

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Gordana Kaić**

**Povezanost broja Foxp3+ limfocita u  
citološkim otiscima sentinel limfnih  
čvorova s prognostičkim čimbenicima  
kod bolesnika oboljelih od melanoma  
kože**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2012.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Gordana Kaić**

**Povezanost broja Foxp3+ limfocita u  
citološkim otiscima sentinel limfnih  
čvorova s prognostičkim čimbenicima  
kod bolesnika oboljelih od melanoma  
kože**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2012.**

Disertacija je izrađena na Odjelu za kliničku citologiju i citometriju Kliničke  
bolnice Dubrava u Zagrebu

Voditeljica rada: doc. dr. sc. Ika Kardum-Skelin

*Od srca zahvaljujem na nesebičnoj pomoći voditeljici ovog rada doc. dr. sc. Iki  
Kardum-Skelin i suradnicima s Odjela za kliničku citologiju i citometriju KBD.*

## SADRŽAJ:

### POPIS KRATICA

#### 1. UVOD

.....	1
1.1. Biologija raka	
.....	1
1.2. Imunološki sustav	
.....	2
1.3. Limfociti T	
.....	4
1.4. Mehanizam periferne tolerancije	
.....	6
1.5. Tumorska imunologija	
.....	8
1.5.1. Tumorski antigeni	
.....	8
1.5.2. Kategorije tumorskih antigena.....	8
1.5.3. Teorije imunološkog nadzora	
.....	9
1.5.4. Tumorski mikrookoliš	
.....	11
1.6. Melanom	
.....	14
1.6.1. Epidemiologija	
.....	14
1.6.2. Patogeneza	
.....	15
1.6.3. Temeljni histološki tipovi melanoma	
.....	17

1.6.4. Histološko stupnjevanje melanoma	17
1.6.5. Klinički kriteriji za dijagnozu melanoma kože	18
1.6.6. Prognostički čimbenici melanoma kože	18
1.7. Sentinel limfni čvor	25
1.8. Dosadašnja istraživanja značaja broja Foxp3+ limfocita	27
2. HIPOTEZA	29
3. CILJ RADA	30
4. ISPITANICI I METODE	31
4.1. Ispitanici	31
4.2. Uzimanje otisaka sentinel čvora	31
4.3. Imunocitokemijska obrada	32
4.4. Brojenje Foxp3+ limfocita	32
4.5. Celularnost otisaka čvorova	33
4.6. Statistička obrada	34
5. REZULTATI	35
5.1. Karakteristike ispitanika	35

5.2. Relativni i apsolutni broj Foxp3+ limfocita	39
5.3. Frekvencije kategorijskih neovisnih varijabli	40
5.4. Usporedbe između dvije varijable	41
5.5. Usporedbe između više varijabli	46
6. RASPRAVA	50
7. ZAKLJUČCI	59
8. SAŽETAK	60
9. SUMMARY	61
10. POPIS LITERATURE	62
11. ŽIVOTOPIS	73

## POPIS KRATICA

AJCC prema *engl. American Joint Committee on Cancer*

AFP  $\alpha$ -fetoprotein

APC prema *engl. antigen presenting cells*, predočne stanice, stanice koje prezentiraju antigen

CEA prema *engl. carcinoembryonic antigen*, karcinoembrionalni antigen

Cel celularnost

CD prema *engl. cluster of differentiation or designation*, protokol koji se koristi za identifikaciju i istraživanje molekula na staničnoj površini

C.I. prema *engl. confidence intervals*, granice pouzdanosti

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

DAMP prema *engl. danger/damage-associated molecular patterns*, stanični receptori urođene imunosti koji prepoznaju obrasce oštećenja stanice

DC prema *engl. dendritic cells*, dendritičke stanice

EBNA-1 Epstein-Barr nuklearni antigen 1

ERK prema *engl. extracellular-related kinase*

Foxp3 prema *engl. forkhead box p3*

gp-100 melanocitni diferencijacijski antigen

Hist dg histološka dijagnoza

HPV-E6, HPV-E7 onkoviralni proteini, produkti humanog papiloma virusa

IDO prema *engl. indoleamine 2.3-dioxygenase*

IFN interferon

IL interleukin

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

LDH laktat dehidrogenaza

MAGE/GAGE - tkivni antigeni iz obitelji tumor-testis antigena

Melan-A/MART-1 melanocitni diferencijacijski antigen

MAPK prema *engl. mitogen-activated protein kinase*

MCAM prema *engl. melanoma cell adhesion molecule*

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

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

MITF prema *engl. microphthalmia associated transcription factor*

MUC-1 tumorski antigen, posttranslacijski modificiran vlastiti protein

N<sup>o</sup> nod broj zahvaćenih limfnih čvorova

NK prema *engl. natural killer*, prirođenoubilačke stanice

NKT prema *engl. natural killer T*, prirođenoubilačke T stanice

NY-ESO-1 tkivni antigen iz obitelji tumor-testis antigena

NP nije primjenjivo

p53 tumorski antigen, prekomjerno izraženi produkt tumor-supresorskog gena TP53

PAMPs prema *engl. pathogen-associated molecular patterns*, patogenu pridruženi molekularni obrasci

PRRs prema *engl. pattern recognition receptors*, receptori za prepoznavanje obrazaca

PT lok lokalizacija primarnog tumora



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

T<sub>C</sub> prema *engl. T cytotoxic*, citotoksični limfociti T

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

TGF-β prema *engl. transforming growth factor-β*

T<sub>H</sub> prema *engl. T helper*, pomoćnički limfociti T

TLRs prema *engl. Toll-like receptors*, stanični receptori urođene imunosti, prepoznaju obrasce patogena

Treg prema *engl. T regulatory*, regulacijski limfocit T

TSA tumor specifični antigeni

TNFα prema *engl. tumor necrosis factor α*

TNM prema *engl. tumor, nodes, metastasis*

Ulc ulceracija

VEGF prema *engl. vascular endothelial growth factor*

# 1. UVOD

Terapijski uspjeh i preživljenje kod maligne bolesti ovisi o biološkom potencijalu tumorskih stanica. Kad se novotvorine dijagnosticiraju u uznapredovaloj fazi rasta, liječenje najčešće ima ograničeni uspjeh. Stoga se ulažu veliki naponi, kako u prevenciju raka, tako i u otkrivanje u ranim kliničkim stadijima sve savršenijim dijagnostičkim metodama. U spektru novodijagnosticiranih bolesti su i one koje bi možda regredirale, ostale stabilne ili progredirale presporo da postanu klinički očite za vrijeme života (*engl. overdiagnosis*). To ponekad ima za posljedicu prekomjerno liječenje (*engl. overtreatment*) jer nije moguće predvidjeti klinički tijek tih malignih bolesti<sup>1-4</sup>.

Danas medicina prikuplja suptilne pokazatelje o prisutnosti raka u sve ranijim kliničkim stadijima, ali oni ne daju informaciju o biološkom potencijalu tumora. Još je uvijek nedovoljno poznata uloga imunološkog sustava u stvaranju, održavanju i eliminaciji tumora.

## 1.1. BIOLOGIJA RAKA

Wallace H. Clark je proučavao način neoplastičke progresije u nekoliko modela humanih malignih bolesti<sup>5</sup>. Rak je definirao kao populaciju abnormalnih stanica koje pokazuju nekontrolirani rast unutar tri različita odjeljka - ishodišni odjeljak, mezenhim ishodišnog odjeljka i udaljeni mezenhim. Razvoj raka, karcinogeneza, obilježena je nizom događaja između inicijacije lezije i njezinog metastatskog rasapa. To je niz promjena, počevši od fokalne proliferacije stanica, koje rezultiraju skupom kvalitativno različitih lezija. Tumorska progresija nije obavezna jer su promjene do određenog stupnja reverzibilne. W. H. Clark tumorske lezije dijeli na prekursorske i intermedijarne, primarni invazivni rak i metastaze, obzirom na vremensko i prostorno ograničenje rasta, a nastanak raka "*de novo*" smatra varijantom koja također mora imati svoju evoluciju i prekursore<sup>5</sup>.

Mirovanje tumora (*engl. "tumor dormancy"*) je vjerojatno dug period u razvoju tumora, za vrijeme kojeg mu nisu zadovoljene osnovne pretpostavke za progresiju, i tada je skriven i bez simptoma. Može biti prisutno kod najranijih razvojnih faza, ali i u stupnju mikrometastaza kao i minimalne rezidualne bolesti te vrlo je učestala pojava u općoj populaciji<sup>6</sup>.

2000. g. Hanahan i Weinberg publicirali su jedan od najcitiranijih članaka koji sabire tadašnje znanje o biologiji raka<sup>7</sup>. Tada su pokušali napraviti logički okvir za razumijevanje izvanredno velike šarolikosti te bolesti. Ustanovili su šest bitnih značajki raka: održavanje proliferativne aktivnosti, izbjegavanje supresora rasta, aktiviranje invazije i metastaza, omogućavanje replikativne besmrtnosti, induciranje angiogeneze i otpornost na staničnu smrt.

Danas, jedanaest godina kasnije, u svjetlu novih spoznaja, revidiraju svoj koncept sa stanovišta da su gore nabrojene značajke samo stečene, funkcionalne sposobnosti<sup>8</sup>. One stanicama raka omogućuju preživljavanje, proliferaciju i diseminaciju. U različitim se tumorima te funkcije stječu na različite načine i u različito vrijeme, za vrijeme višestupanjske tumorigeneze, a uzrok su im četiri temeljna obilježja. Prva dva obilježja, koja omogućuju nastanak raka, su genomska nestabilnost i upalna zbivanja. Razvojem genomske nestabilnosti u stanicama se stvaraju brojne slučajne mutacije, uključujući i one rijetke promjene koje diriraju gore navedene, funkcionalne sposobnosti stanica raka. Upalna zbivanja u displastičnim, "in situ" i malignim lezijama, kojima upravljaju stanice imunološkog sustava, na razne načine doprinose formiranju tumora. Sljedeća dva obilježja su važna jer pospješuju razvoj i progresiju raka. Reprogramiranje staničnog energetskog metabolizma zamjenjuje metabolički program koji djeluje u zdravim tkivima te osigurava adekvatnu potporu kontinuiranom rastu i proliferaciji raka u razvoju. Imunološkim prikrivanjem tumorske stanice sprječavaju uništenje pod nadzorom imunološkog sustava<sup>8</sup>. Na ovakav način izložena temeljna obilježja evolucije raka otkrivaju dvojaku ulogu imunološkog sustava, sudjeluje u nastajanju raka i može mu pospješiti razvoj, ali ga isto tako može i eliminirati.

## 1.2. IMUNOLOŠKI SUSTAV

Svrha imunološkog sustava je nadzor i čuvanje integriteta organizma. Sačinjava ga kompleksna mreža stanica i tkiva, te glasnika putem kojih se odvijaju višestruka međudjelovanja. Povijesno gledano, prvo je shvaćena uloga imunološkog sustava u zaštiti od infektivnih bolesti i ozljeda, a tek kasnije pojavile su se prve teorije o mogućoj povezanosti s nastankom drugih bolesti kao i malignih tumora<sup>9</sup>.

