

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI**

ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

**FACTORI DE PROGNOSTIC
ASOCIAȚI BIOLOGIEI PROCESULUI
TUMORAL ÎN LIMFOMUL HODGKIN**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Prof. Dr. Anca Roxana Lupu

DOCTORAND:

Dr. Andrei Turbatu

BUCUREȘTI

-2020-

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE DIN ACTIVITATEA DOCTORALĂ

Lucrări publicate în calitate de prim autor:

În cadrul activității doctorale am realizat în calitate de prim autor:

- 2 articole în revistă CNCSIS B+
- 1 prezentare orală la congres national

ARTICOLE:

1. *Andrei Turbatu, Andrei Coliță și colab.* PRESENT AND FUTURE IN TREATMENT OF HODGKIN LYMPHOMA. Internal Medicine (Revista Societății Române de Medicină Internă). 2019 Jul, vol. XVI (2): 47-52; ISSN: 1220-5818. Index Copernicus, CNCSIS B+ Link către publicație: <https://doi.org/10.2478/inmed-2019-0050>
2. *Andrei Turbatu, Andrei Coliță și colab.* HOW EPSTEIN-BARR VIRUS “MANIPULATES” THE TUMORAL MICROENVIRONMENT IN HODGKIN LYMPHOMA? Internal Medicine (Revista Societății Române de Medicină Internă). 2019 Jun, vol. XVI (1): 33-9; ISSN: 1220-5818. Index Copernicus, CNCSIS B+ Link către publicație: <https://doi.org/10.2478/inmed-2019-0059>

PREZENTARE ORALĂ LA CONGRES NAȚIONAL:

Andrei Turbatu, Andrei Coliță, Oana Stanca, Nicoleta Berbec, Ana-Maria Bordea, Mădălina Oprea, Cecilia Ghimici, Ionel Gelatu, Elena Coleș, Raluca Manolache, Irina Triantafyllidis, Anca Ciobanu, Gabriela Borșaru, Carmen Șaguna, Anca-Roxana Lupu. FACTORI DE RISC ȘI RĂSPUNS LA TRATAMENT ÎN LIMFOMUL HODGKIN RECĂZUT/ REFRACTAR - DATE DIN VIAȚA REALĂ ÎN ERA BRENTUXIMAB. Al XXV-lea Congres Național de Hematologie Clinică și Medicină Transfuzională (cu participare internațională) Sinaia 2018. Abstract publicat în Caiet de rezumate 2018 Secțiunea Hematologie Clinică - Sesiunea de Comunicări pag.11-12.
Link către publicație: http://srh.org.ro/wp-content/uploads/2019/10/2018-Caiet-de-Rezumate-Conferinta-Nationala_compressed.pdf

CUPRINS

I. PARTEA TEORETICĂ	7
1. Introducere	8
1.1. Considerații generale	8
1.2. Scurt istoric	8
2. Epidemiologie	9
2.1. Incidența	9
2.2. Vârsta	10
2.3. Sexul	11
2.4. Rasa	11
2.5. Influența infecțiilor	11
2.6. Expunerea profesională	13
2.7. Incidența familială și susceptibilitatea genetică	13
3. Patogenie	14
3.1. Originea celulelor HRS și LP	15
3.2. Subtipuri histologice	16
3.2.1. Limfomul Hodgkin clasic	16
3.2.1.1. Limfomul Hodgkin clasic - scleroză nodulară (LH-SN)	20
3.2.1.2. Limfomul Hodgkin clasic - celularitate mixtă (LH-CM)	22
3.2.1.3. Limfomul Hodgkin clasic - bogat limfocitar (LH-BL)	23
3.2.1.4. Limfomul Hodgkin clasic - depleție limfocitară (LH-DL)	25
3.2.2. Limfomul Hodgkin nodular cu predominență limfocitară (LHn-PL)	26
3.3. Modele de progresie a bolii. Stadializarea limfomului Hodgkin	28
4. Date clinice și paraclinice	30
4.1. Prezentarea simptomelor	30
4.2. Teste paraclinice recomandate	32
5. Rolul virusurilor	33
5.1. Influența EBV	33
5.2. Influența HIV	36
6. Factori de prognostic	39
6.1. Căi ale răspunsului imun și prognosticul în limfomul Hodgkin	41
6.2. Reglarea sistemului imun în limfomul Hodgkin	45
7. Tratament	46
7.1. Tratamentul în stadiile incipiente de limfom Hodgkin	51
7.2. Tratamentul în stadiile avansate de limfom Hodgkin	52
7.3. Tratamentul limfomului Hodgkin recidivat/refractor	53
7.4. Transplantul allogen de celule stem	54
7.5. Noile terapii țintite în limfomul Hodgkin	55
7.5.1. Brentuximab vedotin	55
7.5.2. HDACi	56
7.5.3. Calea PI3K/AKT/mTOR	57
7.5.4. Imunomodulatoare	57
8. Micromediul în limfomul Hodgkin	58
8.1. Celulele prezente în micromediu	59

8.2. Modelarea compoziției și activității micromediului	60
8.2.1. Atragerea și modelarea micromediului	62
8.2.2. Inhibarea răspunsului limfocitelor T	63
8.3. Relația dintre micromediu și celulele HRS	63
8.3.1. Activarea căilor de semnalizare pentru supraviețuire	64
8.3.2. Susținerea creșterii celulelor HRS de către cytokine și chemokine	65
8.3.3. Calea de semnalizare JAK-STAT	66
8.3.4. Superfamilia receptorilor factorului de necroză tumorală	66
8.3.5. Membrii familiei de receptori tirozin-kinazici (RTK)	67
8.3.6. Receptorul de cisteinil-leucotriene tipul 1 (CysLT)	68
8.3.7. Lipsa de prezentare antigenică	68
8.3.8. Inhibitorii checkpoint	69
8.4. Aberații somatice și moștenite care influențează micromediul	71
8.4.1. Rolul specific gazdei	71
8.4.2. Aberații somatice în celulele HRS	72
8.5. Impactul prognostic al micromediului tumoral	73
8.6. Impactul chimioterapiei și radioterapiei asupra micromediului tumoral	74
8.7. Abordări terapeutice pentru modularea factorilor care controlează micromediul tumoral	75
8.7.1. Terapii care vizează celulele din micromediu tumoral	75
8.7.2. Intervenții terapeutice pentru modularea comunicării/semnalizării intercelulare	77
8.8. Abordări terapeutice moderne care vizează micromediul tumoral	81
8.9. Direcții viitoare de țintire a micromediului	84
II. PARTEA SPECIALĂ	84
9. Introducere	85
10. Scopul și obiectivele studiului	87
11. Material și metodă	89
11.1. Criterii de diagnostic	89
11.2. Protocolul de studiu	91
11.3. Explorările efectuate	93
11.4. Fișa de lucru	101
11.5. Codificarea variabilelor studiate	102
11.6. Prelucrarea statistică a datelor	107
12. Rezultate	109
13. Discuții	170
14. Concluzii	180
III. BIBLIOGRAFIE	182

PARTEA TEORETICĂ

Limfomul Hodgkin (LH) este o afecțiune malignă relativ rară, care a inspirat în mod considerabil oamenii de știință de-a lungul timpului în primul rând datorită, heterogenității sale clinice, întrunind pe de-o parte aspecte caracteristice de malignitate, dar și aspecte aflate într-o strânsă legătură cu procesele infecțioase, iar în al doilea rând, datorită complexității histologiei sale, incluzând celulele maligne specifice Hodgkin Reed-Sternberg (HRS) situate într-un infiltrat inflamator bogat format dintr-o mare varietate de celule non-maligne care se constituie într-un micromediu dirijat de celulele HRS în sensul asigurării supraviețuirii și protecției față de sistemul imun.

LH a fost împărțit în două mari grupuri – LH clasic (LHc), care cuprinde majoritatea subtipurilor histologice (95%) și LH nodular (LHn) în aproximativ 5% din cazuri, o boală neobișnuită, considerată un limfom cu celulele B, în pofida prezenței celulelor HRS. Chiar și așa, pentru LHc, caracteristica centrală a epidemiologiei sale rămâne concentrată pe urmărirea heterogenității din punct de vedere al incidenței acesteia și al factorilor de risc.

În partea generală sunt prezentate pentru început câteva date privind istoricul limfomului Hodgkin, dar ulterior cea mai mare parte a informațiilor se axează pe date de actualitate în ceea ce privește epidemiologia (incidența bolii, influența unor factori precum vârsta, sexul, rasa, influența infecțiilor, expunerea profesională, incidența familială și susceptibilitatea genetică), patogenia (originea celulelor specifice Hodgkin-Reed-Sternberg, prezentarea principalelor caracteristici ale subtipurilor histologice de limfom Hodgkin, modele de progresie a bolii și stadializare), date clinice și paraclinice asupra acestei neoplazii limfoproliferative cronice.

În prezent modul de stabilire a strategiei terapeutice se bazează pe scoruri prognostice care iau în calcul mai mult elemente clinice, determinări uzuale de laborator și explorări imagistice (stadiul bolii, vârsta, determinările de boală, nivelul hemoglobinei, numărul de leucocite, eozinofile, limfocite, nivelul albuminei, valoarea VSH), iar deciziile de tratament au în vedere în mare parte substanțe citostatice deja cunoscute care și-au dovedit eficacitatea de-a lungul anilor. Acest model de stratificare al pacienților, care nu ține cont de caracteristicile procesului tumoral din LH, are valoare predictivă redusă asupra evoluției bolii într-o proporție importantă a cazurilor și duce la lipsa unei conduite terapeutice diferențiate și personalizate. Din acest motiv pacienții cu LH pot fi tratați insuficient sau în exces. De aceea, cercetarea actuală în domeniu se concentrează pe identificarea unor factori de prognostic asociați caracteristicilor patogenice ale procesului

tumoral, care să permită adaptarea terapiei la gradul de risc al fiecărui pacient, cum ar fi, spre exemplu, noi molecule din clasa anticorpilor monoclonali, inhibitori de PD-1, inhibitori checkpoint, imunomodulatoare și multe alte abordări moderne care vizează micromediul tumoral.

