

Limfociti Foxp3+ u citološkim razmazima punktata limfnih čvorova i njihova povezanost s prognostičkim čimbenicima u bolesnika oboljelih od limfoma

Jelić Puškarić, Biljana

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:153234>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-08**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Biljana Jelić Puškarić

**Limfociti Foxp3+ u citološkim
razmazima punktata limfnih čvorova i
njihova povezanost s prognostičkim
čimbenicima u bolesnika oboljelih od
limfoma**

DISERTACIJA



Zagreb, 2020.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Biljana Jelić Puškarić

**Limfociti Foxp3+ u citološkim
razmazima punktata limfnih čvorova i
njihova povezanost s prognostičkim
čimbenicima u bolesnika oboljelih od
limfoma**

DISERTACIJA

Zagreb, 2020.

Disertacija je izrađena u Zavodu za kliničku citologiju i citogenetiku Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ika Kardum-Skelin, dr. med.

Od srca zahvaljujem svojoj učiteljici i voditeljici ovog rada, prof. dr. sc. Iki Kardum-Skelin, na velikom trudu, beskrajnom strpljenu, stalnom poticanju te korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada. Veliko hvala mojim kolegicama Dunji Šušterčić, dr. med, prim. dr. sc. Gordani Kaić, dr. med., Marini Pažur, dr. med. i Miji Šunjić Stakor, dr. med. za pomoć, strpljenje i razumijevanje tijekom izrade rada. Zahvaljujem citotehnologima Biserki Križaj, Veroniki Anić, Gordani Knežević, Nadi Tuđek, Ana-Mari Papec, Marieli Stipetić te posebno Katarini Parigros na neprocjenjivoj pomoći tijekom tehničke provedbe istraživanja. Veliko hvala kolegama Zavoda za hematologiju na pomoći oko prikupljanja i obrade kliničkih podataka. Zahvaljujem doc. dr. sc. Milanu Miloševiću na pomoći oko statističke analize podataka. Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji, Tvrtku, Tomislavu, mami i tati, kojima od srca zahvaljujem na beskrajnom strpljenju, podršci i pomoći.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

1. UVOD.....	1
1.1. Limfomi.....	1
1.1.1. Klasifikacija.....	1
1.1.2. Epidemiologija.....	4
1.1.3. Etiologija.....	4
1.1.4. Određivanje proširenosti bolesti.....	4
1.1.5. Procjena prognoze bolesti.....	6
1.1.5.1. Međunarodni prognostički indeks, IPI.....	6
1.1.5.2. Međunarodni prognostički indeks za folikularne limfome, FLIPI.....	7
1.1.5.3. Međunarodni prognostički indeks za limfom plaštene zone, MIPI.....	8
1.1.5.4. Prognostički indeksi u bolesnika s Hodgkinovim limfomom.....	9
1.1.6. Indolentni B-NHL.....	10
1.1.6.1. Folikularni limfom, FL.....	10
1.1.6.2. Kronična limfocitna leukemija/limfom malih limfocita, CLL/SLL...11	
1.1.6.3. Limfoplazmocitoidni limfom, LPL.....	11
1.1.6.4. Nodalni limfom marginalne zone, NMZL.....	11
1.1.6.5. Ekstranodalni limfom marginalne zone limfatičnog tkiva vezanog uz sluznice, MALT limfom.....	12
1.1.7. Agresivni B-NHL.....	12
1.1.7.1. Difuzni B velikostanični limfom, DLBCL.....	12
1.1.7.2. Limfom plaštene zone, MCL.....	13
1.1.7.3. Burkittov limfom, BL.....	13

1.1.8. T-NHL.....	14
1.1.8.1. Periferni T stanični limfom, nespecificirani, PTCL, NOS.....	14
1.1.8.2. Angioimunoblastični T stanični limfom, AITL.....	14
1.1.8.3. Anaplastični velikostanični limfom, ALCL.....	15
1.1.9. Hodgkinov limfom.....	15
1.1.9.1. Nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma, NLPHL.....	15
1.1.9.2. Klasični Hodgkinov limfom.....	16
1.2. Regulacijski limfociti T.....	17
1.2.1. Foxp3.....	17
1.2.2. Anergija i supresivna aktivnost regulacijskih limfocita T.....	18
1.2.3. Način djelovanja regulacijskih limfocita T.....	19
1.2.4. Podjela regulacijskih limfocita T.....	20
1.2.4.1. Prirođeni regulacijski limfociti T, nTreg.....	20
1.2.4.1.1. Površinske molekule izražene na prirođenim regulacijskim limfocitima T.....	21
1.2.4.2. Adaptivni (inducirani) regulacijski limfociti T, iTreg.....	22
1.2.4.2.1. Regulacijske T stanice tipa 1 (Tr1 stanice).....	22
1.2.4.2.2. Pomoćnički limfociti T 3 (Th3 regulacijske stanice).....	23
1.2.5. Regulacijski limfociti T u tumorima.....	23
2. HIPOTEZA.....	26
3. CILJEVI RADA.....	27
4. ISPITANICI I METODE.....	28
4.1. Ispitanici.....	28
4.2. Metode.....	29

4.2.1. Citološka punkcija limfnog čvora.....	29
4.2.2. Foxp3 imunocitokemijsko bojenje.....	34
4.2.3. Imunocitokemijska analiza.....	34
4.2.4. Statistička obrada.....	37
5. REZULTATI.....	38
5.1. Kliničke, demografske i laboratorijske odrednice ispitanika.....	38
5.2. Razlika u udjelu Foxp3 ⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL.....	41
5.3. Povezanost udjela Foxp3 ⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s klasičnim HL i NHL.....	47
5.4. Povezanost udjela Foxp3 ⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s klasičnim HL.....	55
5.5. Povezanost udjela Foxp3 ⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s NHL.....	61
5.6. Povezanost udjela Foxp3 ⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s DLBCL.....	67
5.7. Povezanost udjela Foxp3 ⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s FL.....	73
6. RASPRAVA.....	79
7. ZAKLJUČCI.....	88
8. SAŽETAK.....	90
9. SUMMARY.....	92
10. LITERATURA.....	94
11. ŽIVOTOPIS.....	107

POPIS KRATICA

AITL - prema engl. angioimmunoblastic T-cell lymphoma, angioimunoblastični T stanični limfom

ALCL - prema engl. anaplastic large cell lymphoma, anaplastični velikostanični limfom

ALK - prema engl. anaplastic lymphoma kinase, kinaza anaplastičnog limfoma

APC - prema engl. antigen presenting cells, predložne stanice, stanice koje prezentiraju antigen

B7-H3 - homolog 3 ko-inhibitornog receptora B7

BL - Burkittov limfom

CD - prema engl. cluster of differentiation or designation, protokol koji se koristi za identifikaciju staničnih površinskih molekula

CLL - prema engl. chronic lymphocytic leukemia, kronična limfocitna leukemija

CT - prema engl. computed tomography, kompjutorizirana tomografija

CTLA-4 - prema engl. cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, protein 4 povezan s citotoksičnim limfocitima T

CTLs - prema engl. cytotoxic T lymphocytes, citotoksični limfociti T

DC - prema engl. dendritic cells, dendritičke stanice

DLBCL - prema engl. diffuse large B-cell lymphoma, difuzni B velikostanični limfom

EBV - Epstein Barrov virus

FDG - fluorodeoksiglukoza

FL - folikularni limfom

FLIPI - prema engl. follicular lymphoma international prognostic index, međunarodni prognostički indeks za folikularne limfome

Foxp3 - prema engl. forkhead box p3

GCB - prema engl. germinal center B-cell-like, tip DLBCL podrijetla limfocita germinativnog centra

GVHD - prema engl. graft versus host disease, imunološka reakcija davateljevih limfocita T usmjerena protiv tkiva domaćina

HGBL - prema engl. high-grade B-cell lymphomas, B stanični limfomi visokog stupnja

HHV-8 - humani herpes virus 8

HIV- prema engl. human immunodeficiency virus, virus humane imunodeficijencije

HL - Hodgkinov limfom

HLA - prema engl. human leucocyte antigen, ljudski leukocitni antigen

HTLV-1 - prema engl. human T-cell lymphotropic virus-1, ljudski T-limfotropni virus tipa 1

IDO - prema engl. indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN - interferon

IL - interleukin

IPEX - prema engl. the immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome, X-vezani sindrom, karakteriziran imunološkom disregulacijom, poliendokrinopatijom i enteropatijom

IPI - prema engl. international prognostic index, međunarodni prognostički indeks

LDH - laktat dehidrogenaza

LPL - prema engl. lymphoplasmacytic lymphoma, limfoplazmocitoidni limfom

MALT - prema engl. mucosa-associated lymphoid tissue, limfatično tkivo vezano uz sluznice

MBP - prema engl. myelin basic protein, bazični mijelinski protein

MCL - prema engl. mantle cell lymphoma, limfom plaštene zone

MDSC - prema engl. myeloid-derived suppressor cell, supresijske stanice mijeloidnog porijekla

MGUS - prema engl. monoclonal gammopathy of undetermined significance, monoklonalna gamopatija neodređenog značenja

MHC - prema engl. major-histocompatibility-complex, glavni kompleks tkivne podudarnosti

MIPI - prema engl. mantle cell lymphoma international prognostic index, međunarodni prognostički indeks za limfom plaštene zone

MMR - prema engl. mediastinal mass ratio, omjer najvećeg promjera mediastinalnog tumora i širine mediastinuma

NHL - ne-Hodgkinov limfom

NK - prema engl. natural killer, prirođene ubilačke stanice

NLPHL - nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma

NMZL - prema engl. nodal marginal zone lymphoma, nodalni limfom marginalne zone

NOS - prema engl. not otherwise specified, bez osobitosti, nespecificirani

PD-L1 - prema engl. programmed death-ligand 1, ligand programirane smrti

PET - pozitronska emisijska tomografija

PS - prema engl. performance status, opće stanje bolesnika

PTCL - prema engl. peripheral T-cell lymphoma, periferni T stanični limfom

SE - sedimentacija eritrocita

SLL - prema engl. small lymphocytic lymphoma, limfom malih limfocita

SZO - Svjetska zdravstvena organizacija

TAA - prema engl. tumor-associated antigens, tumoru pridruženi antigeni

TAM - prema engl. tumour-associated macrophages, tumoru pridruženi makrofagi

TCR - prema engl. T cell receptor, T stanični receptor

TGF- β - prema engl. transforming growth factor- β , transformirajući čimbenik rasta β

TH - prema engl. T helper, pomoćnički limfociti T

Th3 - prema engl. T helper 3, pomoćnički limfociti T 3

Tr1 - prema engl. type 1 regulatory T cells, regulacijske T stanice tipa 1

Treg - prema engl. T regulatory, regulacijski limfocit T

TNF - prema engl. tumor necrosis factor, čimbenik tumorske nekroze

TSLP - prema engl. thymic stromal lymphopoietin, timusni stromalni limfopoetin

UZV – ultrazvuk

VEGF - prema engl. vascular endothelial growth factor, endotelni čimbenik rasta

WM - Waldenströмова makroglobulinemija

1. UVOD

1.1. Limfomi

1.1.1. Klasifikacija

Limfomi su zloćudni tumori limfatičnih stanica. Predstavljaju vrlo heterogenu skupinu bolesti, sastavljenu od velikog broja različitih entiteta. Tijekom povijesti su se koristile različite klasifikacije limfoma (1,2). Danas je najčešće i najšire primjenjivana klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) prema kojoj se tumori limfatičnih stanica dijele u pet skupina: nezreli (prekursorski) limfatični tumori, zreli tumori limfocita B, zreli tumori T/NK (prema *engl. natural killer*) stanica, Hodgkinov limfom (HL) i limfoproliferativne bolesti povezane s imunodeficijencijom (tablica 1) (3).

Klasifikacija SZO se temelji na multidisciplinarnom pristupu te objedinjuje morfološka, imunofenotipska, genetička, molekularna te klinička obilježja pri dijagnostici limfoma (4). Morfologija i imunofenotip su dovoljni za dijagnostiku većine entiteta. Međutim, niti jedan antigen nije specifičan za neki od limfoma te je za korektnu dijagnostiku najčešće potrebno kombinirati morfološka obilježja i panel sastavljen od više antigena. Genetika i molekularna dijagnostika imaju sve veće značenje u dijagnostici limfoma. Određivanje klonalnosti limfocita B i T može pomoći u diferencijalnoj dijagnostici prema benignim reaktivnim hiperplazijama. Neke vrste limfoma imaju specifične genetičke abnormalnosti koje su važne za njihovo biološko ponašanje te mogu biti od koristi u diferencijalnoj dijagnostici prema drugim limfomima. Tako je npr. t(11;14) karakteristična za limfom plaštene zone (*engl. mantle cell lymphoma*, MCL), t(14;18) za folikularni limfom (FL) te t(8;14) za Burkittov limfom (BL). Osim toga, neke genetičke abnormalnosti imaju prognostičko značenje, npr. *MYC*, *BCL2* i *BCL6* preuredba kod difuznog B velikostaničnog limfoma (*engl. diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) ili *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* i *ATM* mutacija kod kronične limfocitne leukemije/limfoma malih limfocita (*engl. chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma*, CLL/SLL) (1,3). Poznavanje kliničkih obilježja, kao što su lokalizacija tumora, spol i dob bolesnika, neophodno je za točnu klasifikaciju nekih entiteta (primarni medijastinalni B velikostanični limfom, limfomi marginalne zone, limfomi vezani uz točno određene dobne skupine kao što su djeca ili stariji bolesnici) (3,4).

Prema kliničkom tijeku bolesti, limfomi se mogu podijeliti na indolentne i agresivne. Indolentni limfomi, kao što su CLL/SLL, FL, limfomi marginalne zone i limfoplazmocitoidni limfom (*engl. lymphoplasmacytic lymphoma*, LPL), obično pokazuju spor klinički tijek te bolesnici mogu živjeti godinama, često i bez terapije. Agresivni limfomi, kao što su DLBCL, MCL, BL te limfoblastični limfom (LBL), su brzorastući tumori koji zahtijevaju što raniji početak liječenja (3).

Tablica 1. Klasifikacija limfoma prema SZO 2017. godine (3)

Nezreli (prekursorski) limfatični tumori B limfoblastična leukemija / limfom, NOS B limfoblastična leukemija / limfom s ponavljanim genetičkim poremećajima T limfoblastična leukemija / limfom NK limfoblastična leukemija / limfom	Zreli tumori T/NK stanica T prolimfocitna leukemija T stanična leukemija velikih granuliranih limfocita Kronična limfoproliferativna bolest NK stanica Agresivna leukemija NK stanica Sustavni EBV pozitivan T stanični limfom djece Limfoproliferativna bolest slična Hydroi vaccini forme T stanična leukemija/limfom odraslih Ekstranodalni NK/T stanični limfom nosnog tipa T stanični limfom povezan s enteropatijom Monomorfni epiteliotropni intestinalni T stanični limfom Hepatosplenični T stanični limfom T stanični limfom sličan subkutanom panikulitisu Mycosis fungoides Sezary sindrom Primarne kožne CD30 pozitivne T stanične limfoproliferativne bolesti Primarni kožni $\gamma\delta$ T stanični limfom Periferni T stanični limfom, NOS Angioimunoblastični T stanični limfom i drugi nodalni limfomi podrijetla folikularnih pomoćničkih T stanica Anaplastični velikostanični limfom, ALK pozitivan Anaplastični velikostanični limfom, ALK negativan
Zreli tumori limfocita B Kronična limfocitna leukemija / limfom malih limfocita Monoklonalna B stanična limfocitoza B prolimfocitna leukemija Splenični limfom marginalne zone Leukemija vlasastih stanica Splenični B stanični limfom/leukemija, neklasificirani Limfoplazmocitoidni limfom Monoklonalna gamapatija neodređenog značenja (MGUS), IgM Bolest teških lanaca Monoklonalna gamapatija neodređenog značenja (MGUS), IgG / IgA Plazma stanični mijelom Solitarni koštani plazmocitom Ekstraosealni plazmocitom Ekstranodalni limfom marginalne zone limfatičnog tkiva vezanog uz sluznice Nodalni limfom marginalne zone Folikularni limfom Pedijatrijski tip folikularnog limfoma Primarni kožni limfom centra folikla Limfom plaštene zone Difuzni B velikostanični limfom (DLBCL), NOS B velikostanični limfom bogat T stanicama/histiocitima Primarni DLBCL središnjeg živčanog sustava Primarni kožni DLBCL, nožni tip EBV pozitivan DLBCL, NOS DLBCL povezan s kroničnom upalom Limfomatoidna granulomatoza Primarni medijastinalni (timički) B velikostanični limfom Intravaskularni B velikostanični limfom ALK pozitivni B velikostanični limfom Plazmablastični limfom Primarni efuzijski limfom HHV-8 pozitivan DLBCL, NOS Burkittov limfom B stanični limfom visokog gradusa s <i>MYC</i> i <i>BCL2</i> i/ili <i>BCL6</i> preuredbom B stanični limfom visokog gradusa, NOS B stanični limfom, neklasificiran, sa značajkama između DLBCL i klasičnog HL	Hodgkinov limfom Nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma Klasični Hodgkinov limfom Nodularna skleroza klasičnog HL Limfocitima bogat klasični HL Miješana celularnost klasičnog HL Limfocitna deplecija klasičnog HL Limfoproliferativne bolesti povezane s imunodeficijencijom Limfoproliferativne bolesti povezane s primarnim imunološkim poremećajima Limfomi povezani s HIV infekcijom Posttransplantacijske limfoproliferativne bolesti Druge jatrogene limfoproliferativne bolesti povezane s imunodeficijencijom

Legenda: NOS = bez osobitosti (*engl. not otherwise specified*), MGUS = monoklonalna gamapatija neodređenog značenja (*engl. monoclonal gammopathy of undetermined significance*), EBV = Epstein Barrov virus, ALK = kinaza anaplastičnog limfoma (*engl. anaplastic lymphoma kinase*), HHV-8 = Humani herpes virus 8

1.1.2. Epidemiologija

Tijekom zadnjih desetljeća bilježi se značajan porast incidencije ne-Hodgkinovih limfoma (NHL), oko 80 % od 1970.-ih. Ne-Hodgkinovi limfomi čine oko 3-4 % svih zloćudnih bolesti i po učestalosti zauzimaju peto mjesto (3,5). Iako incidencija limfoma varira ovisno o rasi, klimatskim uvjetima i stupnju razvoja pojedinih zemalja, limfomi su općenito češći u razvijenim zemljama, posebno u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), Australiji, Novom Zelandu i zapadnoj Europi. Najčešće vrste su FL i DLBCL, koji čine preko 60 % NHL (3,6,7). Limfomi T/NK stanica su puno rjeđi od onih B fenotipa i čine oko 12 % svih NHL (8). Značajno su češći u Aziji u odnosu na druge dijelove svijeta. Ta razlika je dijelom posljedica njihove veće incidencije u Aziji, a dijelom relativno niže učestalosti većine B-NHL (3). Hodgkinov limfom čini oko 30 % svih limfoma i za razliku od NHL incidencija mu je stabilna, oko 2,67 novih bolesnika na 100 000 stanovnika (3,6).

1.1.3. Etiologija

Imunodeficijencija, bilo prirođena ili stečena, značajan je rizični čimbenik za nastanak limfoma. Bolesnici koji su pod imunosupresivnom terapijom nakon transplantacije solidnih organa ili koštane srži imaju 30-50 puta veći rizik za razvoj NHL u odnosu na opću populaciju (9). Kod bolesnika zaraženih virusom humane imunodeficijencije (*engl. human immunodeficiency virus*, HIV) rizik je povećan >100 puta (5,10). Značajan kofaktor u imunokompromitiranih bolesnika je infekcija Epstein Barrovim virusom (EBV) (5). Drugi virusi koji se povezuju s razvojem limfoma su humani herpes virus 8 (HHV-8) povezan s razvojem primarnog efuzijskog limfoma, virus hepatitisa C povezan s razvojem limfoplazmocitoidnog limfoma te ljudski T-limfotropni virus tipa 1 (*engl. human T-cell lymphotropic virus-1*, HTLV-1) povezan s razvojem T stanične leukemije/limfoma odraslih (3,5).

1.1.4. Određivanje proširenosti bolesti

Važan korak u dijagnostici limfoma je procjena proširenosti bolesti, odnosno određivanje kliničkog stadija. Određuju se lokalizacija i veličina limfnih čvorova te ekstralimfatičnih organa i tkiva zahvaćenih bolešću. Za određivanje stupnja proširenost bolesti koristi se Cotswoldska modifikacija Ann Arborske klasifikacije (tablica 2) (11). Iako je Ann Arborska

klasifikacija prvotno osmišljena za bolesnike s Hodgkinovim limfomom, Cotswoldska modifikacija danas je općenito prihvaćena za sve limfome.

Tablica 2. Cotswoldska modifikacija Ann Arborske klasifikacije (11)

Klinički stadij	Zahvaćeni limfni čvorovi, organi ili područja
I	Zahvaćena samo jedna regija limfnih čvorova (I) ili ograničeno zahvaćen jedan ekstralimfatični organ ili područje (I _E)
II	Zahvaćene dvije ili više regija limfnih čvorova s jedne strane dijafragme (II) ili ograničeno zahvaćen ekstralimfatični organ ili područje i jedan ili više limfnih čvorova s jedne strane dijafragme (II _E)
III	Zahvaćeni limfni čvorovi s obje strane dijafragme (III), uz to može biti zahvaćena slezena (III _S), ograničeno zahvaćen ekstralimfatični organ (III _E) ili oboje (III _{ES})
IV	Difuzno ili diseminirano zahvaćen jedan ili više ekstralimfatičnih organa ili tkiva s ili bez zahvaćanja limfnih čvorova

Prema prisutnosti općih simptoma, svaki stadij bolesti dijeli se na A (bez općih simptoma) i B (kada je prisutan jedan ili više od slijedećih simptoma: neobjašnjiv gubitak više od 10 % tjelesne težine tijekom posljednjih 6 mjeseci, profuzno noćno znojenje ili neobjašnjiva tjelesna temperatura >38 °C).

Bolesnicima s velikom tumorskom masom („*bulky disease*“) se uz klinički stadij bolesti dodaje oznaka X. Kod bolesnika s HL, velikom tumorskom masom smatra se limfni čvor ili konglomerat čvorova najvećeg promjera ≥ 10 cm ili mediastinalna masa čiji je MMR (*engl. mediastinal mass ratio*) ≥ 0.33 . MMR predstavlja omjer najvećeg promjera mediastinalnog tumora i širine mediastinuma (11). Međutim, za bolesnike s NHL nisu usuglašeni stavovi o kriterijima za veliku tumorsku masu. Predlažu se različite veličine, od 6 do 10 cm, ovisno o tipu NHL. Stoga su novije preporuke da se za svakog bolesnika s limfomom pri određivanju kliničkog stadija navede veličina najveće tumorske mase bez potrebe za dodavanjem oznake X (12).

Za procjenu proširenosti bolesti koristi se klinički pregled bolesnika te slikovne metode. Lokalizacija i veličina perifernih limfnih čvorova mogu se odrediti palpacijom ili ultrazvukom (UZV), a limfni čvorovi prsnog koša, trbuha i zdjelice procjenjuju se kompjutoriziranom tomografijom (*engl. computed tomography, CT*). U novije vrijeme se u dijagnostici i praćenju bolesnika s limfomom koristi pozitronska emisijska tomografija (PET) fluorodeoksiglukozom (FDG) koja omogućuje funkcijski slikovni prikaz, budući da tumorsko tkivo jače nakuplja FDG od okolnoga netumorskog tkiva. Najčešće se uz PET pregled radi i CT snimanog područja radi određivanja točnije anatomske lokalizacije pojačanog FDG nakupljanja (13). Pokazalo se da upotreba PET-CT omogućuje precizniju procjenu proširenosti bolesti u odnosu na CT te mijenja klinički stadij bolesti u 10-30 % bolesnika s limfomom, češće u viši klinički stadij. Međutim, za sada nije dokazan utjecaj upotrebe PET-CT tijekom dijagnostičke obrade na preživljenje bolesnika (12,14). Za procjenu proširenosti bolesti u koštanoj srži, rutinski se u dijagnostičkoj obradi radi biopsija kosti. Osim citološke i patohistološke analize, ovisno o vrsti limfoma, uzorci se mogu slati na protočnu citometriju, citogenetiku i/ili molekularnu dijagnostiku. Zbog velike osjetljivosti PET-CT na infiltraciju koštane srži, kod bolesnika s HL kod kojih je učinjen PET-CT više se ne preporuča u dijagnostičkoj obradi raditi biopsiju kosti (12,15). Kod bolesnika s DLBCL kod kojih je učinjen PET-CT, biopsiju nije potrebno raditi u slučaju pozitivnog nalaza PET-CT (12,16,17). Za ostale vrste limfoma još nije prikupljeno dovoljno podataka te se i dalje u procjeni proširenosti bolesti preporuča punkcija i biopsija kosti (12).

1.1.5. Procjena prognoze bolesti

U procjeni prognoze bolesti oboljelih od limfoma koriste se pojedinačni prognostički čimbenici te prognostički indeksi koji objedinjuju pojedinačne statistički značajne prognostičke čimbenike za različite tipove limfoma, s ciljem predviđanja odgovora na terapiju i ishoda bolesti.

1.1.5.1. Međunarodni prognostički indeks, IPI

Međunarodni prognostički indeks (*engl. international prognostic index, IPI*) se smatra zlatnim standardom i najčešće je primjenjivan prognostički model za NHL. Osmišljen je 1993. godine, prvenstveno kao prognostički model za agresivne NHL. Bolesnici su svrstani u četiri

prognostičke skupine (niski, niski/srednji, visoki/srednji i visoki rizik) prema broju nepovoljnih prognostičkih čimbenika: dob > 60 godina, klinički stadij III ili IV, LDH (laktat dehidrogenaza) >240 U/L, opće stanje bolesnika (*engl. performance status, PS*) ≥ 2 , broj zahvaćenih ekстранodalnih sijela >1 (tablica 3) (18).