Iako se imunološki sustav dijeli na dva glavna sustava djelovanja, prirođenu i stečenu imunost, u većini imunoloških odgovora zastupljene su brojne komponente oba sustava. Prirođena imunost je nespecifična, djeluje putem makrofaga, polimorfonuklearnih granulocita, prirođenoubilačkih, NK (prema *engl. natural killer*) stanica i sustava komplementa. Stanice prirođene imunosti patogene prepoznaju zahvaljujući naslijeđenim receptorima za prepoznavanje određenih molekularnih obrazaca mikroorganizama (PAMPs, prema *engl. pathogen-associated molecular patterns*). Stečenoj imunosti su glavna obilježja specifičnost prema pojedinačnom antigenu i pamćenje tog antigena odnosno imunološka memorija. Stečena imunološka reakcija može biti humoralna, posredovana antitijelima koja stvaraju limfociti B ili stanična, posredovana limfocitima T. Specifičnost za određeni antigen je posljedica somatskog preuređenja gena, klonske prirode, kojim se osigurava djelovanje na iznimno veliki repertoar antigena<sup>10</sup>.

Limfociti nastaju u koštanoj srži od hematopoetske matične stanice, a zatim dozrijevaju u primarnim limfatičkim organima, limfociti B u koštanoj srži, a limfociti T u timusu. Stupnjeviti razvoj limfocita T u timusu je u slučaju uspješne preuredbe gena za antigenske receptore praćen promjenama u izražaju površinskih molekula CD44, CD25, CD3-TCR (prema *engl. T cell receptor*) kompleksa i ko-receptorskih molekula CD4 i CD8. Proces sazrijevanja je pod utjecajem mikrookoliša - posebice raznih tipova stromalnih stanica u timusnom korteksu i meduli koje osiguravaju potrebne signale i faktore rasta<sup>11</sup>.

Sazrijevanjem limfocita T u timusu i preuredbom gena za TCR stvara se izvanredno veliki repertoar antigenih receptora. Pozitivnom selekcijom odabiru se limfociti koji pokazuju afinitet za peptide prezentirane na vlastitim molekulama glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, MHC (prema *engl. major-histocompatibility-complex*), a negativnom selekcijom eliminiraju se oni koji ga ne prepoznaju uopće, kao i T stanice

čiji TCR prejako veže kompleks antigena i vlastitog MHC. Time se osigurava nereaktivnost na vlastite antigene tzv. centralna tolerancija<sup>12</sup>. Međutim, pretpostavlja se da i uz selekciju biva propušten mali dio autoreaktivnih limfocita. Za takvu populaciju kao i za eliminaciju onih stanica T čiji su receptori specifični za vlastite peptide izražene izvan timusa, nadležan je mehanizam periferne tolerancije putem regulacijskih (Treg) limfocita T<sup>13</sup>.

Tijekom sazrijevanja većina limfocita T biva uništena apoptozom tijekom procesa pozitivne i negativne selekcije, tako da samo oko 1-3% zrelih naivnih limfocita T bude otpušteno iz timusa u perifernu krv. Tijekom cirkulacije limfociti T se filtriraju u sekundarne limfatičke organe, limfne čvorove, slezenu, Peyerove ploče, tonzile i limfatično tkivo sluznica, gdje je moguć susret s antigenom za koji su specifični<sup>14</sup>.

Antigeni se koncentriraju u sekundarnim limfatičkim organima putem tzv. predočnih stanica, APC (prema *engl. antigen presenting cells*). APC djeluju kao čuvari, nadglednici u tijelu. Kada naiđu na antigen, ingestiraju ga i migriraju do najbližeg sekundarnog limfatičnog tkiva. Tamo ga prezentiraju limfocitima, a odgovarajući limfociti B i T nakon prepoznavanja proliferiraju i sazrijevaju. Zreli limfociti B i T izlaze u cirkulaciju i spremni su djelovati protiv uzročnog antigena. Dio zrelih, antigen specifičnih, limfocita B i T naziva se memorijskim stanicama, ostaju u organizmu dugo nakon odstranjivanja antigena, a nakon ponovnog izlaganja istom antigenu iz njih u kratkom vremenu nastaju brojne efektorske stanice<sup>10,14</sup>.

Dendritičke stanice, DC (prema *engl. dendritic cells*) vrsta su APC koje mogu prouzročiti aktivaciju ili toleranciju limfocita, ovisno o njihovom maturacijskom statusu, koji definira razina ekspresije kostimulacijskih molekula i razinom produkcije citokina<sup>10</sup>.

### 1.3. LIMFOCITI T

Limfociti T su glavni efektori stečene, adaptivne ili stanične imunosti. Većina izražava TCR sastavljen od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca, a dijele se ovisno o izražaju površinskih proteina te posljedično različitim mehanizmima djelovanja<sup>10,12</sup>.

Citotoksični limfociti T, T<sub>C</sub> ili CTLs (prema *engl. cytotoxic T lymphocytes*) uništavaju stanice zaražene virusom, tumorske stanice, a uključeni su i u odbacivanje transplantata. To su CD8<sup>+</sup> limfociti koji antigen prepoznaju ako je vezan uz molekulu MHC klase I

koja je prisutna na svim nukleiranim stanicama. One su pod kontrolom Treg limfocita putem IL-10, adenzina i drugih molekula koje ih inaktiviraju do anergičnog stanja što prevenira autoimune bolesti<sup>10,12</sup>.

Pomoćnički limfociti T, T<sub>H</sub> (prema *engl. T helper*) su CD4+ limfociti koji se aktiviraju nakon prezentacije antigena uz pomoć MHC klase II molekula koje su izražene na površini APC stanica kao što su dendritičke stanice, krvni monociti, tkivni makrofagi i limfociti B. Kad su jednom aktivirane, brzo se dijele i secerniraju produkte tzv. citokine koji sudjeluju u aktivnom imunološkom odgovoru. Pomažu drugim stanicama u imunološkim zbivanjima npr. maturaciji limfocita B u plazma stanice i B memorijske stanice, aktivaciji citotoksičnih T stanica i makrofaga. Pomoćnički limfociti T mogu se diferencirati u funkcionalno različite podtipove obzirom na vrstu citokina koji stvaraju i stvoriti različiti tip imunološkog odgovora<sup>12,15</sup>.

Regulacijski limfociti T, Treg limfociti, prije zvani supresorski limfociti T, neophodni su za održavanje imunološke tolerancije. Glavna im je uloga zaustaviti T staničnu imunost na kraju imunološke reakcije. Dije se na dvije podvrste, prirodene i adaptivne. Prirodni Treg limfociti nastaju u timusu i vezani su uz interakcije između limfocita T u razvoju i mijeloidnih (CD11c+) te plazmacitoidnih (CD123+) dendritičkih stanica<sup>13</sup>.

Prirodenoubilačke (NK) stanice predstavljaju glavnu komponentu prirodene grane imunološkog sustava. Ne izražavaju karakteristične površinske receptore niti limfocita T niti limfocita B, kao niti pan-T stanični marker CD3, već su im karakteristični površinski biljezi CD16 i CD56. Za razliku od limfocita T koji prepoznaju peptidne antigene vezane za MHC, NK stanice citolitički djeluju na strane stanice bez prethodne aktivacije. Ne vežu se direktno na antigene, već na Fc dio antitijela koje oblaže patogen ili su aktivirane posredno putem MHC I- srodnih molekula<sup>10</sup>.

Prirodenoubilačke T stanice (NKT, prema *engl. natural killer T cells*) posebna su vrsta limfocita T, koja dijeli neka obilježja prirodene i stečene imunosti. Posjeduju T stanični receptor, TCR limitiranog raspona, a prepoznaje lipide i glikolipide prezentirane molekulom CD1d, a ne putem MHC. Mogu biti CD4+ ili CD8+. Sličnost s NK stanicama su površinska obilježja CD16 i CD56<sup>16</sup>.

γδ limfociti T predstavljaju oko 2% limfocita T koji posjeduju specifičan TCR na svojoj površini. Većina limfocita T ima TCR sastavljen od dva glikoproteinska lanca nazvanih

$\alpha$ - i  $\beta$ - TCR lanci. TCR u  $\gamma\delta$  limfocitima T je sačinjen od jednog  $\gamma$ - i jednog  $\delta$ -lanca. Obično se nalaze unutar nakupina limfocita crijevne sluznice. Antigeni koji ih aktiviraju nisu poznati, a prepoznavanje im nije vezano za MHC i čini se da su sposobni prepoznati cjelovite bjelančevine, a ne samo peptidne segmente kao većina limfocita T koji antigene prepoznaju u sklopu MHC<sup>10</sup>.

Prepoznavanje antigena u kontekstu stanice ili prezentiranog putem APC je interakcija ovisna o nekoliko vrsta receptora. Specifičnost vezanja omogućena je putem TCR udruženog s CD8 ili CD4 površinskim glikoproteinima, što dovodi do prepoznavanja antigena prezentiranog putem molekule MHC klase I ili II<sup>17</sup>.

Da bi limfociti T obavili svoju efektorsku funkciju, moraju se aktivirati. Aktivacija limfocita T je niz događaja koji započinje kada TCR prepozna peptid prezentiran u kontekstu MHC molekule. Tada se stvara tzv. imunološka sinapsa, prostor u kojem te stanice ostaju u kontaktu. Sinapsa olakšava prijenos signala kroz kompleks površnih molekula CD3 koji je udružen s TCR, a to dovodi do kaskade unutarstaničnih signala što uzrokuje ekspresiju gena, sintezu citokina, ekspresiju površnih molekula, izmjenu citoskeletalnih proteina i omogućavanje efektorske funkcije<sup>17</sup>.

Prepoznavanje antigena i posljedična aktivacija ovisi i o vezivanju parova receptora i kostimulacijskih molekula na APC. Aktivacija Th limfocita rezultira sekrecijom interleukina-2 (IL-2) koji služi kao signal Tc limfocitima. Vrsta kostimulacijskih molekula i citokinski *milieu* u kojem se reakcija zbiva određuju indukciju određenog podtipa Th limfocita definiranog citokinima koje stvaraju npr. Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) ili Th17 (IL-17)<sup>17</sup>.

Uništavanje ciljne stanice zbiva se putem perforinskog mehanizma koji dovodi do nekroze/apoptoze ili putem prepoznavanja membranskog proteina Fas na koji se veže Fas ligand NK stanica s posljedičnim proapoptotičnim signalom<sup>17</sup>.

#### **1.4. MEHANIZAM PERIFERNE TOLERANCIJE**

Imunološki sustav razlikuje vlastito i ne-vlastito, inhibira autoimune odgovore i dozvoljava efektivne odgovore na ne-vlastite antigene. Autoreaktivni limfociti T se fiziološki fizički eliminiraju klonskom delecijom ili funkcionalno, klonskom anergijom. Supresija limfocitima T autoreaktivnih limfocita T ključan je mehanizam imunološke

tolerancije, a subpopulacija limfocita T visoko specijalizirana za supresivnu funkciju, je sastavni dio zdravog imunološkog sustava.