PARTEA SPECIALĂ

Limfomul Hodgkin reprezintă un tip aparte de cancer, prin faptul că celulele maligne (celulele Hodgkin-Reed-Sternberg - HRS) reprezintă doar 2% din masa tumorală, restul fiind reprezentat de un infiltrat inflamator bogat format dintr-o mare varietate de celule non-maligne care se constituie într-un micromediu dirijat de celulele HRS în sensul asigurării supraviețuirii și protecției față de sistemul imun. Cercetările ultimilor ani au identificat o serie de caracteristici imunofenotipice ale celulelor HRS și ale celulelor non-maligne care întrețin micromediul tumoral cu semnificație prognostică: supraexpresia BCL2 în celulele maligne, prezența PD1 la nivelul limfocitelor și antigenul CD68 la nivelul macrofagelor din micromediul tumoral, precum și prezența EGFR. Recrutarea celulelor din micromediu este dirijată de celulele HRS prin intermediul secreției de citokine și chemokine, iar nivelele serice ale unora dintre acestea se pot corela cu prognosticul bolii.

Rezultatele publicate până în prezent asupra diverselor tipuri de biomarkeri au dovedit că aceștia pot fi utili în ameliorarea scorurilor prognostice actuale, iar încorporarea lor în modele prognostice noi bazate pe caracteristici fenotipice și genice va crește capacitatea de predicție a răspunsului terapeutic. Toate aceste date au fost însă analizate în cadrul restrâns al unor studii clinice sau experimentale utilizând metodologii accesibile doar în condiții de cercetare.

Scopul și obiectivele studiului

Lucrarea își propune evaluarea caracteristicilor micromediului tumoral și ale celulelor maligne utilizând tehnici care sunt deja disponibile sau care pot fi implementate cu succes în laboratoarele asociate clinicilor de hematologie din țară. Realizarea proiectului vizează tehnici de histopatologie, imunohistochimie (IHC) pentru caracterizarea fenotipică a celulelor micromediului

și a celor maligne, pentru evidențierea asocierii EBV și pentru studiul expresiei unor gene caracteristice celulelor maligne și non-maligne din masa tumorală.

Studiul de față este de tip observațional analitic retrospectiv/prospectiv și cuprinde pacienți diagnosticați cu limfom Hodgkin clasic (LHc) în perioada 2005 – 2018, aflați în evidența Clinicii de Hematologie a Spitalului Clinic Colțea, București, urmăriți în evoluție până în Decembrie 2019 (sau până la survenirea decesului), la care am dorit selecționarea parametrilor clinici, biologici și de răspuns terapeutic, cu valoare prognostică dovedită.

Obiectivele urmărite în această lucrare au fost:

- Urmărirea evoluției clinice și a răspunsului la tratament în limfoamele Hodgkin, corelate cu posibili factori de prognostic, clinici și biologici.
- Compararea evoluției pacienților în funcție de subtipul histologic, stadiul bolii și tratamentul aplicat, corelate cu factori de prognostic prezenți la debut.
- Studii comparative cu datele din literatură pentru identificarea unor particularități privind incidența, evoluția și răspunsul la tratament.

Aprecierea cât mai reală a prognosticului unui pacient în momentul stabilirii diagnosticului, reprezintă premisa unei abordări terapeutice optime cu efecte secundare pe termen lung cât mai reduse.

Am analizat anumiți factori de risc (clinici, paraclinici) și am evaluat supraviețuirea pacienților cu LHc în funcție de aceștia, de stadiul evolutiv al bolii și de mijloacele terapeutice utilizate. Evoluția diferită a pacienților cu LH, aflați în același stadiu clinic, se explică nu numai prin terapiile diferite folosite, dar și prin caracteristici ale organismului gazdă cât și ale proliferării tumorale.

Scopul este de a descrie un model prognostic bazat pe caracteristicile biologice ale LHc cu valoare predictivă asupra răspunsului terapeutic și care să permită o terapie adaptată gradului de risc al fiecărui pacient.

Evidențierea expresiei EBV în celulele tumorale pentru stabilirea implicațiilor prognostice și a unei abordări terapeutice diferențiate în LH nu sunt uzuale în investigațiile patologice curente. Identificarea markerilor asociați procesului tumoral este extrem de importantă deoarece aceste molecule pot constitui ținte ale terapiilor biologice performante.

Prin urmare, abordarea complexă, cu totalitatea factorilor clinici, biologici și terapeutici cu posibilă influență asupra prognosticului pacientului și individualizarea fiecărui caz în parte orientează în alegerea unei terapii cât mai eficiente.

Material și metodă

Lotul de studiu a fost alcătuit din 93 de pacienți diagnosticați cu limfom Hodgkin clasic (LHc) pe o perioadă de 14 ani, între anii 2005-2018, în Clinica de Hematologie a Spitalului Clinic Colțea, urmăriți în evoluție până în Decembrie 2019 (sau până la survenirea decesului).

În analiză au fost incluși în mod aleator pacienți diagnosticați cu LHc cu toate cele patru subtipuri histologice (conform clasificării WHO) anterior, dar și pe parcursul derulării studiului, pe baza criteriilor de includere definite anterior selecționării acestora:

De menționat că în lotul de analizat nu a fost înrolați pacienți pierduți din observație pe parcursul studiului și nici pacienți diagnosticați cu limfom Hodgkin variantă nodulară.

Culegerea datelor s-a făcut din fișele de observație ale pacienților, care, ulterior au fost înregistrate într-o fișă de cercetare a cazului. Tipul de studiu a fost retrospectiv și prospectiv, din momentul diagnosticului și până la deces sau până în momentul încheierii studiului. Unitatea de observare a fost persoana. S-au studiat caracteristici cantitative (măsurabile) și calitative (nemăsurabile), alternative și nealternative.

Studiul s-a efectuat pe baza unei fișe, o primă etapă constituind-o analiza datelor de identificare a pacienților (nume, prenume, vârstă, sex, mediul de proveniență, condiții de viață și muncă, anul diagnosticului).

Ulterior a urmat diagnosticarea limfomului Hodgkin, determinarea parametrilor clinici și paraclinici, realizarea corelațiilor posibile (clinico - histologice, clinico-paraclinice, histologico-paraclinice, clinico-evolutive), urmărirea impactului asupra prognosticului și stabilirea implicațiilor terapeutice.

În scopul realizării corelațiilor clinico-histologice la pacienții cu LHc, lotul a fost subdivizat, în funcție de răspunsul la tratament la finalul studiului, în două subploturi și anume:

- Lotul 1 alcătuit din 58 de pacienți cu evoluție favorabilă de boală – aflați în remisiune completă după prima linie de tratament;

- Lotul 2 alcătuit din 35 de pacienți cu evoluție nefavorabilă de boală sau cazuri refractare – în care am introdus pacienți aflați în remisiune parțială, pacienți cu boală progresivă, cât și pacienți cu boală stabilă după prima linie de tratament.

Studiul s-a bazat pe analiza factorilor care țin de pacient (vârsta, sexul, statusul de performanță clinică, antecedente patologice personale semnificative), a parametrilor ce evaluează masa tumorală (localizarea biopsiei, prezența simptomelor B, stadiul Ann Arbor, numărul ariilor ganglionare afectate, prezența maselor tumorale voluminoase Bulky, tipul și numărul determinărilor extraganglionare, prezența determinării medulare, prezența hepatomegaliei/splenomegaliei, nivelul seric al LDH, nivel seric al beta-2 microglobulinei), a factorilor prognostici legați de stadiu, subtip histologic, parametrii biologici (hemograma, sideremia, nivelul VSH, nivelul albuminei serice, prezența virusului Epstein-Barr), a factorilor prognostici care țin de tratament (tipul chimioterapiei utilizate în inducție, scăderea masei tumorale cu mai mult de 50% după prima cură, utilizarea radioterapiei, a anticorpilor monoclonali, a transplantului autolog de celule stem hematopoietice, necesitatea PET-CT-ului intermediar) și a noilor factori prognostici care apreciază evoluția bolii (supraexpresia BCL2 în celulele maligne, prezența PD1 la nivelul limfocitelor și antigenul CD68 la nivelul macrofagelor din micromediul tumoral, precum și prezența EGFR).

Diagnosticul histopatologic a fost stabilit pe baza analizei probelor din ganglionul limfatic sau din alt țesut, recoltate prin biopsie incizională sau excizională. Prima etapă în stabilirea diagnosticului histopatologic a fost examenul anatomo-patologic al fragmentelor tumorale reprezentative recoltate, prin care, pe de o parte, s-au exclus proliferările non-hematologice și limfoproliferările benigne, pe de altă parte s-a încercat definirea tipului histologic. Ulterior, s-a stabilit profilul imunofenotipic al limfoproliferării prin efectuarea de teste imunohistochimice pe preparatele tumorale incluse la parafină. Analiza profilului expresiei genice în celulele maligne și studiul citogenetic nu s-au putut realiza din cauza lipsei de accesibilitate a acestor metode, deși ar fi îmbunătățit considerabil acuratețea predicției prognosticului și ar fi fost utilă în particularizarea abordării terapeutice, în funcție de caracteristicile micromediului tumoral.

