 2005;104:864–8.

95. Chu CC, Hsing CH, Shieh JP, Chien CC, Ho CM, Wang JJ. The cellular mechanisms of the antiemetic action of dexamethasone and related glucocorticoids against vomiting. *Eur J Pharmacol*. 2014;722:48–54.

96. Chow R, Chiu L, Navari R, Passik S, Chiu N, Popovic M i sur. Efficacy and safety of olanzapine for the prophylaxis of chemotherapy-induced nausea and vomiting (CINV) as reported in phase I and II studies: a systematic review. *Support Care Cancer*. 2016;24:1001–8.
97. Elis A, Blickstein D, Manor Y, Lishner M. Association between alopecia and response to chemotherapy in patients with Hodgkin lymphoma. *Ther Drug Monit*. 2005;27:287–9.
98. Gaddam M, Iqbal R, Jayakumar J, Ginjupalli M, Vachhani B, Sanka S i sur. Effects and outcomes of tumor lysis syndrome in patients admitted with Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: A National Inpatient Sample study (2019-2020). *JCO*. 2024;42:e19032.
99. Cairo MS, Bishop M. Tumour lysis syndrome: new therapeutic strategies and classification. *Br J Haematol*. 2004;127:3–11.
100. Connors JM, Jurczak W, Straus DJ, Ansell SM, Kim WS, Gallamini A i sur. Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018;378:331–44.
101. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D i sur. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 2003;348:2386–95.
102. Sureda A, Domingo-Domenech E, Gautam A. Neutropenia during frontline treatment of advanced Hodgkin lymphoma: Incidence, risk factors, and management. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;138:1–5.
103. Borchmann P, Ferdinandus J, Schneider G, Moccia A, Greil R, Hertzberg M i sur. 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;404:341–52.
104. Sud A, Thomsen H, Sundquist K, Houlston RS, Hemminki K. Risk of second cancer in Hodgkin Lymphoma survivors and influence of family history. *J Clin Oncol*. 2017;35:1584–90.
105. Dores GM, Anderson WF, Beane Freeman LE, Fraumeni JF, Curtis RE. Risk of breast cancer according to clinicopathologic features among long-term survivors of Hodgkin's lymphoma treated with radiotherapy. *Br J Cancer*. 2010;103:1081–4.
106. Ng A, Constine LS, Advani R, Das P, Flowers C, Friedberg J i sur. ACR Appropriateness Criteria: follow-up of Hodgkin's lymphoma. *Curr Probl Cancer*. 2010;34:211–27.
107. Travis LB, Gospodarowicz M, Curtis RE, Clarke EA, Andersson M, Glimelius B i sur. Lung cancer following chemotherapy and radiotherapy for Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:182–92.

108. Schaapveld M, Aleman BMP, van Eggermond AM, Janus CPM, Krol ADG, van der Maazen RWM i sur. Second cancer risk up to 40 years after treatment for Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;373:2499–511.
109. van Leeuwen FE, Klokman WJ, Stovall M, Hagenbeek A, van den Belt-Dusebout AW, Noyon R i sur. Roles of radiotherapy and smoking in lung cancer following Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1530–7.
110. Milano MT, Li H, Constine LS, Travis LB. Survival after second primary lung cancer: a population-based study of 187 Hodgkin lymphoma patients. *Cancer*. 2011;117:5538–47.
111. Swerdlow AJ, Barber JA, Hudson GV, Cunningham D, Gupta RK, Hancock BW i sur. Risk of second malignancy after Hodgkin's disease in a collaborative British cohort: the relation to age at treatment. *J Clin Oncol*. 2000;18:498–509.
112. Ng AK. Late complications after treatment for Hodgkin lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2008;3:119–25.
113. Schonfeld SJ, Gilbert ES, Dores GM, Lynch CF, Hodgson DC, Hall P i sur. Acute myeloid leukemia following Hodgkin lymphoma: a population-based study of 35,511 patients. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:215–8.
114. van Leeuwen FE, Chorus AM, van den Belt-Dusebout AW, Hagenbeek A, Noyon R, van Kerkhoff EH i sur. Leukemia risk following Hodgkin's disease: relation to cumulative dose of alkylating agents, treatment with teniposide combinations, number of episodes of chemotherapy, and bone marrow damage. *J Clin Oncol*. 1994;12:1063–73.
115. Heidenreich PA, Hancock SL, Lee BK, Mariscal CS, Schnittger I. Asymptomatic cardiac disease following mediastinal irradiation. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:743–9.
116. Girinsky T, M'Kacher R, Lessard N, Koscielny S, Elfassy E, Raoux F i sur. Prospective coronary heart disease screening in asymptomatic Hodgkin lymphoma patients using coronary computed tomography angiography: results and risk factor analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;89:59–66.
117. Martin WG, Ristow KM, Habermann TM, Colgan JP, Witzig TE, Ansell SM. Bleomycin pulmonary toxicity has a negative impact on the outcome of patients with Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:7614–20.
118. Ng AK. Current survivorship recommendations for patients with Hodgkin lymphoma: focus on late effects. *Blood*. 2014;124:3373–9.
119. Velasco R, Domingo-Domenech E, Sureda A. Brentuximab-Induced Peripheral Neurotoxicity: A Multidisciplinary Approach to Manage an Emerging Challenge in Hodgkin Lymphoma Therapy. *Cancers*. 2021;13:6125.