Regulacijski limfociti T (Treg) odgovorni su za održanje periferne tolerancije, preveniranje autoimunosti, limitiranje kroničnih upalnih bolesti kao i ograničavanje protu-tumorske imunosti potiskivanjem citotoksičnih limfocita T koji prepoznaju tumorske antigene<sup>13</sup>. Čini ih CD4+ subpopulacija limfocita T koja konstitutivno izražava CD25 tj.  $\alpha$ -lanac receptora interleukina-2<sup>18</sup>. Karakteristično obilježje Treg limfocita je ekspresija transkripcijskog faktora Foxp3 (prema *engl. forkhead box p3*) (JM2 ili scurfina), bjelančevine kodirane genom *Foxp3*, članom forkhead/winged-helix obitelji transkripcijskih regulatora. Gen *Foxp3* lokaliziran je na segmentu <300 kb, na kromosomu X (p11.23–p11.22)<sup>19</sup>. Hori i sur. (2003.) dokazali su da je Foxp3 ključni gen za razvoj regulacijskih limfocita T<sup>20</sup>. Mutacija tog gena u miša izaziva fatalnu autoimunu, X-vezanu recesivnu bolest (tzv. *scurfy mice*)<sup>21</sup>. Humani ekvivalent toj bolesti je tzv. IPEX (prema *engl. the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*), naslijedni X-vezani sindrom, karakteriziran imunološkom disregulacijom, poliendokrinopatijom i enteropatijom, a nastaje kao posljedica mutacije ortolognog gena. Nije sasvim jasan način gubitka imunološke tolerancije, ali je očito da mutacija koja izaziva inaktivaciju Foxp3 zahvaća funkciju limfocita T na temeljnom nivou<sup>22-24</sup>.

Iako je Foxp3 izražen i u nelimfatičnom tkivu poput epitelnih stanica dojke, odnosno u nekim vrstama tumora, njegova funkcija u imunološkoj regulaciji vezana je uz izražaj na Treg, CD4+ CD25+ stanicama. Dokaz tome je manifestacija Foxp3 deficijencije nakon dokidanja Foxp3 u limfocitima T<sup>25</sup>. Isto tako, zna se da postoji subpopulacija CD8+ limfocita T s izraženim Foxp3, ali je zanemarivo mala u usporedbi s brojem CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg limfocita<sup>26</sup>.

Regulacijske CD4+CD25+Foxp3+ limfocite čine dvije različite populacije: prirođeni Treg limfociti koji se razvijaju u timusu i adaptivni Treg limfociti koji bivaju inducirani na periferiji kao posljedica stimulacije s antigenom, u prisutnosti transformirajućeg faktora rasta  $\beta$ , TGF- $\beta$  (prema *engl. transforming growth factor- $\beta$* ) i IL-2 (interleukin-2). Te dvije populacije stanica, iako vrlo slične u regulacijskoj funkciji i fenotipski, nisu potpuno identične, a u obje je Foxp3 esencijalan za perifernu homeostazu i supresivsku funkciju<sup>25</sup>.



Precizan mehanizam djelovanja Treg limfocita još se uvijek istražuje. Poznata su dva načina: direktna inhibicija putem staničnog kontakta i indirektna putem sekrecije protuupalnih medijatora poput IL-10 (interleukin-10) i TGF $\beta$ <sup>27-29</sup>.

Rezultati najnovijih istraživanja analiziraju stabilnost Treg stanične linije i sugeriraju da Foxp3+ limfociti T pod određenim okolnostima mogu izgubiti ekspresiju Foxp3 i stvarati druge vrste citokina. Isto tako, druge vrste  $\alpha\beta$ TCR limfocita mogu pokazivati tranzitornu ekspresiju Foxp3 i supresijsku funkciju<sup>30</sup>.

Broj Treg limfocita u krvi je uglavnom konstantan i raste samo na mjestima upale. Specifična deplecija Foxp3+ stanica dovoljna je za izazivanje autoimune bolesti. To znači da, nakon značajne redukcije Treg limfocita, moguća konverzija non-Treg limfocita u Treg limfocite nije dovoljna da prevenira autoimunu bolest. Vjerojatno su timički, Foxp3+ prirođeni Treg limfociti funkcionalno stabilni i nenadomjestivi za očuvanje imunološke homeostaze<sup>31</sup>.

## 1.5. TUMORSKA IMUNOLOGIJA

### 1.5.1. Tumorski antigeni

Tumorska imunologija počiva na ideji da transformaciju zdrave stanice u tumorsku prate promjene u izražaju njezinih antigena, što izaziva reakciju imunološki kompetentnih stanica. Antigeni koji se nikada ne nalaze na zdravim stanicama zovu se tumor-specifični antigeni (TSA) i uglavnom su posljedica mutacija karakterističnih za određeni tumor. Idealne su mete za imunoterapiju jer su izraženi samo na malignim stanicama, ali su izraženi individualno, pa čak i samo u dijelu stanica unutar tumora. Češći su antigeni koji su prezentirani i na tumorskim i na normalnim stanicama, tzv. tumor-pridruženi antigeni, TAA prema (*engl. tumor-associated antigens*) koji su rezultat prekomjernog ili aberantnog izražaja nemutiranih proteina<sup>10,32,33</sup>.

Tri su načina na koje peptidi normalnih proteina mogu postati tumorski antigeni. Prvi, stvaranjem mutiranog proteina usljed nemogućnosti tumorske stanice da popravi DNA oštećenje, zatim prekomjernim izražajem normalnog proteina zbog mutacije faktora koji regulira njegovu ekspresiju, te u slučajevima postranslacijske modifikacije, kada je protein promijenjen nakon abnormalnog postranslacijskog procesuiranja<sup>31</sup>.

### **1.5.2. Kategorije tumorskih antigena**<sup>10,32-34</sup>

Tumor-testis antigeni su proteini normalno izraženi tijekom embrionalnog razvoja i u humanom tkivu testisa odraslih, a abnormalno su izraženi na malignim stanicama. Primjeri su MAGE/GAGE obitelj bjelančevina i NY-ESO-1, izraženi na brojnim tumorima uključujući melanom. S obzirom da je tkivo testisa imunološki privilegirano, te stanice testisa pokazuju izražaj MHC I i II, ti antigeni su vrlo prikladne mete za antigen-specifičnu imunoterapiju.

Diferencijacijski antigeni su linijski i stadij-specifični proteini izraženi kod normalnih stanica, a izraženi su i na tumorskim stanicama nastalim iz tog tkiva. Primjer su melanocitni diferencijacijski antigeni Melan-A/MART-1, tirozinaza i gp-100, te CD20 kod B staničnih limfoma i dr.

Onkofetalni antigeni su bjelančevine embrionalnog i fetalnog tkiva izražene u određenim tipovima tumora. Primjer su karcinoembrionalni antigen (CEA, prema *engl. carcinoembryonic antigen*) i  $\alpha$ -fetoprotein (AFP).

Mutirani ili prekomjerno izraženi produkti onkogeni ili tumor-supresorskih gena. Primjer su HER-2/neu i abnormalne forme p53.

Posttranslacijski modificirani vlastiti proteini. Primjer je nedovoljno glikozilirani mucin MUC-1 kod karcinoma dojke i pankreasa.

Onkoviralni proteini kodirani su genomom onkogenih virusa. Primjer su produkti humanog papiloma virusa HPV-E6 i HPV-E7 u karcinomu vrata maternice i EBNA-1 antigen, produkt Epstein-Barr virusa nađen u Burkitt-ovom limfomu i nazofaringealnom karcinomu.

Promjene u izražaju staničnih antigena uslijed maligne transformacije mogu biti prepoznate od imunološkog sustava. Tumorski antigeni se prezentiraju u sklopu MHC molekula klase I i II.

### **1.5.3. Teorije imunološkog nadzora**

Još 1909.g. Paul Erlich je pretpostavio da u organizmu čovjeka stalno nastaje veliki broj tumorski transformiranih stanica ("aberrant germs") koje imunološki sustav

domaćina razara<sup>10</sup>. Sredinom XX stoljeća, Thomas i Burnet razvili su tu ideju u teoriju imunološkog nadzora (*engl. immunosurveillance hypothesis*)<sup>9,10</sup>.

Eksperimentalno je dokazano postojanje tumorskih antigena i imunološki nadzor koji štiti domaćina. Po tome je imunološki odgovor na maligne stanice rani događaj koji, u većini slučajeva, vodi destrukciji prije nego što se razviju u tumore. Isto tako, pretpostavljeno je da imunološka reakcija usporava rast, pa čak i uzrokuje regresiju već uspostavljenih tumora. S tom pretpostavkom može se povezati porast određenih malignih bolesti u imunokompromitiranih bolesnika. Kako postoje tumori uzrokovani virusima, postavljena je sumnja da imunološki sustav kontrolira rast tumora tako što u stvari djeluje na virus koji ga je potaknuo. Postavilo se pitanje na koji način se onda vrši imuni nadzor velike većine malignih tumora koji su nevirusne etiologije. Isto tako, velika manjkavost teorije bila je u tvrdnji da tumori postaju klinički očiti u slučaju oslabljenog imunološkog sustava, jer većina tumora nastaje u imunokompetentnih bolesnika, a mnogi tumori imaju i značajnu upalnu komponentu<sup>34,35</sup>.

Na to nije bilo odgovora do nedavno, kada je eksperimentalno, putem genetski modificiranih miševa deficijentnih na pojedine komponente imunosti, dokazano da i prirodna i stečena imunost doprinose imunološkom nadzoru i eradikaciji nekih tumora nevirusne etiologije<sup>34,35</sup>.

Daljnijim eksperimentima dokazano je da se inducirani maligni tumor u imunodeficijentnog miša ne može transplantirati imunokompetentnom primatelju, dok je u obrnutoj situaciji to moguće. Spoznalo se da vjerojatno postoji eliminacija imunogeničnih tumorskih stanica u imunokompetentnog domaćina. Takvom selekcijom, imunološkim uređivanjem (*engl. immunoediting*) preostaju samo slabo imunogeni klonovi stanica koje čine tumor<sup>34,35</sup>.

Teorija imunološkog uređivanja ukazuje da imunološki sustav oblikuje imunogeničnost tumora. Ona ne samo da sadrži osnovni koncept imunološkog nadzora, već prepoznaje i što se dešava s malignim tumorom koji je izbjegao nadzoru. Fenotip tumora se kontinuirano oblikuje uslijed djelovanja stanica iz okoliša. Taj period latencije koji postoji između kraja eliminacijske faze (*engl. elimination phase*) i početka

tumorskog bijega (*engl. escape*) i pojave klinički vidljive bolesti, naziva se fazom ravnoteže (*engl. equilibrium phase*)<sup>34,35</sup>.

Navedene teorije, odnosno sadašnje važeće shvaćanje tumorske imunosti, počivaju na pretpostavci da je imunološka reakcija zasnovana na prepoznavanju "vlastitog" i "ne vlastitog" (*engl. self vs non-self*), te da je time u potpunosti uvjetovana. Polly Matzinger 1994.god. iznosi ideju da APC odgovaraju na "signale opasnosti" (*engl. "danger signals"*) potekle od stanica koje su izložene oštećenjima<sup>36</sup>.