Anamneza a urmărit:

- antecedente personale semnificative;
- aprecierea condițiilor de viață și de muncă;
- evaluarea statusului de performanță;

- modul de debut cu determinare ganglionară sau extraganglionară;
- prezența semnelor B de boală (febră, transpirații profuze nocturne, scădere ponderală mai mult de 10% din greutatea corporală, în ultimele 6 luni);
- depistare acuzelor sugestive pentru determinări extraganglionare;
- simptome legate de determinarea medulară..

Examenul obiectiv a permis:

- examinarea tuturor ariilor ganglionare (occipitale, retro- și preauriculare, submentoniere, submandibulare, laterocervicale, supraclaviculare, axilare, epitrohleene, inghinale și poplitee) și descrierea caracterelor adenopatiilor;
- aprecierea dimensiunilor ficatului și splinei;
- examinarea directă a țesutului limfoid orofaringeal (inel Waldayer) și/sau prin laringoscopie indirectă;
- evidențierea semnelor clinice care sugerează prezența determinărilor extraganglionare (glande salivare, cutanate, digestive, orbită, tiroidă, etc);
- decelarea complicațiilor (infecțioase, autoimune, metabolice, compresive, postterapeutice).

Evaluarea statusului de performanță clinică, important în stabilirea prognosticului și alegerea conduitei terapeutice și care ilustrează relația gazdă - tumoră. Statusul de performanță (SP) este o evaluare numerică a stării generale de sănătate a pacienților și a capacității lor de a desfășura activități zilnice normale (cum ar fi spălarea și îmbrăcarea, mersul la serviciu și efectuarea treburilor). Așa cum se arată în Tabelul nr.10, SP este notat pe o scară de la 0 la 4, numărul mai mic indicând o stare de sănătate mai bună. Grupele ECOG 0-1 corespund scorurilor prognostice Karnofsky > 80, iar grupele ECOG 2-4 corespund scorurilor prognostice Karnofsky < 70.

Stadializarea limfomului, utilizând clasificarea Ann Arbor (CotSwalds modificat, 1989), importantă pentru stabilirea prognosticului cât și pentru alegerea protocolului terapeutic, s-a efectuat la disgnostic pentru determinarea extensiei bolii (forma localizată sau avansată de boală). Examenul CT toraco-abdomino-pelvin și, mai rar, tomografia cu emisie de pozitroni (PET-CT) precum și biopsia-aspirat de măduvă osoasă au fost necesare atât pentru stadializare cât și pentru evaluarea răspunsului la tratament.

Investigațiile de laborator efectuate:

➤ *La toți pacienții:*

- examenul histopatologic și imunohistochimic al preparatelor tumorale incluse la parafină
- hemogramă
- teste funcționale hepatice (AST, ALT, GGT, LDH, bilirubine, fosfataza alcalină serică)
- teste renale (uree, creatinină, acid uric)
- probe biologice inflamatorii (VSH, fibrinogen)
- sideremie
- albumină serică
- nivelul beta-2-microglobulinei serice
- biopsie/ aspirat de măduvă osoasă hematogenă
- markeri hepatici virali (VHB, VHC) și serologia HIV

➤ *În cazuri selectate:*

- Ac anti EBV/LMP1, PD1, EGFR și CD68 prin tehnica de colorare imunohistochimică manuală

Investigații imagistice :

➤ *La toți pacienții :*

- radiografie toracică
- ecografie abdominală
- examen CT toraco- abdomino-pelvin

➤ *În cazuri selecționate :*

- Endoscopie digestivă superioară cu biopsie
- Colonoscopie
- Tomografie cu emisie de pozitroni (PET) - rar

Biopsia ganglionară a celui mai accesibil ganglion limfatic, de preferință periferic, a fost metoda utilizată în majoritatea cazurilor pentru stabilirea diagnosticului anatomo-patologic și imunohistochimic. Secțiunile din ganglionul limfatic excizat au fost colorate cu hematoxilină-eozină pentru obținerea diagnosticului histopatologic.

Biopsia unei determinări extraganglionare s-a efectuat când aceasta a fost unica localizare a bolii la diagnostic.

Biopsia și aspiratul măduvei osoase hematogene s-a realizat pentru stadializare, afectarea medulară ducând la încadrarea pacientului în stadiul IV Ann Arbor. A fost preferată biopsia osteomedulară de câte ori a fost posibil. Biopsia de măduvă osoasă s-a efectuat din creasta iliacă postero-superioară. Fragmentul recoltat a fost prelucrat în mai multe etape: fixare în fixator sublimat acetic; decalcifiere 48 de ore în acid azotic 5%; includere în parafină; secționare la 5 mm și colorare standard cu hematoxină-eozină, reactiv von Gieson - pentru evidențierea fibrelor de colagen - și impregnare argentică Gomori- pentru evidențierea fibrelor de reticulină. Afectarea măduvei osoase este prezentă la momentul diagnosticului în 10-15% dintre cazuri. Acești pacienți sunt de obicei într-un stadiu clinic avansat. Criteriile histopatologice pentru diagnosticul afectării medulare la pacienții cu limfom Hodgkin stabilit în urma biopsiei limfo-ganglionare au fost recomandate de Comitetul pentru Criterii Histopatologice contribuind la Stadializarea LH, la Simpozionul de la Ann Arbor în 1971. În ultimii 5 ani s-a luat în discuție chiar înlocuirea biopsiei osteomedulare cu PET-CT-ul în ceea ce privește posibilă determinare medulară din LH, investigația imagistică contribuind astfel semnificativ la stadializarea LH. Cea mai mare incidență a afectării medulare este întâlnită în LH cu DL (50-75% din cazuri) și cu CM (20-25% din cazuri). Mai puțin de 10% dintre pacienții cu LH-SN au afectare medulară în momentul diagnosticului și doar rare cazuri de LH-BL prezintă afectare a măduvei.

Studiul imunofenotipic prin imunohistochimia pe țesutul inclus la parafină s-a efectuat de-a lungul timpului în mai multe laboratoare: în cadrul Laboratorului de Anatomie Patologică al Institutului "Victor Babeș", București, apoi în cadrul Laboratorului OncoTeam Diagnostic de la Spitalul Monza, ulterior din cadrul Clinicii Royal Hospital București. Foarte rar s-au obținut rezultate și de alte laboratoare private.

Imunohistochimia pe țesutul inclus la parafină permite folosirea țesutului preparat obișnuit și studiul materialului de arhivă. Celulele Hodgkin-Reed-Sternberg reprezintă doar o proporție scăzută din populația celulară total din biopsii. Întrucât majoritatea celulelor un au un substrat malign, este esențial să se stabilească trăsăturile citologice ale celulelor care reacționează cu diferiți anticorpi. De aceea, este de preferat să se folosească secțiuni de parafină pentru studierea imunofenotipică a LH, ce permit aprecierea atât a arhitecturii leziunii, cât și a detaliilor citologice ale celulelor ce reacționează cu un anumit anticorp. Majoritatea subtipurilor de LHc au un fenotip distinct, alcătuit dintr-o combinație unică a unui antigen de activare limfoidă (CD30) și un antigen mielomonocitar (CD15), cu absența antigenului comun leucocitar (LCA, CD45). Acest fenotip

caracteristic, întâlnit în 85% din cazuri, nu are corespondent normal printre celulele limfoganglionului. CD15 și CD30 se localizează caracteristic atât în complexul Golgi, cât și în membrana celulară a celulelor RS și a variantelor lor. Combinația reactivității pentru complexul Golgi și suprafață conferă aspectul caracteristic “în țintă”. În afară de acest fenotip unic și de localizarea celulară, LHc poate avea un aspect histologic distinct, mai ales în subtipul cu scleroză nodulară. În acest subtip, celulele lacunare formează grupuri, sugerând un sincițiu celular. Astfel, o plajă sincițială de “ținte” CD15+CD30+CD45- este caracteristică LH cu scleroză nodulară. În cele din urmă, chiar dacă un marker este prezent sau absent, cel mai bun criteriu pentru diagnosticul LHc este contextul histologic sau imunoarhitectura, care este patognomonică.

Colorațiile IHC reprezintă o tehnică de fenotipare indirectă bistadială efectuată pe secțiuni din materialul tisular înglobat la parafină. Au fost efectuate colorații IHC utilizând două panouri de anticorpi (Ac) – Tabel nr.1 și Tabel nr.2:

1. Panelul de cinci Ac pentru stabilirea diagnosticului imunofenotipic de LHc:

Nr	Ac anti	Clona	Specificitate	Sursa	Diluție	Metoda
1	CD30	BerH2	Marker de activare limfocitară; pozitiv în >95% dintre cazurile de LHc în celulele RS	Ventana, Roche Diagnostics, Arizona, USA	prediluat	automată
2	CD15	MMA	Marker granulocitar; pozitiv în ~70% dintre cazurile de LHc în celulele RS	Leica Biosystems, Buffalo Grove, USA	prediluat	automată
3	CD20	L26	Marker panB; pozitiv în ~20% dintre cazurile de LHc în celulele RS, pozitivare de intensitate variabilă	Ventana, Roche Diagnostics, Arizona, USA	prediluat	automată

4	PAX5	SP34	Marker panB; pozitiv în >95% dintre cazurile de LHc în celulele RS	Ventana, Roche Diagnostics, Arizona, USA	prediluat	automată
5	CD3	2GV6	Marker panT; negativ în celulele RS din LHc	Ventana, Roche Diagnostics, Arizona, USA	prediluat	automată

Tabel nr.1 – Anticorpi utilizați pentru stabilirea diagnosticului imunofenotipic de limfom Hodgkin clasic

2. Panelul adițional de șase Ac pentru investigarea expresiei în celulele tumorale, respectiv la nivelul micromediului peritumoral:

Nr	Ac anti	Clona	Specificitate	Sursa	Diluție	Metoda
1	EBV/LMP1	CS1	Epstein-Barr virus, proteina latentă de membrană 1	Leica Biosystems, Buffalo Grove, USA	1:100	manuală
2	BCL2	SP66	Proteina oncogenei bcl2	Ventana, Roche Diagnostics, Arizona, USA	prediluat	automată
3	PD1	CD279	Limfocit T helper folicular	BioSB, Santa Barbara, USA	1:50	manuală
4	EGFR	29.11	Factor de creștere epidermală; marker vascular	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, Germany	1:1000	manuală
5	CD68	KP1	Marker histiocitar; macrofage	BioSB, Santa Barbara, USA	1:500	manuală

Tabel nr.2 – Anticorpi utilizați pentru investigarea expresiei în celule tumorale și la nivelul micromediului peritumoral

Aprecierea reacției pentru panelul de Ac adițional:

- reacția pentru EBV/LMP1 în celulele tumorale RS a fost notată cu “+”, respectiv “-“, fără cuantificarea procentuală a numărului de celule tumorale pozitive (reacție calitativă);

- reacția pentru BCL2 în celulele tumorale RS a fost notată cu “+”, respectiv “-”; pentru cazurile “+”, s-a făcut o apreciere calitativă a intensității reacției (pe o scala de la + la +++, raportat la reacția BCL2 din limfocitele mici reactive) și o apreciere cantitativă, a procentului de celule tumorale BCL2 pozitive;
- reacția pentru PD1 a fost notată în micromediul peritumoral, apreciindu-se, cantitativ, procentul de limfocite mici PD1+ și dispoziția acestora raportat la celulele tumorale RS (eventuală rozetare peritumorală);
- reacția pentru CD68 a fost notată în micromediul peritumoral, apreciindu-se, cantitativ, procentul de celule CD68+ și dispoziția acestora raportat la celulele tumorale RS (eventuală rozetare peritumorală);
- reacția pentru EGFR: pentru fiecare secțiune au fost selectate cinci câmpuri cu cea mai mare densitate vasculară (selectate cu obiectiv 10x, ocular 20x cu microscopul Leica DMC 2900); acestea au fost captate cu camera digitală cu software-ul Leica Application Suite (LAS); au fost numărate vasele marcate prin reacția pentru EGFR pe fiecare dintre câmpuri și s-a făcut o medie.

Hemograma s-a efectuat pe analizoare de hematologie și examenul frotiului de sânge periferic prin microscopie optică, după colorare May-Grunwald-Giemsa. Poate evidenția:

- anemie secundară unei mobilizări deficiente a fierului din macrofagele de depozit (anemie cronică simplă), dar poate fi și urmarea directă a hiposieremiei concomitent cu o deficiență nutrițională. Prezența Hb < 10.5g/dL la debutul LH este asociată cu un prognostic negativ.
- leucocitoză (Le ≥ 15000/mm³ se asociază cu un prognostic negativ în stadiile avansate)
- limfopenie (Ly < 8% se asociază cu un prognostic negativ în stadiile avansate)
- eozinofilie
- neutrofilie

Nivelul seric al LDH a fost efectuat la toți bolnavii incluși în lotul studiat. Valoarea LDH-ului la diagnostic constituie:

- factor de prognostic independent; nivelul seric crescut la debut este asociat cu o rată mai mică de remisiuni complete și parțiale;
- se corelează cu răspunsul la tratamentul convențional și reprezintă un parametru de monitorizare a evoluției limfomului.

Beta-2-Microglobulina serică a putut fi determinată într-un număr semnificativ de cazuri, mai ales în ultimii 5 ani. Nivelul seric ridicat se corelează cu un volum tumoral mare și cu deficiența sistemelor imune anti-tumorale. Este un indicator al rezistenței la tratament.

Indicatorii sindromului biologic inflamator (VSH, fibrinogen) au fost determinați la majoritatea pacienților lotului studiat atât la diagnostic cât și la reevaluarile ulterioare, în scopul monitorizării răspunsului la tratament. Creșterea VSH semnifică boala agresivă și/sau activă și are semnificație prognostică negativă. Fibrinogenul nu are valoare prognostică, creșterea acestuia corelându-se mai degrabă cu tendința la hipercoagulabilitate.

Testul HIV, când a fost posibil, s-a efectuat la toți pacienții lotului studiat.

Markerii hepatici virali s-au determinat la cei mai mulți dintre pacienții lotului studiat.

Radiografia toracică s-a efectuat de rutină la toți pacienții lotului studiat, în vederea identificării adenopatiilor hilare, mediastinale și a detectării eventualelor determinări pulmonare, revărsatelor pleurale sau pericardice.

Ecografia abdomino-pelvină s-a efectuat de rutină la pacienții lotului studiat în vederea detectării la diagnostic a adenopatiilor profunde subdiafragmatice, hepatosplenomegaliei, proceselor localizate (intrahepatice, intrasplenice, etc) cât și pentru aprecierea răspunsului la tratament și monitorizarea evoluției pacienților.

Ecografia cardiacă cu determinarea fracției de ejeția a ventriculului stâng (FEVS) s-a efectuat la toți pacienții care au beneficiat de tratament cu antracicline.

Tomografia computerizată toraco-abdomino-pelvină a fost efectuată pentru detectarea adenopatiilor profunde, hepatomegaliei, splenomegaliei, a proceselor localizate în ficat, splină, alte organe interne, în marea majoritate a cazurilor, mai ales în ultimii 5-8 ani.

Tomografia cu emisie de pozitroni (PET-CT) a fost efectuată mai rar, dar cu preponderență în ultimii ~5 ani (când a devenit mult mai accesibilă în țară) pentru acuratețea stadializării inițiale, evaluarea postterapeutică intermediară, a diferențierii bolii reziduale de fibroză sau necroză.

Endoscopia digestivă superioară sau inferioară a fost metoda folosită pentru evidențierea leziunilor tractului gastrointestinal din cadrul LH (localizări destul de rare).

Laparatomia exploratorie a fost o metoda investigațională invazivă la care s-a recurs, de asemenea, foarte rar, la pacienții cu mase tumorale abdominale sau pelviene palpabile, evidențiate echografic și/sau tomografic și la care laparatomia a constituit singura variantă posibilă de diagnostic. Avantajul acestei metode este că a realizat o apreciere obiectivă a extensiei procesului

limfomatos, permițând biopsierea ganglionilor abdominali din diverse grupe și eventual, prelevarea de biopsii hepatice.

Prelucrarea statistică a datelor s-a realizat pe calculatorul personal, în programul OFFICE versiunea 18.2006.1031.0.

Pentru loturile studiate am considerat că înregistrările sunt independente întrucât parametrii provin de la pacienți diferiți, iar lotul inițial îndeplinește condițiile de aleatorizare impuse de metodele statistic utilizate.

Variabilele utilizate în analiză au fost, în mare măsură, parametrii biologici măsurabili (hemoglobină, număr de leucocite, număr de limfocite, VSH, LDH seric, beta-2-microglobulina serică, sideremie, albumină serică etc.), însă în unele cazuri, datorită necesității surprinderii unor fenomene sau caracteristici calitative s-au introdus valori categoriale binare. La variabilele cu mai mult de două valori (stadiul bolii, status de performanță, etc) s-a avut în vedere și transformarea lor în variabile primare.

Pentru parametrii sau variabilele utilizate în această lucrare au fost prezentate valorile extreme, media și deviația standard, coeficientul de variație, eroarea standard și a fost verificată ipoteza normalității, atât prin aprecierea existenței unei simetrii cu ajutorul medianei și a cuartilelor, cât și prin utilizarea mai multor teste de normalitate.

În cazurile în care, pentru o anumită variabilă/parametru s-a constatat existența unei abatere evidente de la curba lui Gauss, s-a testat posibilitatea existenței unui alt tip de repartiție a valorilor parametrului respectiv (repartiție exponențială, chi pătrat). În aceste cazuri, s-a avut în vedere, la analiza corelațiilor existente între parametrii, determinarea coeficienților de corelare neparametrici.

Testul Chi pătrat este un test neparametric și este utilizat în special în cazul datelor nenumerice (nemăsurabile) - ordinale și nominale - a căror distribuție nu se poate determina, cât și în cazul datelor măsurabile cu distribuție necunoscută. Testul Chi pătrat este utilizat pentru a evalua asociația dintre două variabile. Principiul testului Chi pătrat constă în compararea frecvențelor absolute (numărul de apariții) rezultate din observații cu frecvențele absolute așteptate sau frecvențele absolute teoretice.

După calcularea valorii Chi pătrat pe baza frecvențelor observate, această valoare se compară cu valorile teoretice din tabelele statistice. Dacă valoarea Chi pătrat calculată este mai mare sau egală cu valoarea Chi pătrat din tabele, atunci respingem ipoteza nulă și acceptăm ipoteza

alternativă la nivelul pragului de semnificație statistică de cel puțin $p \leq 0.05$. Dacă valoarea Chi pătrat calculată este mai mică decât valoarea Chi pătrat din tabele, atunci respingem ipoteza alternativă și acceptăm ipoteza nulă și afirmăm că nu putem stabili nici o legătură statistic semnificativă între cele două variabile.

Pragul semnificației statistice p este riscul sau probabilitatea de a respinge ipoteza nulă când aceasta este adevărată. În medicină, pragul semnificației statistice este $p = 0.05$. Sau, altfel spus, atunci când afirmăm că respingem ipoteza nulă, ca fiind falsă, la pragul de $p \leq 0.05$ ne asumăm să greșim în mai puțin de 5% din cazuri.