Tablica 3. Međunarodni prognostički indeks, IPI (18)

Prognostički čimbenici	Broj bodova	Prognostičke skupine
Dob > 60 godina	0-1	Niski rizik
Klinički stadij III ili IV	2	Niski/srednji rizik
LDH >240 U/L	3	Visoki/srednji rizik
PS (ECOG ljestvica) ≥ 2	4-5	Visoki rizik
Broj zahvaćenih ekстранodalnih sijela >1		
Svaki parametar boduje se s jednim bodom		

Legenda: ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group, američka istraživačka kooperativna skupina

1.1.5.2. Međunarodni prognostički indeks za folikularne limfome, FLIPI

IPI, koji je osmišljen prvenstveno za agresivne limfome, može se koristiti i za indolentne limfome. Međutim, vrlo mali broj bolesnika s FL (oko 10-15 %) ulazi u skupinu bolesnika s visokim rizikom kada se koristi IPI. Stoga je za bolesnike s FL 2004. godine dizajniran poseban prognostički indeks, FLIPI (*engl. follicular lymphoma international prognostic index*). Bolesnici se dijele u tri prognostičke skupine (niski, srednji i visoki rizik) prema broju nepovoljnih prognostičkih čimbenika: dob >60 godina, klinički stadij III ili IV, hemoglobin <120 g/L, LDH >240 U/L, broj regija zahvaćenih limfnih čvorova >4 (tablica 4) (19).

Tablica 4. Međunarodni prognostički indeks za folikularne limfome, FLIPI (19)

Prognostički čimbenici	Broj bodova	Prognostičke skupine
Dob >60 godina	0-1	Niski rizik
Klinički stadij III ili IV		
Hemoglobin <120 g/L	2	Srednji rizik
LDH >240 U/L		
Broj regija zahvaćenih limfnih čvorova >4	3-5	Visoki rizik
Svaki parametar boduje se s jednim bodom		

1.1.5.3. Međunarodni prognostički indeks za limfom plaštene zone, MIPI

2008. godine Hoster i suradnici su razvili međunarodni prognostički indeks za limfom plaštene zone (*engl. mantle cell lymphoma international prognostic index*, MIPI) kao prvi prognostički model specifičan za bolesnike s uznapredovalim MCL. Uključena su četiri neovisna prognostička čimbenika: dob, opće stanje bolesnika, LDH te broj leukocita. Budući da MIPI uključuje složenu matematičku formulu za izračunavanje, osmišljen je pojednostavljeni MIPI (tablica 5). Za svaki prognostički čimbenik bolesniku se daje 0-3 boda te se bodovi zbrajaju. Bolesnici se prema broju bodova dijele u tri prognostičke skupine: niski rizik (0-3 boda), srednji rizik (4-5 bodova) te visoki rizik (6-11 bodova) (20).

Tablica 5. Pojednostavljeni međunarodni prognostički indeks za limfom plaštene zone, MIPI (20)

Bodovi	Dob (godine)	PS (ECOG)	LDH/240 U/L	Leukociti (x10 ⁹ /L)
0	<50	0-1	<0.67	6.700
1	50-59	-	0.67-0.99	6.700-9.999
2	60-69	2-4	1.00-1.49	10.000-14.999
3	≥70	-	≥1.5	≥15.000

1.1.5.4. Prognostički indeksi u bolesnika s Hodgkinovim limfomom

U bolesnika s HL limfomom koriste se različiti prognostički čimbenici ovisno o kliničkom stadiju bolesti. Nepovoljnim rizičnim čimbenicima za bolesnike s lokaliziranom bolešću (klinički stadij I i II) smatraju se: dob bolesnika ≥ 40 godina, histološki podtip miješana celularnost (MC) ili limfocitna deplecija (LD), sedimentacija eritrocita (SE) > 50 ako nisu prisutni B simptomi, SE > 30 ukoliko su prisutni B simptomi, velika medijastinalna tumorska masa (MMR > 0.33 ili medijastinalni tumor > 10 cm), broj zahvaćenih regija limfnih čvorova > 2 te prisutnost bolesti u ektranodalnim sijelima (tablica 6). Ukoliko je prisutan jedan ili više navedenih čimbenika bolesnik se ubraja u skupinu s nepovoljnom prognozom (21).

Tablica 6. Prognostički čimbenici u bolesnika s lokaliziranim Hodgkinovim limfomom (klinički stadij I i II) (21)

Hodgkinov limfom klinički stadij I i II
Dob bolesnika ≥ 40 godina
Histološki podtip MC ili LD
SE > 50 ako nisu prisutni B simptomi
SE > 30 ukoliko su prisutni B simptomi
Velika medijastinalna tumorska masa (MMR > 0.33 ili medijastinalni tumor > 10 cm)
Broj zahvaćenih regija limfnih čvorova > 2
Prisutnost bolesti u ektranodalnim sijelima
Bolesnik se svrstava u nepovoljnu prognostičku skupinu ako je prisutan 1 ili više prognostičkih parametara

Bolesnici s proširenom bolešću (klinički stadij III i IV) svrstavaju se u skupinu s nepovoljnom prognozom ukoliko su prisutna najmanje 3 nepovoljna prognostička čimbenika (tablica 7): koncentracija albumina < 40 g/L, hemoglobin < 105 g/L, muški spol, dob bolesnika ≥ 45 godina, stadij bolesti IV, leukocitoza ($L > 15.0 \times 10^9/L$), limfopenija (limfociti $< 0.6 \times 10^9/L$ ili $< 8\%$) (22)

Tablica 7. Prognostički čimbenici u bolesnika s proširenim Hodgkinovim limfomom (klinički stadij III i IV) (22)

Hodgkinov limfom klinički stadij III i IV
Koncentracija albumina <40 g/L Hemoglobin <105 g/L Muški spol Dob ≥ 45 godina Klinički stadij bolesti IV Leukociti $>15.0 \times 10^9/L$ Limfociti $<0,6 \times 10^9/L$ ili $<8 \%$
Bolesnik se svrstava u nepovoljnu prognostičku skupinu ako su prisutna 3 ili više prognostička čimbenika

1.1.6. Indolentni B-NHL

1.1.6.1. Folikularni limfom, FL

Folikularni limfom je zrela B neoplazma koja nastaje proliferacijom stanica germinativnog centra (malih, zarezanih stanica-centrocita i velikih, nezarezanih stanica-centroblasti). Tumorsko tkivo barem dijelom pokazuje folikularni uzorak. Tumorske stanice uz ekspresiju B-staničnih antigena (CD19, CD20, CD22, CD79a) pokazuju i pozitivnost na CD10, BCL2 te BCL6. U većini slučajeva se nalazi translokacija $t(14;18)(q32;q21)$ i preuredba *BCL2* gena. FL se tradicionalno dijeli u tri stupnja prema broju centroblasti (stupanj 1; 0-5, stupanj 2; 6-15 i stupanj 3; >15 centroblasti po vidnom polju pod velikim povećanjem). Prema udjelu centrocita stupanj 3 se dalje dijeli na 3A i 3B. Kod FL stupnja 3A uz centroblaste prisutni su i centrociti, a kod stupnja 3B nalaze se samo centroblasti (3). Prema nekim istraživanjima FL stadija 3B se razlikuje po svojim biološkim osobinama od FL stadija 1-3A, a pokazuje neka obilježja koja ukazuju na njegovu povezanost s DLBCL (često su CD10 i BCL2 negativni, pokazuju ekspresiju IRF4/MUM1 i preuredbu *BCL6*, a ne *BCL2* gena) (23-25). FL je najčešći indolentni limfom. Čini oko 20 % svih limfoma s najvećom incidencijom u SAD i zapadnoj Europi te značajno nižom incidencijom u istočnoj Europi, Aziji i nerazvijenim zemljama. Nešto češće se

javlja kod žena nego kod muškaraca, a medijan dobi pri pojavi bolesti je u šestom desetljeću. FL se ubraja u limfome dobre prognoze s petogodišnjim preživljenjem preko 70 % (3).

1.1.6.2. Kronična limfocitna leukemija/limfom malih limfocita, CLL/SLL

Kronična limfocitna leukemija/limfom malih limfocita je neoplazma zrelih limfocita B građena od jednoličnih malih, okruglih stanica, koje su obično CD5 i CD23 pozitivne. Uz male limfocite može se naći nešto prolimfocita i paraimunoblasta (3). CLL i SLL se smatraju inačicama iste bolesti. CLL je leukemijski oblik bolesti kod koje nalazimo $\geq 5 \times 10^9/L$ tumorskih stanica u perifernoj krvi. SLL se odnosi na neleukemijski oblik bolesti kod koje je prisutna limfadenopatija i/ili splenomegalija, ali je broj tumorskih stanica u perifernoj krvi $< 5 \times 10^9/L$. CLL/SLL čine oko 7 % svih NHL. Leukemijski oblik bolesti je češći i predstavlja najčešću leukemiju odrasle dobi u zapadnim zemljama (3,26).

1.1.6.3. Limfoplazmocitoidni limfom, LPL

Limfoplazmocitoidni limfom je rijetka B neoplazma indolentnog kliničkog tijeka, koja čini oko 1 % svih NHL. Nastaje proliferacijom malih limfocita, limfoplazmocitoidnih stanica te plazma stanica. Obično je zahvaćena koštana srž, a mogu biti zahvaćeni i limfni čvorovi te slezena. Kod značajnog broja bolesnika s LPL može se naći Waldenströмова makroglobulinemija (WM), koja se definira kao LPL s infiltracijom koštane srži i IgM monoklinalnom gamapatijom (3). Oko 90 % bolesnika s LPL ili WM ima *MYD88* L265P mutaciju, što može biti od pomoći u diferencijalnoj dijagnostici prema drugim malostaničnim limfomima s plazmocitoidnom diferencijacijom (27).

1.1.6.4. Nodalni limfom marginalne zone, NMZL

Nodalni limfom marginalne zone (*engl. nodal marginal zone lymphoma*, NMZL) je primarna nodalna B stanična neoplazma. Građen je od polimorfne populacije stanica, uz limfocite B marginalne zone (nalik centrocitima ili monocitoidnog izgleda) mogu se naći plazma stanice te transformirane limfatične stanice. Pokazuje pozitivnost na pan-B stanične biljege, a CD5, CD23, CD10 i ciklin-D1 su obično negativni. NMZL čini oko 1.5-1.8 % svih limfoma, podjednako često se javlja u oba spola, a medijan dobi pri pojavi bolesti je oko 60 godina (3).

1.1.6.5. Ekstranodalni limfom marginalne zone limfatičnog tkiva vezanog uz sluznice, MALT limfom

Ekstranodalni limfom marginalne zone limfatičnog tkiva vezanog uz sluznice (*engl. extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT limfom) dijeli morfološke i imunofenotipske karakteristike s NMZL, ali za razliku od njega nastaje u ekstralimfatičnim organima. Njegov nastanak obično je povezan s kroničnom upalom. Najčešća lokalizacija MALT limfoma je gastrointestinalni trakt, u prvom redu želudac, gdje je njegova pojava povezana s *Helicobacter pylori* infekcijom. Druge češće lokalizacije bolesti su žlijezde slinovnice, pluća, adneksa oka te štitnjača. Čini 7-8 % svih NHL B fenotipa. Bolest se obično prezentira u ranom kliničkom stadiju i ima dobru prognozu (3). Pokazalo se da eradikacija uzročnika kronične upale, kao što su *Helicobacter pylori* kod MALT limfoma želuca ili *Chlamydia psittaci* kod MALT limfoma očnih adneksa, može dovesti do regresije limfoma (3,28).

1.1.7. Agresivni B-NHL

1.1.7.1. Difuzni B velikostanični limfom, DLBCL

Difuzni B velikostanični limfom je građen od difuznih nakupina velikih limfatičnih stanica čija je jezgra više nego dvostruko veća od zrelog limfocita. Klasifikacija SZO razlikuje više podtipova DLBCL te posebno izdvojenih entiteta koji pripadaju u skupinu velikostaničnih B limfoma (tablica 1) (3). Daleko najčešći oblik je nespecificirani DLBCL (*engl. Not Otherwise Specified*, NOS), dok su ostali oblici vrlo rijetki. DLBCL, NOS čini 25-30 % svih NHL u zapadnim zemljama, nešto je češći u muškaraca, a medijan dobi pri pojavi bolesti je u sedmom desetljeću (3,8). U oko 40 % slučajeva bolest se manifestira kao primarni ekstranodalni limfom. Najčešća ekstranodalna lokalizacija bolesti je probavni sustav. Bolest je agresivnog kliničkog tijeka, ali je potencijalno izlječiva (3).

U 5-14 % DLBC, NOS nalazi se preuredba *MYC* gena koja je često udružena s preuredbom *BCL2* i/ili *BCL6* gena. Istovremena prisutnost navedenih preuredbi ("double-hit" ili „triple-hit“) povezuje se s agresivnijim ponašanjem tumora i lošijom prognozom (29). Stoga klasifikacija SZO iz 2016 izdvaja novi entitet, B stanični limfomi visokog stupnja (*engl. high-grade B-cell lymphomas*, HGBL) s *MYC* i *BCL2* i/ili *BCL6* preuredbom (3,30).

Ekspresija MYC proteina je češća od preuredbe gena i nalazi se u 30-50 % DLBCL. U 20-35 % slučajeva povezana je s istovremenom ekspresijom BCL2 proteina (29). Većina tih limfoma nema preuredbu *MYC/BCL2* gena i naziva ih se „*double-expressor*“ limfomima. Oni imaju lošiju prognozu u odnosu na ostale DLBCL, NOS, ali nisu tako agresivni kao HGBL s *MYC* i *BCL2* i/ili *BCL6* preuredbom i ne izdvajaju se kao zaseban entitet (3).

1.1.7.2. Limfom plaštene zone, MCL

Limfom plaštene zone je građen od uniformnih malih do srednje velikih limfatičnih stanica s nepravilnim, često zarezanim jezgrama (nalik na centrocite). Stanice pokazuju karakterističan fenotip ($CD5^+$, $CD10^-$, $CD23^-$, $FMC7^+$), a gotovo u svim slučajevima nalazi se $t(11;14)(q13;q32)$ koja dovodi do povećane ekspresije ciklina-D1. Smatra se da akumulacija dodatnih genetičkih abnormalnosti, koje često zahvaćaju *TP53* gen, dovodi do transformacije u agresivnije varijante bolesti, kao što su blastoidna i pleomorfna varijanta. MCL čini oko 3-10 % svih NHL, češći je u muškaraca, a medijan dobi pri pojavi bolesti je oko 60 godine. Pri dijagnozi je bolest obično proširena te su uz limfne čvorove zahvaćeni slezena i koštana srž, a često i druga ektranodalna sijela kao što je gastrointestinalni trakt (3). Novija istraživanja ukazuju na postojanje dva biološki i klinički različita oblika MCL. Češći, SOX11 pozitivan, klasični oblik, obično zahvaća limfne čvorove i ekstralimfatične organe. Drugi je leukemijski, SOX11 negativan oblik, koji obično zahvaća perifernu krv, koštanu srž i slezenu te pokazuje indolentan klinički tijek bolesti (3,31,32).

1.1.7.3. Burkittov limfom, BL

Burkittov limfom je vrlo agresivna, brzorastuća neoplazma zrelih B stanica koja vrlo često zahvaća ektranodalne lokalizacije ili se prezentira kao akutna leukemija. Građen je od jednoličnih srednje velikih stanica s okruglim jezgrama i bazofilnim vakuoliziranim citoplazmama. Zbog brzog rasta tumora vide se brojne mitoze te fagociti zaduženi za uklanjanje odumrlih stanice što tumoru daje izgled tzv. „zvjezdanog neba“. Tumorske stanice pokazuju pozitivnost na pan-B stanične antigene, CD10 i BCL6, dok su TdT i BCL2 negativni. Gotovo 100 % stanica je Ki-67 pozitivno. Za BL su karakteristične translokacije *MYC* gena koje dovode do pojačane ekspresije MYC proteina. Nalazimo ih u većini slučajeva BL, ali nisu specifične samo za BL. Razlikujemo tri kliničke varijante BL: endemski oblik, koji se javlja u

djece zaražene malarijom u ekvatorijalnoj Africi i Papui Novoj Gvineji, sporadični oblik, koji se javlja kod djece i mladih odraslih u drugim dijelovima svijeta te BL povezan s imunodeficijencijom, koji se obično javlja u bolesnika zaraženih HIV. BL čini oko 1-2 % svih NHL u SAD i zapadnoj Europi. Petogodišnje preživljavanje bolesnika s BL je oko 60-90 %, ovisno o stadiju bolesti (3). Prema novijim istraživanjima se u oko 70 % slučajeva sporadičnog te u 40 % slučajeva endemičnog BL nalaze mutacije *TCF3* ili *ID3* gena (3,33).

1.1.8. T-NHL

1.1.8.1. Periferni T stanični limfom, nespecificirani, PTCL, NOS

Periferni T stanični limfom, nespecificirani (*engl. peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified*, PTCL, NOS) je nodalni ili ektranodalni limfom zrelih limfocita T koji ne zadovoljava kriterije za uključivanje u neki od specifičnih entiteta. Najčešći je oblik perifernih T staničnih limfoma i čini oko 26 % svih PTCL (34). Bolest je pri dijagnozi obično proširena, a uz limfne čvorove često su zahvaćena i ektranodalna sijela (35). Većina tumora je građena od srednje velikih i/ili velikih stanica s nepravilnim, pleomornim jezgrama. Tumorske stanice su obično CD4 pozitivne uz aberantan gubitak nekih antigena (CD7, CD5, CD52) (3). PTCL, NOS je agresivan limfom s lošim odgovorom na terapiju i čestim relapsima. Petogodišnje preživljenje je oko 32 % (35).

1.1.8.2. Angioimunoblastični T stanični limfom, AITL

Angioimunoblastični T stanični limfom (*engl. angioimmunoblastic T-cell lymphoma*, AITL) je jedan od najčešćih specifičnih subtipova perifernih T staničnih limfoma te čini 15-30 % od nekožnih T staničnih limfoma (3,34). Jedan je od oblika limfoma podrijetla folikularnih pomoćničkih T stanica (3). Bolest se gotovo uvijek manifestira u uznapredovalom stadiju s prisutnim općim simptomima. Uz generaliziranu limfadenopatiju često su zahvaćeni jetra, slezena i koštana srž. Tumorske stanice su u većini slučajeva CD4 pozitivne te izražavaju pan-T stanične biljege (CD2, CD3, CD5). Uz tumorske stanice nalazi se primjesa brojnih reaktivnih stanica: malih limfocita, eozinofila, plazma stanica, histiocita te imunoblasta B. Uz to je prisutna proliferacija folikularnih dendritičnih stanica te endotela venula. AITL ima lošu prognozu s medijanom preživljena kraćim od tri godine (3,36).

1.1.8.3. Anaplastični velikostanični limfom, ALCL

Anaplastični velikostanični limfom (*engl. anaplastic large cell lymphoma, ALCL*) je agresivan CD30 pozitivan T stanični limfom. Klasifikacija SZO razlikuje dva oblika bolesti: ALK-pozitivni (*engl. anaplastic lymphoma kinase, ALK*) ALCL, povezan s *NPM-ALK* translokacijom t(2;5) te ALK-negativni ALCL. ALK-pozitivni ALCL se obično javlja u mlađih bolesnika i ima bolju prognozu (petogodišnje preživljenje 70-90 %) u odnosu na ALK-negativni ALCL (petogodišnje preživljenje 40-60 %) (3,37). Oba oblika se obično dijagnosticiraju u uznapredovalom stadiju bolesti s prisutnim B simptomima te često sa zahvaćenim ektranodalnim sijelima. Za ALCL su karakteristične velike, CD30 pozitivne stanice s obilnom citoplazmom te ekscentrično položenim bubrežastim jezgrama (3). Uz CD30, tumorske stanice obično izražavaju jedan ili više T antigena. U rijetkim slučajevima stanice gube ekspresiju svih T antigena („*null cell*“ fenotip), ali im se može dokazati klonalna preuredba T staničnog receptora (*engl. T-cell receptor, TCR*) (38).

1.1.9. Hodgkinov limfom, HL

Hodgkinov limfom obuhvaća dva entiteta, nodularnu limfocitnu predominaciju i klasični Hodgkinov limfom, koji se međusobno razlikuju po kliničkim obilježjima, sastavu upalnog staničnog infiltrata te morfologiji i fenotipu tumorskih stanica (39).

1.1.9.1. Nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma, NLPHL

Nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma (NLPHL) je B stanična neoplazma građena od krupnih, CD20 pozitivnih, a CD30 i CD15 negativnih tumorskih stanica. Zbog velikih lobuliranih jezgara često ih se naziva kokičastim („*popcorn*“) stanicama. Tumorske stanice su raspršene u obilnom nodularnom ili nodularnom i difuznom infiltratu sastavljenom od malih limfocita, histiocita te epitelioidnih stanica. NLPHL čini oko 5 % svih HL. Obično se javlja u mlađih osoba i češća je kod muškaraca. Bolest je pri dijagnozi obično lokalizirana i ima dobru prognozu (40,41).

1.1.9.2. Klasični Hodgkinov limfom

Klasični Hodgkinov limfom je B stanična neoplazma građena od mononuklearnih Hodgkinovih te multinuklearnih Reed-Sternbergovih (HRS) stanica koje su raspršene u obilnom upalnom infiltratu. Za razliku od kokičastih stanica, HRS stanice su CD30 i CD15 pozitivne te obično CD20 negativne. Prema karakteristikama upalnog infiltrata i morfologiji HRS stanica razlikujemo četiri histološka oblika: nodularna skleroza, miješana celularnost, limfocitna deplecija te limfocitima bogat klasični HL. Klasični HL čini oko 95 % svih HL i pokazuje dva vrška pojavnosti, jedan između 15. i 30. godine života i drugi oko 70. godine života. Najčešće su zahvaćeni limfni čvorovi vrata, zatim medijastinuma, pazuha te paraaortalni limfni čvorovi. Primarna ekstrapodalna lokalizacija bolesti je vrlo rijetka. Preko 60 % bolesnika pri dijagnozi ima lokaliziranu bolest (klinički stadij I i II). Uz primjenu suvremene radio i kemoterapije klasični HL se smatra izlječivim u više od 85 % slučajeva (3,42).

1.2. Regulacijski limfociti T

Imunološki sustav koristi brojne mehanizme kojima osigurava toleranciju na vlastite antigene te zaštitu domaćina od prejakog imunološkog odgovora na strane antigene. Djelovanje regulacijskih limfocita T (Treg), koji su ranije zvani supresivni limfociti T, ključni je mehanizam kojim imunološki sustav ograničava neprimjerenu (autoimunu) ili prejaku imunološku reakciju (43).

Tijekom sazrijevanja limfociti uče razlikovati vlastito od tuđeg. Od cjelokupnog broja limfocita koji krenu u diferencijaciju samo mali postotak (u timusu manje od 5 %) postanu funkcionalno zrele imunokompetentne stanice koje se otpuštaju u perifernu krv, a većina propada apoptotičkom smrću tijekom procesa pozitivne i negativne selekcije. Na taj se način osigurava tolerancija vlastitog, tzv. centralna tolerancija (44). Kako mali dio autoreaktivnih limfocita uspijeva izbjeći mehanizme centralne tolerancije (negativnu selekciju) i dospijeva u periferiju, razvijen je mehanizam periferne tolerancije koji putem Treg limfocita kontrolira proliferaciju i aktivaciju takvih autoreaktivnih limfocita (45).

Treg stanice mogu suprimirati aktivaciju, proliferaciju i efektorske funkcije (kao što je izlučivanje citokina) velikog broja stanica, uključujući CD4 i CD8 pozitivne limfocite T, NK stanice, limfocite B te predočne stanice (*engl. antigen presenting cells, APC*) (46).

Treg limfociti su neophodni za održavanje periferne tolerancije, prevenciju autoimunih bolesti kao što su dijabetes tipa 1 i reumatoidni artritis te ograničavanje kroničnih upalnih bolesti poput astme i upalne bolesti crijeva. Odgovorni su i za suprimiranje imunološkog odgovora na neke mikroorganizme te ograničavanje protu-tumorske imunosti (45,47).

1.2.1. Foxp3

Treg limfociti su prvi put opisani 1995. godine, kao subpopulacija CD4 pozitivnih limfocita T koji konstitutivno izražavaju CD25 (α -lanac receptora za IL-2) te pokazuju imunosupresivnu aktivnost (48). Karakteristično obilježje regulacijskih limfocita T je ekspresija transkripcijskog čimbenika Foxp3 (*engl. forkhead box P3*) iz obitelji forkhead/winged-helix transkripcijskih regulatora, koji je kodiran genom *Foxp3*, smještenim na kromosomu X. Njegova ekspresija je neophodna za razvoj, funkcioniranje i homeostazu Treg limfocita (49,50).

Mutacija gena *Foxp3* izaziva autoimune poremećaje i kod miša i kod ljudi. Mutacija tog gena u miša (tzv. *Scurfy mice*) dovodi do letalne autoimune bolesti, sa smrtnim ishodom unutar mjesec dana nakon rođenja (51). Inačica ove bolesti kod ljudi je tzv. IPEX sindrom (*eng. immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*). Radi se o nasljednom, X-vezanom sindromu kod kojeg se javlja dermatitis, enteropatija, dijabetes tipa 1, tireoiditis, hemolitička anemija i trombocitopenija (52).

Smatra se da *Foxp3* ostvaruje svoju ulogu tako što, posredno ili neposredno, kontrolira na stotine gena, uključujući gene koji kodiraju transkripcijske čimbenike, citokine, površinske stanične molekule, molekule za prijenos signala, enzime staničnog metabolizma te mikroRNA (45).

Za razliku od mišjih *Foxp3* negativnih limfocita T, dio humanih $CD4^{+}$ i $CD8^{+}$ limfocita T pokazuje *Foxp3* ekspresiju nakon *in vitro* stimulacije. Međutim, *Foxp3* ekspresija je u tim satnicama prolazna, ne dovodi do razvoja supresivne funkcije niti do izražaja fenotipa karakterističnog za regulacijske limfocite T (53).

Prema Miyari i suradnicima (54) $Foxp3^{+}CD4^{+}$ limfociti T ne predstavljaju homogenu populaciju stanica već se mogu podijeliti u tri funkcionalno i fenotipski različite populacije stanica: mirujuće Treg (*engl. restingTreg*, rTreg) stanice koje su CD45RA pozitivne i pokazuju niski izražaj *Foxp3* ($CD45RA^{+}Foxp3^{lo}$), aktivirane Treg (aTreg) stanice koje su CD45RA negativne i pokazuju visoki izražaj *Foxp3* ($CD45RA^{-}Foxp3^{hi}$) te nesupresivne Treg stanice koje su CD45RA negativne i pokazuju niski izražaj *Foxp3* ($CD45RA^{-}Foxp3^{lo}$). Prve dvije populacije stanica imaju supresivnu aktivnost dok treća populacija stanica ne pokazuje supresivnu aktivnost i može lučiti pro-upalne citokine. Antigena stimulacija rTreg stanica dovodi do njihove diferencijacije u aTreg stanice koje su krajnje diferencirane i visoko supresivne.