Ti "signali opasnosti" alarm su koji upozorava imunološki sustav da postoji problem na koji treba reagirati. Po toj teoriji imunološki odgovor ne nastaje zbog neonatalne definicije "vlastitog" niti zbog historijskih definicija "patogena", već zbog dinamičkog i stalnog obnavljanja odgovora na opasnost, odnosno na oštećenje stanica. Analogno dosadašnjem shvaćanju o prepoznavanju mikroorganizama uvjetovanom prirođenim, evolucijski-konzerviranim receptorima za prepoznavanje obrazaca, PRRs (prema *engl. pattern recognition receptors*) kojima se prepoznaju obrasci mikroorganizama, PAMPs (prema *engl. pathogen-associated molecular patterns*) putem TLRs (prema *engl. Toll-like receptors*) na APC, sugerira se postojanje sličnih obrazaca prepoznavanja oštećenja, DAMP (prema *engl. danger/damage-associated molecular patterns*), koji su također evolucijski očuvani<sup>36</sup>. Princip djelovanja tih obrazaca je izlaganje dijelova molekula koje se trebaju nalaziti sakriveni unutar stanice s posljedicom popravka ili remodeliranja stanice. Iako ta teorija nudi objašnjenje kako započinje imunološki odgovor, ne odgovara na pitanje zašto sustav reagira na različite načine u različitim situacijama. Pretpostavka na kojoj se trenutačno radi jest da tkiva šalju signale koji određuju vrstu odgovora<sup>36</sup>.

#### **1.5.4. Tumorski mikrookoliš**

Čini se da je W.H. Clark bio u pravu kada je ustanovio da je priroda raka mnogoznačna i da se ne treba pripisivati nekoj određenoj promjeni u stanici koju će naslijediti njezino potomstvo, a koja nosi sve informacije o događajima koji su se zbili u tom neoplastičnom sustavu<sup>5</sup>. Štoviše, suvremeno je shvaćanje raka da je to tkivo čija složenost daleko nadmašuje normalno. Više se ne smatra da tumorsko tkivo čine samo

relativno homogene maligne stanice, već brojni tipovi stanica u parenhimnom odjeljku i mreža stanica iz okoliša, strome nastale tijekom procesa stupnjevite tumorigeneze<sup>37</sup>.

Tumorske i stromalne stanice ostvaruju brojne recipročne interakcije, početna neoplazija stvara preneoplastičnu stromu privlačeći i aktivirajući određene tipove stromalnih stanica. Tada stroma svojim djelovanjem podržava neoplastični fenotip što malignim stanicama omogućuje da dalje evoluiraju i opet šalju drugačije signale u stromu ne bi li je reprogramirali, što osigurava invaziju u okolno tkivo i diseminaciju tumorskih stanica. Kod procesa metastaziranja se ponavlja taj obrazac međudjelovanja, jer parenhimne stanice dopijevaju na mjesto bez odgovarajuće strome<sup>37,38</sup>.

Prema tome, stanice imunološkog sustava koje infiltriraju tumor, danas su shvaćene kao njegov integralni dio. Već je rečeno da mogu djelovati agonistički i antagonistički, tj. u tumorima su prisutne različite proporcije pro- i protu-tumorskih leukocita. Prisutnost protu-tumorskih CTL i NK stanica je duže poznata, ali prisutnost pro-tumorskih je tek krajem prošlog stoljeća temeljena na opažanju udruženosti tumora i kronične upale, što je vodilo do metafore da su tumori "rane koje nikada ne zacijele"<sup>39</sup>.

U normalnom, fiziološkom zacjeljivanju i borbi protiv infekcije infiltracija leukocitima je tranzitorna pojava. U slučajevima kronične upale, njihova dugotrajna prisutnost vezana je uz različite abnormalnosti tkiva, fibrozu, aberantnu angiogenezu i neoplaziju<sup>37,38</sup>.

Pro-tumorske stanice su određeni podtipovi makrofaga, mastociti i neutrofil, limfociti B i T. Brojne su signalne molekule koje te stanice otpuštaju, a služe kao efektori njihovih pro-tumorskih djelovanja, kemokini i citokini koji pojačavaju upalu, potiču i održavaju angiogenezu, stimuliraju proliferaciju, prisutnošću na marginama tumora olakšavaju invaziju i podržavaju metastaziranje<sup>37,38</sup>. Ova obilježja otkrivaju dihotomnu ulogu imunološkog sustava – sprečava, ali i pospješuje tumorski rast i progresiju<sup>8</sup>.

Tumor koji raste izaziva odgovor domaćinovog imunološkog sustava. Tumorski antigeni i topivi produkti privlače dendritičke stanice u tumorsko tkivo čime se može pokrenuti dva tipa imunološkog odgovora<sup>32</sup>.

#### Imunostimulacijski ili upalni okoliš (Th1 odgovor)

Dendritičke stanice procesuiraju antigene i razvijaju se u zrele DC koje produciraju IL-12. Putuju u drenirajuće limfne čvorove gdje stimuliraju CD4+Th1 pomoćničke limfocite koji stvaraju IFN- $\gamma$ . CD4+Th1 pomoćnički limfociti pomažu u

ekspanziji CD8+ citotoksičnih limfocita koji mogu uništiti tumorske stanice lučenjem granzima B i perforina. U prisutnosti Th1 citokina tumori izražavaju MHC I i kostimulacijske molekule neophodne da ih CTL prepoznaju. Također, u takvom okolišu se odvija i nespecifična aktivacija putem Fas liganda i drugih efektorskih molekula<sup>32</sup>.

#### Imunosupresivni ili neupalni okoliš (Th2 odgovor)

Druga vrsta tumorskih antigena, potiče razvoj druge vrste dendritičke stanice, nezrele DC, koja tada luči citokine IL-6 i TNF $\alpha$ . (prema *engl. tumor necrosis factor  $\alpha$* ). To omogućuje proliferaciju drugog tipa limfocita T, CD4+ Th2, koje nisu efektivne u odbacivanju tumora, a luče proupalne citokine IL-4 i IL-13. Smanjuje se izražaj MHC i kostimulacijskih molekula, a tumorske stanice luče imunosupresivne citokine TGF- $\beta$  i IDO (indoleamine 2.3-dioxygenase) i generiraju Treg limfocite, makrofage i supresivne stanice mijeloidnog porijekla, MDSC (prema *engl. myeloid-derived suppressor cell*)<sup>32</sup>. Tumorske stanice mijenjaju okoliš i u doba otkrivanja tumora ravnoteža je pomaknuta u korist imunosupresije odnosno imunološke tolerancije tumora (Th2 odgovor). Imunoterapijom se ravnoteža pokušava pomaknuti u korist imunostimulacijskog, Th1 odgovora<sup>32</sup>.

#### Izbjegavanje imunološkog nadzora nad tumorom

U skladu s gore rečenim, brojni su načini na koje tumor izbjegava imunološki nadzor i eradikaciju tumorskih stanica te osigurava neograničen rast tumora. Danas se još ne zna utjecaj i trajanje svakog od tih mehanizama tijekom napredovanja tumora<sup>40</sup>. Pretpostavlja se da postoje sljedeći načini izbjegavanja imunološkog nadzora nad tumorom:

- 1) Poremećena prezentacija antigena: interakcija TCR nedovoljna za izazivanje produktivnog T staničnog odgovora uslijed neefikasnog prikazivanja antigena u sklopu MHC, defekti u provođenju signala ili izgubljeni izražaj MHC I čime se izbjegava prepoznavanje od CD8+ limfocita;
- 2) Nedovoljan izražaj kostimulacijskih molekula ili tumorska produkcija koinhibicijskih molekula;

- 3) Regulacija putem tumorske strome te stvaranje TGF- $\beta$  i IL-10 čime se inducira anergija efektorskih stanica, a induciraju Treg limfocite i APC koje toleriraju tumorske antigene.

Privlačenje i/ili indukcija Treg limfocita, kao mosta između anti-upalnih citokina i tolerogenih APC možda je jedan od glavnih načina imune evazije tumora<sup>40</sup>.

## 1.6. MELANOM

### 1.6.1. Epidemiologija

Melanom je maligni tumor porijeklom iz melanocita, stanica koje stvaraju pigment, smještenih uglavnom u koži, ali se nalaze i u očima, ušima, probavnom sustavu, mekim moždanim ovojnicama i sluznici spolnog sustava<sup>41</sup>.

Incidencija melanoma ima globalni trend rasta i najviša je u Australiji i Novom Zelandu gdje stopa iznosi 37,7 za muškarce i 29,4 za žene /100000 stanovnika. U SAD se incidencija utrostručila u zadnja dva desetljeća tako da je melanom peti najčešći maligni tumor u muškaraca, a šesti u žena<sup>41-43</sup>. U Hrvatskoj 2007.god. incidencija oboljelih bila je 11,2/100000 stanovnika<sup>44</sup>.

Stariji ljudi imaju veću vjerojatnost da dobiju melanom i umru od njega<sup>45</sup>. Medijan dobi u doba postavljanja dijagnoze je 53 godine. Od njega češće umiru muškarci nego žene, a najviše preživljenje je u razvijenim zemljama Sjeverne Amerike i Europe<sup>42,46</sup>.

Iako čini samo 4% malignih tumora kože, uzrok je čak 65-80% smrti od svih tumora kože. Samo 14% bolesnika s metastatskim melanomom preživi pet godina. Često je rezistentan na terapiju, a smrt nastupa zbog nastanka udaljenih metastaza<sup>46,47</sup>.

Rana detekcija tankih melanoma kože najbolji je način za smanjivanje mortaliteta. Klinički stadiji 0 i I izlječivi su više od 90% kompletnom kirurškom ekscizijom, dok stadij IV ima medijan očekivanog trajanja života manje od jedne godine<sup>47</sup>.

Primarni melanom kože u većini slučajeva nastaje "*de novo*" iako se može razviti i iz prekursornih pigmentiranih lezija. Multifaktorijalno je uzrokovan i povezan s brojnim rizičnim čimbenicima uključujući obiteljsku anamnezu (naslijedna mutacija

tumor supresijskih gena *CDKN2A* i *CDK4*), displastični nevoidni sindrom, prethodni melanom, imunosupresivna stanja, pretjerano izlaganje UV zračenju, svijetlu put i stariju životna dob<sup>47</sup>.

### 1.6.2. Patogeneza

Redoslijed događaja kojim se normalni melanociti pretvaraju u stanice melanoma je nedovoljno istražen. Clarkov model progresije pretpostavlja stupnjevitu transformaciju proliferativnih lezija (neoplazija) u kojima se događa niz fokalnih promjena (tumorska progresija). Jedan od mogućih ishoda je aberantna diferencijacija i citološka atipija pojedinačnih stanica (displazija). Prekursorne lezije vremenski su i prostorno ograničene, mogu nestati, perzistirati ili progredirati. Progresija znači vremenski neograničenu proliferaciju kontinuirano smještenih, displastičnih stanica, ali i dalje prostorno ograničenog rasta u odjeljku tkiva u kojem su nastale (intermedijarna lezija, "*in situ*" melanom). Primarna invazivna lezija je vremenski i prostorno neograničena te može rasti u više tkivnih odjeljaka i ima sposobnost daljnjeg metastaziranja<sup>5</sup>.