120. Glatzel-Plucińska N, Piotrowska A, Dzięgiel P, Podhorska-Okolów M. The role of SATB1 in tumour progression and metastasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4156.
121. Frömberg A, Engeland K, Aigner A. The Special AT-rich Sequence Binding Protein 1 (SATB1) and its role in solid tumors. *Cancer Letters.* 2018;417:96–111.
122. Luo XD, Yang SJ, Wang JN, Tan L, Liu D, Wang YY, et al. Downregulation of SATB1 increases the invasiveness of Jurkat cell via activation of the WNT/ β -catenin signaling pathway in vitro. *Tumour Biol.* 2016 Jun;37(6):7413–9.
123. Grzanka D, Gagat M, Izdebska M, Marszałek A. Expression of special AT-rich sequence-binding protein 1 is an independent prognostic factor in cutaneous T-cell lymphoma. *Oncol Rep.* 2015 Jan;33(1):250–66.
124. Luo X, Xu L, Wu X, Tan H, Liu L. Decreased SATB1 expression promotes AML cell proliferation through NF- κ B activation. *Cancer Cell Int.* 2019;19:134.
125. Yi H, Wei Y, Chen JJ. Expression of SATB1 is a prognostic indicator for survival in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2022;26:382–90.
126. Jankowska-Konsur A, Kobierzycki C, Reich A, Grzegorzolka J, Bieniek A, Dzięgiel P. Expression of SATB1, MTI/II and Ki-67 in Mycosis Fungoides. *Anticancer Res.* 2016;36:189–97.
127. Gao Y, Liu F, Sun J, Wen Y, Tu P, Kadin ME i sur. Differential SATB1 expression reveals heterogeneity of cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 2021;141:607-618.
128. Wang Y, Su M, Zhou LL, Tu P, Zhang X, Jiang X, et al. Deficiency of SATB1 expression in Sezary cells causes apoptosis resistance by regulating FasL/CD95L transcription. *Blood.* 2011;117:3826–35.
129. Wang Y, Gu X, Zhang G, Wang L, Wang T, Zhao Y i sur. SATB1 overexpression promotes malignant T-cell proliferation in cutaneous CD30+ lymphoproliferative disease by repressing p21. *Blood.* 2014;123:3452–61.
130. Fredholm S, Willerslev-Olsen A, Met Ö, Kubat L, Gluud M, Mathiasen SL i sur. SATB1 in malignant T Cells. *J Invest Dermatol.* 2018;138:1805–15.
131. Grzanka A, Grzanka D, Gagat M, Tadrowski T, Sokołowska-Wojdyło M, Marszałek A i sur. Correlation of SATB1 expression with clinical course of cutaneous T-cell lymphomas. *Pol J Pathol.* 2012;63:101–5.
132. Sun J, Yi S, Qiu L, Fu W, Wang A, Liu F i sur. SATB1 defines a subtype of cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders associated with a T-helper 17 cytokine profile. *J Invest Dermatol.* 2018;138:1795–804.