În lucrarea de față, testul Chi patrat a fost folosit pentru compararea pacienților în funcție de evoluția bolii și influența factorilor de prognostic asupra evoluției favorabile sau nefavorabile a bolii.

Rezultate și discuții

Eșantionul studiat a fost compus din 93 de pacienți cu diagnostic confirmat de limfom Hodgkin clasic, conform criteriilor WHO internaționale, la care s-au analizat o serie de parametrii clinici și paraclinici cu rol prognostic dovedit, dar și potențiali factori de prognostic corelați cu evoluția bolii, care a fost notată în dinamică. Răspunsul la terapie a fost urmărit pe parcursul unei perioade relativ îndelungate în care s-a derulat studiul, între 2005 și 2018, în cadrul Clinicii de Hematologie Colțea.

Limfomul Hodgkin este o malignitate a țesutului limfoid destul de rară la nivel mondial (1% din totalul neoplasmelor și 10% din totalul limfoamelor). Din punct de vedere al **tendinței evolutive**, am constatat o rată crescută în timp a diagnosticării pacienților cu limfom Hodgkin. În lotul studiat, s-a evidențiat o incidență crescătoare în ultimi 5-6 ani ai perioadei de studiu, aproape două treimi din cazurile de LH clasic - aproximativ 65% (60 de pacienți), rezultate concordante cu datele din literatura de specialitate. Această distribuție neuniformă este posibil să se datoreze atât creșterii reale a incidenței LH, dar și creșterii acurateții diagnosticului.

Vârsta medie a pacienților cu LHc din lotul luat în discuție este de 38.08 +/- 15.89 ani, cu un minim de 18 ani și un maxim de 78 de ani, rezultat concordant cu datele din literatură. În ceea ce privește repartitia pacienților în funcție de vârstă în cadrul celor 2 subploturi, se evidențiază că

vârsta medie a pacienților din lotul 1, cu evoluție favorabilă, este mai mică (36.47 ani +/- 1.71) față de media de vârstă a pacienților din lotul 2, cu evoluție nefavorabilă de boală (40.61 ani +/- 2.91).

În ceea ce privește variația specific pe grupe de vârstă a incidenței limfomului Hodgkin clasic în lotul nostru de studiu se observă faptul că între 18 și 28 ani limfomul Hodgkin afectează în aproape în egală măsură ambele sexe, lucru întâlnit discret și în preajma intervalului de vârstă 38-40 ani, ulterior peste 40 ani, afecțiunea predomină la bărbați. În literatură este menționată predominanța sexului masculin în orice decadă de vârstă.

Subtipurile histologice predominante în lotul studiat sunt scleroză nodulară și celularitate mixtă, cu o ușoară înclinare a balanței în favoarea primului subtip histologic – aproximativ 50% (date comparabile cu cele din literatură în acest sens). Subtipul celularitate mixtă înregistrează o proporție mult mai mare de cazuri decât cele menționate în cărțile de specialitate (circa 45%) - în țările industrializate, aproximativ 20-25% din cazurile de LHc prezintă subtip de celularitate mixtă, cu un procent mai mare observat în țările în curs de dezvoltare. De remarcat ar fi că în lotul de studiu există și un procent foarte scăzut de 2.2% pacienți cu subtip histologic neclasificabil.

Din analiza lotului general reiese cu particularitate faptul că subtipul histologic bogat limfocitar a fost diagnosticat doar la pacienții cu vârste cuprinse între 41-50 ani (1 caz). De asemenea, subtipul histologic majoritar, celularitate mixtă, predomină la pacienții de peste 65 de ani (80%). Subtipul histologic scleroză nodulară apare predominant la pacienții sub 40 ani (de 3 ori mai mulți pacienți cu SN au vârsta sub 40 ani), pe când subtipul histologic depleție limfocitară este prezent doar la pacienți sub 65 ani și în proporții relativ egale pe grupe de vârstă.

Repartiția pe **sexe** a lotului studiat arată o predominanță a sexului feminin în subtipul histologic scleroză nodulară (~62%), raportul inversându-se în cazul subtipului histologic celularitate mixtă, în care predomină sexul masculin (~53%). De asemenea, în categoria celor încadrați în subtipul histologic depleție limfocitară predomină sexul feminin (4.8%), iar în cazul pacienților cu subtip histologic bogat limfocitar se regăsesc numai bărbați. În studiul de față raportul bărbați/ femei este de 1.2:1. În literatura de specialitate, pe baza studiilor efectuate, se menționează faptul că subtipul histologic SN reprezintă 60-70% din cazuri și spre deosebire de predominanța masculină observată la celelalte subtipuri de LHc, raportul bărbați/femei al LH-SN este aproape egal.

În lotul studiat, există o diferență semnificativă în privința **mediului de proveniență** al pacienților, 62 dintre ei (2/3 din total) fiind din mediul urban și 1/3 provenind din cel rural. În ceea ce privește incidența subtipurilor histologice pe medii de proveniență, în ambele cazuri predomină subtipurile histologice SN și CM.

Cei mai mulți pacienți au fost încadrați la debut în stadiul IV de boală (45.16%), procentul pacienților crescând direct proportional cu creșterea gradului de stadializare (std. I – 3.23%, std. II – 24.73% și std. III – 26.88%). Repartiția pacienților din lotul general în **forme limitate și avansate** evidențiază un număr de cazuri semnificativ mai mare în favoarea celor cu forme extinse de boală (aprox. 72%). Din analiza întregului lot reiese că indiferent de subtipul histologic, majoritatea pacienților au fost diagnosticați în stadiul IV de boală (SN – 22 de cazuri, CM – 16 cazuri, DL – 2 cazuri). Excepție a făcut subtipul histologic bogat limfocitar reprezentat de un singur caz diagnosticat în stadiul II, iar în cazul pacienților cu subtip neclasificabil (2 cazuri) se remarcă diagnosticarea în stadiul IV.

La nivelul întregului lot studiat, aproximativ 56% dintre pacienții cu limfom Hodgkin au prezentat **semne generale de boală**. Conform rezultatelor obținute în analiza de față, prezența semnelor generale de boală la debut este proporțională cu evoluția stadiului bolii. Astfel, la pacienții aflați în stadiul I nu s-au înregistrat semne generale de boală, în stadiul II simptomele B sunt prezente în procent de 8.60%, în stadiul III 12.90%, iar în stadiul IV 34.41%. În literatură se menționează faptul că febra, scăderea ponderală sau transpirațiile profuze nocturne apar în 25% din cazuri la debut, dar în evoluție sunt semnalate în 50% din cazuri. În lotul studiat semnele generale de boală sunt prezente în cazul a 52 de pacienți din 93 (55.91%).

Analiza tuturor cazurilor a relevat că 21.51% dintre pacienți au prezentat la debut **formațiune tumorală** voluminoasă (**Bulky**) sau bloc ganglionar cu dimensiuni ≥ 7 cm.

La nivelul întregului lot studiat, aproximativ 56% dintre pacienții cu limfom Hodgkin au prezentat la debut hiposideremie, mecanismul fiind de tip inflamator. Hiposideremia joacă un rol prognostic negativ în evoluția cazurilor de limfom Hodgkin, astfel că în lotul 2, cu evoluție nefavorabilă, au fost înregistrate mai multe cazuri de pacienți cu sideremie scăzută (68.57%) decât cu sideremie normală (31.43%). Totodată s-au înregistrat mai multe cazuri de pacienți cu **sideremie** scăzută în lotul 2 comparativ cu lotul 1 (68.57%), în care avem pacienți cu evoluție favorabilă (48.28%). Putem concluziona că hiposideremia se corelează statistic cu evoluția nefavorabilă a pacienților cu limfom Hodgkin (**p < 0.05**).

Trecând mai departe, la analiza factorilor de prognostic deja cunoscuți asupra cazurilor din lotul de studiu alcătuit, am observat următoarele:

Distribuția pacienților din lotul general în funcție de valoarea **hemoglobinei** este relativ egală, cu o ușoară predominanță în rândul celor cu anemie (normocromă normocitară). În lotul 2, cu evoluție nefavorabilă, se afla un procent mai mare de pacienți cu anemie (52.78%) comparativ cu lotul 1, cu evoluție favorabilă (45.61%), iar în lotul 1 sunt mai mulți pacienți cu valori normale ale Hb (54.39% față de 47.22%), putând concluziona că anemia la diagnostic este un factor de prognostic negativ în evoluția cazurilor de limfom Hodgkin, dar fără semnificație statistică ($p=0.601585$).

Deși a fost identificată la puțin peste o treime din cazurile analizate (39.78%), **leucocitoza** ($Le \geq 15000/\text{mmc}$) s-a înregistrat într-o proporție mult mai mare în rândul pacienților cu evoluție nefavorabilă (45.71%) comparativ cu cei cu evoluție favorabilă (36.21%). Cu toate acestea, analizând datele obținute, nu s-a evidențiat o corelație statistică între valoarea crescută a leucocitelor și evoluția bolii ($p=0.364132$). Acest lucru ar putea fi cauzat și de faptul că cele 2 subloturi alcătuite sunt formate atât din pacienți aflați în stadii limitate, cât și pacienți aflați în stadii extinse de boală, iar leucocitoza este un factor de prognostic ce se ia în calcul cu preponderență în cazul formelor extinse.