Pretpostavlja se da je taj redoslijed fenotipski ishod brojnih genetskih i epigenetskih alteracija koje mijenjaju procese u stanici i njihovu interakciju s ekstracelularnim matriksom. Genomska složenost humanog melanoma ukazuje da je za potpunu malignu transformaciju potreban efekt multiplih genetskih lezija<sup>48</sup>.

Molekularne promjene prisutne već u benignim proliferativnim lezijama uključuju mutacije *BRAF* i *N-RAS* gena koje abnormalno aktiviraju signalni put MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) i ERK (engl. *extracellular-related kinase*), što stimulira rast stanica<sup>47,49</sup>. Razvoj displastičnih lezija i citološke atipije obilježen je nasljednim (*CDKN2A*, *CDK4*) i stečenim (*PTEN*) mutacijama u tumor-supresorskim genima koje utječu na procese rasta, nemogućnost popravka DNA i stanične smrti<sup>49</sup>.

Prihvaćena premisa u biologiji tumora jest da karakteristične fenotipske značajke malignosti ukazuju na ishodišnu stanicu i njena razvojna biološka obilježja. MITF (prema engl. *microphthalmia associated transcription factor*) je esencijalni



transkripcijski faktor, koji djeluje na niz diferencijacijsko/pigmentacijskih gena kao i na gene što reguliraju proliferaciju/opstanak melanocita. Aktivacija MAPK, kao i brojne moguće dodatne postranlacijske modifikacije tog signalnog puta, uzrokuju promjenu transkripcijske aktivnosti MITF<sup>48</sup>.

Keratociti bazalnog sloja epidermisa u fiziološkim okolnostima komuniciraju s melanocitima i na taj način kontroliraju rast i izražaj njihovih površinskih receptora<sup>50</sup>. Gubitak E-kadherina uz izražaj N-kadherina i MCAM (prema *engl. melanoma cell adhesion molecule MUC18*) omogućava stanicama melanoma kontakt s dermalnim fibroblastima i vaskularnim endotelom, a ekspresija  $\alpha V\beta 3$  integrina inducira antiapoptotični gen *BCL-2* i MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) koja degradira kolagen bazalne membrane, te omogućava stanicama melanoma kontakt s komponentama ekstracelularnog matriksa<sup>51</sup>. Poremećaj stanične adhezije doprinosi tumorskoj invaziji, interakciji tumora i strome, te olakšava signaliziranje tumorskih stanica, a izražen je u vertikalnoj fazi rasta, te disocijaciji i migraciji stanica kod metastaziranja<sup>51</sup>.

Uz spomenute genetske lezije, biološki procesi koji održavaju i podržavaju uspostavljeni tumor vjerojatno uključuju epigenetsku disregulaciju i tumor-stromalne interakcije čija je molekularna osnova još uvijek slabo razjašnjena, ali stvara mogućnost potencijalnog terapijskog djelovanja na mehanizme koji su neophodni u održavanju nastalog melanoma<sup>48</sup>.

Diseminirani melanom jedan je od terapijski najotpornijih malignih tumora, s prosječnim preživljenjem 6-9 mjeseci<sup>52</sup>. Istodobno, ova bolest dosljedno pruža naznake mogućih terapijskih puteva koje bi se mogle primjeniti i na druge tipove tumora: nadu daju rijetki, ali jaki klinički odgovori na imunomodulacijsku terapiju i česte genetske lezije koje zahvaćaju MAPK<sup>48</sup>. Esencijalna uloga MAPK je u produkciji različitih imunosupresivnih faktora, lučenje IL-6, IL-10, VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*) i TNF $\alpha$  čime se sprečava maturacija DC stanica<sup>47,53</sup>.

Jedan od najvažnijih procesa u biologiji metastatskog melanoma je način na koji se stanice melanoma udomljavaju na metastatskim lokacijama. Istraživanja o tome su malobrojna i djelomična, a bazirana su na eksperimentalnim modelima. Ispitivanje odnosa melanoma i imunokompetentnih stanica je pristup kojim se mogu dobiti neke informacije o tom procesu<sup>54</sup>.

Sadašnji prognostički indikatori kod metastatskog melanoma, proširenost bolesti obzirom na lokaciju i razina laktat-dehidrogenaze u serumu, nisu dovoljno dobri za razlikovanje između velike populacije bolesnika s agresivnom bolešću i male subpopulacije s relativno indolentim tijekom bolesti. Činjenica je da većina melanoma, bez obzira na vrstu genetske mutacije, dijele sličnu biologiju, te se postavlja pitanje zašto nemaju iste ishode<sup>55</sup>.

### **1.6.3. Temeljni histološki tipovi melanoma**

Četiri najvažnija tipa primarnog melanoma kože s obzirom na učestalost i histološki obrazac rasta su: lentigo maligna melanom, površno šireći melanom, nodularni melanom i akralni lentiginozni melanom. Međusobno se razlikuju po učestalosti, lokalizaciji, tipu atipičnih melanocita, načinu rasta i prognozi. Preostali, rjeđi tipovi čine <5% melanoma<sup>43,56</sup>.

### **1.6.4. Histološko stupnjevanje melanoma**

Mikroskopska obilježja uznapredovalosti primarnog tumora određuju se kao stupanj invazije po Clarku, odnosno koliko je melanom proširen kroz slojeve kože, te kao debljina tumora po Breslowu<sup>43,57</sup>.

#### Stupanj invazije po Clarku

Stupanj I znači da je melanom ograničen na epidermis (melanom "in situ"). U stupnju II stanice melanoma prisutne su u papilarnom dermisu, a u stupnju III ga ispunjavaju i ekspaniraju. U stupnju IV tumorske stanice infiltriraju retikularni dermis, a u stupnju V infiltrirano je subkutano tkivo.

#### Stupnjevanje melanoma po Breslowu

Debljina melanoma mjeri se baždarenim okularnim mikrometrom od granularnog sloja kože (kod ulceriranih melanoma od dna vrijeda), okomito u kontinuitetu, do najdubljeg dijela (baze) tumora. Izražava se u milimetrima.

I < 0,76 mm

II 0,76 - 1,50 mm

III 1,51 - 2,25 mm

IV 2,26 - 3,00 mm

V > 3,00 mm

#### 1.6.5. Klinički kriteriji za dijagnozu melanoma kože

Inspekcija kože je inicijalna i osnovna dijagnostička pretraga, a klinički kriteriji za melanom kože su tzv. ABCDE kriteriji<sup>58</sup>.

**A** Asimetrija (prema *engl. asymetry*): polovica lezije nije identična drugoj polovici.

**B** Nepravilnost ruba (prema *engl. border irregularity*): rubovi lezije su hrapavi, urezani ili neoštri.

**C** Nejednolična boja (prema *engl. color variegation*): nijanse smeđe i crne boje, bijela, crvena i plava diskoloracija.

**D** Promjer (prema *engl. diameter*): veći od 6 mm je karakterističan, iako ima i manjih melanoma. Svaki madež koji raste treba procijeniti.

**E** Razvoj (prema *engl. evolving*): promjene u lezijama kroz određeno vrijeme karakteristične su, što je posebno važno za melanome koji ne izražavaju gore navedene klasične kriterije. Osim na promjene u boji, veličini i obliku, odnose se i na promjene u izdignutosti iznad kože, kvaliteti površine, okolnoj koži, osjetljivosti i konzistenciji lezije<sup>58</sup>.

Potkraj 20. i početkom 21. stoljeća razvile su se i razne tehnologije *in vivo* pregleda pigmentiranih lezija. To su dermatoskopija (epiluminiscentna mikroskopija) koja vizualizira strukture epidermisa i papilarnog dermisa, digitalna analiza slike, multispektralna digitalna dermoskopija, laserska mikroskopija, te niz drugih modernih tehnika koje su unaprijedile ranu dijagnozu melanoma<sup>59</sup>.

#### 1.6.6. Prognostički čimbenici melanoma kože

Histopatološki status regionalnih limfnih čvorova jedan je od najznačajnijih prediktora ponovne pojave bolesti i ukupnog preživljenja u ranim kliničkim stadijima. Prema važećoj klasifikaciji bolesnika oboljelih od melanoma, AJCC (prema *engl. American Joint Committee on Cancer*) Cancer Staging Manual, kliničke stadije I i II čine bolesnici bez regionalnih ili distalnih metastaza i imaju najbolju prognozu. Prediktori preživljenja u toj grupi su debljina i ulceracija, te broj mitotičkih ćelija primarnog tumora<sup>60</sup>.

Primarni tumor (T) obzirom na debljinu podijeljen je na: T in situ, T1  $\leq$  1,00 mm, T2 1,01-2,00 mm, T3 2,01-4,00 mm i T4  $>$  4,00 mm. Ulceracija se prikazuje kao prisutna ili ne u kategorijama T1-4, a broj mitozu  $\geq$  1/mm<sup>2</sup> samo u kategoriji T1 (Tablica 1).

Bolesnici u stadiju III imaju metastaze u regionalnim limfnim čvorovima. Broj metastatskih čvorova (N) podijeljen je na kategorije N0, N1 (jedan čvor), N2 (dva do tri čvora) i N3 (četiri i više čvorova) (Tablica 1).

Postojanje udaljenih metastaza (M) kategorizira se kao M0 i M1. Stadij IV čine bolesnici s udaljenim metastazama (M1) i najlošijom prognozom, a lokalizacija udaljene metastaze i razina laktat dehidrogenaze (LDH) u serumu najbitniji je prognostički čimbenik u ovoj kategoriji bolesnika (Tablica 1).

Petogodišnje i 10-godišnje preživljavanje iznosi 97% odnosno 93% za bolesnike T1aN0M0 grupe (klinički stadij IA), u usporedbi s 53%, odnosno 39% kod bolesnika T4bN0M0 grupe (klinički stadij IIC)<sup>60</sup>.

Značajna heterogenost među prognostičkim grupama u odnosu na preživljenje je vjerojatno uvjetovana biološkim obilježjima primarnog tumora. Tako su ulceracija i mitotski indeks vjerojatno važni morfološki pokazatelji molekularnih staničnih mehanizama koji kontroliraju proliferaciju<sup>61,62</sup>, a debljina primarnog tumora mogući je odraz proteklog vremena i niza događaja potrebnih za progresiju<sup>5</sup>.

#### Debljina primarnog tumora:

Kod T1 tumora 10-godišnje preživljenje je 92%, kod T2 je 80%, kod T3 je 63%, a kod T4 iznosi samo 50%<sup>60</sup>.

#### Ulceracija primarnog tumora:

Preživljenje bolesnika s ulceriranim melanomom niže je unutar iste T kategorije, ali vrlo slično neulceriranim melanomima sljedeće više T kategorije<sup>60</sup>.