1.2.2. Anergija i supresivna aktivnost regulacijskih limfocita T

Interleukin-2 (IL-2) je citokin koji omogućuje dugotrajan rast (proliferaciju) limfocita T. Neophodan je za razvoj i preživljenje Treg limfocita koji izražavaju visoko afinitetni receptor za IL-2 (CD25 je α lanac tog receptora). *Foxp3* zajedno s drugim transkripcijskim čimbenicima i koaktivatorima/korepresorima koči transkripciju IL-2 u Treg stanicama čineći ih na taj način ovisnima o IL-2 koji luče druge stanice, prvenstveno aktivirane efektorske stanice (48). Zbog

nedostatka IL-2, nakon kontakta Treg limfocita s antigenom ne dolazi do njihove proliferacije. Na taj se način objašnjava nereaktivnost Treg limfocita na stimulaciju antigenom, odnosno njihova anergija. Međutim, u kontaktu s aktiviranim efektorskim limfocitima koji luče IL-2, Treg limfociti proliferiraju i izražavaju svoju supresivnu aktivnost, odnosno zaustavljaju aktivaciju i funkciju različitih efektorskih stanica (46,55).

1.2.3. Način djelovanja regulacijskih limfocita T

Točan način djelovanja Treg limfocita se još uvijek istražuje, premda je zadnjih godina postignut značajan napredak na tom području. Poznavanje preciznih mehanizama djelovanja Treg stanica, uz pružanje važnih informacija o kontrolnim procesima periferne tolerancije, ukazalo bi i na potencijalne mogućnosti terapijskog djelovanja (45).

Do sada su istraživani brojni mehanizmi, koji se prema Vignalliju i suradnicima mogu grupirati u četiri modela: supresija citokinima, citolizom, metaboličkom disrupcijom te djelovanjem na sazrijevanje i funkciju dendritičkih stanica (*engl. dendritic cells*, DC) (45,56).

Interleukin-10 (IL-10), transformirajući čimbenik rasta β (*engl. transforming growth factor- β* , TGF- β) te interleukin-35 (IL-35) su ključni protuupalni citokini koje otpuštaju Treg limfociti (57). Osim toga, IL-10 i TGF- β imaju značajnu ulogu u stvaranju adaptivnih Treg stanica. Prema nekim istraživanjima, Treg limfociti mogu pokazivati citotoksičnu aktivnost te uzrokovati citolizu efektorskih stanica posredovanu granzimima i perforinima (58,59). Jedan od opisanih modela djelovanja Treg limfocita je metabolička disrupcija, odnosno apoptoza efektorskih stanica posredovana uskraćivanjem IL-2. Kako Treg limfociti izražavaju visoko afinitetni receptor za IL-2, njihova proliferacija dovodi do „nestašice“ lokalnog IL-2, neophodnog za preživljavanje efektorskih stanica (60). Osim direktnog učinka, smatra se da Treg limfociti na efektorske stanice mogu djelovati i posredno, preko DC. Interakcija između proteina 4 povezanog s citotoksičnim limfocitima T (*engl. cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*, CTLA-4), koji je konstitutivno izražen na Treg limfocitima, i CD80 i/ili CD86 na DC dovodi do ekspresije indolamin 2,3-dioksigenaze (IDO) i supresije efektorskih stanica (45,61).

1.2.4. Podjela regulacijskih limfocita T

Prema mjestu razvoja, razlikujemo dvije populacije Treg limfocita: prirodene (*engl. natural Treg, nTreg*), koji se razvijaju u timusu te adaptivne ili inducirane (*engl. induced Treg, iTreg*), koji se razvijaju na periferiji (43).

1.2.4.1. Prirođeni regulacijski limfociti T, nTreg

Prirođeni Treg limfociti, poput drugih limfocita T, nastaju u koštanoj srži od hematopoetske matične stanice, a zatim dozrijevaju u timusu. Predstavljaju malu populaciju stanica, čineći svega oko 5-10 % $CD4^+$ limfocita T u perifernoj krvi, ali je njihovo postojanje od vitalnog značenja (43,62). Mišji nTreg limfociti napuštaju timus i pojavljuju se na periferiji 2-4 dana nakon rođenja te neonatalna timektomija oko 3 dana dovodi do letalne autoimunosti zbog nedostatka nTreg limfocita (46,63). Za razliku od mišjih, funkcionalno zrele Treg stanice kod ljudi razvijaju se *in utero*. Ljudski timus stvara zrele T stanice već od 13. tjedna gestacije. U 14. tjednu gestacije oko 7 % $CD4^+$ zrelih timocita pokazuje visoki izražaj CD25 i bilježi se naseljavanje Treg limfocita u fetalne organe. Takvi fetalni Treg limfociti su Foxp3 pozitivni i pokazuju supresivnu funkciju (46,64).

Za sazrijevanje nTreg limfocita u timusu je potrebna interakcija između limfocita T u razvoju i stromalnih stanica, uključujući epitelne i DC u kori i srži timusa. Osim signala koji nastaje vezanjem T staničnog receptora s antigenom prezentiranim na vlastitim molekulama glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl. major-histocompatibility-complex, MHC*) izraženim na stromalnim stanicama, potreban je i dodatni signal, koji nastaje vezanjem kostimulacijskih molekula izraženih na limfocitima T (kao što je CD28) i njihovih liganada (kao što je CD80 i CD86) na stromalnim stanicama (46,65). Smatra se da nakupine epitelnih stanica u srži timusa (Hassalova tjelešaca) pridonose razvoju mikrokoliša pogodnog za sazrijevanje Treg limfocita kod ljudi. Hassalova tjelešca kod ljudi izražavaju timusni stromalni limfopoetin (*engl. thymic stromal lymphopoietin, TSLP*) koji potiče aktivaciju i izražaj visokih razina kostimulacijskih molekula CD80 i CD86 na timusnim CD11c pozitivnim DC. Takve aktivirane CD11c pozitivne DC potiču proliferaciju i diferencijaciju timocita u Treg stanice (66).

1.2.4.1.1. Površinske molekule izražene na prirođenim regulacijskim limfocitima T

Iako se Foxp3 pokazao najspecifičnijim biljekom za identifikaciju nTreg stanica, njegova upotreba u istraživanjima je otežana njegovim unutarstaničnim (nuklearnim) smještajem. Stoga su istraživane brojne površinske molekule kao potencijalni biljezi za identifikaciju i izolaciju nTreg stanica. Međutim, ekspresija niti jedne od površinskih molekula nije ograničena samo na nTreg stanice te ih se može naći i na drugim podvrstama limfocita T, prvenstveno za vrijeme njihove aktivacije (43).

Regulacijski limfociti T su prvotno opisani kao CD4⁺ subpopulacija limfocita T koja konstitutivno izražava CD25, što je upućivalo na mogućnost upotrebe CD25 molekule kao specifičnog biljega za Treg stanice. Međutim, pokazalo se da CD25 nije dobar marker za identifikaciju Treg stanica jer je njegova ekspresija izražena kod velikog broja aktiviranih CD4⁺ i CD8⁺ limfocita T (67).

Prema nekim autorima bi se snižena ekspresija molekule CD127 (α -lanac receptora za IL-7) u Treg stanicama, koja obrnuto korelira s njihovom supresivnom aktivnošću i izražajem Foxp3, mogla koristiti kao alternativa upotrebi CD25 molekule (68,69). Međutim, konvencionalni CD4⁺ limfociti T vrlo rano tijekom aktivacije također potiskuju izražaj CD127, što ograničava upotrebu CD127 kao izoliranog biljega u identifikaciji nTreg stanica (65,70).

Interakcija kostimulacijskih molekula iz porodice CD28/CTLA-4, izraženih na nTreg stanicama, s njihovim ligandima iz porodice B7 igra značajnu ulogu u razvoju nTreg stanica (71). Miševi s izraženim nedostatkom CD28 imaju značajno niže razine nTreg stanica u timusu i na periferiji (72). nTreg stanice konstitutivno izražavaju visoku razinu unutarstaničnog i nisku razinu površinskog CTLA-4. CTLA-4 je uključen u regulacijsku aktivnost nTreg stanica i njihova aktivacija dovodi do pojačane ekspresije površinskog CTLA-4 (73).

Neke od molekula iz porodice receptora za čimbenik tumorske nekroze (*engl. tumor necrosis factor receptor*, TNFR), kao što su glukokortikoidom potaknut TNFR (*engl. glucocorticoid-induced TNFR*, GITR), 4-1BB i OX40, pokazuju izražaj na nTreg stanicama i igraju značajnu ulogu u njihovoj funkciji (73). Visoka razina izražaja GITR kod Treg stanica ograničena je samo na mirujuće nTreg stanice u timusu i na periferiji. GITR može djelovati na Treg stanice na različite načine. Budući da GITR ekspresija čini limfocite T otpornima na TCR-om potaknutu apoptozu, njegova visoka razina štiti CD4⁺CD25⁺ timocite od negativne selekcije u timusu i tako potiče razvoj nTreg stanica. Međutim, aktivacija GITR vezanjem s ligandom ili agonističkim antitijelom dovodi do kočenja supresivne aktivnosti nTreg stanica (71,74).

Kostimulacijska molekula OX40 (CD134), koja pokazuje prolaznu ekspresiju na aktiviranim limfocitima T, izražena je i na nTreg limfocitima i uključena u njihov razvoj, homeostazu i djelovanje (75). Kostimulacijska molekula 4-1BB (CD137), značajna za aktivaciju, održavanje i preživljenje CD4, CD8 i NK stanica, dovodi do proliferacije nTreg stanica (76).

1.2.4.2. Adaptivni (inducirani) regulacijski limfociti T, iTreg

Adaptivni ili inducirani Treg limfociti predstavljaju heterogenu populaciju stanica koja se razvija na periferiji iz konvencionalnih, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ limfocita T nakon podražaja antigenom (43). Prema citokinima koji potiču njihov nastanak razlikuju se dvije glavne subpopulacije iTreg limfocita: regulacijske T stanice tipa 1 (*engl. type 1 regulatory T cells*, Tr1), potaknute IL-10 i pomoćnički limfociti T 3 (*engl. T helper 3*, Th3), potaknuti TGF- β (77-79).

Iako se razvojno radi o dvije različite populacije stanica, prirođeni i adaptivni Treg limfociti imaju sličan fenotip te koriste preklapajuće mehanizme supresije. Obje populacije stanica izražavaju površinske biljege karakteristične za aktivirane limfocite T, kao što su CD25, CTLA-4, GITR, CD62L (43). Th3 stanice mogu pokazivati Foxp3 ekspresiju. Međutim, Tr1 stanice niti konstitutivno niti nakon aktivacije ne izražavaju Foxp3 (78). U različitim modelima se pokazalo da prijenos ili nTreg ili iTreg stanica može spriječiti razvoj autoimunih bolesti i reakcije na presađak (43).

1.2.4.2.1. Regulacijske T stanice tipa 1 (Tr1 stanice)

Tr1 stanice mogu nastati nakon izlaganja naivnih CD4⁺ limfocita T antigenu uz prisutnost visoke razine IL-10 ili kombinacije IL-10 i IFN- α (77,80). Kombinacija vitamina D3 i deksametazona te nezrele DC također mogu potaknuti Tr1 diferencijaciju (81,82).

Tr1 stanice stvaraju velike količine IL-10 i nešto manje količine TGF- β , putem kojih ostvaruju svoju supresivnu aktivnost. Osim toga, Tr1 stanice stvaraju manje količine IFN- γ i IL-5, vrlo male količine IL-2, a ne stvaraju IL-4. Ovakav citokinski profil karakterističan je za Tr1 stanice i pomaže u njihovom razlučivanju od ostalih CD4⁺ stanica (77,83).

Tr1 stanice ne pokazuju Foxp3 ekspresiju i mogu se razvijati i kada postoji nedostatak nTreg stanica, npr. kod bolesnika s IPEX sindromom, što sugerira da se Tr1 stanice razvojno razlikuju

od nTreg stanica (78,81). Međutim, supresivna aktivnost Tr1 stanica podjednako je učinkovita kao i ona koju pokazuju nTreg limfociti (78).

Tr1 stanice imaju značajnu ulogu u održavanju periferne tolerancije, kontroli autoimunosti (83, 84), prevenciji reakcije na presađak (85) te sprečavanju razvoja imunološke reakcije davateljevih limfocita T protiv tkiva domaćina (*engl. graft versus host disease, GVHD*) (86,87). Smatra se da Tr1 stanice sudjeluju i u kontroli upalnog odgovora na različite mikroorganizme i alergene, ali i tumorske antigene (83).

1.2.4.2.2. Pomoćnički limfociti T 3 (Th3 regulacijske stanice)

Th3 stanice predstavljaju posebnu vrstu regulacijskih stanica koja je otkrivena tijekom istraživanja mehanizama oralne tolerancije (79). Prvi put su identificirane u miševa nakon indukcije oralne tolerancije na bazični mijelinski protein (*engl. myelin basic protein, MBP*) (88). Pokazalo se da tretman s MBP dovodi do indukcije MBP-specifičnih Th3 stanica koje luče TGF- β i inhibiraju razvoj autoimunog encefalitisa *in vivo* (89). Osim toga, Th3 stanice koče proliferaciju i otpuštanje citokina MBP-specifičnih Th1 stanica *in vitro* (88).

Iako su Th3 limfociti specifični za antigen koji je potaknuo njihov nastanak, oni mogu suprimirati i efektorske stanice koje nisu specifične za taj antigen (79, 90). Th3 stanice ostvaruju svoju supresivnu aktivnost putem TGF- β . Osim velike količine TGF- β , Th3 stanice stvaraju manje količine IL-10 i IL-4 (79). Budući da TGF- β ima širok raspon ekspresije i utječe na funkciju različitih tipova stanica, Th3 stanice igraju značajnu ulogu u mnogim aspektima imunološke regulacije i T stanične homeostaze (91).

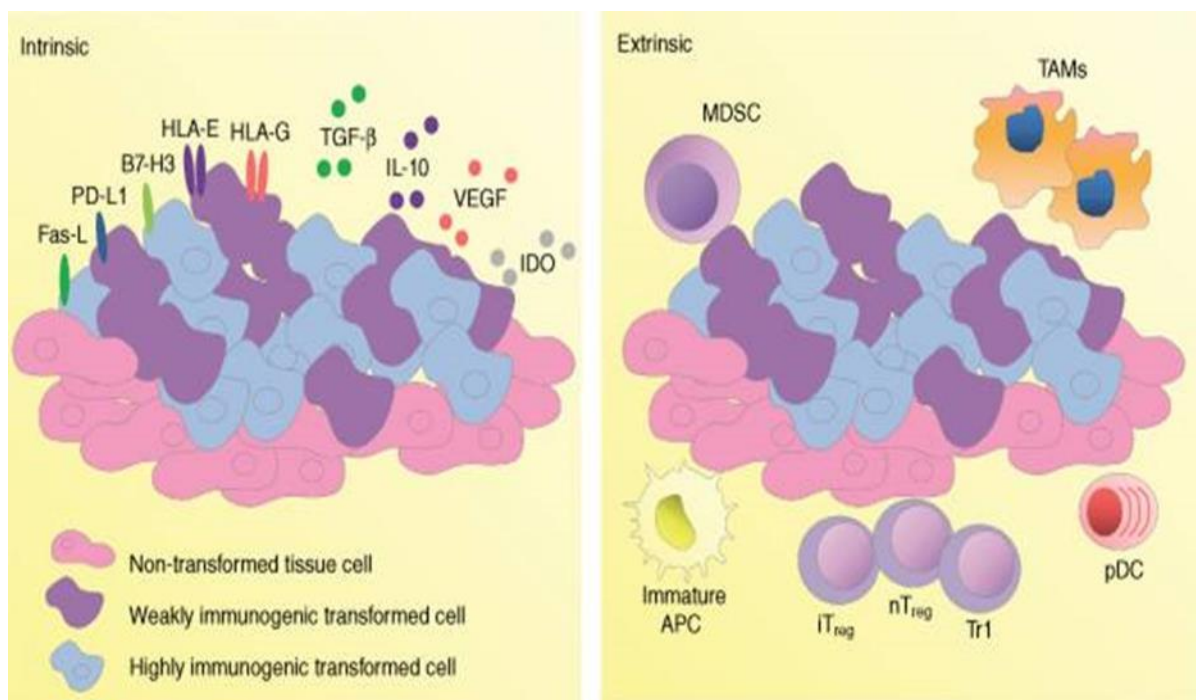
1.2.5. Regulacijski limfociti T u tumorima

Treg limfociti su neophodni za uspostavljanje i održavanje periferne tolerancije, prevenciju autoimunih bolesti te ograničavanje kroničnih upalnih bolesti (45,47). Međutim, njihova uloga kod bolesnika s tumorima je kompleksnija i smatra se da bi oni mogli pridonositi razvoju i progresiji mnogih tumora (92).

Brojnim modelima dokazano je postojanje specifične tolerancije na tumor bez istovremenog razvoja generalizirane imunodeficijencije ili imunosupresije, što tumor čini imunološki privilegiranim mjestom. Razni mehanizmi su uključeni u razvoj specifične tolerancije na

tumor, a obuhvaćaju promjene na samim tumorskim stanicama koje se dešavaju tijekom razvoja tumora (unutarnji mehanizmi) te promjene u tumorskom mikrokolišu (vanjski mehanizmi) (92,93). Unutarnji mehanizmi uključuju pojačanu ekspresiju inhibitornih molekula na tumorskim stanicama, kao što su ligand programirane smrti (*engl. programmed death-ligand 1*, PD-L1), Fas ligand (Fas-L), homolog 3 koinhibitornog receptora B7 (B7-H3) te molekule ljudskog leukocitnog antigena E i G (*engl. human leucocyte antigen E/G*, HLA E/G). Osim toga, tumorske stanice luče imunosupresivne citokine (IL-10, TGF- β), enzime (IDO) i čimbenike rasta, kao što je vaskularni endotelni čimbenik rasta (*engl. vascular endothelial growth factor*, VEGF). Vanjski mehanizmi obuhvaćaju nakupljanje različitih vrsta stanica sa supresivnim djelovanjem, među kojima ključnu ulogu imaju Treg limfociti. Uz prirodene i inducirane Treg limfocite, uključene su supresijske stanice mijeloidnog porijekla (*engl. myeloid-derived suppressor cell*, MDSC), plazmocitoidne DC, nezrele APC stanice te tumoru pridruženi makrofagi (*engl. tumour-associated macrophages*, TAM). Opisani mehanizmi shematski su prikazani na slici 1 (92,93).

Kako tumorske stanice pokazuju ekspresiju i vlastitih i tumoru pridruženih antigena (*engl. tumor-associated antigens*, TAA), koji su obično modificirani ili aberantno izraženi vlastiti antigeni, razumljivo je da Treg limfociti imaju ključnu ulogu u slabljenju antitumorskog odgovora (92,94). Pojačano nakupljanje Treg limfocita dokazano je u brojnim zloćudnim bolestima (95). Treg limfociti čine 5-10 % perifernih CD4⁺ limfocita u zdravih dobrovoljaca, a kod bolesnika s raznim zloćudnim bolestima njihov udio u tumorskom tkivu (96-98) i perifernoj krvi (99,100) značajno je veći i može dosezati 20-30 % CD4⁺ limfocita T (92). Brojna istraživanja su pokazala povezanost većeg broja Treg limfocita s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima te lošijom prognozom (101). Shang i sur. (101) su prikupili i analizirali rezultate 76 objavljenih radova o prognostičkom značenju Foxp3⁺ Treg limfocita u zloćudnim tumorima. Kada su zajedno analizirane sve vrste tumora, Foxp3⁺ Treg limfociti su imali negativan učinak na ukupno preživljenje. Međutim, primarno sijelo i vrsta tumora značajno su utjecali na prognostičku vrijednost Treg limfocita. U većini solidnih tumora, uključujući karcinom vrata maternice, bubrega, dojke, želuca, jetre te melanom, veći broj Treg limfocita bio je povezan s kraćim preživljenjem. Međutim, u nekim solidnim tumorima, kao što je karcinom debelog crijeva (102,103) i pločasti karcinomi u području glave i vrata (104), te hematološkim zloćudnim bolestima (105), kao što su klasični HL, FL i DLBCL - podrijetla limfocita germinativnog centra (*engl. germinal center B-cell-like*, GCB), veći broj Treg limfocita se povezuje s boljom prognozom.



Slika 1. Mehanizmi uključeni u razvoj specifične tolerancije na tumor (preuzeto iz: Oleinika K, Nibbs RJ, Graham GJ, Fraser AR. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. Clin Exp Immunol. 2013;171(1):36–45.)

2. HIPOTEZA

Povećan broj Foxp3 pozitivnih limfocita određen imunocitokemijski u punktatima limfnih čvorova povezan je s indolentnim NHL i klasičnim HL te korelira s povoljnim prognostičkim čimbenicima.

3. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog rada su:

- Ispitati postoji li razlika u broju Foxp3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom te bolesnika s klasičnim HL i različitim tipovima NHL.
- Ispitati povezanost broja Foxp3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima kod bolesnika s klasičnim HL i NHL:

- 1) spol bolesnika (Ž ili M)
- 2) dob bolesnika (<45, ≥45 do ≤60, >60)
- 3) Ann Arbor klinički stadij (I, II, III, IV)
- 4) veličina najvećeg tumora (<10 cm, ≥10 cm)
- 5) broj ekстранodalnih sijela (0, 1, >1)
- 6) prisutnost B simptoma (da, ne)
- 7) aktivnost LDH u serumu (≤1 x referentna vrijednost, >1 x referentna vrijednost)
- 8) koncentracija hemoglobina u krvi (<120 g/l, ≥120 g/l)

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 137 ispitanika kojima je u Zavodu za kliničku citologiju i citogenetiku Kliničke bolnice Merkur, u razdoblju od prosinca 2012. do veljače 2018. godine, učinjena citološka punkcija povećanog limfnog čvora ili druge lezije i postavljena dijagnoza reaktivne hiperplazije limfatičnih stanica ili limfoma. Kriteriji za uključivanje ispitanika u ispitivanje bili su: postojanje neiskorištenih, nebojenih citoloških razmaza za Foxp3 imunocitokemijsko bojenje, patohistološka potvrda dijagnoze limfoma, izostanak primjene terapije prije dijagnostičke obrade te dostupni klinički podaci.

Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: kontrolna skupina ispitanika s reaktivnom hiperplazijom limfatičnih stanica (34 ispitanika) i bolesnici kod kojih je postavljena dijagnoza limfoma (103 bolesnika). U skupini bolesnika s limfomom bio je 31 bolesnik s klasičnim HL, 66 bolesnika s B-NHL te 6 bolesnika s T-NHL. Bolesnici s B-NHL podijeljeni su u dvije skupine: bolesnici s agresivnim (36 bolesnika) i bolesnici s indolentnim B-NHL (30 bolesnika). U tablici 8 je prikazana zastupljenost pojedinih tipova limfoma među uključenim bolesnicima.

Pretraživanjem povijesti bolesti prikupljeni su slijedeći klinički podaci o bolesnicima s postavljenom dijagnozom limfoma: dob i spol bolesnika, Ann Arbor klinički stadij, veličina najvećeg tumora, broj zahvaćenih ektranodalnih sjela, prisutnost B simptoma, aktivnost LDH u serumu, koncentracija hemoglobina u krvi, veličina jetre i slezene, broj leukocita, eritrocita, trombocita i limfocita u krvi, koncentracija albumina u serumu, koncentracija C reaktivnog proteina (CRP) u serumu, brzina SE, IPI kod bolesnika s agresivnim B-NHL te FLIPI kod bolesnika s FL.