În lotul studiat, procentul pacienților cu **limfopenie** ($Ly < 8\%$) a fost relativ similar cu cel al pacienților cu valoarea limfocitelor în limite normale, cu o discretă creștere în favoarea celor cu limfopenie (51.61%). Iar în ceea ce privește distribuția pe cele două subloturi, se observă o ușoară creștere a procentului de pacienți cu limfopenie în lotul 2 (57.14%) față de lotul 1 (48.28%), o valoare nesemnificativă statistic ($p=0.407121$)

Există o pondere semnificativă a pacienților diagnosticați cu limfom Hodgkin și **VSH** crescut în lotul studiat (75%). VSH-ul crescut este un indice inflamator frecvent întâlnit în rândul pacienților cu limfom Hodgkin, mai ales în cazul celor cu evoluție de boală nefavorabilă din lotul 2 (88.57%) față de lotul 1 cu evoluție favorabilă (65.52%), dar diferența semnificativă statistic ($p < 0.05$) se înregistrează în cadrul lotului 2 în ceea ce privește procentul de pacienți cu VSH normal (11.43%) față de cei cu VSH crescut (88.57%).

Cei mai mulți pacienți au prezentat la diagnostic o valoare normală a **LDH**-ului (aproximativ 60%), iar în distribuția pe subloturi s-a înregistrat, de asemenea, în mod surprinzător un procent mai scăzut de pacienți cu LDH crescut în lotul 2 cu evoluție nefavorabilă (37.14%) față

de lotul 1 (43.10%). Datele obținute nu prezintă semnificație statistică ($p= 0.571049$), în cadrul studiului efectuat, valoarea LDH-ului necorelându-se cu gradul de evoluție a bolii.

Majoritatea pacienților din lotul studiat au prezentat la diagnostic o valoare a **albuminei** în limite normale (77.42%). Cu toate acestea se observă o proporție discret mai mare de pacienți cu hipoalbuminemie în cazul lotului 2 (28.57%) comparativ cu lotul 1 (18.97%), însă fără semnificație statistică ($p= 0.283102$).

Deși mai mult de jumătate dintre pacienții lotului general au prezentat la diagnostic o valoare normală a **beta-2-microglobulinei** serice (de obicei, un factor de prognostic negativ în cazul limfoproliferărilor cronice), se poate observa că un procent crescut (54.29%) dintre pacienții cu evoluție de boală nefavorabilă au prezentat o valoare ridicată a beta-2-microglobulinei serice (**$p < 0.05$**) față de cei cu evoluție favorabilă din lotul 1 (36.21%), acest parameru corelându-se statistic cu evoluția bolii (**$p= 0.037999$**).

Pacienții încadrați în **forme limitate** prezintă o pondere mai mare a cazurilor cu evoluție favorabilă (36.21% față de 14.29%), așa cum cei încadrați în **forme avansate** au avut un procent mai mare de cazuri cu evoluție nefavorabilă (85.71% față de 63.79%), date ce se corelează cu cele din literatură și prezintă semnificație statistică (**$p= 0.022485$**). În rândul pacienților lotului general cu forme limitate se înregistrează un număr de aproximativ 3 ori mai mare de cazuri **cu factori de risc** (73.08%) comparativ cu cele **fără factori de risc** (26.92%). Pe de altă parte, în grupul pacienților cu forme limitate și fără factori de risc au fost doar cazuri cu evoluție favorabilă (33.33%), iar în rândul pacienților cu forme limitate și factori de risc, balanța a înclinat în favoarea cazurilor cu evoluție nefavorabilă. În funcție de **indicele prognostic internațional (IPI)**, ce se calculează doar pentru formele avansate de limfom Hodgkin (std. III+IV), am trasat o distribuție a pacienților lotului general în **forme cu prognostic favorabil** (62.69%) și **forme cu prognostic rezervat** (37.31%), cu un scor $IPI > 3$. Dintre cazurile cu forme avansate, se observă un procent mai mare de pacienți cu evoluție favorabilă în grupul celor cu $IPI = 0-3$ (67.57%) și, așa cum era de așteptat, un procent mai mare de pacienți cu evoluție nefavorabilă în grupul celor cu indice prognostic între 4-7 (43.33%). Analiza cazurilor de limfom Hodgkin cu forme extinse din lotul general a relevat un procent mai mare de pacienți cu evoluție favorabilă (10.81%) cu $IPI = 1$ față de cei cu evoluție nefavorabilă (3.33%), de asemenea și în cazul celor cu $IPI = 2$ (29.73%), dar pe măsura creșterii valorii indicelui prognostic internațional se observă și o creștere a procentului de cazuri cu evoluție nefavorabilă - se evidențiază totodată o distribuție gaussiană a cazurilor de

limfom Hodgkin cu forme extinse în funcție de valoarea indicelui prognostic internațional - date ce se corelează statistic ($p < 0.05$). Cei mai mulți dintre aceștia au avut un IPI=3 (33.33%), urmați de cei cu IPI=4 (16.67%) și cei cu IPI=6 (13.33%). Un lucru interesant de remarcat este ceea ce se întâmplă în rândul pacienților cu IPI=5, o repartiție relativ egală a cazurilor în privința evoluției bolii (~13%).

Analiza lotului general studiat a evidențiat că aproximativ jumătate dintre pacienți au fost diagnosticați cu limfom Hodgkin pe baza **biopsiei ganglionare** din adenopatii latero-cervicale (46.24%) și de 2 ori mai puțini din adenopatii situate la nivel supraclavicular (20.43%).

Aproximativ jumătate (46.24%) dintre pacienții înrolați în studiu nu au asociat la debut **determinare extraganglionară**, 19.35% dintre aceștia au avut doar determinare medulară (fără implicarea splinei, ficatului etc.), 12.90% au prezentat determinare pulmonară/ pleurală și doar 5.38% determinare splenică. În urma rezultatelor obținute se remarcă faptul că un procent semnificativ de pacienți (aproximativ 75%) din lotul 2 au asociat determinare extranodală la diagnostic, ceea ce vine în sprijinul ideii de factor predispozant negativ și se corelează statistic cu evoluția bolii ($p < 0.05$).

Din numărul total de pacienți care au beneficiat de examinare medulară la debut marea majoritate nu au prezentat determinare de boală (77.42%). Proporția pacienților care a avut **determinare medulară** la diagnostic este mai importantă în rândul pacienților cu evoluție nefavorabilă din lotul 2 (31.43%) față de 17.24% în lotul 1, asociere slabă semnificativă statistic ($p = 0.062899$).

Deși cea mai mare parte dintre pacienții studiați au avut un **status de performanță** foarte bun - ECOG 0, rezultatele au arătat că pacienții cu status de performanță ECOG 1 și 2 sunt mai numeroși în lotul 2 (31.43% comparativ cu 17.24%, respectiv 14.29% comparativ cu 3.45%), ceea ce scoate în evidență faptul că odată cu creșterea statusului de performanță crește și predispoziția la o evoluție nefavorabilă ($p < 0.05$).

Toți pacienții au beneficiat de scheme polichimioterapice, 26.88% dintre pacienți au beneficiat de radioterapie asociată chimioterapiei, 34.41% dintre pacienți au întreprins transplant autolog de celule stem hematopoietice, iar 23.66% au efectuat tratament cu anticorp monoclonal anti-CD30, brentuxiamb vedotin (fie pre-transplant, fie ca tratament de întreținere post-autotransplant etc).

Cea mai mare parte dintre pacienți au efectuat ca primă linie terapeutică schema tip ABVD (68.82%) după stabilirea diagnosticului și doar o treime polichimioterapie tip BEACOPP (31.18%). Protocolul terapeutic preferat a fost ABVD, alegerea între curele ABVD și BEACOPP ca tratament de primă linie fiind încă un subiect controversat. Deși schema BEACOPP ar fi mai eficientă în stadiile avansate Ann-Arbor, este grevată de complicații mai frecvente, uneori severe. La pacienții peste 60 de ani se optează preferential pentru cure tip ABVD, data fiind toxicitatea mai mare a curelor tip BEACOPP.

La nivelul întregului lot aproximativ două treimi dintre pacienți (61.29%) au obținut remisiune completă după prima linie terapeutică, în timp ce 16.13% au obținut remisiune parțială. 19.35% din cazuri au progresat ca boală în ciuda tratamentului efectuat, iar 3.23% au rămas staționari. Dintre pacienții care au obținut remisiune completă după prima linie terapeutică, au reușit să-și mențină răspunsul mai mult de jumătate (52.63%), restul au recăzut în proporții relativ echivalente, la mai puțin de 1 an 22.81% și peste 1 an 24.56%.

Schema utilizată cel mai frecvent ca tratament de linia a II-a în lotul de pacienți studiat este protocolul polichimioterapic tip IGEV (41.67%) – urmat în mod ideal de chimioterapie high-dose și transplant autolog de celule stem hematopoietice, acolo unde există cazuri eligibile.

Doar aproximativ un sfert dintre pacienții analizați au beneficiat de tratament cu brentuximab vedotin.

În lotul 2, cu evoluție nefavorabilă, mai mult de jumătate dintre pacienți au avut între 3-5 linii de tratament - chimio/ imuno/ radioterapie și/ sau transplant de celule stem hematopietice (54.29%).

În urma analizei lotului general, s-a demonstrat că mai mult de 70% dintre pacienți nu au beneficiat de **PET-CT intermediar** pe parcursul tratamentului. Totuși 17.20% au prezentat un PET-CT de etapă pozitiv. Deși nu avem un procent mare de pacienți cu PET-CT intermediar pozitiv, 22.86% dintre aceștia s-au înregistrat în lotul 2 cu evoluție nefavorabilă comparativ cu 2.86% dintre pacienții cu PET-CT intermediar negativ, astfel încât putem concluziona că rezultatul PET-CT-ului intermediar influențează prognosticul bolii, având semnificație statistică (**p=0.026716**).