133. Liu Y, van den Berg A, Veenstra R, Rutgers B, Nolte I, van Imhoff G i sur. PML nuclear bodies and SATB1 are associated with HLA class I expression in EBV+ Hodgkin lymphoma. *PLoS One*. 2013;8:e72930.
134. Irshaid F, Tarawneh K, Alshdefat A, Dilmi F, Jaran A, Al-Hadithi R i sur. Loss of P16 protein expression and its association with Epstein-Barr Virus LMP-1 expression in Hodgkin's lymphoma. *Iran J Cancer Prev*. 2013;6:78–84.
135. Kim L hua, Peh S cheng, Poppema S. Expression of retinoblastoma protein and P16 proteins in classic Hodgkin lymphoma: relationship with expression of p53 and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death. *Hum Pathol*. 2006;37:92–100.
136. Caliò A, Zamò A, Ponzoni M, Zanolin ME, Ferreri AJM, Pedron S i sur. Cellular senescence markers p16INK4a and p21CIP1/WAF are predictors of Hodgkin lymphoma outcome. *Clin Cancer Res*. 2015;21:5164–72.
137. Al-Salam S, Awwad A, Sudhadevi M, Daoud S, Nagelkerke NJD, Castella A i sur. Epstein-Barr virus infection correlates with the expression of COX-2, p16(INK4A) and p53 in classic Hodgkin lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6:2765–77.
138. Inoue K, Fry EA. Aberrant expression of p16INK4a in human cancers - a new biomarker? *Cancer Rep Rev*. 2018;2:1-7.
139. Morente MM, Piris MA, Abaira V, Acevedo A, Aguilera B, Bellas C i sur. Adverse clinical outcome in Hodgkin's disease is associated with loss of retinoblastoma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression. *Blood*. 1997;90:2429–36.
140. Jones F, Merciana L, Oehadian A, Marthoenis M. Difference of neutrophil-to-lymphocyte ratio, monocyte-to-lymphocyte ratio, and platelet-to-lymphocyte ratio in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *AMJ*. 2024;11(4).
141. Tao Y, He X, Qin Y, Liu P, Zhou S, Yang J i sur. Low platelet/platelet distribution width and high platelet/lymphocyte ratio are adverse prognostic factors in patients with newly diagnosed advanced Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2021;62:3119–29.
142. Reddy JP, Hernandez M, Gunther JR, Dabaja BS, Martin GV, Jiang W i sur. Pre-treatment neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio are prognostic of progression in early stage classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2018;180:545–9.
143. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310:2191.

144. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET i sur. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982;5:649–55.
145. Azam F, Latif MF, Farooq A, Tirmazy SH, AlShahrani S, Bashir S i sur. Performance Status Assessment by Using ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) score for cancer patients by Oncology Healthcare Professionals. *Case Rep Oncol.* 2019;12:728–36.
146. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987;8:138–40.
147. Chen Z, Li Z, Li W, Zong Y, Zhu Y, Miao Y i sur. SATB1 promotes pancreatic cancer growth and invasion depending on MYC activation. *Dig Dis Sci.* 2015;60:3304–17.
148. Müller-Meinhard B, Seifert N, Grund J, Reinke S, Yalcin F, Kaul H i sur. Human leukocyte antigen (HLA) class I expression on Hodgkin–Reed–Sternberg cells is an EBV-independent major determinant of microenvironment composition in classic Hodgkin lymphoma. *HemaSphere.* 2024;8:e84.
149. Kubes V, Kren L, Sokol F, Michalka J, Muzik J, Arpas T i sur. Prognostic significance of immune-checkpoint molecule PD-L1 in classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathologic study of 120 cases. *In Vivo.* 2023;37:1735–42.
150. Herrera A, Fredholm S, Cheng A, Mimitou EP, Seffens A, Bar-Natan M i sur. Low SATB1 expression promotes IL-5 and IL-9 expression in Sézary syndrome. *J Invest Dermatol.* 2020;140:713–6.
151. de la Cruz-Merino L, Lejeune M, Nogales Fernández E, Henao Carrasco F, Grueso López A, Illescas Vacas A i sur. Role of immune escape mechanisms in Hodgkin’s lymphoma development and progression: a whole new world with therapeutic implications. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:756353.
152. Irshaid F, Jaran A, Dilmi F, Tarawneh K, Hadeth R, Khatib AA. Prevalence of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1 in Jordanian patients with Hodgkin’s lymphoma and non-Hodgkin’s Lymphoma. *J of Biological Sciences.* 2010;10:507–13.
153. Zhao P, Lu Y, Liu L, Zhong M. Aberrant expression of ID2 protein and its correlation with EBV-LMP1 and P16(INK4A) in classical Hodgkin lymphoma in China. *BMC Cancer.* 2008;8:379.
154. Lebok P, Roming M, Kluth M, Koop C, Özden C, Taskin B i sur. p16 overexpression and 9p21 deletion are linked to unfavorable tumor phenotype in breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7:81322–31.