Tablica 8. Zastupljenost pojedinih tipova limfoma među uključenim bolesnicima

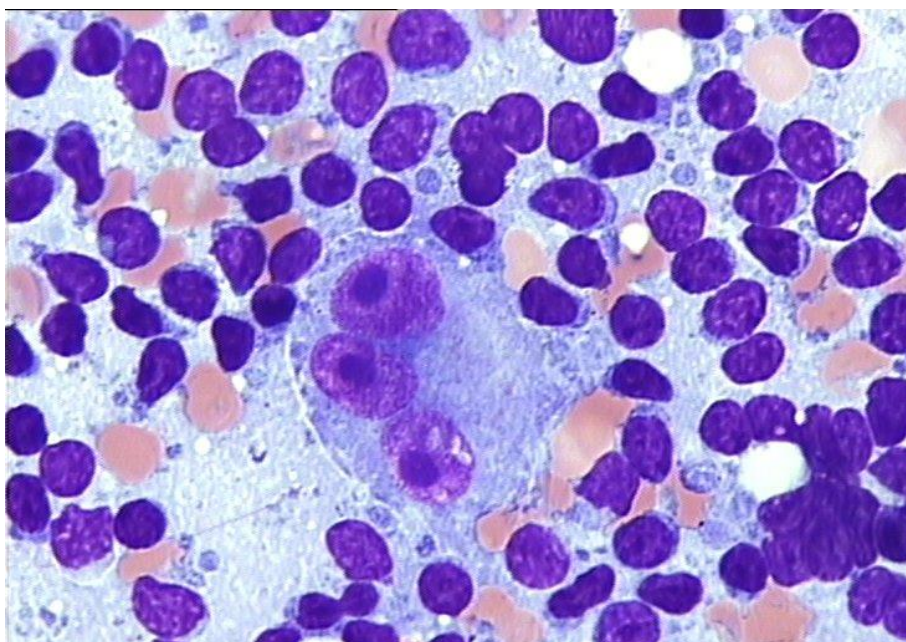
Tip limfoma	N
Klasični HL	31
Agresivni B-NHL	36
DLBCL	23
MCL	7
DLBCL/FL	2
B stanični limfom visokog gradusa	2
LBL	1
PBL	1
Indolentni B-NHL	30
FL	18
CLL/SLL	7
NMZL	2
EMZL	2
LPL	1
T-NHL	6
PTCL	2
ALCL	2
AITL	2

4.2. Metode

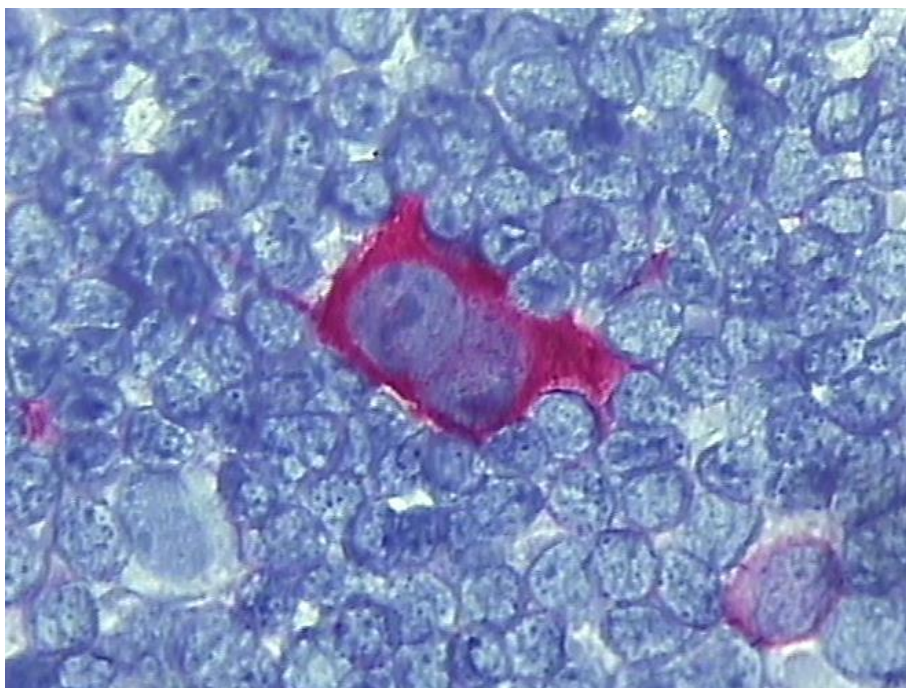
4.2.1. Citološka punkcija limfnog čvora

Citološka punkcija limfnih čvorova ili drugih patoloških lezija vrši se tankom iglom (21-23 G), nakon čišćenja kože na mjestu punkcije medicinskim alkoholom. U slučaju površinskih lezija, koje su dostupne palpaciji, punkcija se vrši na slijepo, dok se u slučaju nepalpabilnih i duboko smještenih tvorbi (unutar prsne ili trbušne šupljine) vrši punkcija pod kontrolom UZV ili CT.

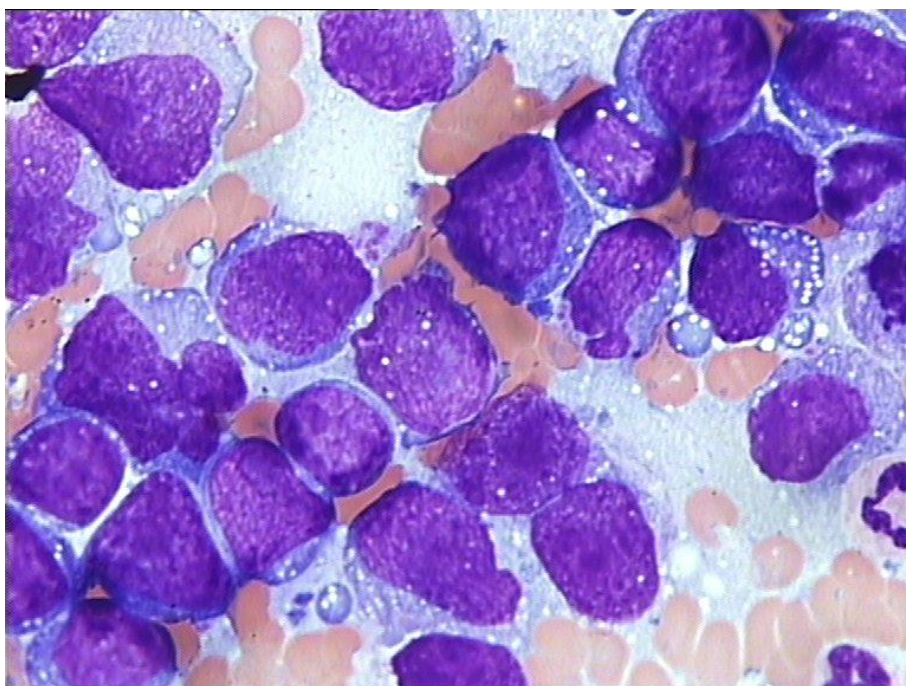
Citološka punkcija površinskih lezija radi se ambulantno. Za punkciju duboko smještenih patoloških tvorbi bolesnici moraju biti hospitalizirani te ostaju pod liječničkim nadzorom slijedeća 24 sata. Uzorak dobiven citološkom punkcijom razmazuje se na stakalca koja se suše na sobnoj temperaturi. Za citomorfološku dijagnostiku dio razmaza boji se standardnom May-Grünwald Giemsa (MGG) metodom te se ovisno o nalazu dijagnostika upotpunjuje dodatnim imunocitokemijskim bojenjima (slike 2-7).



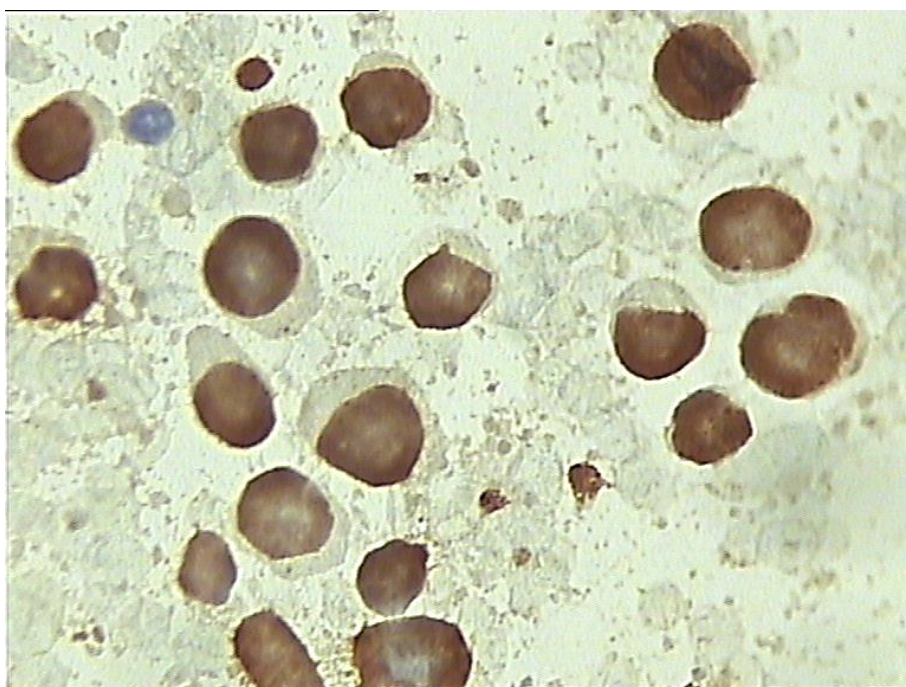
Slika 2. Reed-Sternbergova stanica u razmazu punktata limfnog čvora bolesnika s klasičnim Hodgkinovim limfomom, MGG, 1000x



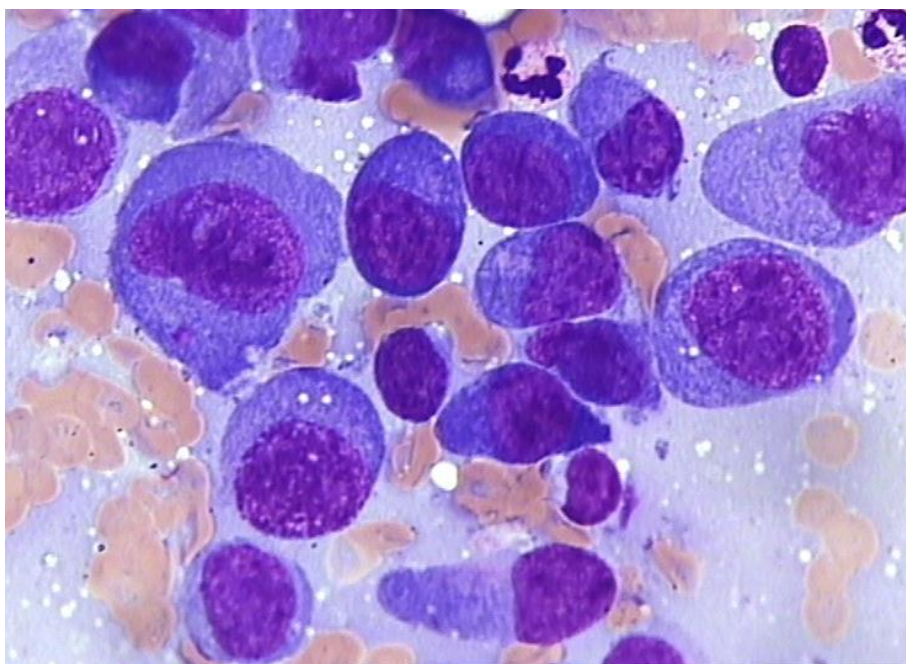
Slika 3. CD30 pozitivna Reed-Sternbergova stanica u razmazu punktata limfnog čvora bolesnika s klasičnim Hodgkinovim limfomom, imunocitokemija, LSAB, 1000x



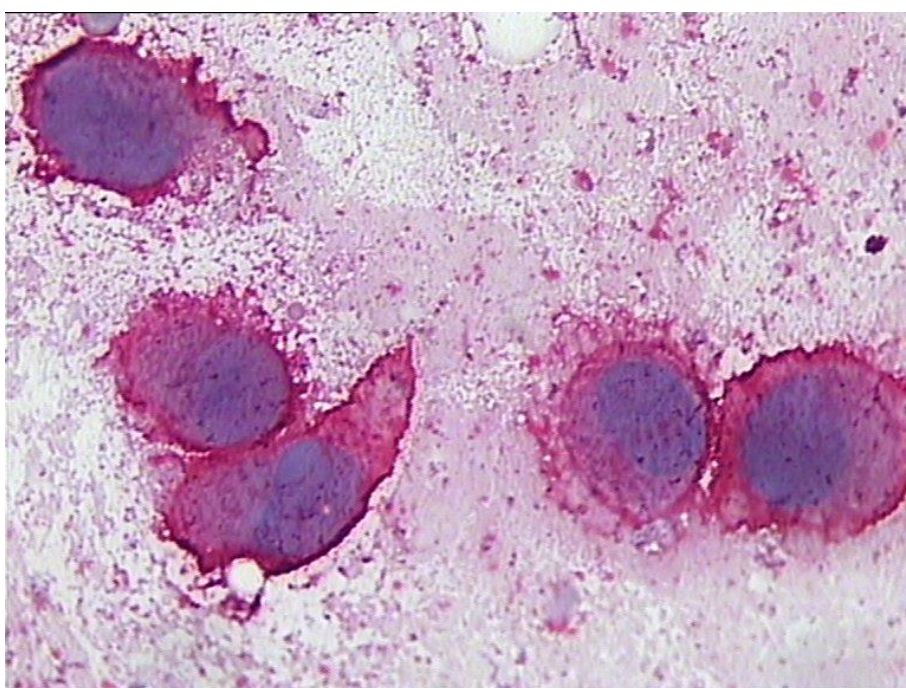
Slika 4. Razmaz punktata limfnog čvora bolesnika s difuznim B velikostaničnim limfomom, MGG, 1000x



Slika 5. Ki-67 pozitivne stanice u punktatu limfnog čvora bolesnika s difuznim B velikostaničnim limfomom, imunocitokemija, LSAB, 1000x



Slika 6. Razmaz punktata limfnog čvora bolesnika s anaplastičnim velikostaničnim limfomom, MGG, 1000x



Slika 7. ALK pozitivne stanice u punktatu limfnog čvora bolesnika s anaplastičnim velikostaničnim limfomom, imunocitokemija, LSAB, 1000x

4.2.2. Foxp3 imunocitokemijsko bojenje

Za Foxp3 imunocitokemijsko bojenje koristili smo nebojene razmaze punktata limfnih čvorova, koji su ostali neiskorišteni nakon kompletne rutinske dijagnostičke obrade. Razmazi su čuvani na sobnoj temperaturi 1-15 dana. Za fiksaciju razmaza korišten je aceton, u trajanju od 10 minuta. Nakon fiksacije razmazi su se uranjali 5 minuta u vodeni pufer, pH 7,6 (Dako Danska A/S, Glostrup, Danska). Za blokadu endogene peroksidaze korišten je 3 % hidrogen peroksid, u trajanju od 5 minuta. Nakon 5 minutnog uranjanja u vodeni pufer na razmaze se apliciralo razrijeđeno (1:80) primarno antitijelo, anti-FOXP3 antitijelo, 236A/E7 (Abcam, Cambridge, MA, SAD). Razmazi su se zatim inkubirali 40 minuta u vodenoj kupelji, na temperaturi 37 °C. Nakon 5 minutnog uranjanja razmaza u vodeni pufer primijenjen je daljnji postupak prema uputama proizvođača s komercijalnog seta za vizualizaciju LSAB+ System-HRP (Dako Danska A/S, Glostrup, Danska). Za kontrastiranje jezgara korišten je Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification), (Dako Danska A/S, Glostrup, Danska), a za uklapanje stakalaca Shandon Immu-Mount™

Kao pozitivnu kontrolu koristili smo citološke razmaze punktata operativno odstranjenih tonzila, a kao negativnu kontrolu razmaze na koje smo umjesto primarnog antitijela aplicirali otapalo (Antibody Diluent, Dako Danska A/S, Glostrup, Danska).

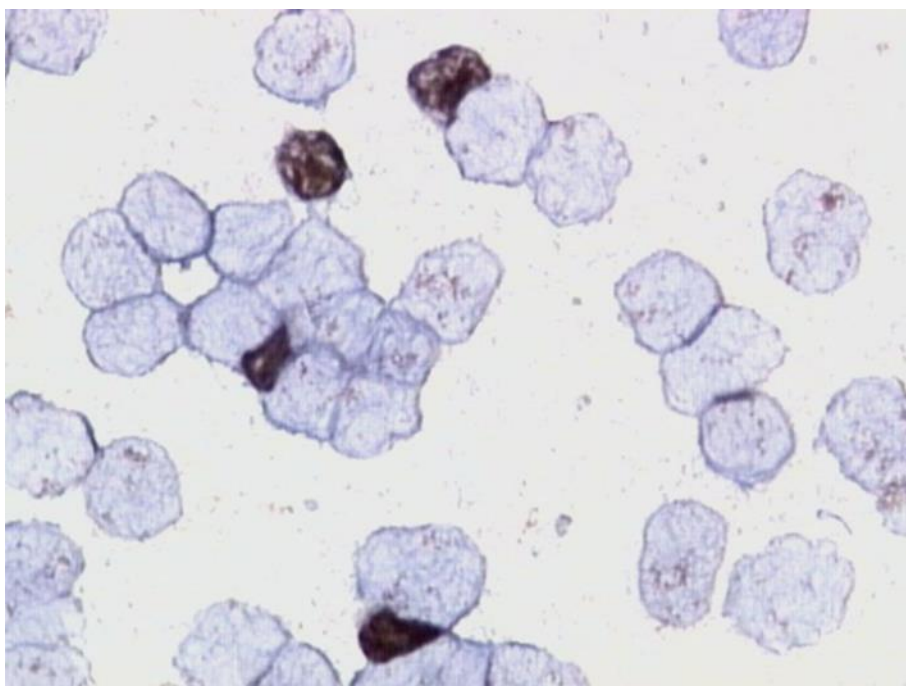
4.2.3. Imunocitokemijska analiza

Za imunocitokemijsku analizu je korišten binokularni mikroskop Olympus BX41, uz povećanje 1000x. Pozitivnom Foxp3 imunocitokemijskom reakcijom smatra se svijetlo do tamno smeđe obojenje jezgara limfocita (slike 8 i 9). Za svakog ispitanika udio Foxp3 pozitivnih limfocita izražen je na dva načina:

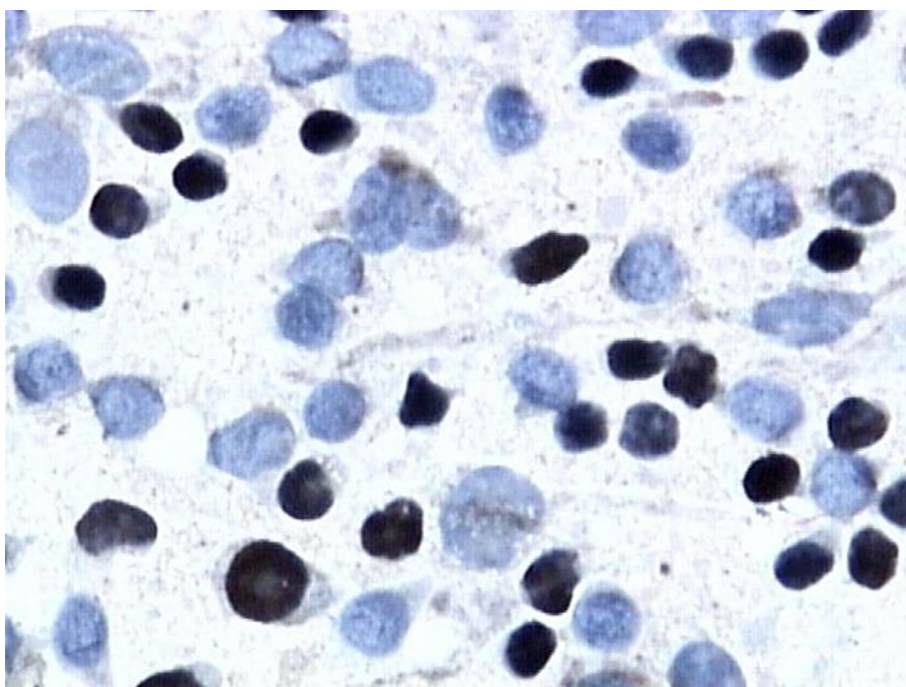
- **postotak Foxp3⁺ limfocita (broj Foxp3⁺ limfocita / sve limfatične stanice);** broj Foxp3 pozitivnih stanica na 100 limfatičnih stanica, računajući prosjek od najmanje 10 brojenja po jednom citološkom razmazu (analizirano je najmanje 1000 stanica).

- **postotak Foxp3⁺ limfocita / postotak CD3⁺ limfocita (broj Foxp3⁺ limfocita / limfociti T);** budući da se pri analizi citoloških punktata limfnih čvorova rutinski radi imunocitokemijsko bojenje na pan-T biljeg CD3, odredili smo također broj CD3 pozitivnih stanica na 100 limfatičnih stanica, računajući prosjek najmanje 10 brojenja (1000 stanica) po jednom citološkom razmazu (postotak CD3⁺ limfocita / sve limfatične stanice) te izračunali omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita.

Pri imunocitokemijskoj analizi razmaza punktata limfnih čvorova zauzetih limfomima teško je sa sigurnošću razlikovati tumorske i netumorske limfatične stanice, naročito kod indolentnih limfoma. Stoga smo pri određivanju postotka Foxp3⁺ i CD3⁺ limfocita broj pozitivnih stanica izražavali na sve limfatične stanice prisutne u razmazu, uključujući i tumorske limfatične stanice u čvorovima zauzetim limfomom.



Slika 8. FcγR3 pozitivni limfociti u razmazu punktata limfnog čvora, imunocitokemija, LSAB, 1000x



Slika 9. FcγR3 pozitivni limfociti u razmazu punktata limfnog čvora, imunocitokemija, LSAB, 1000x

4.2.4. Statistička obrada

Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Podaci su prikazani tablično i grafički. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspon, a razlike između njih analizirane su Kruskal-Wallisovim testom, odnosno Mann-Whitneyjevim U testom (u slučajevima usporedbi dviju skupina) te prikazane u Box i Whiskerovom plotu unutar kojeg su prikazane vrijednosti medijana, interkvartilnih raspona, minimalnih i maksimalnih vrijednosti te ekstremnih vrijednosti koje se od medijana razlikuju za više od 3 interkvartilna raspona.

P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>).

5. REZULTATI

5.1. Kliničke, demografske i laboratorijske odrednice ispitanika

Tablica 9. Kliničke i demografske odrednice ispitanika prikazane kroz kategorijske vrijednosti

		N	%
Dob (skupine)	<45 godina	47	34,3 %
	≥45 do ≤60 godina	40	29,2 %
	>60 godina	50	36,5 %
Spol	Muški	70	51,1 %
	Ženski	67	48,9 %
Skupine ispitanika prema dijagnozi	Klasični HL	31	22,6 %
	Agresivni B-NHL	36	26,3 %
	Indolentni B-NHL	30	21,9 %
	T-NHL	6	4,4 %
	Reaktivna hiperplazija	34	24,8 %
Klinički stadij	I	2	1,9 %
	II	27	26,2 %
	III	18	17,5 %
	IV	56	54,4 %
Klinički stadij (rani/kasni)	I + II	29	28,2 %
	III + IV	74	71,8 %
B simptomi	Ne	64	62,1 %
	Da	39	37,9 %
Veličina najvećeg tumora ≥10 cm	Ne	97	94,2 %
	Da	6	5,8 %
Veličina jetre (uredna/uvećana)	B.O.	96	93,2 %
	Uvećana jetra	7	6,8 %
Veličina slezene (uredna/uvećana)	B.O.	72	69,9 %
	Uvećana slezena	31	30,1 %
Broj ekстранodalnih sijela	0	34	33,0 %
	1	36	35,0 %
	>1	33	32,0 %

Tablica 9 prikazuje opisnu statistiku odabranih kategorijskih socio-demografskih i kliničkih varijabli. Više od 60 godina imalo je 50 (36,5 %) ispitanika, dok je njih 70 (54,1 %) bilo muškog spola. Od limfoma najzastupljeniji su bili agresivni B-NHL, u 36 (26,3 %) slučajeva. 56 (54,4 %) ispitanika bilo je u kliničkom stadiju IV, a B simptomi su bili prisutni u 39 (37,9

%) ispitanika. Veličina najvećeg tumora ≥ 10 cm nađena je u 6 (5,8 %) ispitanika. Uvećanu jetru imalo je 7 (6,8 %) ispitanika, a uvećanu slezenu 31 (30,1 %) ispitanik. Broj ektranodalnih sijela veći od jednog bio je prisutan u 33 (32,0 %) ispitanika.

Tablica 10. Laboratorijske odrednice ispitanika prikazane kroz kategorijske vrijednosti

		N	%
LDH < i ≥ 241 U/L	<241 U/L	64	62,1 %
	≥ 241 U/L	39	37,9 %
Hemoglobin < i ≥ 120 g/L	<120 g/L	28	27,2 %
	≥ 120 g/L	75	72,8 %
Leukociti < i $\geq 15 \times 10^9/L$	<15x10 ⁹ /L	92	89,3 %
	$\geq 15 \times 10^9/L$	11	10,7 %
Limfociti < i $\geq 0,6 \times 10^9/L$	<0,6x10 ⁹ /L	3	2,9 %
	$\geq 0,6 \times 10^9/L$	99	97,1 %
Limfociti < i ≥ 8 %	< 8%	5	4,9 %
	$\geq 8\%$	97	95,1 %
Albumini < i ≥ 40 g/L	<40 g/L	28	27,2 %
	≥ 40 g/L	75	72,8 %
CRP < i ≥ 5 mg/L	<5 mg/L	42	41,2 %
	≥ 5 mg/L	60	58,8 %
$\beta 2$ -mikroglobulin < i $\geq 2,4$ mg/L	<2,4 mg/L	40	44,0 %
	$\geq 2,4$ mg/L	51	56,0 %
SE $\leq i > 50$ mm/3,6ks	≤ 50 mm/3,6ks	74	74,7 %
	> 50 mm/3,6ks	25	25,3 %
SE $\leq i > 30$ mm/3,6ks	≤ 30 mm/3,6ks	64	64,6 %
	> 30 mm/3,6ks	35	35,4 %

Laboratorijske odrednice ispitanika prikazane kroz kategorijske vrijednosti prikazane su u tablici 10. Povećanu aktivnost LDH u serumu imalo je 39 (37,9 %), sniženu koncentraciju hemoglobina 28 (27,2 %), sniženu koncentraciju albumina 28 (27,2 %), povećani CRP 60 (58,8 %), povećani $\beta 2$ -mikroglobulin 51 (56,0 %), dok je sedimentaciju > 30 mm/3,6ks imalo 35 (35,4 %) ispitanika. Broj leukocita $\geq 15 \times 10^9/L$ imalo je 11 (10,7 %), a broj limfocita $< 0,6 \times 10^9/L$ 3(2,9 %) ispitanika.

Tablica 11. Kliničke odrednice ispitanika prikazane kroz kvantitativne vrijednosti i odgovarajuće mjere centralne tendencije

	Aritmetička sredina	SD	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Dob (godine)	52,31	18,78	14,00	90,00	38,50	54,00	67,00
Foxp3 ⁺ (%)	10,48	6,76	0,60	42,00	5,80	9,00	14,20
CD3 ⁺ (%)	38,40	17,08	5,70	76,00	25,30	38,60	50,00
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0,29	0,15	0,03	0,85	0,18	0,26	0,35
Veličina najvećeg tumora (mm)	49,36	30,34	13,00	200,00	30,00	40,00	62,00
LDH [U/L]	287,20	243,05	97,00	1664,00	174,00	211,00	287,00
Hemoglobin [g/L]	130,97	21,10	77,00	187,00	118,00	134,00	144,00
Leukociti [X10 ⁹ /L]	12,46	17,14	2,50	138,58	6,58	8,35	11,40
Eritrociti [X10 ¹² /L]	4,57	0,65	2,69	5,62	4,23	4,68	5,05
Trombociti [X10 ⁹ /L]	248,54	108,05	41,00	642,00	182,00	231,00	305,00
Limfociti [X10 ⁹ /L]	4,68	14,46	0,26	127,04	1,20	1,62	2,38
Limfociti (%)	26,82	18,59	5,00	92,00	15,30	22,00	29,83
Albumini [g/L]	42,63	7,36	19,60	56,30	39,00	43,00	48,00
CRP [mg/L]	33,64	47,49	0,30	196,80	2,70	9,70	47,35
β2-mikroglobulin [mg/L]	3,85	3,61	1,30	24,90	1,90	2,40	4,30
SE mm/3,6ks	33,16	30,79	1,00	130,00	11,00	20,00	52,00

Kliničke odrednice ispitanika prikazane kroz kvantitativne vrijednosti i odgovarajuće mjere centralne tendencije prikazane su u tablici 11.