La nivelul întregului lot peste jumătate dintre pacienți (62.37%) au obținut remisiune completă la finalul studiului (după cel puțin o linie de tratament), în timp ce 2.15% au obținut remisiune parțială. 23.66% din cazuri au progresat ca boală în pofida tratamentului administrat, iar

11.83% au rămas staționari. Cea mai mare parte dintre pacienții încadrați în lotul cu evoluție de boală nefavorabilă (62.86%) prezintă boală progresivă, 31.43% boală stabilă și doar 5.71% remisiune parțială.

În urma studiului, se observă o distribuție gaussiană a cazurilor analizate în funcție de durata de supraviețuire, atingându-se un vârf pentru pacienții aflați în intervalul de supraviețuire 5-10 ani (31.18%), cele mai mici procente înregistrându-se pentru pacienții care au supraviețuit sub 1 an (1.08%) și pentru cei cu supraviețuire mai mare de 10 ani (6.45%), iar 18.28% dintre pacienți au decedat. De menționat că dintre cei 6 pacienți cu perioadă de supraviețuire mai mare de 10 ani (6.45%), toți aveau vârste sub 40 ani, 5 pacienți se încadrează în subtipul histologic scleroză nodulară la momentul diagnosticului, adică cel considerat majoritar în literatura de specialitate. În lotul 1 durata medie de supraviețuire a fost de 61.56 luni (cu un min de 12 luni și un max de 130 de luni) față de lotul 2 în care a fost de 48.58 (cu un min de 7 luni și un max de 132 de luni).

Din eșantionul total de 93 de pacienți, s-a reușit analiza la 34 dintre aceștia și a unei serii de noi factori prognostici care apreciază evoluția bolii (investigații suplimentare), precum: prezența virusului Epstein-Barr, supraexpresia BCL2 în celulele maligne, prezența PD1 la nivelul limfocitelor și antigenul CD68 la nivelul macrofagelor din micromediul tumoral, precum și prezența EGFR.

În aproximativ 68% dintre cazurile analizate suplimentar, celulele tumorale au fost pozitive pentru **EBV/LMP1**; reacția a fost difuză citoplasmatic, mai accentuată granular paranuclear la nivelul aparatului Golgi. Doar o treime din pacienții lotului general de studiu au fost testați pentru infecția cu virus Epstein-Barr, iar dintre cei testați sunt EBV pozitivi de ~2 ori mai mulți decât cei negativi (24.73% față de 11.83%). Deși în ambele subploturi, ponderea pacienților cu EBV+ a fost mai mare decât a celor negativi, se poate observa cu claritate că procentul pacienților pozitivi din lotul 2 (81.82%) este mai mare decât cel al cazurilor pozitive din lotul 1 (60.87%), și mai mult, analizând lotul 2 al pacienților cu evoluție nefavorabilă comparativ cu lotul 1 al pacienților cu evoluție favorabilă se evidențiază o rată semnificativ mai mare a cazurilor pozitive (81.82%) față de cea a cazurilor negative de doar 18.18%, putând sublinia impactul negativ al infecției EBV în evoluția pacienților cu limfom Hodgkin și asocierea semnificativă statistic (**p= 0.021895**).

Există o relație între limfomul Hodgkin și infecția cu EBV, așa cum o arată și datele din literatura de specialitate. Mecanismele care stau la baza acestei asocieri sunt necunoscute, dar studiile efectuate au relevat că pacienții cu antecedente de mononucleoză infecțioasă cauzată de

virusul Epstein-Barr pot avea risc crescut de a dezvolta limfom Hodgkin, EBV fiind principalul virus incrimat în apariția limfomului Hodgkin. Cu toate acestea, tot din literatură aflăm că genomul EBV a fost izolat în interiorul tumorii doar în aproximativ 20-40% din cazurile de limfom Hodgkin cu un diagnostic anterior de mononucleoză infecțioasă. Mai multe studii sugerează că EBV poate fi un agent de transformare în limfom Hodgkin. Pacienții cu antecedente infecțioase de EBV prezintă un risc de 2-3 ori mai mare pentru dezvoltarea limfomului Hodgkin.

Majoritatea pacienților cu LH testați pentru EBV au fost bărbați, atât în rândul cazurilor pozitive de EBV, cât și în cazul celor negative, așa cum se specifică și în literatură. Continuând analiza datelor obținute, se observă o distribuție semnificativ crescută a cazurilor de LH-SN EBV-pozitive față de cele negative (72.22% comparativ 27.78%), o situație asemănătoare pentru cazurile de LH-CM (71.43% comparativ cu 28.57%), iar în cazul celorlalte 2 subtipuri histologice (BL, DL) se înregistrează câte 1 caz cu EBV(-). Totodată comparând cazurile EBV(+) în funcție de subtipul histologic se decelează o proporție relativ crescută a pacienților cu SN față de cei cu CM. Ultimele date obținute se corelează doar parțial cu cele din cărțile de specialitate, acestea din urmă susținând că cele mai multe cazuri de LH-CM sunt EBV pozitive (75%), dar că majoritatea cazurilor de LH-SN sunt EBV negative, cu rate de pozitivitate raportate variind în intervalul 10-40%.

Celulele tumorale au exprimat **BCL2** în 21 dintre cazurile studiate (61.76%). Procentul de celule tumorale BCL2 pozitive a fost variabil, între 20% și maxim 90%. Raportat la reacția BCL2 în limfocitele mici reactive, expresia BCL2 în celulele Reed-Sternberg a fost de intensitate redusă (notată +) în 47.62% dintre cazurile BCL2 pozitive, foarte intens pozitive (notată +++) în aproximativ 33% dintre cazuri și de aceeași intensitate cu reacția BCL2 în limfocitele mici (notată ++) în restul de ~19% dintre cazuri (comparația a fost făcută pentru cea mai mare intensitate a reacției). În general o intensitate crescută (+++) a reacției pentru BCL2 s-a corelat cu un procent mare (90%) de celule RS pozitive. În ceea ce privește repartitia pe cele 2 subploturi, se observă o pondere discret crescută a pacienților cu BCL2 prezent în rândul celor cu evoluție de boală nefavorabilă (63.64% față de 60.87%) – asociere slabă semnificativă statistic (0.076578). Dar, este interesant de observat procentul semnificativ crescut pe cele 2 subploturi în funcție de intensitatea redusă a exprimării BCL2 (+) cu **p < 0.05**.

Reacția pentru **PD1** în micromediul peritumoral a fost de intensitate mai redusă comparativ cu reacția în limfocitele mici T helper foliculare din centrul germinativ reactivi restanți. În majoritatea cazurilor studiate (20 de cazuri, 60%) procentul de limfocite mici T helper foliculare

PD1 pozitive în micromediul peritumoral a fost redus (<10%). În rare cazuri (5 cazuri, 15%) procentul de limfocite mici PD1 pozitive a fost între 30 și 50% dintre celule, cu rozetarea acestora în jurul celulelor tumorale. De remarcat numărul foarte redus de limfocite mici T helper foliculare în ariile cu densitate mare a celulelor tumorale. Se observă un procent majoritar de pacienți care prezintă în micromediul tumoral PD1 la distanță (~80%), iar în privința repartiției pe subloturi, se înregistrează o creștere ne semnificativă a pacienților din lotul 2 comparativ cu cei din lotul 1 în funcție de prezența PD1 la distanță și, în mod surprinzător, o pondere scăzută a pacienților cu evoluție nefavorabilă de boală față de cei cu evoluție favorabilă în cazul PD1 cu rozetare, fără semnificație statistică ($p=0.810339$).

Procentul de histiocite și macrofage din micromediul peritumoral a fost variabil între 10% și 40% din celularitate; în cazurile cu procent mai redus de celule **CD68** pozitive acestea au fost dispuse la distanță de celulele RS; dacă procentul de celule CD68 pozitive a fost mare (40-50%) acestea s-au dispus și în proximitatea celulelor RS, uneori (3 cazuri – 12%) cu rozetare incompletă în jurul acestora. În urma analizei cazurilor se evidențiază o distribuție relativ egală a proporției de pacienți cu celule CD68+ din micromediu dispuse la distanță de celulele RS în funcție de evoluția bolii (69.57% și 63.64%) și o proporție mai mare a pacienților cu celule CD68+ cu rozetare în lotul 2 comparativ cu lotul 1 ($p < 0.05$).

Numărul de vase a fost variabil, între 21 de vase și 78 de vase. Pentru cazurile de LHc-SN, densitatea vasculară a fost mai mare în scleroza peritumorală comparativ cu ariile de infiltrare tumorală. De remarcat, în același caz, și numărul mai redus de vase în ariile cu densitate celulară tumorală mare comparativ cu ariile cu rare celule tumorale, argument în favoarea faptului că **neoangiogeneza** este un important factor de creștere tumorală și în LHc, corelându-se cu procentul mai mare de cazuri refractare din lotul 2 comparativ cu lotul 1 ($p < 0.05$) atât în cazul numărului de vase mai mic de 50 (45.45% față de 21.74%), cât și în cazul numărului mai mare de 50 de vase (27.27% față de 13.04%).