155. Zhou N, Gu Q. Prognostic and clinicopathological value of p16 protein aberrant expression in colorectal cancer: A PRISMA-compliant Meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97:e0195.
156. Moscona-Nissan A, Mancilla-Osuna MF, Bardán-Duarte A, Rendón-Macías ME. Classical Hodgkin lymphoma histologic subtypes distribution among geographical regions and correlation with human development index. *Health Sciences Review*. 2023;9:100117.
157. Shamoon RP, Ali MD, Shabila NP. Overview and outcome of Hodgkin's Lymphoma: Experience of a single developing country's oncology centre. *PLoS One*. 2018;13:e0195629.
158. Bazzeh F, Rihani R, Howard S, Sultan I. Comparing adult and pediatric Hodgkin lymphoma in the Surveillance, Epidemiology and End Results Program, 1988-2005: an analysis of 21 734 cases. *Leuk Lymphoma*. 2010;51:2198–207.
159. Aurer I, Dreta B, Milunović V, Ivić M, Međugorac M, Miljak A i sur. Četvrti Hrvatski konsenzus o dijagnostici i liječenju limfoma. *Bilten Krohema*. 2022;14:8-11.

12. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i Prezime: Lučana Vicelić Čutura

Datum i mjesto rođenja: 11.08.1987., Split

E-mail: lucana.vicelic@gmail.com

OBRAZOVANJE

1994.-2002. Osnovna škola “Bol” ,Split

1996.-2006. IV. Gimnazija “Marko Marulić”

2006.-2012. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2014.- danas doktorski studij Klinička medicina utemeljena na dokazima (EBM),
Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu

2017/2018. Poslijediplomski specijalistički studij Hematologija, Medicinski
fakultet, Sveučilište u Zagrebu

RADNO ISKUSTVO

2012.-2013. pripravnčki staž pri Zavodu za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske
županije

2014. liječnik pri Zavodu za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije

2014.- 2021. specijalizacija iz hematologije, Zavod za hematologiju, KBC-a Split

2021.- danas specijalist hematolog, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Split

VJEŠTINE

Rad na računalu: aktivno i svakodnevno korištenje MS Office paketa

Strani jezici: engleski aktivno u govoru i pismu

ČLANSTVO U ZNANSTVENIM I STRUČNIM DRUŠTVIMA

2013.- Hrvatska liječnička komora

2014.- član KROHEM-a (Hrvatska kooperativna grupa za hematološke bolesti)

OBJAVLJENI ZNANSTVENI I STRUČNI RADOVI

Vicelić Čutura L, Vujčić M, Galušić D, Blaslov V, Petrić M, Miljak A i sur. SATB1 and p16 expression and prognostic value in Croatian Hodgkin lymphoma patients: a unicentric study. Cells. 2024;13:1323.

Miljak A, Pavlović A, Benzon B, Čutura Vicelić L, Galušić D, Vujčić M i sur. 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. *IJMS* . 2025;26:5592.

Zjačić Puljiz D, Vrkić I, Jeličić I, Borić Škaro D, Delić Jukić IK, Vicelić Čutura L i sur. Late-onset HSV-2 encephalitis in a kidney transplant recipient: a rare case report. *Life*. 2025;15:152.

Zjačić Puljiz D, Delić Jukić IK, Puljiz M, Vicelić Čutura L, Jerčić Martinić-Ceza I, Božić D, i sur. Which factors influence liver stiffness measured by real-time two dimensional shear wave elastography in patients on maintenance hemodialysis? *Croat Med J*. 2021;62:34–43.

Galusic D, Lucijanic M, Livun A, Radman M, Blaslov V, Vicelic Cutura L i sur. Higher AURKA and PLK1 expression are associated with inferior overall survival in patients with myelofibrosis. *Blood Cells Mol Dis*. 2020;81:102396.