5.2. Razlika u udjelu Foxp3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL

Tablica 12. Razlika u postotku Foxp3⁺ limfocita, postotku CD3⁺ limfocita i omjeru postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL: Kruskal-Wallisov test

Skupine ispitanika		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Klasični HL	31	2,80	42,00	7,20	13,50	19,50
	Agresivni B-NHL	36	0,80	24,10	3,85	5,70	10,65
	Indolentni B-NHL	30	0,60	24,70	4,08	7,60	13,08
	T-NHL	6	6,00	14,90	8,10	9,30	14,38
	Reaktivna hiperplazija	34	1,80	19,20	8,25	10,50	14,13
CD3 ⁺ (%)	Klasični HL	31	27,00	68,00	41,60	50,00	58,70
	Agresivni B-NHL	36	5,70	61,40	15,03	23,95	34,55
	Indolentni B-NHL	30	7,10	73,00	15,88	26,45	35,75
	T-NHL	6	48,80	72,00	48,95	51,70	65,55
	Reaktivna hiperplazija	34	25,00	76,00	42,83	48,00	55,75
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Klasični HL	31	4,00 %	75,00 %	17,00 %	31,00 %	37,00 %
	Agresivni B-NHL	36	9,00 %	65,00 %	21,00 %	24,50 %	45,50 %
	Indolentni B-NHL	30	8,00 %	85,00 %	23,75 %	31,00 %	41,75 %
	T-NHL	6	9,00 %	29,00 %	12,00 %	18,00 %	28,25 %
	Reaktivna hiperplazija	34	3,00 %	41,00 %	16,00 %	21,50 %	28,25 %

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	22,003	4	<0,001
CD3 ⁺ (%)	72,607	4	<0,001
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	11,015	4	0,026

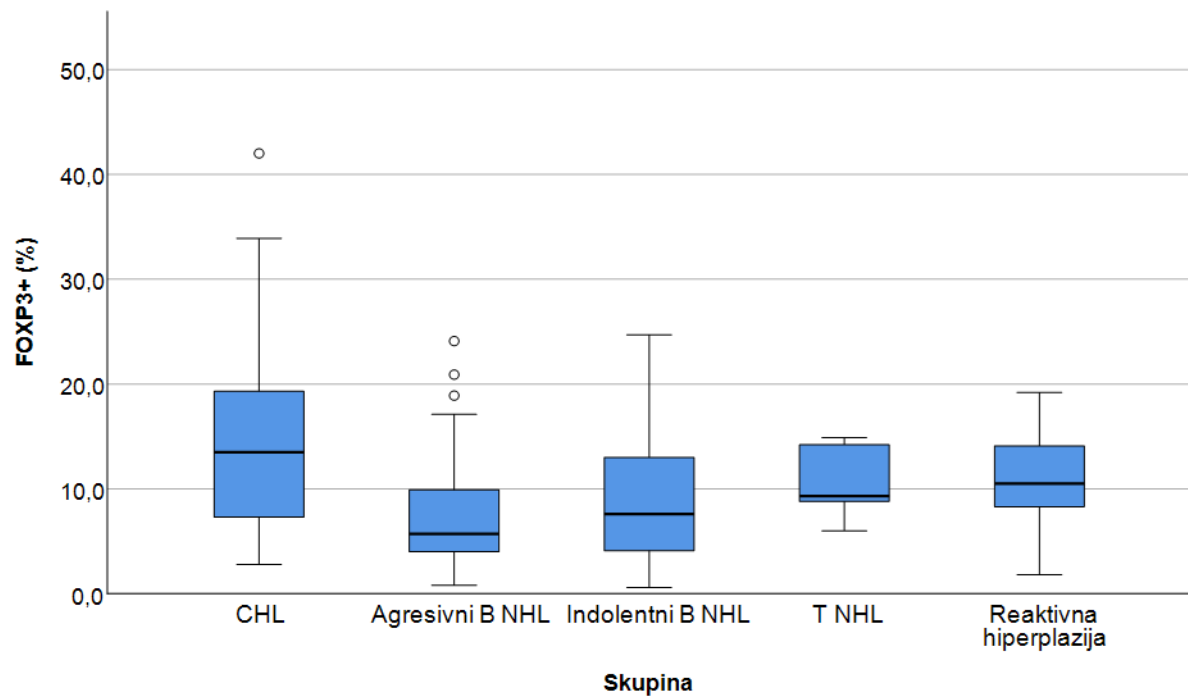
Razlika u postotku Foxp3⁺ limfocita, postotku CD3⁺ limfocita i omjeru postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL prikazana je u tablici 12. Postoje značajne razlike u postotku Foxp3⁺ limfocita, postotku CD3⁺ limfocita i omjeru postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s

reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL koje su dodatno analizirane post-hoc Mann-Whitney U testom (tablica 13) te prikazane na slikama 10 - 12.

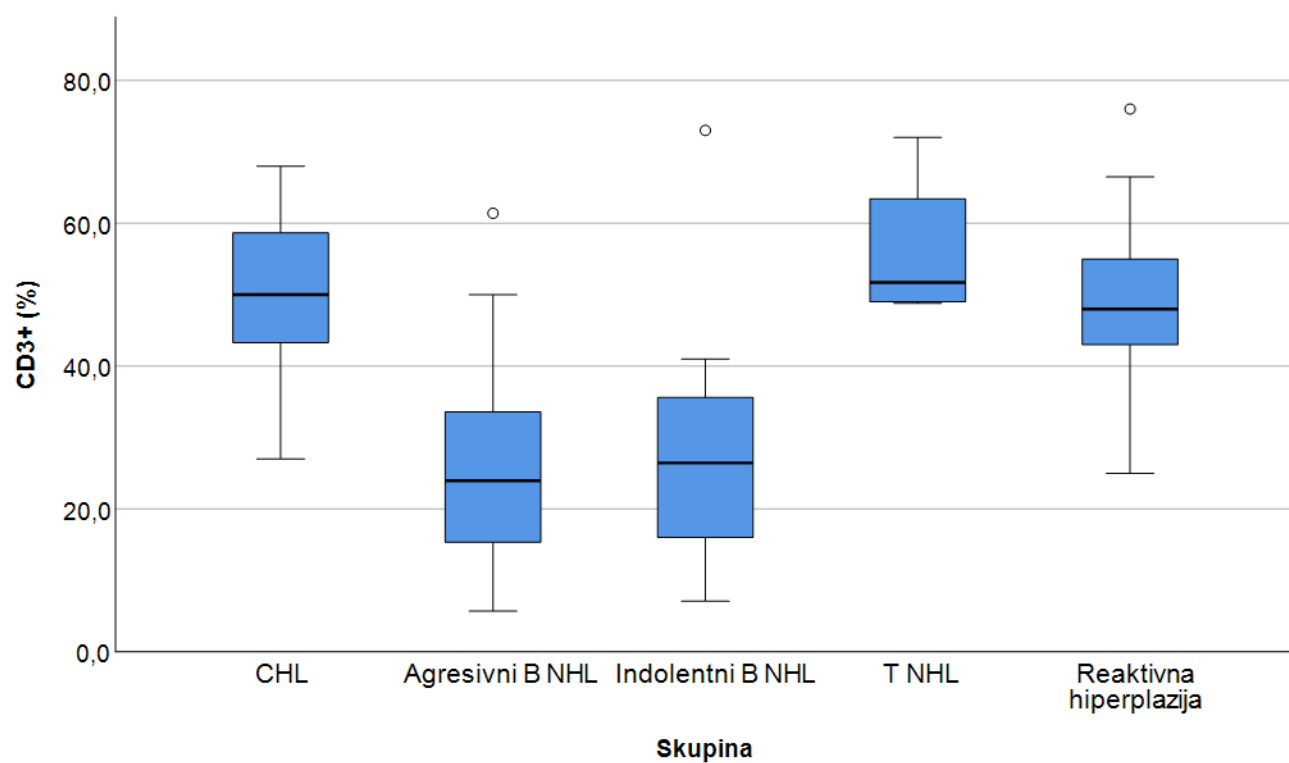
Tablica 13. Post-hoc analiza (Mann-Whitney U test) razlika u postotku Foxp3⁺ limfocita, postotku CD3⁺ limfocita i omjeru postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL

Usporedbe	Foxp3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ (%)	Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)
Klasični HL vs. Agresivni B-NHL	< 0,001	< 0,001	0,865
Klasični HL vs. Indolentni B-NHL	0,003	< 0,001	0,568
Klasični HL vs. T-NHL	0,313	0,232	0,087
Klasični HL vs. Reaktivna hiperplazija	0,118	0,788	0,061
Agresivni B-NHL vs. Indolentni B-NHL	0,321	0,524	0,268
Agresivni B-NHL vs. T-NHL	0,057	< 0,001	0,087
Agresivni B-NHL vs. Reaktivna hiperplazija	0,001	< 0,001	0,058
Indolentni B-NHL vs. T-NHL	0,252	< 0,001	0,037
Indolentni B-NHL vs. Reaktivna hiperplazija	0,053	< 0,001	0,005
T-NHL vs. Reaktivna hiperplazija	0,691	0,134	0,437

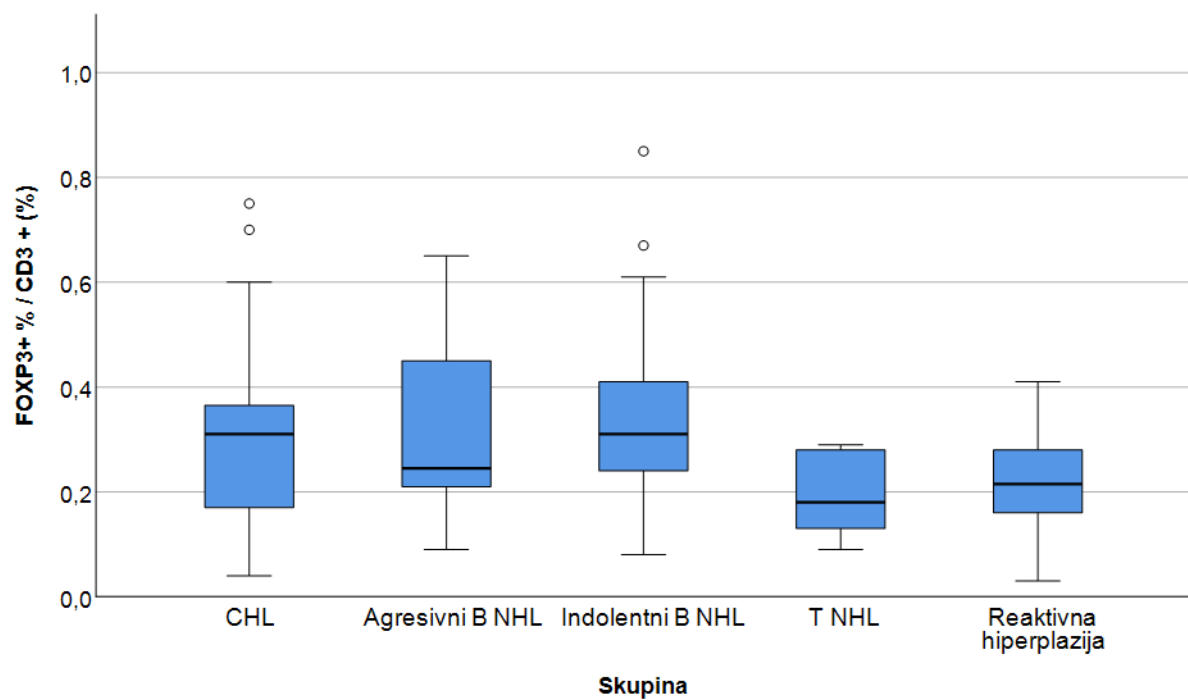
Post-hoc analiza (Mann-Whitney U test) razlika u postotku Foxp3⁺ limfocita, postotku CD3⁺ limfocita i omjeru postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL prikazana je u tablici 13. Klasični HL vs. agresivni B-NHL i indolentni B-NHL ima značajno veće postotke Foxp3⁺ i CD3⁺ limfocita. Agresivni B-NHL u odnosu na reaktivnu hiperplaziju ima značajno niže postotke Foxp3⁺ i CD3⁺ limfocita, dok u odnosu na T-NHL ima značajno niži samo postotak CD3⁺ limfocita. Indolentni B-NHL u odnosu na T-NHL, kao i na reaktivnu hiperplaziju ima značajno niži postotak CD3⁺ limfocita i veći omjer postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita.



Slika 10. Razlika u postotku Foxp3⁺ limfocita u punktovima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL: P<0,001



Slika 11. Razlika u postotku CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL: P<0,001



Slika 12. Razlika u omjeru postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL: P=0,026

Tablica 14. Razlika u postotku Foxp3⁺ limfocita, postotku CD3⁺ limfocita i omjeru postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL, DLBCL, FL i MCL: Kruskal-Wallisov test

Skupine ispitanika		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	CHL	31	2,80	42,00	7,20	13,50	19,50
	DLBCL	23	0,80	24,10	4,30	5,80	8,40
	FL	18	0,60	24,70	3,95	7,10	13,48
	MCL	7	1,20	11,40	1,80	3,10	5,10
	Reaktivna hiperplazija	34	1,80	19,20	8,25	10,50	14,13
CD3 ⁺ (%)	CHL	31	27,00	68,00	41,60	50,00	58,70
	DLBCL	23	5,70	61,40	18,20	27,00	35,50
	FL	18	7,10	40,60	16,68	28,70	36,40
	MCL	7	6,20	21,40	8,40	9,80	19,00
	Reaktivna hiperplazija	34	25,00	76,00	42,83	48,00	55,75
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	CHL	31	0,04	0,75	0,17	0,31	0,37
	DLBCL	23	0,09	0,65	0,21	0,24	0,32
	FL	18	0,08	0,67	0,22	0,32	0,42
	MCL	7	0,12	0,56	0,19	0,21	0,53
	Reaktivna hiperplazija	34	0,03	0,41	0,16	0,22	0,28

Tablica 15. Post-hoc analiza (Mann-Whitney U test) razlika u postotku Foxp3⁺ limfocita, postotku CD3⁺ limfocita i omjeru postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL, DLBCL, FL i MCL

Usporedbe	P vrijednost (Mann-Whitney U test)		
	Foxp3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ (%)	Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)
CHL vs. DLBCL	0,001	<0,001	0,643
CHL vs. FL	0,014	<0,001	0,648
CHL vs. MCL	<0,001	<0,001	0,851
CHL vs. Reaktivna hiperplazija	0,118	0,788	0,061
DLBCL vs. FL	0,486	0,703	0,275
DLBCL vs. MCL	0,042	0,010	0,844
DLBCL vs. Reaktivna hiperplazija	0,003	<0,001	0,157
FL vs. MCL	0,032	0,007	0,880
FL vs. Reaktivna hiperplazija	0,157	<0,001	0,023
MCL vs. Reaktivna hiperplazija	0,001	<0,001	0,260

Post-hoc analiza (Mann-Whitney U test) razlika u postotku Foxp3⁺ limfocita, postotku CD3⁺ limfocita i omjeru postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL i različitim tipovima NHL prikazana je u tablici 15. Klasični HL vs. DLBCL, FL i MCL ima značajno veće postotke Foxp3⁺ limfocita i CD3⁺ limfocita. DLBCL i FL vs. MCL imaju značajno veće postotke Foxp3⁺ limfocita i CD3⁺ limfocita. DLBCL i MCL u odnosu na reaktivnu hiperplaziju imaju značajno niže postotke Foxp3⁺ limfocita i CD3⁺ limfocita. FL vs. reaktivna hiperplazija ima značajno veći omjer postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita.

5.3. Povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s klasičnim HL i NHL

Tablica 16. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika s klasičnim HL i NHL

Spol		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Muški	56	0,80	42,00	5,00	7,75	13,30
	Ženski	47	0,60	30,70	5,60	8,10	16,30
CD3 ⁺ (%)	Muški	56	6,20	73,00	21,45	33,00	47,98
	Ženski	47	5,70	65,20	23,50	35,00	49,00
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Muški	56	0,04	0,75	0,18	0,27	0,38
	Ženski	47	0,08	0,85	0,18	0,31	0,41

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	1218,500	-0,646	0,519
CD3 ⁺ (%)	1287,000	-0,192	0,848
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1255,500	-0,401	0,689

Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika s klasičnim HL i NHL prikazana je u tablici 16. Nije bilo statistički značajnih razlika.

Tablica 17. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na dob bolesnika s klasičnim HL i NHL

Dob (skupine)		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<45 godina	27	2,70	42,00	6,20	11,60	18,50
	≥45 do ≤60 godina	30	0,80	24,10	5,50	7,60	14,40
	>60 godina	46	0,60	24,70	4,25	7,75	13,35
CD3 ⁺ (%)	<45 godina	27	6,20	68,00	33,60	48,10	56,80
	≥45 do ≤60 godina	30	6,60	72,00	20,98	32,70	49,85
	>60 godina	46	5,70	73,00	15,88	28,65	37,30
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<45 godina	27	0,04	0,75	0,17	0,32	0,37
	≥45 do ≤60 godina	30	0,08	0,85	0,17	0,25	0,31
	>60 godina	46	0,08	0,70	0,21	0,29	0,47

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	4,096	2	0,129
CD3 ⁺ (%)	17,247	2	<0,001
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	2,139	2	0,343

Razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na dob bolesnika s klasičnim HL i NHL prikazane su u tablici 17. Mlađi ispitanici imali su značajno više vrijednosti CD3⁺ (%) limfocita (P<0,001).

Tablica 18. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na klinički stadij bolesnika s klasičnim HL i NHL

Klinički stadij		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	I	2	5,30	5,90	3,98	5,60	4,43
	II	27	2,80	42,00	7,00	15,00	20,17
	III	18	4,00	30,70	5,95	10,20	15,35
	IV	56	0,60	24,70	3,73	6,95	11,78
CD3 ⁺ (%)	I	2	16,90	21,80	12,68	19,35	16,35
	II	27	24,50	68,00	35,00	47,40	56,80
	III	18	12,60	65,20	25,60	46,50	59,50
	IV	56	5,70	73,00	14,98	27,00	36,65
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	I	2	0,24	0,35	0,18	0,30	0,26
	II	27	0,04	0,75	0,17	0,31	0,46
	III	18	0,09	0,52	0,22	0,27	0,32
	IV	56	0,08	0,85	0,18	0,27	0,43

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	16,789	3	0,001
CD3 ⁺ (%)	31,042	3	<0,001
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0,516	3	0,915

Razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na klinički stadij bolesnika s klasičnim HL i NHL prikazane su u tablici 18. Značajne razlike zabilježene su u postotcima Foxp3⁺ limfocita i CD3⁺ limfocita. Najviše vrijednosti Foxp3⁺ (%) limfocita bile su kod bolesnika u II kliničkom stadiju.

Tablica 19. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na veličinu tumora bolesnika s klasičnim HL i NHL

Tm ≥10 cm		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Ne	97	0,60	42,00	5,50	8,30	14,80
	Da	6	0,80	6,60	1,10	3,80	6,38
CD3 ⁺ (%)	Ne	97	5,70	73,00	21,85	34,40	48,90
	Da	6	6,60	36,20	8,48	16,65	35,30
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Ne	97	0,04	0,85	0,20	0,29	0,43
	Da	6	0,09	0,26	0,11	0,18	0,24

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	105,500	-2,612	0,009
CD3 ⁺ (%)	145,500	-2,049	0,040
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	124,500	-2,346	0,019

Tablica 19 prikazuje razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na veličinu tumora kod bolesnika s klasičnim HL i NHL. Tumori ≥10 cm imali su značajno niže vrijednosti Foxp3⁺ (%) limfocita (P=0,009), CD3⁺ (%) limfocita (P=0,040) i omjera Foxp3⁺ (%) / CD3⁺ (%) (P=0,019).

Tablica 20. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na broj ektranodalnih sijela bolesnika s klasičnim HL i NHL

Broj ektranodalnih sijela		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	0	34	2,80	33,90	6,18	13,25	19,63
	1	36	1,20	42,00	4,50	7,75	12,00
	>1	33	0,60	17,10	3,90	7,60	12,50
CD3 ⁺ (%)	0	34	12,60	68,00	31,48	47,75	58,88
	1	36	8,40	63,40	20,35	31,95	39,05
	>1	33	5,70	73,00	14,75	27,30	36,15
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0	34	0,04	0,70	0,23	0,31	0,39
	1	36	0,10	0,85	0,18	0,27	0,44
	>1	33	0,08	0,56	0,19	0,27	0,39

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	9,590	2	0,008
CD3 ⁺ (%)	18,023	2	<0,001
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0,471	2	0,790

Tablica 20 prikazuje razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na broj ektranodalnih sijela bolesnika s klasičnim HL i NHL. Ispitanici sa zahvaćenim ektranodalnim sijelima imaju značajno niže vrijednosti Foxp3⁺ (%) limfocita (P=0,008) i CD3⁺ (%) limfocita (P<0,001).

Tablica 21. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na prisutnost B simptoma kod bolesnika s klasičnim HL i NHL

B simptomi		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Ne	64	1,20	30,70	5,53	7,90	14,90
	Da	39	0,60	42,00	4,40	7,90	14,20
CD3 ⁺ (%)	Ne	64	6,20	73,00	21,65	34,00	47,30
	Da	39	5,70	72,00	16,00	33,20	49,00
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Ne	64	0,08	0,85	0,21	0,29	0,36
	Da	39	0,04	0,75	0,16	0,26	0,47

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	1167,500	-0,547	0,584
CD3 ⁺ (%)	1229,500	-0,126	0,900
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1143,000	-0,714	0,475

Tablica 21 prikazuje razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na prisutnost B simptoma kod bolesnika s klasičnim HL i NHL. Nije bilo značajnih razlika.

Tablica 22. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na aktivnost LDH u serumu kod bolesnika s klasičnim HL i NHL

LDH < i ≥ 241 U/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<241 U/L	64	0,60	42,00	5,15	8,15	15,15
	≥241 U/L	39	0,80	33,90	5,50	7,60	14,00
CD3 ⁺ (%)	<241 U/L	64	6,20	73,00	21,65	35,00	48,63
	≥241 U/L	39	5,70	72,00	16,00	31,80	44,70
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<241 U/L	64	0,04	0,85	0,19	0,28	0,38
	≥241 U/L	39	0,08	0,67	0,18	0,28	0,41

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	1141,000	-0,728	0,467
CD3 ⁺ (%)	1090,000	-1,074	0,283
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1163,500	-0,575	0,565

Tablica 22 prikazuje razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na aktivnost LDH u serumu kod bolesnika s klasičnim HL i NHL. Nije bilo značajnih razlika.

Tablica 23. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na koncentraciju hemoglobina kod bolesnika s klasičnim HL i NHL

Hemoglobin < i ≥ 120 g/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<120 g/L	28	0,80	33,90	6,85	10,55	14,35
	≥120 g/L	75	0,60	42,00	4,90	7,20	14,90
CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	28	5,70	72,00	21,50	32,70	47,00
	≥120 g/L	75	6,20	73,00	21,60	34,40	48,80
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	28	0,09	0,60	0,19	0,31	0,47
	≥120 g/L	75	0,04	0,85	0,18	0,27	0,36

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	907,500	-1,056	0,291
CD3 ⁺ (%)	1034,500	-0,115	0,909
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	935,500	-0,849	0,396

Razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na koncentraciju hemoglobina kod bolesnika s klasičnim HL i NHL prikazane su u tablici 23. Nije bilo značajnih razlika.

5.4. Povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s klasičnim HL

Tablice 24 do 31 prikazuju razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika, dob bolesnika, Ann Arbor klinički stadij, veličinu najvećeg tumora, broj ektranodalnih sijela, prisutnost B simptoma, aktivnost LDH u serumu i koncentraciju hemoglobina kod bolesnika s klasičnim HL. U svim usporedbama nije bilo statistički značajnih razlika.

Tablica 24. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika s klasičnim HL

Spol		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Muški	18	2,80	42,00	7,50	13,40	19,35
	Ženski	13	6,20	30,70	6,45	14,90	19,75
CD3 ⁺ (%)	Muški	18	27,00	68,00	39,80	47,85	57,27
	Ženski	13	29,00	65,20	40,00	53,00	59,60
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Muški	18	0,04	0,75	0,17	0,30	0,47
	Ženski	13	0,11	0,52	0,16	0,32	0,35

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	115,000	-0,080	0,936
CD3 ⁺ (%)	107,500	-0,380	0,704
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	110,000	-0,281	0,779

Tablica 25. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na dob bolesnika s klasičnim HL

Dob (skupine)		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<45 godina	21	2,80	42,00	6,80	12,00	19,75
	≥45 do ≤60 godina	8	5,80	21,90	7,75	14,15	18,20
	>60 godina	2	13,50	22,60	10,13	18,05	16,99
CD3 ⁺ (%)	<45 godina	21	29,00	68,00	43,30	53,00	58,65
	≥45 do ≤60 godina	8	27,00	65,20	37,65	48,80	64,30
	>60 godina	2	32,40	47,00	24,30	39,70	35,29
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<45 godina	21	0,04	0,75	0,16	0,32	0,37
	≥45 do ≤60 godina	8	0,13	0,49	0,16	0,26	0,42
	>60 godina	2	0,29	0,70	0,22	0,50	0,57

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	0,782	2	0,676
CD3 ⁺ (%)	1,802	2	0,406
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1,185	2	0,553

Tablica 26. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na klinički stadij bolesnika s klasičnim HL

Klinički stadij		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	II	19	2,80	42,00	6,60	15,00	21,90
	III	8	5,80	30,70	9,05	15,10	19,78
	IV	4	7,60	14,90	8,70	12,65	14,50
CD3 ⁺ (%)	II	19	29,00	68,00	41,60	53,00	58,60
	III	8	34,40	65,20	46,25	55,80	62,50
	IV	4	27,00	47,60	28,65	40,30	47,45
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	II	19	0,04	0,75	0,14	0,31	0,44
	III	8	0,13	0,52	0,19	0,29	0,33
	IV	4	0,16	0,49	0,20	0,34	0,46

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	0,422	2	0,810
CD3 ⁺ (%)	4,210	2	0,122
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0,466	2	0,792

Klinički stadij		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	I + II	19	2,80	42,00	6,60	15,00	21,90
	III + IV	12	5,80	30,70	9,05	13,40	18,50
CD3 ⁺ (%)	I + II	19	29,00	68,00	41,60	53,00	58,60
	III + IV	12	27,00	65,20	37,30	47,30	59,70
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	I + II	19	0,04	0,75	0,14	0,31	0,44
	III + IV	12	0,13	0,52	0,19	0,31	0,35

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	0,03	2	0,871
CD3 ⁺ (%)	0,08	1	0,776
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0,07	1	0,792

Tablica 27. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na veličinu tumora bolesnika s klasičnim HL

Tm ≥10 cm		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Ne	30	2,80	42,00	7,35	14,20	19,63
	Da	1	6,30	6,30	.	.	.
CD3 ⁺ (%)	Ne	30	27,00	68,00	44,15	51,10	58,88
	Da	1	35,00	35,00	.	.	.
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Ne	30	0,04	0,75	0,17	0,32	0,39
	Da	1	0,18	0,18	.	.	.