#### Broj mitozu u primarnom tumoru:

Nađena je značajna ovisnost broja mitozu  $\geq$  1/mm<sup>2</sup> i pada stope preživljenja, te je broj mitozu drugi najsnažniji prediktor, odmah iza debljine primarnog tumora. Najveći značaj ima u grupi T1 tumora, a u klasifikaciji je zamijenio dubinu invazije po Clarku u definiciji T1b tumora. Za važnost tog kriterija ilustrativan je primjer 10-godišnje

preživljenje od 95% kod bolesnika s neulceriranim, T1 melanomima bez mitozama, koje u slučaju postojanja  $\geq 1$  mitozama/mm<sup>2</sup> pada na 88%<sup>60</sup>.

#### Regionalne metastaze:

U kliničkom stadiju T1-4N1aM0 petogodišnje preživljenje je 70% u usporedbi s 39% kod T1-4N3M0<sup>60</sup>. Prisutnost metastaza u limfnim čvorovima je definirana korištenjem HE (hematoksilin-eozin) ili imunohistokemijskog bojenja. Više ne postoji donja granica veličine metastaze, za razliku od prethodne AJCC klasifikacije iz 2002. god. po kojoj je ta granica iznosila 0,2 mm<sup>63</sup>. Također, u prethodnoj klasifikaciji mikrometastaze su bile definirane kao metastaze veličine od 0,2-2,0 mm, a veće od toga su bile definirane kao makrometastaze<sup>63</sup>. Mikrometastaza po novoj reviziji AJCC klasifikacije od 2010. god.<sup>60</sup> definirana je kao bilo koja metastaza dijagnosticirana biopsijom sentinel limfnog čvora odnosno kompletnom limfadenektomijom, a makrometastaze su definirane kao klinički uočljive metastaze u limfnim čvorovima, potvrđene patološki ili u slučajevima makroskopske ekstrakapsularne ekstenzije.

#### Satelitske i intranizitne lezije:

Satelitske metastaze su kožne i potkožne lezije nastale unutar 2 cm od primarnog tumora. Intranizitne metastaze razvijaju se unutar dermalnih i subdermalnih limfnih prostora prije nego dosegnu regionalne limfne čvorove. AJCC ih definira kao bilo koje kožne ili potkožne metastaze koje su više od 2 cm udaljene od primarne lezije, ali nisu dosegle regionalne limfne čvorove. Satelitske i intranizitne lezije čine posebnu N2c kategoriju kada postoje u odsutnosti metastaza u limfnim čvorovima.

Prognoza bolesnika s takvom vrstom metastaza je jednaka onima s multiplim zahvaćenim čvorovima, a kombinirane satelitske/intranizitne i metastaze u limfne čvorove imaju lošiju prognozu i klasificirane su kao N3. Kliničko razlikovanje rekurencije tumora i intranizitne metastaze je često teško i definicije nisu sasvim precizne<sup>60</sup>.

#### Udaljene metastaze:

Bolesnici s metastazama u koži, potkožju i udaljenim limfnim čvorovima, te normalnom razinom LDH (M1a) imaju najbolju prognozu u ovoj grupi i dvogodišnje

preživljenje im je 40%, dok je kod bolesnika koji imaju povišen LDH (M1c) samo 18%<sup>60</sup>.

Tablica 1. TNM kategorije kod melanoma kože<sup>60</sup>

KATEGORIJA T	DEBLJINA PRIMARNOG TUMORA (mm)	ULCERACIJSKI STATUS/MITOZE
Tis	NP	NP
T1	≤ 1,00	a: bez ulceracije i mitoze < 1/mm <sup>2</sup> b: s ulceracijom ili mitoze ≥ 1/mm <sup>2</sup>
T2	1,01-2,00	a: bez ulceracije b: s ulceracijom
T3	2,01-4,00	a: bez ulceracije b: s ulceracijom
T4	> 4,00	a: bez ulceracije b: s ulceracijom
KATEGORIJA N	BROJ METASTATSKIH ČVOROVA	VELIČINA METASTATSKOG DEPOZITA
N0	0	NP
N1	1	a: mikrometastaze* b: makrometastaze**
N2	2-3	a: mikrometastaze* b: makrometastaze** c: satelitske lezije/intranzitne metastaze bez metastatskih čvorova
N3	4+ metastatska čvora ili slijepljeni čvorovi ili satelitske lezije/ intranzitne metastaze s metastatskim čvorovima	
KATEGORIJA M	LOKACIJA UDALJENIH METASTAZA	SERUMSKI LDH
M0	Nema udaljenih metastaza	NP
M1a	Koža	Normalna
M1b	Pluća	Normalna
M1c	Sve druge visceralne metastaze Bilo koja lokalizacija	Normalna Povišena

Legenda: NP = nije primjenjivo, LDH = laktat dehidrogenaza, \*Mikrometastaze = metastaze dijagnosticirane biopsijom sentinel limfnog čvora,\*\* Makrometastaze = definirane kao klinički uočljive metastaze u limfnim čvorovima, potvrđene patološki ili u slučajevima makroskopske ekstrakapsularne ekstenzije. Detaljno objašnjenje na str. 20.

Tablica 2. Klinički TNM i patološki pTNM stadiji bolesti kod melanoma kože<sup>60</sup>

<u>T</u> <u>N</u> <u>M</u>				<u>p T</u> <u>N</u> <u>M</u>			
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Svaki T	N>N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
					Svaki T	N3	M0
IV	Svaki T	Svaki N	M1	IV	Svaki T	Svaki N	M1

Kliničko stupnjevanje se po dogovoru radi nakon kompletne ekscizije primarnog melanoma, a uključuje histološku evaluaciju primarnog melanoma i kliničko/radiološku evaluaciju metastaza. Patološko stupnjevanje uključuje histološku evaluaciju primarnog melanoma i informaciju o regionalnim limfnim čvorovima nakon sentinel ili kompletne limfadenektomije. Iznimka su patološki stadiji 0 i IA jer se kod tih bolesnika ne mora napraviti limfadenektomija<sup>60</sup> (Tablica 2).

Starija životna dob je neovisni negativni prognostički čimbenik s obzirom na preživljenje unutar svake podgrupe T stadija. Isto tako, muški spol i aksijalna lokalizacija primarnog tumora ukazuju na kraće preživljenje, ali su slabiji prediktori nego debljina i ulceracija primarnog tumora<sup>45,52</sup>.

Statistički značajni prognostički čimbenici koji imaju bitno manji utjecaj na preživljenje su prisutnost regresije primarnog tumora, limfatička/krvnožilna invazija, limfocitni infiltrati i tip tumora<sup>42</sup>.

## 1.7. SENTINEL LIMFNI ČVOR

Sentinel limfni čvor (tzv. čvor čuvar) je prvi čvor u koji se drenira limfa iz područja tumora. Kako je kod oboljelih od melanoma pojava udaljenih metastaza glavni uzrok smrti, koncept sentinel limfadenektomije kao pouzdan, minimalno invazivan postupak, osigurava važne prognostičke podatke. Nakon dvostrukog preoperativnog obilježavanja radioaktivnim izotopom i bojom, izvađeni sentinel čvorovi bivaju histološki pregledani standardnim i imunohistokemijskim tehnikama<sup>64</sup>. Ako u sentinel čvoru nema malignih stanica, velika je vjerojatnost da ih nema niti u jednom od regionalnih limfnih čvorova. Sentinel limfadenektomijom se izbjegavaju nepotrebne radikalne disekcije limfnih čvorova u bolesnika koji su s obzirom na karakteristike primarnog tumora visoko rizični za regionalne metastaze. Danas je sentinel limfadenektomija dio standardnog postupka kod klinički lokaliziranog karcinoma dojke i melanoma, a istražuje se i primjena kod brojnih drugih solidnih tumora<sup>65-67</sup>.

Iako se do nedavno nalaz izoliranih tumorskih stanica i mikrometastaza u sentinel limfnim čvorovima smatrao beznačajnim, danas se zna da pogoršava prognozu bolesti<sup>66,68-70</sup>, te je 2010.g. napravljena izmjena postojeće AJCC klasifikacije melanoma, u smislu da nema donje granice veličine tumorskog depozita pri dijagnosticiranju metastaza u limfnim čvorovima<sup>60</sup>.

Osim histološke pretrage, sentinel limfni čvorovi mogu se i citološki analizirati tako da se sa svake rezne plohe svježe razrezanog, nefiksiranog tkiva uzimaju otisci. U svjetlu novih spoznaja o značajnosti metastaza bez obzira na njihovu veličinu, korištenjem još jedne morfološke tehnike za njihovu identifikaciju značajno se povećava ukupna osjetljivost i specifičnost pretrage<sup>71,72</sup>. Velika prednost citološke analize jest intraoperativno kliničko stupnjevanje i mogućnost izvođenja radikalne limfadenektomije u istom aktu<sup>73</sup>.

Važno je naglasiti da je sentinel limfni čvor prvo mjesto prezentacije tumorskih antigena s posljedičnom aktivacijom imunološkog sustava što rezultira promjenom citokinske i stanične kompozicije čvora<sup>74</sup>.

Prema teoriji imunološkog nadzora, imunološki sustav kontinuirano sprečava razvoj tumora i većinom ih eliminira u ranim fazama razvoja. Sentinel čvor bi mogao biti primarno mjesto takvog zbivanja. Visoko specijalizirane APC procesuiraju antigene, prezentiraju ih naivnim limfocitima T i induciraju efektorske limfocite T. Umnoženi limfociti T, specifični protiv tumorskih antigena, iz sentinel čvora bi



ponovo ušli u cirkulaciju i naposljetku bili deponirani na mjestu primarnog tumora sa svrhom da ga unište<sup>74</sup>.

Uloga sentinel čvora u izazivanju tumor-specifične imunosti još uvijek je nejasna, iako se zna da je imunosupresivan, jer je zabilježen manjak kostimulacijskih molekula, kao i reducirana ekspresija maturacijskih biljega dendritičkih stanica, te povećana produkcija imunosupresivnih citokina. To imunosupresivno stanje moglo bi ovisiti i o tipu malignog tumora kao i o stadiju tumorske progresije.<sup>75,76</sup>

## **1.8. DOSADAŠNJA ISTRAŽIVANJA ZNAČAJA BROJA FOXP3+ LIMFOCITA**

Brojni objavljeni radovi ukazuju na vezu prognoze i odgovora na terapiju u odnosu na imune infiltrate u tumorima<sup>77</sup>. Povećani broj Foxp3+ Treg limfocita u tumorskom tkivu smatra se nepovoljnim prognostičkim čimbenikom, kod karcinoma dojke<sup>78-80</sup>, gušterače<sup>81</sup>, pluća<sup>82</sup> i vrata maternice<sup>83,84</sup>. Suprotan prognostički predznak postoji u karcinomima debelog crijeva<sup>85</sup>, glave i vrata<sup>8,6</sup> te kod limfoma<sup>87</sup> u kojima je povezan s boljim preživljenjem, što se tumači regionalnom i funkcionalnom specifičnošću okoliša u kojem ti maligni tumori nastaju.