Concluzii

1. Limfomul Hodgkin a devenit una dintre cele mai posibil curabile neoplazii hematologice, atât în cazul pacienților adulți, cât mai ales în cazul celor cu vârstă pediatrică cu o rată generală actuală înaltă de vindecare
2. Micromediul este o componentă fundamentală din masa tumorală și un factor patogenetic esențial în limfomul Hodgkin, furnizând celulelor tumorale factori de creștere și inhibând răspunsurile imune antitumorale.
3. Studiul continuu al celulelor Hodgkin-Reed Sterberg caracteristice acestui tip de limfom, cât mai ales analiza micromediului tumoral înconjurător, în mod special în cazul pacienților cu boală în stadii avansate au stat la baza a diferite activități de cercetare care au ajutat la înțelegerea limfomului Hodgkin din punct de vedere fiziopatologic, imunologic și molecular, dar și asupra relevanței de infecție cu EBV și a eliberării de citokine în cazul a cel puțin unei proporții de pacienți.
4. Celulele tumorale manipulează micromediul, permițându-le să-și dezvolte propriul fenotip malign și să se sustragă atacului de răspuns imun al gazdei, astfel că interacțiunea dintre celulele tumorale și micromediul reactiv determină nu numai trăsăturile histologice, dar și caracteristicile și prognosticul clinico-patologic ale acestor pacienți.
5. În studiul efectuat se înregistrează o incidență crescătoare în ultimii ani a cazurilor de LH – pondere semnificativ ridicată a pacienților cu forme avansate (~72%, 67 cazuri din 93 analizate), cea mai mare parte prezentând semne generale de boală, subtip histologic predominant scleroză nodulară, preponderent bărbați, din mediul urban.
6. Se observă o distribuție liniară (nu bimodală) a cazurilor în funcție de vârstă.
7. Se evidențiază o pondere crescută a pacienților cu durată de supraviețuire între 3-10 ani.
8. Deși prognosticul relativ bun și rata generală înaltă de vindecare generală actuală a LH, este important de subliniat faptul că factorii clinico-biologici rămân în continuare principalii piloni în ghidarea strategiilor terapeutice.
9. Peste 70% dintre pacienți pot fi vindecați cu tratament adaptat factorilor de prognostic, incluzând chimioterapie și radioterapie.
10. Schema terapeutică ABVD reprezintă tratamentul standard al LH în scop curativ la nivel mondial și puține lucruri s-au schimbat în practica clinică în ultimele două decenii, dar cu

toate acestea, există loc de îmbunătățire, deoarece un procent semnificativ de pacienții vor recidiva în final după un tratament de succes.

11. Analiza datelor colectate în lucrarea de față aduce în prim-plan următorii parametrii cu valoare prognostică și semnificație statistică: hiposideremia, sindromul biologic inflamator (VSH), nivelul crescut al beta-2-microglobulinei serice, determinarea extraganglionară la debut, statusul de performanță ECOG, PET-CT-ul intermediar, infecția cu EBV la diagnostic, asocierea cu BCL2 de intensitate redusă (+), prezența CD68 cu rozetare, prezența EGFR.
12. Pe de altă parte, printre parametrii cu valoare prognostică, dar fără semnificație statistică s-au numărat: anemia la debut, numărul crescut de leucocite la diagnostic, limfopenia la debut, valoarea LDH, hipoalbuminemia, determinarea medulară la diagnostic, asocierea cu BCL2 de intensitate medie (++) și crescută (+++), prezența PD1, asocierea CD68 la distanță și de vecinătate.
13. Direcțiile viitoare includ îmbunătățirea scorurilor prognostice clinice cu integrarea de noi markeri moleculari prognostici și ale rezultatelor PET-CT-ului intermediar, pentru a identifica mai exact pacienții cu risc crescut, precum și încorporarea unor noi agenți, cum ar fi anticorpii monoclonali și inhibitori check-point în tratamentul de primă linie și cel de salvare, dar și dezvoltarea terapiei pe bază de celule T care țintesc diferite alte componente celulare ale micromediului tumoral.
14. Utilizarea PET-CT-ului în algoritmi de diagnostic și de monitorizare ai LH, utilizarea pe scară largă a noilor factori prognostici biologici și moleculari la diagnosticare, noile molecule extrem de eficiente și cunoștințele recente cu privire la efectele chimioterapice asupra micromediului, ar permite o abordare terapeutică diferită și personalizată a LH pe termen scurt și lung.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Barros MH, Segges P, Vera-Lozada G, Hassan R, Niedobitek G (2015) Macrophage polarization reflects T cell composition of tumor microenvironment in pediatric classical Hodgkin lymphoma and has impact on survival. *PLoS One* 10:e0124531
- Bosch Princep, R.; Lejeune, M.; Salvado Usach, M.T.; Jaen Martinez, J.; Pons Ferre, L.E. & Alvaro Naranjo, T. (2005). Decreased number of granzyme B+ activated CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the inflammatory background of HIV-associated Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol*, Vol.84, No.10, pp. 661-666, 0939-5555
- Cajaiba MM, Kahwash SB (2012) Interfollicular Hodgkin lymphoma in children: an uncommon mimicker of reactive lymphadenopathy. *Leuk Lymphoma* 53(9):1814–1816
- Cartwright RA and Watkins G. (2004). Epidemiology of Hodgkin's disease: A Review. *Hematolo Oncol*, 22:11-26.
- Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, Holmes AB, Bhagat G, Murty VV et al (2011) Combined genetic inactivation of beta2-microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 20:728–740
- Cozen W, Hamilton AS, Zhao P, Salam MT, Deapen DM, Nathwani BN et al (2009) A protective role for early oral exposures in the etiology of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood* 114:4014–4020
- Friedberg, J.W. (2011). Hodgkin lymphoma: answers take time! *Blood*, Vol.117, No.20, pp. 5274-5276, 1528-0020
- Fuchs M, Eichenauer DA, Nogová L, Diehl V, Engert A, Group GHS (2008) Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep* 3(3):126–131
- Glaser SL, Hsu JL. (2002). Hodgkin's disease in Asians: incidence patterns and risk factors in population-based data. *Leukemia Research*, 26(3):261-269.
- Greaves P, Clear A, Owen A, Iqbal S, Lee A, Matthews J et al (2013) Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. *Blood* 122:2856–2863

- Haynes, N.M.; van der Most, R.G.; Lake, R.A. & Smyth, M.J. (2008). Immunogenic anticancer chemotherapy as an emerging concept. *Curr Opin Immunol*, Vol.20, No.5, pp. 545-557, 0952-7915
- Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD & Green AR. (2011). *Postgraduate Hematology*, Wiley-Blackwell, ISBN 978-4051-9180-7, Oxford.
- Kamper, P., K. Bendix, et al. (2011). "Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma." *Haematologica* 96(2): 269-76.
- Karube K, Niino D, Kimura Y, Ohshima K (2013) Classical Hodgkin lymphoma, lymphocyte depleted type: clinicopathological analysis and prognostic comparison with other types of classical Hodgkin lymphoma. *Pathol Res Pract* 209(4):201–207
- Kelley TW, Pohlman B, Elson P et al (2007) 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* 128:958–965
- Klimm B, Franklin J, Stein H, Eichenauer DA, Haverkamp H, Diehl V et al (2011) Lymphocyte-depleted classical Hodgkin's lymphoma: a comprehensive analysis from the German Hodgkin study group. *J Clin Oncol* 29(29):3914–3920
- Lamprecht B, Kreher S, Anagnostopoulos I, Jöhrens K, Monteleone G, Jundt F et al (2008) Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. *Blood* 112:3339–3347
- Ma Y, Visser L, Roelofsen H, de Vries M, Diepstra A, van Imhoff G et al (2008b) Proteomics analysis of Hodgkin lymphoma: identification of new players in the cross-talk between HRS cells and infiltrating lymphocytes. *Blood* 111:2339–2346
- Marshall NA, Culligan DJ, Tighe J, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA (2007) The relationships between Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and regulatory T cells in Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol* 35:596–604
- Morales O, Mrizak D, Francois V, Mustapha R, Miroux C, Depil S et al (2014) Epstein-Barr virus infection induces an increase of T regulatory type 1 cells in Hodgkin lymphoma patients. *Br J Haematol* 166:875–890

- Nam-Cha SH, Montes-Moreno S, Salcedo MT, Sanjuan J, Garcia JF, Piris MA (2009) Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: distinctive tumor and microenvironment markers. *Mod Pathol* 22(8):1006–1015
- Rathore, B. & Kadin, M.E. (2010). Hodgkin's lymphoma therapy: past, present, and future. *Expert Opin Pharmacother*, Vol.11, No.17, pp. 2891-2906, 1744-7666
- Schneider M, Schneider S, Zuhlke-Jenisch R, Klapper W, Sundström C, Hartmann S et al (2015) Alterations of the CD58 gene in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 54:638–645
- Schnitzer B. (2009). Hodgkin lymphoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(4): 747-768
- Schulz, H.; Rehwald, U.; Morschhauser, F.; Elter, T.; Driessen, C.; Rudiger, T.; Borchmann, P.; Schnell, R.; Diehl, V.; Engert, A. & Reiser, M. (2008). Rituximab in relapsed lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: long-term results of a phase 2 trial by the German Hodgkin Lymphoma Study Group (GHSG). *Blood*, Vol.111, No.1, pp. 109-111, 0006-4971
- Slack GW, Ferry JA, Hasserjian RP, Sohani AR, Longtine JA, Harris NL et al (2009) Lymphocyte depleted Hodgkin lymphoma: an evaluation with immunophenotyping and genetic analysis. *Leuk Lymphoma* 50(6):937–943
- Townsend W, Linch D. Hodgkin's lymphoma in adults. *Lancet*. 2012;380(9844):836–47.
- Wei, W.Z.; Morris, G.P. & Kong, Y.C. (2004). Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother*, Vol.53, No.2, pp. 73-78
- Wolf M, Albrecht S, Marki C (2008) Proteolytic processing of chemokines: implications in physiological and pathological conditions. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1185–1198
- Wu R, Sattarzadeh A, Rutgers B, Diepstra A, van den Berg A, Visser L (2016) The microenvironment of classical Hodgkin lymphoma: heterog
- Younes, A. (2009). Novel treatment strategies for patients with relapsed classical Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pp. 507-519, 1520-4383