Tablica 28. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na broj ektranodalnih sijela kod bolesnika s klasičnim HL

Broj ektranodalnih sijela		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	0	21	2,8	33,9	20,0	15,20	7,2
	1	6	5,8	42,0	16,7	10,85	6,3
	>1	4	7,6	14,9	14,1	12,65	9,8
CD3 ⁺ (%)	0	21	29,0	68,0	59,4	53,60	46,0
	1	6	34,4	63,4	55,8	49,60	35,0
	>1	4	27,0	47,6	47,3	40,30	30,3
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0	21	0,04	0,7	0,37	0,31	0,17
	1	6	0,13	0,75	0,32	0,24	0,17
	>1	4	0,16	0,49	0,425	0,34	0,24

	Kruskal -Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	0,582	2	0,748
CD3 ⁺ (%)	4,088	2	0,130
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0,552	2	0,759

Tablica 29. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na prisutnost B simptome kod bolesnika s klasičnim HL

B simptomi		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Ne	20	5,80	30,70	7,30	15,10	19,88
	Da	11	2,80	42,00	7,20	11,60	19,10
CD3 ⁺ (%)	Ne	20	29,00	64,60	37,50	51,10	59,22
	Da	11	27,00	68,00	41,60	47,60	56,80
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Ne	20	0,11	0,70	0,17	0,32	0,37
	Da	11	0,04	0,75	0,16	0,25	0,49

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	93,500	-0,681	0,496
CD3 ⁺ (%)	104,500	-0,227	0,820
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	94,500	-0,641	0,522

Tablica 30. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na aktivnost LDH u serumu kod bolesnika s klasičnim HL

LDH < i ≥ 241 U/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<241 U/L	27	2,80	42,00	7,40	13,50	19,10
	≥241 U/L	4	6,60	33,90	6,75	13,35	30,30
CD3 ⁺ (%)	<241 U/L	27	27,00	68,00	35,00	48,10	58,70
	≥241 U/L	4	41,60	60,80	44,45	54,90	59,80
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<241 U/L	27	0,04	0,75	0,17	0,31	0,36
	≥241 U/L	4	0,11	0,60	0,13	0,27	0,54

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	50,000	-0,236	0,814
CD3 ⁺ (%)	43,000	-0,648	0,517
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	53,500	-0,030	0,976

Tablica 31. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na koncentraciju hemoglobina kod bolesnika s klasičnim HL

Hemoglobin < i ≥ 120 g/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<120 g/L	6	11,60	33,90	12,88	14,20	21,00
	≥120 g/L	25	2,80	42,00	6,80	12,00	19,75
CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	6	27,00	56,80	41,25	47,00	53,35
	≥120 g/L	25	29,00	68,00	38,30	53,00	59,60
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	6	0,25	0,60	0,28	0,32	0,52
	≥120 g/L	25	0,04	0,75	0,15	0,29	0,37

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	59,000	-0,800	0,424
CD3 ⁺ (%)	52,000	-1,150	0,250
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	50,500	-1,227	0,220

5.5. Povezanost udjela Fexp3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s NHL

Tablice 32 do 39 prikazuju razlike postotka Fexp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Fexp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika, dob bolesnika, Ann Arbor klinički stadij, veličinu najvećeg tumora, broj ektranodalnih sijela, prisutnost B simptoma, aktivnost LDH u serumu i koncentraciju hemoglobina kod bolesnika s NHL. Statistički značajne razlike zabilježene su kod kliničkog stadija (tablica 34) i veličine tumora (tablica 35). Klinički stadij II imao je najviše vrijednosti Fexp3⁺ (%) limfocita i CD3⁺ (%) limfocita, dok su veći tumori imali značajno niže vrijednosti Fexp3⁺ (%) limfocita i omjera Fexp3⁺ (%) / CD3⁺ (%) limfocita.

Tablica 32. Povezanost postotka Fexp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Fexp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika s NHL

Spol		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Fexp3 ⁺ (%)	Muški	38	0,80	20,90	4,25	6,45	10,40
	Ženski	34	0,60	24,70	4,25	7,45	14,25
CD3 ⁺ (%)	Muški	38	6,20	73,00	17,73	24,55	36,90
	Ženski	34	5,70	63,40	15,68	30,55	37,48
Fexp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Muški	38	0,09	0,61	0,19	0,26	0,36
	Ženski	34	0,08	0,85	0,20	0,30	0,45

	Mann-Whitney U	Z	P
Fexp3 ⁺ (%)	563,000	-0,936	0,349
CD3 ⁺ (%)	595,500	-0,570	0,569
Fexp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	592,500	-0,604	0,546

Tablica 33. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na dob bolesnika s NHL

Dob (skupine)		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<45 godina	6	2,70	14,90	3,98	5,95	13,48
	≥45 do ≤60 godina	22	0,80	24,10	4,53	6,70	11,00
	>60 godina	44	0,60	24,70	4,15	7,45	12,12
CD3 ⁺ (%)	<45 godina	6	6,20	53,60	19,18	28,70	41,00
	≥45 do ≤60 godina	22	6,60	72,00	16,67	24,45	40,03
	>60 godina	44	5,70	73,00	15,63	27,65	37,15
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<45 godina	6	0,12	0,44	0,20	0,27	0,42
	≥45 do ≤60 godina	22	0,08	0,85	0,17	0,25	0,31
	>60 godina	44	0,08	0,67	0,20	0,29	0,47

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	0,106	2	0,949
CD3 ⁺ (%)	0,154	2	0,926
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1,311	2	0,519

Tablica 34. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na klinički stadij bolesnika s NHL

Klinički stadij		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	I	2	5,30	5,90	3,98	5,60	4,43
	II	8	6,70	20,90	7,23	15,15	19,95
	III	10	4,00	14,90	5,57	7,20	12,75
	IV	52	0,60	24,70	3,70	6,05	11,00
CD3 ⁺ (%)	I	2	16,90	21,80	12,67	19,35	16,35
	II	8	24,50	61,40	31,17	37,40	40,63
	III	10	12,60	63,40	23,10	28,85	50,15
	IV	52	5,70	73,00	14,72	24,55	36,03
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	I	2	0,24	0,35	0,18	0,30	0,26
	II	8	0,17	0,55	0,26	0,32	0,52
	III	10	0,09	0,47	0,22	0,26	0,32
	IV	52	0,08	0,85	0,18	0,27	0,43

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	8,417	3	0,038
CD3 ⁺ (%)	8,766	3	0,033
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	2,049	3	0,562

Klinički stadij		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	I + II	10	5,30	20,90	6,50	9,50	19,52
	III + IV	62	0,60	24,70	3,95	6,20	11,10
CD3 ⁺ (%)	I + II	10	16,90	61,40	23,83	35,30	39,88
	III + IV	62	5,70	73,00	15,33	25,80	36,85
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	I + II	10	0,17	0,55	0,24	0,32	0,50
	III + IV	62	0,08	0,85	0,19	0,26	0,39

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	4,621	1	0,032
CD3 ⁺ (%)	2,84	1	0,092
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1,851	1	0,174

Tablica 35. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na veličinu tumora kod bolesnika s NHL

Tm ≥10 cm		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Ne	67	0,60	24,70	4,40	7,30	12,20
	Da	5	0,80	6,60	1,00	1,50	6,35
CD3 ⁺ (%)	Ne	67	5,70	73,00	18,00	28,00	37,20
	Da	5	6,60	36,20	7,85	9,80	29,85
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Ne	67	0,08	0,85	0,21	0,28	0,44
	Da	5	0,09	0,26	0,11	0,18	0,25

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	65,500	-2,260	0,024
CD3 ⁺ (%)	89,500	-1,728	0,084
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	69,000	-2,183	0,029

Tablica 36. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na broj ektranodalnih sijela kod bolesnika s NHL

Broj ektranodalnih sijela		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	0	16	4,00	20,90	5,67	7,95	17,90
	1	45	0,60	24,70	4,20	6,70	11,00
	>1	11	0,80	17,10	1,50	5,50	11,90
CD3 ⁺ (%)	0	16	12,60	63,40	22,30	28,85	43,78
	1	45	7,10	72,00	16,00	27,30	36,90
	>1	11	5,70	73,00	6,60	22,50	35,50
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0	16	0,09	0,55	0,25	0,31	0,44
	1	45	0,08	0,85	0,18	0,27	0,40
	>1	11	0,09	0,56	0,19	0,24	0,44

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	4,757	2	0,093
CD3 ⁺ (%)	3,724	2	0,155
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1,819	2	0,403

Tablica 37. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na prisutnost B simptoma kod bolesnika s NHL

B simptomi		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Ne	44	1,20	24,70	4,45	6,65	11,40
	Da	28	0,60	20,90	3,85	7,60	13,70
CD3 ⁺ (%)	Ne	44	6,20	73,00	18,30	26,30	36,80
	Da	28	5,70	72,00	11,03	29,70	43,40
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Ne	44	0,08	0,85	0,22	0,27	0,36
	Da	28	0,08	0,56	0,16	0,26	0,47

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	610,500	-0,064	0,949
CD3 ⁺ (%)	609,500	-0,075	0,940
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	570,000	-0,532	0,595

Tablica 38. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na aktivnost LDH u serumu kod bolesnika s NHL

LDH < i ≥ 241 U/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<241 U/L	37	0,60	24,10	4,20	5,90	11,20
	≥241 U/L	35	0,80	24,70	4,40	7,60	13,00
CD3 ⁺ (%)	<241 U/L	37	6,20	73,00	17,45	23,50	36,65
	≥241 U/L	35	5,70	72,00	16,00	29,90	38,60
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<241 U/L	37	0,08	0,85	0,21	0,27	0,41
	≥241 U/L	35	0,08	0,67	0,18	0,28	0,41

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	587,000	-0,682	0,495
CD3 ⁺ (%)	580,500	-0,755	0,450
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	600,000	-0,535	0,592

Tablica 39. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na koncentraciju hemoglobina kod bolesnika s NHL

Hemoglobin < i ≥ 120 g/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<120 g/L	22	0,80	17,10	5,58	8,55	13,30
	≥120 g/L	50	0,60	24,70	4,07	5,85	11,10
CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	22	5,70	72,00	15,70	31,75	40,58
	≥120 g/L	50	6,20	73,00	16,67	24,45	37,03
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	22	0,09	0,56	0,18	0,29	0,46
	≥120 g/L	50	0,08	0,85	0,21	0,27	0,36

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	449,500	-1,229	0,219
CD3 ⁺ (%)	476,500	-0,899	0,369
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	544,000	-0,073	0,941

Tablica 40. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na IPI kod bolesnika s agresivnim B-NHL

IPI		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Niski rizik (0-2)	17	2,7	24,1	4,60	5,50	9,85
	Visoki rizik (3-5)	19	0,8	17,1	1,80	6,70	11,90
CD3 ⁺ (%)	Niski rizik (0-2)	17	6,2	61,4	19,50	22,50	30,80
	Visoki rizik (3-5)	19	5,7	50,0	9,10	27,00	36,80
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Niski rizik (0-2)	17	0,15	0,65	0,24	0,26	0,49
	Visoki rizik (3-5)	19	0,09	0,56	0,17	0,23	0,46

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	147,000	-0,460	0,646
CD3 ⁺ (%)	160,000	-0,048	0,962
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	120,000	-1,317	0,188

Tablica 40 prikazuje povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na IPI kod bolesnika s agresivnim B-NHL. Nije bilo značajnih razlika.

5.6. Povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s DLBCL

Tablice 41 do 49 prikazuju razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika, dob bolesnika, Ann Arbor klinički stadij, veličinu najvećeg tumora, broj ektranodalnih sijela, prisutnost B simptoma, aktivnost LDH u serumu, koncentraciju hemoglobina i IPI kod bolesnika s DLBCL. Statistički značajne razlike zabilježene su kod veličine tumora (tablica 44). Veći tumori imali su značajno niže vrijednosti Foxp3⁺ (%) limfocita i CD3⁺ limfocita.

Tablica 41. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika s DLBCL

Spol		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Muški	12	0,80	17,10	4,00	5,50	8,13
	Ženski	11	1,00	24,10	4,30	6,70	16,30
CD3 ⁺ (%)	Muški	12	6,60	50,00	11,38	22,20	30,58
	Ženski	11	5,70	61,40	20,00	29,30	37,10
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Muški	12	0,09	0,56	0,23	0,25	0,32
	Ženski	11	0,15	0,65	0,18	0,23	0,46

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	51,500	-0,893	0,372
CD3 ⁺ (%)	51,000	-0,923	0,356
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	56,500	-0,586	0,558

Tablica 42. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na dob bolesnika s DLBCL

Dob		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	≥45 do ≤60 godina	10	0,80	24,10	4,05	5,55	10,20
	>60 godina	13	1,00	17,10	4,30	6,70	10,15
CD3 ⁺ (%)	≥45 do ≤60 godina	10	6,60	61,40	15,93	23,45	40,33
	>60 godina	13	5,70	39,20	18,00	28,00	33,15
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	≥45 do ≤60 godina	10	0,09	0,65	0,21	0,24	0,28
	>60 godina	13	0,15	0,56	0,20	0,24	0,47

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	60,500	-0,279	0,780
CD3 ⁺ (%)	64,000	-0,062	0,951
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	59,500	-0,342	0,732

Tablica 43. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na klinički stadij bolesnika s DLBCL

Klinički stadij		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	I	1	5,30	5,30			
	II	3	6,70	18,90	6,70	7,10	18,90
	III	2	5,50	5,60	4,13	5,55	4,26
	IV	17	0,80	24,10	4,00	5,80	10,15
CD3 ⁺ (%)	I	1	21,80	21,80			
	II	3	29,90	61,40	29,90	39,20	61,40
	III	2	21,90	24,40	16,43	23,15	18,36
	IV	17	5,70	50,00	12,55	27,00	33,15
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	I	1	0,24	0,24			
	II	3	0,17	0,31	0,17	0,24	0,31
	III	2	0,23	0,25	0,17	0,24	0,25
	IV	17	0,09	0,65	0,20	0,24	0,47

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	1,747	3	0,627
CD3 ⁺ (%)	4,643	3	0,200
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0,097	3	0,992

Klinički stadij		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	I+II	4	5,30	18,90	5,65	6,90	15,95
	III+IV	19	0,80	24,10	4,30	5,60	8,40
CD3 ⁺ (%)	I+II	4	21,80	61,40	23,83	34,55	55,85
	III+IV	19	5,70	50,00	16,00	24,40	30,80
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	I+II	4	0,17	0,31	0,19	0,24	0,29
	III+IV	19	0,09	0,65	0,21	0,24	0,46

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	29,000	-0,731	0,465
CD3 ⁺ (%)	19,000	-1,541	0,123
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	35,000	-0,244	0,807

Tablica 44. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na veličinu tumora kod bolesnika s DLBCL

Tm ≥10 cm		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<10 cm	21	1,00	24,10	5,10	6,70	10,15
	≥10 cm	2	0,80	1,50	0,60	1,15	1,16
CD3 ⁺ (%)	<10 cm	21	5,70	61,40	20,90	28,00	36,30
	≥10 cm	2	6,60	9,10	4,95	7,85	6,86
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<10 cm	21	0,15	0,65	0,22	0,24	0,39
	≥10 cm	2	0,09	0,23	0,07	0,16	0,21

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	1,000	-2,184	0,029
CD3 ⁺ (%)	3,000	-1,964	0,049
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	7,000	-1,531	0,126

Tablica 45. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na broj ektranodalnih sijela kod bolesnika s DLBCL

Broj ektranodalnih sijela		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	0	4	5,30	18,90	5,35	5,55	15,58
	1	8	4,30	24,10	4,68	7,00	8,13
	>1	11	0,80	17,10	1,50	5,50	11,90
CD3 ⁺ (%)	0	4	21,80	61,40	21,83	23,15	52,15
	1	8	16,00	50,00	21,75	28,65	38,68
	>1	11	5,70	37,60	7,90	22,50	30,80
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0	4	0,23	0,31	0,23	0,25	0,30
	1	8	0,15	0,65	0,16	0,22	0,42
	>1	11	0,09	0,56	0,23	0,24	0,47

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	0,842	2	0,656
CD3 ⁺ (%)	1,625	2	0,444
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1,072	2	0,585

Tablica 46. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na prisutnost B simptoma kod bolesnika s DLBCL

B simptomi		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Ne	13	1,50	24,10	5,10	5,80	7,85
	Da	10	0,80	18,90	3,03	6,40	16,50
CD3 ⁺ (%)	Ne	13	6,60	50,00	20,90	27,00	37,35
	Da	10	5,70	61,40	8,80	25,90	31,98
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Ne	13	0,15	0,65	0,22	0,24	0,29
	Da	10	0,09	0,56	0,17	0,28	0,49

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	62,500	-0,155	0,877
CD3 ⁺ (%)	56,000	-0,558	0,577
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	56,500	-0,528	0,597

Tablica 47. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na aktivnost LDH u serumu kod bolesnika s DLBCL

LDH < i ≥ 241 U/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<241 [U/L]	11	4,30	24,10	4,90	6,70	17,10
	≥241 [U/L]	12	0,80	16,30	2,05	5,70	7,30
CD3 ⁺ (%)	<241 [U/L]	11	18,20	61,40	21,80	30,80	37,60
	≥241 [U/L]	12	5,70	50,00	8,20	23,15	29,43
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<241 [U/L]	11	0,15	0,65	0,22	0,24	0,32
	≥241 [U/L]	12	0,09	0,54	0,19	0,24	0,42

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	47,500	-1,139	0,255
CD3 ⁺ (%)	35,000	-1,908	0,056
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	56,500	-0,586	0,558

Tablica 48. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na koncentraciju hemoglobina kod bolesnika s DLBCL

Hemoglobin < i ≥ 120 g/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<120 g/L	9	0,80	17,10	2,35	6,70	12,20
	≥120 g/L	14	1,50	24,10	5,20	5,70	9,28
CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	9	5,70	39,20	8,50	20,00	33,15
	≥120 g/L	14	6,60	61,40	21,88	27,50	37,23
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	9	0,09	0,56	0,18	0,23	0,51
	≥120 g/L	14	0,15	0,65	0,23	0,24	0,30

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	54,000	-0,567	0,570
CD3 ⁺ (%)	47,000	-1,008	0,313
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	63,000	0,000	1,000

Tablica 49. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na IPI kod bolesnika s DLBCL

IPI		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Niski rizik (0-2)	10	4,30	24,10	4,75	5,50	10,05
	Visoki rizik (3-5)	13	0,80	17,10	2,60	7,30	10,15
CD3 ⁺ (%)	Niski rizik (0-2)	10	18,20	61,40	21,35	23,45	31,70
	Visoki rizik (3-5)	13	5,70	50,00	8,50	28,00	36,55
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Niski rizik (0-2)	10	0,15	0,65	0,23	0,24	0,28
	Visoki rizik (3-5)	13	0,09	0,56	0,18	0,23	0,47

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	60,000	-0,310	0,756
CD3 ⁺ (%)	63,000	-0,124	0,901
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	61,500	-0,218	0,828

5.7. Povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima bolesnika s FL

Tablice 50 do 58 prikazuju razlike postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika, dob bolesnika, Ann Arbor klinički stadij, veličinu najvećeg tumora, broj ektranodalnih sijela, prisutnost B simptoma, aktivnost LDH u serumu, koncentraciju hemoglobina i FLIPI kod bolesnika s FL. Nije bilo statistički značajnih razlika.

Tablica 50. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na spol bolesnika s FL

Spol		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Muški	9	3,20	13,30	4,80	6,30	10,60
	Ženski	9	0,60	24,70	2,60	13,00	17,00
CD3 ⁺ (%)	Muški	9	8,40	40,60	19,25	25,60	36,70
	Ženski	9	7,10	38,60	14,30	31,80	36,00
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Muški	9	0,10	0,61	0,21	0,27	0,37
	Ženski	9	0,08	0,67	0,20	0,36	0,50

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	29,000	-1,015	0,310
CD3 ⁺ (%)	36,500	-0,353	0,724
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	29,500	-0,972	0,331

Tablica 51. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na dob bolesnika s FL

Dob		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<45 godina	2	5,80	13,00	4,35	9,40	9,75
	≥45 do ≤ 60 godina	6	1,20	19,30	4,73	6,95	13,08
	>60 godina	10	0,60	24,70	3,65	8,40	14,18
CD3 ⁺ (%)	<45 godina	2	25,60	31,80	19,20	28,70	23,85
	≥45 do ≤ 60 godina	6	16,00	35,00	16,68	24,00	35,00
	>60 godina	10	7,10	40,60	11,55	34,70	37,55
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<45 godina	2	0,23	0,41	0,17	0,32	0,31
	≥45 do ≤ 60 godina	6	0,08	0,55	0,22	0,31	0,40
	>60 godina	10	0,08	0,67	0,16	0,34	0,48

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	0,009	2	0,995
CD3 ⁺ (%)	0,599	2	0,741
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0,190	2	0,909

Tablica 52. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na klinički stadij bolesnika s FL

Klinički stadij		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	I	1	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90
	II	2	7,60	19,30	7,60	13,45	19,30
	III	1	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
	IV	14	0,60	24,70	3,80	8,40	13,30
CD3 ⁺ (%)	I	1	16,90	16,90	16,90	16,90	16,90
	II	2	24,50	35,00	24,50	29,75	35,00
	III	1	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60
	IV	14	7,10	40,60	21,60	32,50	37,00
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	I	1	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
	II	2	0,31	0,55	0,31	0,43	0,55
	III	1	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
	IV	14	0,08	0,67	0,18	0,29	0,41

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	2,055	3	0,561
CD3 ⁺ (%)	2,461	3	0,482
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0,761	3	0,859

Klinički stadij		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	I+II	3	5,90	19,30	5,90	7,60	19,30
	III+IV	15	0,60	24,70	3,80	6,60	13,30
CD3 ⁺ (%)	I+II	3	16,90	35,00	16,90	24,50	35,00
	III+IV	15	7,10	40,60	16,00	31,80	37,00
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	I+II	3	0,31	0,55	0,31	0,35	0,55
	III+IV	15	0,08	0,67	0,18	0,31	0,41

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	17,000	-0,652	0,515
CD3 ⁺ (%)	19,500	-0,356	0,722
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	15,500	-0,830	0,406

Tablica 53. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na veličinu tumora kod bolesnika s FL

Tm ≥10 cm		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<10 cm	17	0,60	24,70	3,90	8,90	13,65
	≥10 cm	1	6,60	6,60	6,60	6,60	6,60
CD3 ⁺ (%)	<10 cm	17	7,10	40,60	16,45	28,15	36,00
	≥10 cm	1	36,20	36,20	36,20	36,20	36,20
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<10 cm	17	0,08	0,67	0,26	0,34	0,43
	≥10 cm	1	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	7,000	-0,204	0,838
CD3 ⁺ (%)	4,000	-0,817	0,414
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	3,000	-1,022	0,307

Tablica 54. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na broj ektranodalnih sijela kod bolesnika s FL

Broj ektranodalnih sijela		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	0	4	4,00	19,30	4,95	6,75	13,45
	1	8	3,20	24,70	5,05	8,40	13,65
	>1	6	0,60	14,70	1,20	8,40	13,00
CD3 ⁺ (%)	0	4	12,60	35,00	14,75	20,70	29,75
	1	8	8,40	40,60	22,55	36,60	37,90
	>1	6	7,10	35,00	16,00	28,70	33,20
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	0	4	0,31	0,55	0,32	0,34	0,45
	1	8	0,10	0,67	0,22	0,32	0,50
	>1	6	0,08	0,44	0,08	0,27	0,41

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	0,453	2	0,797
CD3 ⁺ (%)	2,906	2	0,234
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1,340	2	0,512

Tablica 55. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na prisutnost B simptoma kod bolesnika s FL

B simptomi		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Ne	15	1,20	24,70	5,80	7,60	13,30
	Da	3	0,60	14,70	0,60	3,20	14,70
CD3 ⁺ (%)	Ne	15	12,60	40,60	21,60	31,80	37,00
	Da	3	7,10	33,20	7,10	8,40	33,20
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Ne	15	0,08	0,67	0,23	0,31	0,41
	Da	3	0,08	0,44	0,08	0,38	0,44

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	14,000	-1,007	0,314
CD3 ⁺ (%)	8,000	-1,719	0,086
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	21,500	-0,119	0,906

Tablica 56. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na aktivnost LDH u serumu kod bolesnika s FL

LDH < i ≥ 241 U/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<241 [U/L]	11	0,60	19,30	3,80	5,90	10,20
	≥241 [U/L]	7	1,20	24,70	7,60	13,00	14,70
CD3 ⁺ (%)	<241 [U/L]	11	7,10	40,60	12,60	23,50	36,20
	≥241 [U/L]	7	16,00	38,60	24,50	33,20	37,00
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<241 [U/L]	11	0,08	0,61	0,18	0,27	0,38
	≥241 [U/L]	7	0,08	0,67	0,31	0,36	0,44

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	19,000	-1,766	0,077
CD3 ⁺ (%)	27,500	-0,997	0,319
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	27,500	-0,997	0,319

Tablica 57. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na koncentraciju hemoglobina kod bolesnika s FL

Hemoglobin < i ≥ 120 g/L		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	<120 g/L	2	13,00	14,70	13,00	13,85	14,70
	≥120 g/L	16	0,60	24,70	3,90	6,45	12,15
CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	2	31,80	33,20	31,80	32,50	33,20
	≥120 g/L	16	7,10	40,60	16,45	25,05	36,60
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	<120 g/L	2	0,41	0,44	0,41	0,43	0,44
	≥120 g/L	16	0,08	0,67	0,21	0,31	0,37

	Mann-Whitney U	Z	P
Foxp3 ⁺ (%)	6,000	-1,405	0,160
CD3 ⁺ (%)	14,000	-0,281	0,779
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	6,000	-1,406	0,160

Tablica 58. Povezanost postotka Foxp3⁺ limfocita, postotka CD3⁺ limfocita i omjera postotka Foxp3⁺ i postotka CD3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova obzirom na FLIPI

FLIPI		N	Min	Max	Centile		
					25.	Medijan	75.
Foxp3 ⁺ (%)	Nizak rizik	5	5,80	19,30	5,85	6,30	13,45
	Srednji rizik	3	3,20	13,30	3,20	11,00	13,30
	Visoki rizik	10	0,60	24,70	3,15	8,40	14,18
CD3 ⁺ (%)	Nizak rizik	5	16,90	35,00	20,20	24,50	30,30
	Srednji rizik	3	8,40	35,00	8,40	21,60	35,00
	Visoki rizik	10	7,10	40,60	15,15	34,70	37,55
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	Nizak rizik	5	0,23	0,55	0,25	0,31	0,45
	Srednji rizik	3	0,31	0,61	0,31	0,38	0,61
	Visoki rizik	10	0,08	0,67	0,10	0,29	0,42

	Kruskal-Wallis H	df	P
Foxp3 ⁺ (%)	0,008	2	0,996
CD3 ⁺ (%)	1,691	2	0,429
Foxp3 ⁺ (%) / CD3 ⁺ (%)	1,524	2	0,467

6. RASPRAVA

Povećan broj Treg limfocita u tumorskom tkivu uočen je u većini oblika solidnih tumora ljudi (95). Woo i sur. (96) su prvi opisali povećan broj Treg limfocita u tumorskom upalnom infiltratu bolesnika s karcinomom pluća i jajnika. Osim u tumorskom tkivu, povećan broj regulacijskih limfocita nađen je i u perifernoj krvi bolesnika s različitim oblicima karcinoma, kao što su karcinom dojke i gušterače (99) te jetre (100). Kao i u solidnim tumorima, pojačano nakupljanje Treg limfocita dokazano je i u različitim hematološkim zloćudnim bolestima, uključujući limfome. Povećan broj Treg limfocita uočen je u tumorskom tkivu bolesnika oboljelih od NHL i HL u usporedbi s reaktivnim limfnim čvorovima (97,98,106-108), kao i u perifernoj krvi tih bolesnika u usporedbi s perifernom krvi zdravih dobrovoljaca (97,98,109).