Rezultati istraživanja intratumorskih infiltrata Foxp3+ limfocita u melanomu su proturječna. Miracco i sur.<sup>88</sup> navode značajno veći broj intratumorskih CD25+Foxp3+ stanica u grupi recidivirajućih melanoma, dok su Ladányi i sur.<sup>89</sup> ustanovili da nema razlike u broju Foxp3+ limfocita koji infiltriraju primarni tumor s obzirom na prognostičke čimbenike i preživljenje.

Do sada objavljeni radovi govore o povećanom broju Treg Foxp3+ limfocita i u limfnim čvorovima zauzetim metastazama melanoma, karcinoma dojke, pankreasa, bubrega, odnosno u perifernoj krvi tih bolesnika<sup>90-93</sup>. Mnoga istraživanja su rađena metodama molekularne dijagnostike i protočne citometrije, no te metode (iako visoko osjetljive u detekciji) imaju ograničenja jer je ekspresija Foxp3 dokazana i u stanicama tumora<sup>94-96</sup>. Štoviše, izgleda da takva ekspresija u stanicama melanoma ima supresivni učinak na efektorske limfocite T, poput učinka Foxp3+ Treg limfocita<sup>97</sup>.

S obzirom da dosadašnja istraživanja govore o imunosupresivnoj ulozi sentinel limfnih čvorova<sup>74,75</sup>, takav okoliš privlači i podržava Foxp3+ Treg limfocite. Tek u

zadnje vrijeme objavljeni su radovi gdje se imunohistokemijski dokazuju Foxp3+ stanice u drenirajućim čvorovima kod karcinoma jajnika<sup>83-84</sup> i sentinel limfnim čvorovima kod karcinoma dojke<sup>98</sup>. Rezultati govore u prilog tome da je povećani broj Treg limfocita nepovoljan prognostički parametar, iako ima i drugačijih izvještaja koji nisu pronašli razliku između sentinel limfnih čvorova s metastazama i bez metastaza<sup>99</sup>.

Postoji tek nekolicina radova u kojima su imunohistokemijski dokazivani Foxp3+limfociti u sentinel limfnim čvorovima oboljenih od melanoma, a obrađuju vrlo malo ispitanika i međusobno su proturječni. Polak i sur. dokazuju vezu progresije melanoma i promjena imunološkog profila u ukupno 26 primarnih tumora i 56 odgovarajućih limfnih čvorova, među ostalim, i ispitivanjem Foxp3+ stanica<sup>100</sup>. Viguier i sur. na samo 12 ispitanika nalaze značajno povećan broj Foxp3+ stanica u metastatskim čvorovima<sup>90</sup>, a Mansfield i sur. na 8 pozitivnih i 12 negativnih sentinel čvorova, te 20 kontrola tvrde da nema značajne razlike između pozitivnih i negativnih<sup>101</sup>. To tumače promjenama u lokalnoj imunosti koje prethode procesu metastaziranja, a što podupiru i nepostojanjem razlika u odnosu na niz drugih celularnih i citokinskih parametara koje su istodobno ispitivali<sup>101</sup>. Tim promjenama tumače svoje rezultate i u odnosu na istraživanja u kojima se došlo do suprotnih zaključaka, tvrdeći da je uloga Treg limfocita u limfnim čvorovima vjerojatno izrazitija u kasnim fazama bolesti, kad čvorovi postanu klinički uočljivi<sup>101</sup>.

## **2. HIPOTEZA**

Broj Foxp3+ limfocita u otiscima sentinel limfnih čvorova povezan je s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima u bolesnika oboljelih od melanoma kože.

### 3. CILJ RADA

Cilj ovog rada je ispitati povezanost broja Foxp3+ limfocita u otiscima sentinel limfnih čvorova sa sedam poznatih prognostičkih čimbenika kod bolesnika oboljelih od melanoma kože:

- 1) spola bolesnika (M ili Ž),
- 2) dobi bolesnika (<60 god i ≥60 godina),
- 3) lokalizacija primarnog tumora: A (aksijalna- trup, glava i vrat) i E (ekstremiteti),
- 4) T stadij ( T1, T2, T3 i T4),
- 5) postojanje ulceracije primarnog tumora (da ili ne),
- 6) prisutnost ili odsutnost malignih stanica u sentinel limfnom čvoru (pozitivni ili negativni čvorovi),
- 7) broj zahvaćenih čvorova (jedan zahvaćen čvor/dva ili više zahvaćenih čvorova).

Osim toga ispitat će se i povezanost broja Foxp3+ limfocita s funkcionalnim stanjem limfnog čvora posredno preko:

- 8) celularnosti otiska

## **4. ISPITANICI I METODE**

### **4.1. Ispitanici**

Od ukupno 94 bolesnika koji su podvrgnuti sentinel limfadenektomiji u Kliničkoj bolnici Dubrava u periodu od veljače 2009. do rujna 2010.g., njih 80 obuhvaćeno je ovim istraživanjem.

14 bolesnika nije obrađeno zbog slijedećih razloga:

1. Podatak o hematološkoj malignoj bolesti kod dva bolesnika (kronična limfatična leukemija i mijeloproliferativna neoplazma);
2. Bolesnici s histološki negativnim čvorovima (histološka dijagnoza je standard) koji su citološki pozitivni/suspektni i nakon revizije citološke dijagnoze kod tri bolesnika;
3. Tehnički razlozi:
  - a) kod četiri bolesnika nisu uzeti otisci svih izvađenih sentinel limfnih čvorova te se histološka i citološka dijagnoza nisu mogle usporediti;
  - b) nema neobojenih otisaka kod dva bolesnika;
  - c) nejasne oznake na stakalcima kod tri bolesnika.

Slijedeći klinički podaci o bolesnicima dobiveni su pretraživanjem bolničke arhive: dob, spol, lokalizacija primarnog tumora, debljina primarnog tumora u milimetrima, postojanje ulceracije primarnog tumora, histološki nalazi (prisutnost ili odsutnost malignih stanica u sentinel limfnim čvorovima, ukupni broj pozitivnih izvađenih limfnih čvorova). Neki podaci koji imaju prognostičku vrijednost nisu se mogli uvrstiti u istraživanje zbog nehomogenosti kliničkih podataka.

### **4.2. Uzimanje otisaka sentinel čvorova**

Nakon dvostrukog obilježavanja radioaktivnim izotopom i bojom, izvađeni sentinel čvorovi razrezani su za tkivnu analizu. Sa svake rezne plohe svježe razrezanog, nefiksiranog tkiva, uzima se 4-6 citoloških otisaka nježnim dodirivanjem površine predmetnim stakalcem. Na stakalcima su se obilježile oznake čvora i rezne plohe s koje je otisak uzet. Nakon kraćeg sušenja na zraku i bojenja Hemacolorom (Merck KGaA,

Darmstadt, Germany) postavljena je citološka dijagnoza. Histološka dijagnoza postavljena je na standardnim HE rezovima i imunohistokemijski (HMB-45, Melan A).

#### **4.3. Imunocitokemijska obrada**

Za Foxp3 imunocitokemijsku obradu koristili su se ostatni, nebojeni citološki otisci, arhivirani na sobnoj temperaturi. Fiksacija otisaka vršila se s FMA (formalin:metanol:acetone) u omjeru 2:19:19, u trajanju četiri minute. Nakon odstranjivanja viška fiksativa, stakla su uronjena u TBS (Tris-Buffered Saline) pH 7,6 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) na 15 minuta. Sljedeći dan uronjena su u TRS (Target Retrieval Solution), pH 9 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) i podvrgnuta zagrijavanju u mikrovalnoj pećnici pet minuta na 350W, te sljedećih 10 minuta na 70W. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi 90 min., stakla su uronjena u TBS sljedećih 30 min. Nakon sušenja izvršena je blokada endogene peroksidaze 3% hidrogen peroksidom kroz 5 min. Nakon ispiranja s TBS, primijenjeno je primarno antitijelo, anti-human Foxp3, clone 236A/E7<sup>102</sup> (eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA), razrijeđeno 1:100. Stakla su inkubirana 24 sata na 4<sup>0</sup> C. Daljnja procedura izvođena je prema uputama proizvođača s LSAB+ System-HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark).

Kao pozitivna i negativna kontrola koristili su se od prije poznati pozitivni otisci. Na negativnu kontrolu je umjesto primarnog antitijela apliciran Antibody Diluent (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Mayer's Hematoksilin (Lillie's Modification) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) korišten je za kontrastno bojenje jezgara.

Gotovi preparati preliveni su s Neo-Mount (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) i prekriveni pokrovnim stakalcem. Pozitivan rezultat imunocitokemijske reakcije jest žućkasto-smeđe obojenje jezgre limfocita (slika 1).

#### **4.4. Brojenje Foxp3+ limfocita**

Otisci su prvo orijentaciono pregledani na povećanju od 40x i 100x radi procjene distribucije Foxp3+ limfocita. Foxp3+ limfociti brojeni su na mjestima gdje ih je bilo najviše, uz povećanje 1000x. Brojenje Foxp3+ limfocita se provelo na dva načina:

1. Relativni broj Foxp3+ limfocita u otisku čvora (% Foxp3+) = broj pozitivnih stanica na 100 limfocita, prosjek 10 brojenja.

2. Apsolutni broj Foxp3+ limfocita (Foxp3+/VP) izbrojen je u 10 VP i izračunat je prosječni broj po VP.

Otisci u kojima je nađeno  $<1\%$  i prosječno  $\leq 1$  Foxp3+ limfocita/VP shvaćeni su kao Foxp3 negativni i pridružena im je vrijednost 0. Otisci u kojima je nađeno  $\geq 1\%$  i  $>1$  Foxp3+/VP, shvaćeni su kao pozitivni, kao i otisci koji su imali  $<1\%$ , ali su im prosječne vrijednosti Foxp3+ limfocita/VP bile  $>1$ . Pozitivnim otiscima pridružene su izračunate vrijednosti broja Foxp3+ limfocita.

#### **4.5. Celularnost otisaka čvorova**

Kako je uočena raznolika celularnost ispitivanih otisaka čvorova, ocjenjivana je prema sljedećim kriterijima:

1 = slaba celularnost = rijetko raspoređeni limfociti, nema gušćih područja (uz povećanje 100x), manje od 10 VP u potpunosti ispunjeno limfocitima (uz povećanje 1000x);

2 = umjerenjena celularnost = u većem dijelu otiska limfociti gusto raspoređeni, pretežno dvodimenzionalni raspored limfocita, više od 10 VP u potpunosti ispunjeno limfocitima (uz povećanje 1000x);

3 = jaka celularnost = limfociti gusto raspoređeni, u većem dijelu otiska nalaze se trodimenzionalne nakupine limfocita.