U našem istraživanju analizirali smo udio imunocitokemijski Foxp3 pozitivnih limfocita u punktatima limfnih čvorova bolesnika oboljelih od limfoma u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika s reaktivnom limfocitnom hiperplazijom. Bolesnici kod kojih je postavljena dijagnoza limfoma podijeljeni su na one s klasičnim HL, B-NHL i T-NHL, a bolesnici s B-NHL nadalje u dvije skupine, bolesnici s indolentnim i agresivnim B-NHL. Pri određivanju postotka imunocitokemijski Foxp3⁺ limfocita broj pozitivnih stanica izražavali smo na sve limfatične stanice prisutne u razmazu, uključujući i tumorske limfatične stanice u čvorovima zauzetim limfomom. Zbog vrlo različitog udjela tumorskih stanica kao i limfocita T u različitim tipovima limfoma, s mogućim utjecajem na rezultate istraživanja, za svakog ispitanika odredili smo i postotak CD3⁺ limfocita te omjer postotka Foxp3⁺ i CD3⁺ limfocita (broj Foxp3⁺ limfocita / limfociti T). U dosadašnjim istraživanjima u kojima je metodom protočne citometrije određivan udio Treg limfocita, postotak Treg limfocita izražavan je kao broj Treg limfocita u odnosu na sve limfocite (108,110) ili kao broj Treg limfocita u odnosu na CD4⁺ limfocite T (97,98,106). U dosadašnjim istraživanjima u kojima je određivan broj imunohistokemijski Foxp3⁺ limfocita, izražavan je ili postotak Foxp3⁺ limfocita u odnosu na sve stanice ili apsolutni broj Foxp3⁺ limfocita (105,111-113).

U skupini bolesnika s klasičnim HL nađen je najveći postotak Foxp3⁺ limfocita, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na bolesnike s agresivnim ($P<0,001$) i indolentnim ($P=0,003$) B-NHL, dok razlika u odnosu na bolesnike s T-NHL i reaktivnom hiperplazijom nije dosegla razinu statističke značajnosti. Kada smo udio Foxp3⁺ limfocita izrazili kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, vrijednosti su bile granično statistički značajno

veće u skupini bolesnika s klasičnim HL u odnosu na bolesnike s T-NHL ($P=0,087$) i reaktivnom hiperplazijom ($P=0,061$), ali se izgubila statistička značajnost razlike u odnosu na bolesnike s agresivnim i indolentnim B-NHL. Bosler i sur. (108) su u svom radu također opisali značajno veći broj Treg limfocita u limfnim čvorovima bolesnika s klasičnim HL u odnosu na bolesnike s B-NHL. Međutim, za razliku od našeg istraživanja, u opisanom radu je i broj Treg limfocita u klasičnom HL bio značajno veći u odnosu na benigne, reaktivno promijenjene limfne čvorove te autori ističu mogućnost korištenja razlike u broju Treg limfocita u diferencijalnoj dijagnostici klasičnog HL prema NHL i reaktivno promijenjenim limfnim čvorovima. Slične rezultate dobili su i Hudnall i sur. (110) koji su uspoređivali sastav upalnog infiltrata HL i reaktivne limfocitne hiperplazije. Upalni infiltrat HL bio je značajno bogatiji Treg limfocitima. U opisanim radovima, za razliku od našeg istraživanja, za analizu je korištena metoda protočne citometrije, što bi mogao biti jedan od mogućih uzroka razlike u dobivenim rezultatima. U opisanim istraživanjima broj Treg limfocita izražen je kao postotak $CD4^+CD25^+$ limfocita u odnosu na sve limfocite, a dobivene vrijednosti su bile značajno niže nego u našem radu, pogotovo u uzorcima limfnih čvorova s reaktivnom hiperplazijom. U skupini bolesnika s klasičnim HL, medijan postotka $Foxp3^+$ limfocita u našem istraživanju bio je 13,5 %, a medijan postotka $CD4^+CD25^+$ Treg limfocita 7,5 % u istraživanju Boslera i sur., odnosno 9 % u istraživanju Hudnalla i sur. Za reaktivne limfne čvorove navedene vrijednosti su iznosile; 10,5 % (naše istraživanje), 3,3 % (Bosler i sur.) te 2 % (Hudnall i sur.).

Suprotno očekivanjima, postotak $Foxp3^+$ limfocita u skupini bolesnika s B-NHL bio je niži nego u skupini ispitanika s reaktivnom hiperplazijom. Razlika između agresivnog B-NHL i reaktivne hiperplazije dosegla je razinu statističke značajnosti ($P=0,001$), dok je razlika između indolentnog B-NHL i reaktivne hiperplazije bila granično statistički značajna ($P=0,053$).

Yang i sur. (106) su metodom protočne citometrije analizirali postotak Treg limfocita u limfnim čvorovima bolesnika s B-NHL. Kao kontrolu su koristili perifernu krv zdravih dobrovoljaca, upalno promijenjene tonzile te benigne limfne čvorove. Značajno veći postotak Treg limfocita nađen je u limfnim čvorovima bolesnika s B-NHL (17 % svih $CD4^+$ limfocita T) u odnosu na perifernu krv zdravih dobrovoljaca (8 % svih $CD4^+$ limfocita T), tonzile (11 % svih $CD4^+$ limfocita T) te benigne limfne čvorove (6 % svih $CD4^+$ limfocita T). Značajno veći broj Treg limfocita u limfnim čvorovima zauzetim B-NHL (38,2 % svih $CD4^+$ limfocita T) u odnosu na benigne, reaktivno promijenjene limfne čvorove (11,6 % svih $CD4^+$ limfocita T), našli su i Mittal i sur. (97). Autori su također koristili metodu protočne citometrije, a osim

tumorskog tkiva analizirali su i perifernu krv bolesnika te zdravih dobrovoljaca. Postotak Treg limfocita bio je značajno veći u perifernoj krvi bolesnika (20,4 % svih CD4⁺ limfocita T) nego u perifernoj krvi zdravih dobrovoljaca (3,2 % svih CD4⁺ limfocita T). Pojačano nakupljanje Treg limfocita kod bolesnika s B-NHL dokazali su u svom istraživanju i Han i sur. (98). Našli su značajno veći udio Treg limfocita u perifernoj krvi i koštanoj srži bolesnika s NHL u odnosu na perifernu krv zdravih dobrovoljaca. Postotak Treg limfocita bio je značajno veći u limfnim čvorovima zauzetim B-NHL (26,8 % svih CD4⁺ limfocita T) nego u benignim limfnim čvorovima (7,9 % svih CD4⁺ limfocita T). Također, u istog bolesnika postotak Treg limfocita u limfomom zauzetom limfnom čvoru bio je značajno veći nego u perifernoj krvi i koštanoj srži, što ukazuje na preferencijalno nakupljanje Treg limfocita u tumorskom tkivu.

Kada smo udio Foxp3⁺ limfocita izrazili kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, nađena je statistički značajno veća vrijednost u skupini bolesnika s indolentnim B-NHL (P=0,005) te granično značajno veća vrijednost u skupini bolesnika s agresivnim B-NHL u odnosu na reaktivnu limfocitnu hiperplaziju (P=0,058). Ti rezultati su u skladu s rezultatima Mittala i sur. (97) koji su također našli značajno veći udio Treg limfocita, izražen kao postotak svih CD3⁺ limfocita, u limfnim čvorovima zauzetim B-NHL u odnosu na benigne limfne čvorove.

U našem istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u udjelu Foxp3 pozitivnih limfocita između skupina bolesnika s indolentnim i agresivnim B-NHL, što je u skladu s rezultatima Hana i sur. (98) te Mittala i sur. (97). Osim između indolentnih i agresivnih B-NHL, Mittal i sur. (97) nisu našli razliku niti između pojedinih subtipova limfoma. Međutim, Tzankov i sur. (105) u opsežnom istraživanju, kojim je obuhvaćeno 1019 bolesnika s limfomom (739 NHL i 280 klasičnih HL), opisuju razliku u broju Treg Foxp3⁺ limfocita ovisno o subtipu limfoma. Najveći broj Treg Foxp3⁺ limfocita uočen je u FL, visoke vrijednosti nađene su također u AITL, nodularnoj sklerozi klasičnog HL, PMBCL i PTCL, dok su niže vrijednosti Treg Foxp3⁺ limfocita uočene u MZL, MCL te limfocitima bogatom klasičnom HL. U našem istraživanju analizirali smo razliku u udjelu Foxp3⁺ limfocita u punktatima limfnih čvorova u skupinama ispitanika s reaktivnom hiperplazijom, klasičnim HL te najčešćim tipovima B-NHL (DLBCL, FL i MCL). U skupini bolesnika s klasičnim HL nađen je najveći postotak Foxp3⁺ limfocita, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na bolesnike s DLBCL (P=0,001), FL (P=0,014) i MCL (P<0,001). Postotak Foxp3⁺ limfocita bio je statistički značajno veći u skupini bolesnika s DLBCL u odnosu na bolesnike s MCL (P=0,042) te u skupini bolesnika s FL u odnosu na bolesnike s MCL (P=0,032). Kada smo udio Foxp3⁺ limfocita izrazili kao omjer postotka

Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, bolesnici s FL imali su značajno veće vrijednosti u odnosu na ispitanike s reaktivnom hiperplazijom, dok za ostale skupine nisu nađene statistički značajne razlike.

Oleinika i sur. (92) ističu da bi poznavanje mehanizama koji dovode do pojačanog nakupljanja Treg stanica u tumorskom tkivu moglo doprinijeti razvoju uspješnijih terapijskih protokola. Autori opisuju tri različita modela, koja se međusobno ne isključuju, te pridonose pojačanom intratumorskom Treg nakupljanju: pojačana migracija Treg stanica, proliferacija Treg stanica unutar tumorskog tkiva te konverzija konvencionalnih Foxp3 negativnih stanica u Treg stanice.

Prvi model (pojačana migracija Treg stanica) se temelji na interakciji različitih kemokina i njihovih receptora. Za Treg stanice je specifična ekspresija kemokinskih receptora CCR4 i CCR8 čiji su ligandi kemokini CCL22, CCL17 i CCL1 (114). Ishida i sur. (115) su u svom istraživanju pokazali kako je migracija CCR4 pozitivnih Treg stanica u HL potaknuta kemokinima CCL17 i CCL22 koje luče Hodgkinove stanice. Slične rezultate pokazala su istraživanja i na drugim hematološkim malignim bolestima. Yang i sur. (106) su istraživali izražaj kemokinskih receptora CCR4 i CCR8 na intratumorskim Treg stanicama bolesnika s B-NHL te izražaj kemokina CCL17 i CCL22 na limfomskim B stanicama. Većina Treg stanica pokazivala je površinski CCR4 izražaj, ali ne i izražaj CCR8, a tumorski limfociti B izražavali su visoke razine CCL22, ali ne i CCL17. Opisani rezultati sugeriraju da bi izražaj CCL22 na tumorskim limfocitima B mogao biti odgovoran za privlačenje i pojačano nakupljanje CCR4 pozitivnih Treg stanica u tumorskom tkivu B-NHL. Tumorske stanice bolesnika s CLL također luče CCL22 što potiče migraciju CCR4 pozitivnih limfocita T, a primjena anti-CCL22 antitijela koči tu migraciju (116).

Drugi model uključuje proliferaciju Treg stanica unutar tumorskog tkiva i limfnih čvorova koji dreniraju tumore. U mišjem modelu autoimunog dijabetesa se pokazalo da su za održavanje homeostaze i preživljavanje Treg stanica unutar otočića gušterače potrebne niske razine IL-2 (117). Pretpostavlja se da su niske razine IL-2 neophodne za održavanje homeostaze i proliferaciju Treg stanica i u tumorskom tkivu (93). Quezada i sur. (118) su u svom radu pokazali da je tumorsko tkivo mišjeg modela melanoma infiltrirano Treg stanicama kao i CD4 pozitivnim efektorskim stanicama te se smatra da bi IL-2 kojeg luče efektorske stanice mogao biti odgovoran za proliferaciju Treg stanica. U skladu s tim je i visok izražaj proliferacijskog biljega Ki-67 u Treg stanicama koje infiltriraju tumor.

Treći model uključuje konverziju konvencionalnih Foxp3 negativnih limfocita T u iTreg stanice koje zajedno s nTreg stanicama pridonose nakupljanju regulacijskih stanica u tumorskom tkivu (119). Poznato je da TGF- β može potaknuti indukciju Treg stanica (120) te se smatra da TGF- β kojeg luče tumorske stanice pridonosi konverziji konvencionalnih CD4⁺CD25⁻ stanica u Treg stanice u tumorskom tkivu (121). Smatra se da bi na sličan način mogao djelovati i imunosupresivni enzim IDO. Curti i sur. (122) su pokazali da tumorske stanice kod akutne mijeloične leukemije pokazuju IDO ekspresiju i IDO-ovisnim mehanizmima potiču konverziju CD4⁺CD25⁻ stanica u Treg stanice. Sharma i sur. (123) su u istraživanju na miševima pokazali da Treg stanice izolirane iz limfnih čvorova koji dreniraju tumore pokazuju potentniju supresivnu aktivnost koja se dijelom gubi kada tumor raste u domaćinu s nedostatkom IDO enzima. Autori pretpostavljaju da IDO pozitivne plazmocitoidne DC potiču aktivaciju Treg stanica i tako podržavaju supresivni mikrookoliš u limfnim čvorovima koji dreniraju tumore. Međutim, prema nekim istraživanjima konverzija konvencionalnih limfocita T u Treg stanice ne pridonosi značajno porastu broja Treg stanica u tumorskom tkivu. Tome u prilog govori istraživanje Elkorda i sur. (124) koji su pokazali da je u perifernoj krvi bolesnika s karcinomom bubrega značajno veći broj prirođenih Treg stanica u odnosu na inducirane Treg stanice. Hindley i sur. (125) su analizirali repertoar TCR konvencionalnih i Treg stanica u tumorskom mikrookolišu te ustanovili da se značajno razlikuje, što sugerira da lokalna konverzija ne pridonosi značajno porastu ukupnog broja Treg stanica u tumorskom tkivu.

Treg limfociti imaju značajnu ulogu u regulaciji protu-tumorskog imunološkog odgovora i važan su sastavni element upalnog infiltrata u tumorskom tkivu. Smatra se da bi Treg limfociti mogli predstavljati mehanizam putem kojeg tumori izbjegavaju protu-tumorski imunološki odgovor (126). Tome u prilog govore istraživanja na miševima kod kojih deplecija Treg stanica dovodi do odbacivanja tumora (127,128) te klinička istraživanja koja pokazuju povezanost većeg broja Treg limfocita u različitim solidnim tumorima s negativnim prognostičkim čimbenicima i lošijom prognozom (95,101,129,130). Međutim, istraživanja vezana uz neke vrste karcinoma te neke oblike limfoma pokazuju drugačiji prognostički predznak (101). Tako se veći broj Treg limfocita u tumorskom upalnom infiltratu povezuje s povoljnijom prognozom kod bolesnika s karcinomom debelog crijeva (102,103) te kod bolesnika s pločastim karcinomom u području glave i vrata (104).

U našem smo istraživanju za bolesnike s limfomom ispitivali povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita s prognostičkim čimbenicima, uključujući spol i dob bolesnika, Ann Arbor klinički

stadij, veličinu najvećeg tumora, broj zahvaćenih ekстранodalnih sijela, prisutnost B simptoma, aktivnost LDH u serumu te koncentraciju hemoglobina u krvi. Za bolesnike s agresivnim B-NHL također smo ispitivali i povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita s IPI, a za bolesnike s FL s FLIPI.

Kada smo analizirali sve bolesnike s limfomom, našli smo statistički značajno veći postotak Foxp3⁺ limfocita u skupinama bolesnika s izraženim povoljnim prognostičkim čimbenicima, kao što su rani klinički stadij, veličina najvećeg tumora <10 cm te nezahvaćenost ekстранodalnih sijela. Za ostale prognostičke čimbenike nije bilo statistički značajne razlike. Kada smo udio Foxp3⁺ limfocita izrazili kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, statistički značajno veći broj je nađen u skupini bolesnika s veličinom najvećeg tumora <10 cm, a za ostale prognostičke čimbenike nije bilo statistički značajne razlike.

U skupini bolesnika s klasičnim HL nismo našli statistički značajnu razliku u broju Foxp3⁺ limfocita niti za jedan ispitivani prognostički čimbenik.

U skupini bolesnika s NHL našli smo povezanost većeg postotka Foxp3⁺ limfocita s povoljnim prognostičkim čimbenicima, kao što su rani klinički stadij te veličina najvećeg tumora <10 cm. Postotak Foxp3⁺ limfocita bio je granično statistički značajno veći kod bolesnika sa zahvaćenim manjim brojem ekстранodalnih sijela. Za ostale prognostičke čimbenike nije bilo statistički značajne razlike. Kada smo udio Foxp3⁺ limfocita izrazili kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, statistički značajno veći broj je nađen u skupini bolesnika s veličinom najvećeg tumora <10 cm, a za ostale prognostičke čimbenike nije bilo statistički značajne razlike. U skupini bolesnika s DLBCL našli smo povezanost većeg postotka Foxp3⁺ limfocita s veličinom najvećeg tumora <10 cm, dok u skupini bolesnika s FL nije nađena statistički značajna povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita niti s jednim ispitivanim prognostičkim čimbenikom.

Dosadašnja istraživanja o prognostičkom značenju broja Treg limfocita kod bolesnika oboljelih od limfoma pokazuju heterogene rezultate. Iako se u većini istraživanja veći broj Treg stanica povezuje s boljom prognozom, postoje i istraživanja sa suprotnim rezultatima.

Tzankov i sur. (105) su u opsežnom istraživanju, kojim je obuhvaćeno 926 bolesnika s limfomom, našli povezanost većeg broja imunohistokemijski Foxp3⁺ Treg limfocita u tumorskom tkivu s povoljnom prognozom u bolesnika s klasičnim HL, FL i DLBCL-GCB. Prema istraživanju Lee i sur. (111) veći broj Foxp3⁺ Treg limfocita također ukazuje na bolju prognozu kod bolesnika s DLBCL, a Coutinho i sur. (131) veći broj Foxp3⁺ limfocita povezuju

s boljom prognozom i manjim rizikom od ponovne pojave bolesti nakon provedene kemoimunoterapije. Povezanost većeg broja Foxp3⁺ Treg limfocita u tumorskom infiltratu s boljim preživljenjem bolesnika uočena je i kod FL, kao i značajno smanjenje broja Foxp3⁺ Treg limfocita u tumorskom infiltratu pri transformaciji FL u DLBCL (132). Rezultati našeg istraživanja (povezanost većeg udjela Foxp3⁺ limfocita s povoljnim prognostičkim čimbenicima kada smo analizirali sve bolesnike s limfomom te skupinu bolesnika s NHL) u skladu su s rezultatima navedenih istraživanja.

Međutim, u skupini bolesnika s klasičnim HL u našem istraživanju nije nađena povezanost niti jednog prognostičkog čimbenika s udjelom Foxp3⁺ Treg limfocita, dok većina objavljenih radova pokazuje povezanost većeg broja Foxp3⁺ Treg limfocita s boljom prognozom. Opisana razlika u dobivenim rezultatima možda se može povezati s malim brojem bolesnika s klasičnim HL koji su uključeni u naše istraživanje. Osim toga, u većini radova, za razliku od našeg istraživanja, za analizu broja Foxp3⁺ limfocita je korišteno imunohistokemijsko bojenje na histološkim rezovima tumora. Opsežnim istraživanjima, Kelley i sur. (126) 98 bolesnika, Alvaro i sur. (112) 257 bolesnika te Tzankov i sur. (105) 280 bolesnika s klasičnim HL, nađena je povezanost većeg broja Foxp3⁺ Treg limfocita u tumorskom infiltratu s povoljnim kliničkim ishodom. Uočeno je da manji broj Foxp3⁺ limfocita u uzorcima tumorskog tkiva bolesnika s klasičnim HL otpornim na terapiju i kod ponovne pojave bolesti korelira s lošijim preživljenjem (113). Smanjenje broja Foxp3⁺ limfocita zamijećeno je i u uzorcima HL pri ponovnoj pojavi bolesti u odnosu na uzorke uzete pri postavljanju dijagnoze kod istih bolesnika (112).

Kelley i sur. (126) opisuju tri moguća mehanizma kojima bi se mogla objasniti povezanost većeg broja Foxp3⁺ Treg stanica s povoljnijom prognozom u bolesnika s HL. Kao prvi mehanizam navode da bi broj Treg limfocita mogao zapravo predstavljati zamjenski biljeg za neki imunološki odgovor povezan s boljom prognozom. Zatim, moguće je da Treg limfociti slabe upalnu reakciju u tumorskom mikrookolišu, koji je sastavni dio HL, te na taj način suprimiraju lučenje citokina i drugih čimbenika značajnih za proliferaciju i preživljenje tumorskih HRS stanica. Kao treći mehanizam navode mogućnost da Treg stanice mogu direktno suprimirati tumorske stanice ili uzrokovati njihovu smrt.

Pokazalo se da Treg limfociti mogu izravno suprimirati limfocite B (133) ili uzrokovati njihovu smrt (58), čime bi se dijelom mogao objasniti njihov pozitivan učinak na prognozu kod bolesnika s B-NHL i HL. Lim i sur. (133) su u svom istraživanju pokazali da Foxp3⁺ Treg

limfociti mogu izravno, bez prethodne supresije pomoćničkih limfocita T, djelovati na limfocite B, tako što koče stvaranje imunoglobulina te proces promjene klase protutijela. Zhao i sur. (58) su pokazali da aktivirani $CD4^+CD25^+$ Treg limfociti mogu izravno uzrokovati smrt limfocita B, odnosno dovode do apoptoze aktiviranih limfocita B koja je posredovana granzimom i perforinom.

Za razliku od navedenih radova, neka istraživanja su pokazala povezanost većeg broja Treg limfocita u perifernoj krvi i tumorskim sijelima kod bolesnika s NHL s lošijom prognozom (97,105,109). Beyer i sur. (109) su našli razliku u postotku Treg limfocita u perifernoj krvi bolesnika s CLL ovisno o stadiju bolesti, a najveće vrijednosti su bile kod bolesnika s proširenom bolesti (Binet C). Prema Tzankovu i sur. (105) veći broj $Foxp3^+$ Treg limfocita u tumorskom tkivu povezuje se s lošijom prognozom kod bolesnika s DLBCL-non-GCB. Mittal i sur. (97) su našli značajno veći broj Treg limfocita u perifernoj krvi bolesnika s uznapredovalim NHL (kasni klinički stadij, veće vrijednosti LDH).

$Foxp3^+$ limfociti T predstavljaju heterogenu populaciju stanica koja se fenotipski i funkcionalno može podijeliti u tri subpopulacije: efektorske Treg stanice koje pokazuju jaku supresivnu aktivnost, naivne Treg stanice koje se mogu diferencirati u efektorske Treg stanice te non-Treg stanice koje ne pokazuju supresivnu aktivnost (56,67). Smatra se da bi upravo različita zastupljenost pojedinih subtipova $Foxp3^+$ Treg stanica mogla biti odgovorna za suprotno prognostičko značenje Treg stanica u različitim tumorima (134,135).

Prema udjelu efektorskih Treg i non-Treg limfocita u tumorskom infiltratu bolesnika s karcinomom kolona, Saito i sur. (135) razlikuju dva tipa karcinoma kolona; tip A i tip B. Kod karcinoma tipa A dominiraju efektorski Treg limfociti uz mali udio non-Treg limfocita, a visok $Foxp3$ izražaj povezuje se s lošijom prognozom. Međutim, kod karcinoma tipa B dominiraju non-Treg limfociti, a visok $Foxp3$ izražaj povezuje se s boljom prognozom.

Nakayama i sur. (134) ističu važnost određivanja broja visokosupresivnih efektorskih Treg stanica pri procjeni prognostičkog značaja. Autori su kod bolesnika s DLBCL analizirali broj svih $Foxp3^+$ Treg stanica te broj efektorskih Treg stanica. Za odvajanje efektorskih Treg stanica koristili su dvostruko $Foxp3/CTLA-4$ bojenje. CTLA-4 je negativni imunomodulator koji pokazuje izražaj na aktiviranim limfocitima T pa tako i na efektorskim Treg stanicama, dok su non-Treg stanice CTLA-4 negativne. Bolesnici s velikim brojem $Foxp3^+$ stanica imali su značajno bolje preživljenje nego bolesnici s manjim brojem $Foxp3^+$ stanica, što je u skladu s brojnim drugim istraživanjima (105,111,131). Suprotno tome, visoka razina dvostruko

Foxp3/CTLA-4 pozitivnih stanica bila je povezana s lošijom prognozom. Autori ističu da bi rezultati ovog istraživanja mogli utjecati na pristup u primjeni imunoterapije kod bolesnika s DLBCL. Primjena imunoterapije usmjerene na efektorske Treg stanice testira se na raznim solidnim tumorima kao što je melanom i karcinom pluća. U bolesnika s melanomom, primjena ipilimumaba (anti-CTLA-4 antitijelo) je praćena smanjenjem broja Treg stanica u tumorskom tkivu te korelira s kliničkim odgovorom (136-138). Kako se povećan broj Foxp3⁺ Treg stanica povezuje s boljom prognozom kod bolesnika s DLBCL, smatralo se da primjena imunoterapije kod njih ne bi imala učinka. Međutim, prema Nakayami i sur. (134) povećan broj Foxp3/CTLA-4 dvostruko pozitivnih efektorskih Treg stanica povezuje se s lošijom prognozom, što upućuje na mogućnost povoljnog učinka imunokemoterapije kod bolesnika s DLBCL.

Rezultati našeg istraživanja dopunjuju dosadašnja saznanja o utjecaju mikrookoliša na razvoj i progresiju bolesti. Dosadašnja istraživanja broja Foxp3⁺ Treg limfocita kod bolesnika oboljelih od limfoma rađena su pretežno metodama protočne citometrije te imunohistokemijskim i molekularnim metodama. Prema našem saznanju, ovo je prvi rad kojim se određuje broj imunocitokemijski Foxp3⁺ limfocita na razmazima citoloških punktata limfnih čvorova. Citološka punkcija limfnog čvora pouzdana je, vremenski i financijski pristupačna metoda, a citološki razmazi uzoraka dobivenih punkcijom omogućuju istovremenu analizu morfoloških i imunocitokemijskih obilježja stanica, što citološku punkciju čini prikladnom i vrlo korisnom metodom za usavršavanje dijagnostičko-prognostičkih postupaka te terapijskih mogućnosti kod bolesnika oboljelih od limfoma.

7. ZAKLJUČCI

- Najveći postotak Foxp3⁺ limfocita nađen je u skupini bolesnika s klasičnim HL, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na bolesnike s agresivnim i indolentnim B-NHL, dok razlika u odnosu na bolesnike s T-NHL te ispitanike s reaktivnom hiperplazijom ne doseže razinu statističke značajnosti.
- U skupini bolesnika s B-NHL nađen je niži postotak Foxp3⁺ limfocita u odnosu na ispitanike s reaktivnom hiperplazijom. Razlika između agresivnog B-NHL i reaktivne hiperplazije doseže razinu statističke značajnosti, dok je razlika između indolentnog B-NHL i reaktivne hiperplazije granično statistički značajna.
- Najveći udio Foxp3⁺ limfocita, izražen kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, nađen je u skupinama bolesnika s klasičnim HL i indolentnim B-NHL.
- Udio Foxp3⁺ limfocita, izražen kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, granično je statistički značajno veći u skupini bolesnika s klasičnim HL u odnosu na bolesnike s T-NHL te ispitanike s reaktivnom hiperplazijom, ali nije nađena statistički značajna razlika u odnosu na bolesnike s agresivnim i indolentnim B-NHL.
- Udio Foxp3⁺ limfocita, izražen kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, značajno je statistički veći u skupini bolesnika s indolentnim B-NHL te granično značajno veći u skupini bolesnika s agresivnim B-NHL u odnosu na reaktivnu limfocitnu hiperplaziju.
- U skupini bolesnika s klasičnim HL nađen je najveći postotak Foxp3⁺ limfocita, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na bolesnike s DLBCL, FL i MCL. Postotak Foxp3⁺ limfocita bio je statistički značajno veći u skupini bolesnika s DLBCL u odnosu na bolesnike s MCL te u skupini bolesnika s FL u odnosu na bolesnike s MCL.
- Veći postotak Foxp3⁺ limfocita povezan je s povoljnim prognostičkim čimbenicima, kao što su rani klinički stadij, veličina najvećeg tumora <10 cm te nezahvaćenost ektranodalnih sjela, u skupini koja obuhvaća sve bolesnike s limfomom.
- Veći udio Foxp3⁺ limfocita, izražen kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, povezan je s veličinom najvećeg tumora <10 cm u skupini koja obuhvaća sve bolesnike s limfomom.

- Veći postotak Foxp3⁺ limfocita povezan je s povoljnim prognostičkim čimbenicima, kao što su rani klinički stadij i veličina najvećeg tumora <10 cm, u skupini bolesnika s NHL.
- Veći udio Foxp3⁺ limfocita, izražen kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, povezan je s veličinom najvećeg tumora <10 cm u skupini bolesnika s NHL.
- Veći postotak Foxp3⁺ limfocita povezan je s veličinom najvećeg tumora <10 cm u skupini bolesnika s DLBCL.
- U skupini bolesnika s FL nije nađena statistički značajna povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita niti s jednim ispitivanim prognostičkim čimbenikom.
- U skupini bolesnika s klasičnim HL nije nađena statistički značajna povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita niti s jednim ispitivanim prognostičkim čimbenikom.

8. SAŽETAK

Važan sastavni dio tumorskog mikrookoliša bolesnika s Hodgkinovim (HL) i ne-Hodgkinovim limfomima (NHL) čine $CD4^+CD25^+$ regulatorni limfociti T (Treg), karakterizirani ekspresijom transkripcijskog čimbenika Foxp3. Pojačano nakupljanje Treg limfocita u tumorskom tkivu uočeno je u brojnim solidnim tumorima i hematološkim zloćudnim bolestima, uključujući limfome.

Cilj ovog rada je bio usporediti udio Foxp3 pozitivnih limfocita u punktatima limfnih čvorova bolesnika oboljelih od klasičnog HL i NHL u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika s benignom reaktivnom hiperplazijom. Kod bolesnika s klasičnim HL i NHL također smo ispitivali povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita s prognostičkim čimbenicima značajnim za klinički tijek limfoma (dob, spol, klinički stadij, veličina najvećeg tumora, broj ektranodalnih sijela, prisutnost B simptoma, koncentracija hemoglobina te aktivnost laktat dehidrogenaze u serumu). U istraživanje je uključeno ukupno 137 ispitanika, 34 ispitanika s reaktivnom hiperplazijom limfatičnih stanica te 103 bolesnika s limfomom. U skupini bolesnika s limfomom bio je 31 bolesnik s klasičnim HL, 66 bolesnika s B-NHL te 6 bolesnika s T-NHL. Bolesnici s B-NHL podijeljeni su u dvije skupine: bolesnici s agresivnim (36 bolesnika) i bolesnici s indolentnim B-NHL (30 bolesnika). Udio imunocitokemijski Foxp3⁺ limfocita je za sve bolesnike izražen na dva načina: kao postotak Foxp3⁺ limfocita (broj Foxp3⁺ limfocita / sve limfatične stanice) te kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita (broj Foxp3⁺ limfocita / limfociti T).

U skupini bolesnika s klasičnim HL nađen je najveći postotak Foxp3⁺ limfocita, sa statistički značajnom razlikom u odnosu na bolesnike s agresivnim i indolentnim B-NHL. Suprotno očekivanjima, postotak Foxp3⁺ limfocita u skupini bolesnika s B-NHL bio je niži nego u skupini ispitanika s reaktivnom hiperplazijom. Međutim, kada smo udio Foxp3⁺ limfocita izrazili kao omjer postotka Foxp3⁺ limfocita i postotka CD3⁺ limfocita, nađena je statistički značajno veća vrijednost u skupini bolesnika s indolentnim B-NHL te granično značajno veća vrijednost u skupini bolesnika s agresivnim B-NHL u odnosu na reaktivnu limfocitnu hiperplaziju. U skupini koja je obuhvaćala sve bolesnike s limfomom nađena je povezanost većeg postotka Foxp3⁺ limfocita s povoljnim prognostičkim čimbenicima, kao što su rani klinički stadij, veličina najvećeg tumora <10 cm te nezahvaćenost ektranodalnih sijela. U skupini bolesnika s NHL, veći postotak Foxp3⁺ limfocita također je povezan s povoljnim

prognostičkim čimbenicima, kao što su rani klinički stadij i veličina najvećeg tumora <10 cm. Međutim, u skupini bolesnika s klasičnim HL nije nađena statistički značajna povezanost udjela Foxp3⁺ limfocita niti s jednim ispitivanim prognostičkim čimbenikom.

9. SUMMARY

Foxp3⁺ lymphocytes in cytologic smears of lymph node aspirates and their association with prognostic markers in patients with lymphomas

CD4⁺CD25⁺ T regulatory (Treg) cells constitute important elements of the tumor microenvironment of patients with Hodgkin (HL) and non-Hodgkin lymphoma (NHL), with characteristic expression of the transcription factor Foxp3. Elevated numbers of Treg cells in tumor tissues have been observed in various types of solid organ tumors and hematologic malignancies, including lymphomas.

The aim of this study was to compare the proportion of Foxp3⁺ lymphocytes in fine needle aspirates of lymph nodes in patients with HL and NHL with a control group with benign reactive hyperplasia. In lymphoma (HL and NHL) patients we also analysed the correlation between the proportion of Foxp3⁺ lymphocytes and prognostic factors affecting the clinical course of the lymphoma (age, gender, clinical stage, size of the largest tumor, number of extranodal involvement sites, presence of B symptoms, hemoglobin concentration, and serum lactate dehydrogenase activity). The study involved a total of 137 participants, 34 with reactive lymphoid cell hyperplasia and 103 with lymphoma. The lymphoma patients group consisted of 31 patients with classical HL, 66 with B-NHL and six with T-NHL. The B-NHL patients were divided into two groups: patients with aggressive (n=36) and indolent B-NHL (n=30). The proportion of Foxp3⁺ lymphocytes based on immunocytochemical staining was expressed for all patients in two ways: as a percentage of the Foxp3⁺ cells (number of Foxp3⁺ cells / all lymphatic cells) and as a ratio between the percentage of Foxp3⁺ cells and CD3⁺ cells (number of Foxp3⁺ cells / T cells).

The highest percentage of Foxp3⁺ cells was found in the group of patients with classical HL, with a statistically significant difference in comparison to patients with aggressive and indolent B-NHL. Contrary to expected results, the percentage of Foxp3⁺ cells found in the group of B-NHL patients was lower than in the group of patients with reactive hyperplasia. However, when the proportion of Foxp3⁺ lymphocytes was expressed as a ratio between the Foxp3⁺ cell percentage and CD3⁺ cell percentage, a statistically significant higher value was found in patients with indolent B-HNL and a borderline significant higher value in patients with aggressive B-HNL in comparison to reactive lymphocytic hyperplasia. In the lymphoma patient

group, higher percentage of Foxp3⁺ cells correlated with favorable prognostic factors, such as early clinical stage, size of the largest tumor <10 cm, and no involvement of extranodal sites. In the group of patients with NHL, increased percentage of Foxp3⁺ cells also correlated with favorable prognostic factors, such as early clinical stage and size of the largest tumor <10 cm. However, in patients with classical HL there was no statistically significant association between the proportion of Foxp3⁺ lymphocytes and any of the prognostic factors investigated.

Biljana Jelić Puškarić, 2020.

10. LITERATURA

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008;112(12):4384-99.
2. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, i sur. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-92.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, i sur., ur. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Rev. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2017.
4. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
5. Chiu BC, Weisenburger DD. An update of the epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma*. 2003;4(3):161-8.
6. 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(1):265-76.
7. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. NonHodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*. 1998; 9:717-20.
8. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89(11):3909-18.
9. Hoover RN. Lymphoma risks in populations with altered immunity—a search for mechanism. *Cancer Res*. 1992;52:5477-8.
10. Beral V, Peterman T, Berkelman R, Jaffe H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 1991;337:805-9.
11. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, i sur. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds Meeting. *J Clin Oncol*. 1989;7:1630-6.
12. 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.
13. Aurer I, Gašparov S, Kralik M, Balenović A, Huić D, Šantek F, i sur. Dijagnostika i liječenje limfoma – drugi hrvatski konsenzus. *Liječ Vjesn*. 2013;135:63-76.
 14. Cheson BD. Role of functional imaging in the management of lymphoma. *J Clin Oncol*. 2011;29:1844-1854.
 15. El-Galaly TC, d'Amore F, Mylam KJ, de Nully Brown P, Bøgsted M, Bukh A, i sur. Routine bone marrow biopsy has little or no therapeutic consequence for positron emission tomography/computed tomography-staged treatment-naïve patients with Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*. 2012;30:4508-14.
 16. Berthet L, Cochet A, Kanoun S, Berriolo-Riedinger A, Humbert O, Toubreau M, i sur. In newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma, determination of bone marrow involvement with 18F-FDG PET/CT provides better diagnostic performance and prognostic stratification than does biopsy. *J Nucl Med*. 2013;54:1244-50.
 17. Khan AB, Barrington SF, Mikhaeel NG, Hunt AA, Cameron L, Morris T, i sur. PET-CT staging of DLBCL accurately identifies and provides new insight into the clinical significance of bone marrow involvement. *Blood*. 2013;122:61-7.
 18. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;329:987–94.
 19. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, i sur. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 2004;104:1258-65.
 20. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, i sur. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;111(2):558-65.
 21. Klimm B, Goergen H, Fuchs M, von Tresckow B, Böll B, Meissner J, i sur. Impact of risk factors on outcomes in early-stage Hodgkin's lymphoma: an analysis of international staging definitions. *Ann Oncol*. 2013;24(12):3070-6.
 22. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1998;339(21):1506-14.
 23. Bosga-Bouwer AG, van Imhoff GW, Boonstra R, van der Veen A, Haralambieva E, van den Berg A, i sur. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically

- defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood*. 2003;101(3):1149-54.
24. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M, i sur. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*. 2002;99(10):3806-12.
 25. Karube K, Guo Y, Suzumiya J, Sugita Y, Nomura Y, Yamamoto K, i sur. CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109(7):3076-9.
 26. Hallek M, Cheson BD, Cytovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, i sur. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-8.
 27. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, i sur. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstroöm's macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367(9):826-33.
 28. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, i sur. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 1993;342(8871):575-7.
 29. Karube K, Campo E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol*. 2015;52(2):97-106.
 30. Swerdlow SH. Diagnosis of 'double hit' diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):90-9.
 31. Campo E, Rule S. Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. *Blood*. 2015;125(1):48-55.
 32. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3416-23.
 33. Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, i sur. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature*. 2012;490(7418):116-20.

34. International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4124-30.
35. Weisenburger DD, Savage KJ, Harris NL, Gascoyne RD, Jaffe ES, MacLennan KA, et al. Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: a report of 340 cases from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Blood*. 2011;117(12):3402-8.
36. Lunning MA, Vose JM. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: the many-faced lymphoma. *Blood*. 2017;129(9):1095-102.
37. Hapgood G, Savage KJ. The biology and management of systemic anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2015;126(1):17-25.
38. Foss HD, Anagnostopoulos I, Araujo I, Assaf C, Demel G, Kummer JA, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. *Blood* 1996;88(10):4005-11.
39. Mason DY, Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, de Wolf Peeters C, et al. Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease: a distinct clinicopathological entity. *Am J Surg Pathol*. 1994;18(5):526-30.
40. Anagnostopoulos I, Hansmann M, Franssila K, Harris M, Harris NL, Jaffe ES, et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood*. 2000;96(5):1889-99.
41. Nogova L, Reineke T, Brillant C, Sieniawski M, Rüdiger T, Josting A, et al. Lymphocyte-Predominant and Classical Hodgkin's Lymphoma: A Comprehensive Analysis From the German Hodgkin Study Group. *J Clin Oncol*. 2008;26:434-9.
42. Diehl V, Engert A, Re D. New strategies for the treatment of advanced-stage Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21(5):897-914.
43. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(16):2603–22.
44. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(10):772-82.
45. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523–32.

46. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775–87.
47. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, i sur. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev*. 2001;182:18–32.
48. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
49. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
50. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330-6.
51. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, i sur. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001;27(1):68-73.
52. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, i sur. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001;27(1):20-1.
53. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, i sur. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(17):6659-64.
54. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, i sur. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30(6):899-911.
55. Pevec B, Radulović Pevec M, Stipić Marković A, Batišta I. Patofiziološki mehanizmi u nastanku i liječenju alergijskih bolesti. *Acta Med Croatica*. 2011;65:391-403.
56. Vignali DAA. Mechanisms of T(reg) Suppression: Still a Long Way to Go. *Front Immunol*. 2012;3:191.

57. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, i sur. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566–9.
58. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 2006;107(10):3925-32.
59. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, i sur. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007;27(4):635-46.
60. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1353-62.
61. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1206-12.
62. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
63. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 1996;184(2):387-96.
64. Darrasse-Jeze G, Marodon G, Salomon BL, Catala M, Klatzmann D. Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetuses. *Blood*. 2005;105(12):4715-21.
65. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):490-500.
66. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, i sur. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 2005;436(7054):1181-5.
67. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 2005;22(3):329-41.
68. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, i sur. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701-11

69. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, i sur. Expression of (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1693-700.
70. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature Rev Immunol*. 2007;7(2):144-54.
71. Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol Immunol*. 2006;3(3):189-95.
72. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, i sur. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immuno- regulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000;12(4):431-40.
73. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte- associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2000;192(2):295-302.
74. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002;3(2):135-42.
75. Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, i sur. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol*. 2004;172(6):3580-9.
76. Zheng G, Wang B, Chen A. The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004;173(4):2428-34.
77. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, i sur. A CD4+ Tcell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-42.
78. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, i sur. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2004;172(10):5986-93.
79. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001;182:207-14.

80. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN- α and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol.* 2001;166(9):5530-9.
81. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, i sur. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002;195(5):603-16.
82. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breitmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 2003;18(5):605-17.
83. Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R, Roncarolo MG. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol.* 2006;18(2):120-7.
84. Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, i sur. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 1994;179(2):493–502.
85. VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, Chin T, Kusaka S, Geissler F, i sur. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest.* 2000;106(1):145–55.
86. Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, i sur. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2003;349(23):2201–10.
87. Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Grogan B, Chen PJ, i sur. Genetic variation in the IL-10 pathway modulates severity of acute graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation: synergism between IL-10 genotype of patient and IL-10 receptor beta genotype of donor. *Blood.* 2005;106(12):3995–4001.
88. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994;265(5176):1237-40.
89. Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein- specific transforming growth factor- β 1-secreting Th3 T cells by oral administration of

- myelin in multiple sclerosis patients. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;98(1):70-7.
90. Gol-Ara M, Jadidi-Niaragh F, Sadria R, Azizi G, Mirshafiey A. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2012;2012:805875.
 91. Jonuleit H, Schmitt E. The regulator T cell family: distinct subsets and their interrelations. *Journal of Immunology*. 2003;171(12):6323-7.
 92. Oleinika K, Nibbs RJ, Graham GJ, Fraser AR. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clin Exp Immunol*. 2013;171(1):36–45.
 93. Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev*. 2011;241(1):104-18.
 94. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(4):295–307.
 95. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 2006;108(3):804-11.
 96. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, i sur. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001;61(12):4766-72.
 97. Mittal S, Marshall NA, Duncan L, Culligan DJ, Barker RN, Vickers MA. Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111(11):5359-70.
 98. Han Y, Wu J, Bi L, Xiong S, Gao S, Yin L, i sur. Malignant B Cells Induce the Conversion of CD4+CD25- T Cells to Regulatory T Cells in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *PLoS One*. 2011;6(12):e28649.
 99. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, i sur. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169(5):2756-61.
 100. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65(6):2457-64.

101. Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:15179.
102. Frey DM, Droeser RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U, i sur. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2010;126(11):2635-43.
103. Lee WS, Park S, Lee WY, Yun SH, Chun HK. Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer. *Cancer*. 2010;116:5188-99.
104. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, i sur. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):465-72.
105. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008;93(2):193-200.
106. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T-cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107(9):3639-46.
107. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, i sur. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004;103(5):1755-62.
108. Bosler DS, Douglas-Nikitin VK, Harris VN, Smith MD. Detection of T-regulatory cells has a potential role in the diagnosis of classical Hodgkin lymphoma. *Cytometry Part B*. 2008;74B:227-35.
109. Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, i sur. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+ CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood*. 2005;106(6):2018-25.
110. Hudnall SD, Betancourt E, Barnhart E, Patel J. Comparative flow immunophenotypic features of the inflammatory infiltrates of hodgkin lymphoma and lymphoid hyperplasia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(1):1-8.

111. Lee NR, Song EK, Jang KY, Choi HN, Moon WS, Kwon K, i sur. Prognostic impact of tumor infiltrating FOXP3 positive regulatory T cells in diffuse large B-cell lymphoma at diagnosis. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(2):247-56.
112. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, García JF, Jaén J, i sur. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1467-73.
113. Koreishi AF, Saenz AJ, Persky DO, Cui H, Moskowitz A, Moskowitz CH, i sur. The role of cytotoxic and regulatory T cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(3):206-11.
114. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F i sur. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 2001;194(6):847-53.
115. Ishida T, Ishii T, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, Iida S, i sur. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res*. 2006;66(11):5716-22.
116. Ghia P, Strola G, Granziero L, Geuna M, Guida G, Sallusto F, i sur. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1403-13.
117. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, i sur. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity*. 2008;28(5):687-97.
118. Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Shen Y, Littman DR, Allison JP. Limited tumor infiltration by activated T effector cells restricts the therapeutic activity of regulatory T cell depletion against established melanoma. *J Exp Med*. 2008;205(9):2125–38.
119. Zhou G, Levitsky HI. Natural regulatory T cells and de novo induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J Immunol*. 2007;178(4):2155-62.
120. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, i sur. Conversion of peripheral CD4(+)CD25(–) naive T cells to CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003;198(12):1875-86.

121. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, i sur. Tumor evasion of the immune system by converting CD4(+) CD25(-) T cells into CD4(+) CD25(+) T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol.* 2007;178(5):2883-92.
122. Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, i sur. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25(-) into CD25(+) T regulatory cells. *Blood.* 2007;109(7):2871-7.
123. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, i sur. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2570-82.
124. Elkord E, Sharma S, Burt DJ, Hawkins RE. Expanded subpopulation of FoxP3(+) T regulatory cells in renal cell carcinoma co-express Helios, indicating they could be derived from natural but not induced Tregs. *Clin Immunol.* 2011;140(3):218-22.
125. Hindley JP, Ferreira C, Jones E, Lauder SN, Ladell K, Wynn KK, i sur. Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors. *Cancer Res.* 2011;71(3):736-46.
126. Kelley TW, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(6):958-65.
127. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1999;59(13):3128-33.
128. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol.* 1999;163(10):5211-8.
129. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, i sur. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942-9.
130. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible

- involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*. 2003;98(5):1089-99.
131. Coutinho R, Clear AJ, Mazzola E, Owen A, Greaves P, Wilson A, i sur. Revisiting the immune microenvironment of diffuse large B-cell lymphoma using a tissue microarray and immunohistochemistry: robust semi-automated analysis reveals CD3 and FoxP3 as potential predictors of response to R-CHOP. *Haematologica*. 2015;100(3):363-9.
 132. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, i sur. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2006;108(9):2957-64.
 133. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 2005;175(7):4180-3.
 134. Nakayama S, Yokote T, Akioka T, Hiraoka N, Nishiwaki U, Miyoshi T, i sur. Infiltration of effector regulatory T cells predicts poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Blood Adv*. 2017;1(8):486-93.
 135. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, i sur. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*. 2016;22(6):679-84.
 136. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:1-7.
 137. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer*. 2010;127(4):759-67.
 138. Hodi FS, Butler M, Oble DA, Seiden MV, Haluska FG, Kruse A, i sur. Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(8):3005-10.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15. rujna 1974. godine u Tesliću. U Zagrebu sam završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala sam 2000. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2001. godine sam položila državni ispit nakon obavljenog pripravničkog staža u Studentskoj poliklinici u Zagrebu. Od 2001. do 2003. godine sam radila kao liječnik sekundarac u Sveučilišnoj klinici Vuk Vrhovac u Zagrebu. 2004. godine sam započela specijalističko usavršavanje iz Kliničke citologije za Kliničku bolnicu Merkur. Specijalistički ispit sam položila 2008. godine, od kada sam zaposlena u Zavodu za kliničku citologiju i citogenetiku Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu. U akademskoj godini 2006/07 sam završila Stručni poslijediplomski studij iz Kliničke citologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2015. godine sam završila Znanstveni poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2008. godine sam sudjelovala u nastavi Stručnog poslijediplomskog studija iz Kliničke citologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a od 2016. godine u nastavi Specijalističkog poslijediplomskog studija Patologija i citologija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2009. do 2013. godine sam bila tajnica Hrvatskog društva za kliničku citologiju HLZ-a, a od 2018. godine sam članica Upravnog odbora Hrvatskog društva za kliničku citologiju HLZ-a. Aktivno sudjelujem na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima, jedan sam od autora na 30 radova, od toga 12 znanstvenih radova objavljenih u časopisima koje citira Current Contents.