#### **4.6. Statistička obrada**

Statistička analiza napravljena je korištenjem statističkog programa SPSS verzija 19.0. Prvo je napravljena eksploratorna analiza podataka. Pregledom distribucije kontinuiranih ovisnih varijabli uočeno je odstupanje od normalne distribucije. Zatim su napravljene bivariatne usporedbe, linearna regresija za dvije ovisne kontinuirane varijable i jednosmjerna ANOVA da se ustanovi značajnost povezanosti ovisnih sa svakom neovisnom ispitivanom varijablom. P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima. Dvosmjerna ANOVA provedena je da se utvrdi postoje li značajne interakcije između dobi i celularnosti, jedinih varijabli koje su pokazale statistički značajnu povezanost s brojem Foxp3+ limfocita. Grafički prikazi napravljeni su korištenjem statističkog programa R, verzija 2.11.1<sup>103</sup>.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Karakteristike ispitanika

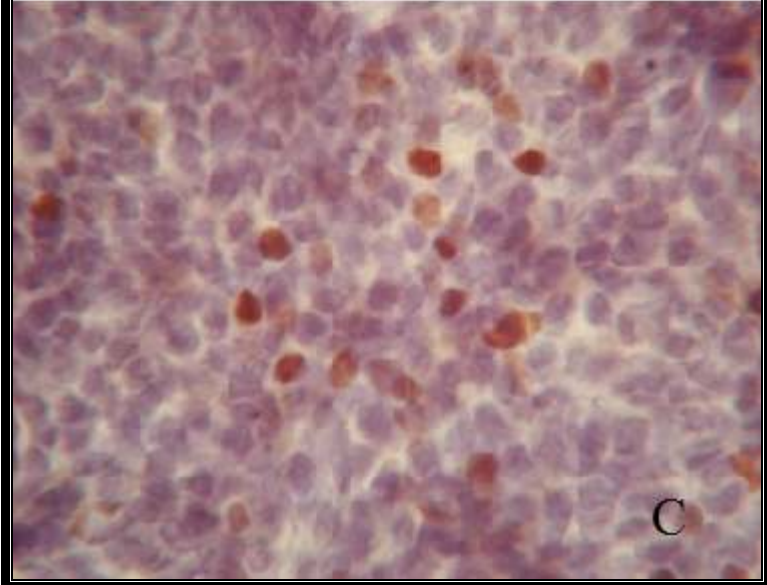
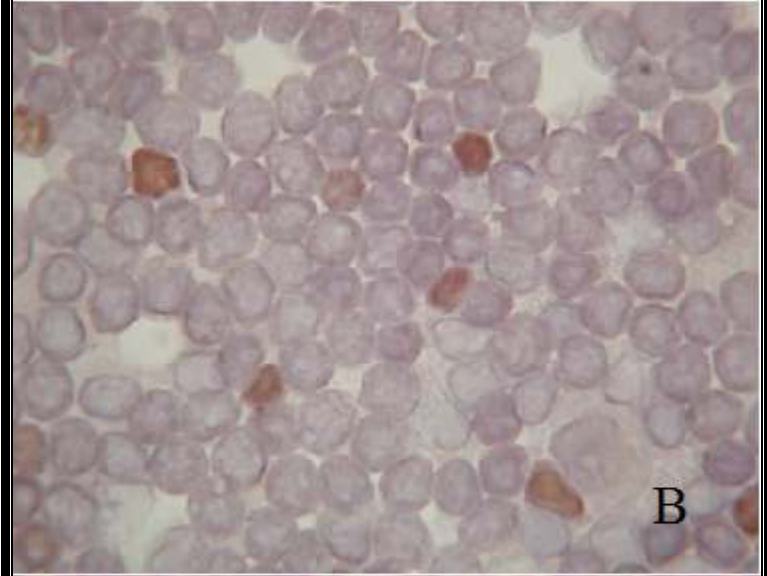
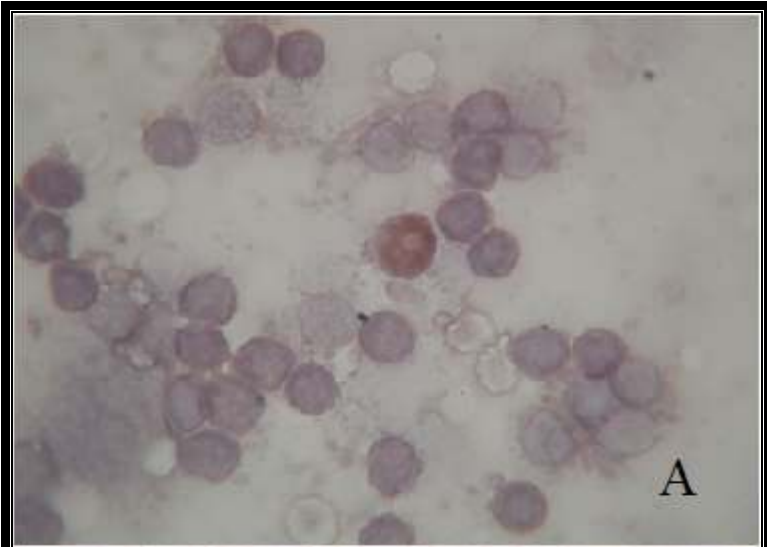
Od ukupno 80 analiziranih bolesnika, bilo je 40 (50%) žena i 40 (50%) muškaraca. Primarni tumor bio je lokaliziran na trupu, glavi ili vratu (aksijalna lokalizacija) kod 41 (52%) bolesnika, a na ekstremitetima kod 39 (48%) bolesnika. Bolesnika mlađih od 60 godina (medijan 48,5; raspon 20-59) bilo je nešto više tj. 48, (60%) u odnosu na one od 60 ili više godina (medijan 68,5; raspon 60-83), kojih je bilo 32 (40%). U tablici 3 prikazane su karakteristike bolesnika u odnosu na obilježja primarnog tumora i na kliničku proširenost bolesti.

Tablica 3. Zastupljenost različitih debljina (T stadij\*) i ulceracije primarnog tumora, prisutnost metastaza i broj zahvaćenih limfnih čvorova

T STADIJ*		ULCERACIJA			PRISUTNOST METASTAZA		BROJ ZAHVAĆENIH ČVOROVA	
		NE	DA	NP**	NE	DA	1	≥ 2
T1	15	10	3	2	14	1	1	0
T2	15	10	2	3	13	2	2	0
T3	25	11	10	4	17	8	6	2
T4	24	2	18	4	10	14	9	5
T <sub>NP**</sub>	1	-	-	1	1	-	-	-
UKUPNO	80	33	33	14	55	25	18	7

\*T stadij T1 ≤ 1,00 mm, T2 1,01-2,00 mm, T3 2,01-4,00 mm i T4 > 4,01 mm; \*\*NP nije poznato





*Slika 1.* Različiti stupnjevi celularnosti u citološkim otiscima sentinel limfnih čvorova. Slaba celularnost(A), umjerena celularnost(B), jaka celularnost(C) (Imunocitokemija Foxp3, x1000)

Ukupno 35 (44%) bolesnika ocijenjeno je negativnima na Foxp3, dok od toga kod četvero bolesnika nije nađen niti jedan Foxp3+ limfocit. U preostalim 45 ispitanika (56%) nađena je Foxp3 pozitivnost. Celularnost otisaka je kod 17 (21%) bolesnika ocijenjena kao slaba, u 52 (65%) kao umjerena, a kod 11 (14%) kao jaka (slika 1).

U tablici 4 definirane su uključene varijable i njihove kategorije.

Tablica 4. Popis i objašnjenje uključenih varijabli.

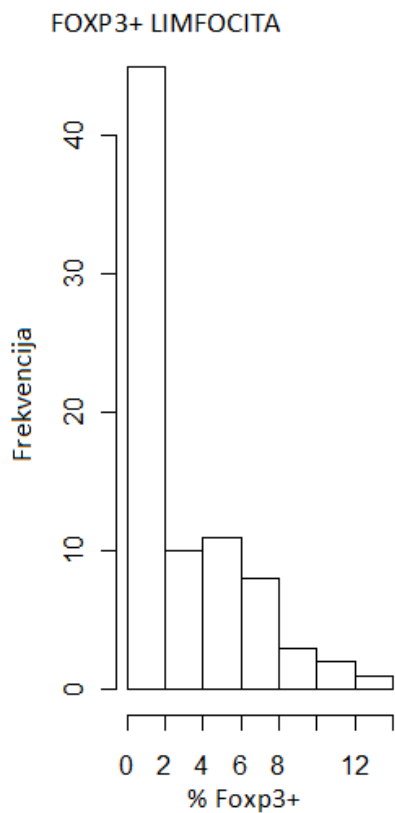
Ime varijable	Kategorija	Definicija
% Foxp3+	kontinuirana	% izbrojenih stanica
Foxp3+/VP	kontinuirana	broj izbrojenih stanica/VP
Spol	1	muški
	2	ženski
Dob	1	< 60
	2	≥ 60
PT lok <sup>1</sup>	1	aksijalna - glava, vrat, trup
	2	ekstremiteti - ruke, noge
T stadij	1	≤ 1.00 mm
	2	1.01 - 2.00 mm
	3	2.01 -4.00 mm
	4	> 4.00 mm
Ulc <sup>2</sup>	0	nije prisutna
	1	prisutna
Hist dg <sup>3</sup>	0	negativan na metastaze
	1	pozitivan na metastaze
N <sup>o</sup> nod <sup>4</sup>	0	nema pozitivnih čvorova
	1	jedan pozitivan čvor
	2	dva ili više poz. čvorova
Cel <sup>5</sup>	1	slaba
	2	umjerena
	3	jaka

<sup>1</sup> PT lok - lokalizacija primarnog tumora, <sup>2</sup> Ulc - ulceracija, <sup>3</sup> Hist dg - histološka dijagnoza, <sup>4</sup> N<sup>o</sup> nod - broj zahvaćenih limfnih čvorova, <sup>5</sup> Cel – celularnost

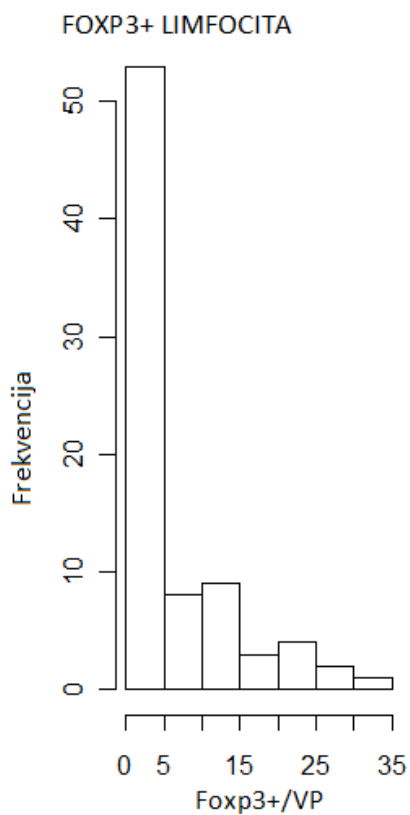
## 5.2. Relativni i apsolutni broj Foxp3+ limfocita

Izračunate su srednje vrijednosti za relativni i apsolutni broj Foxp3+ limfocita. Srednja vrijednost % Foxp3+ je 2,68 ( $N = 80$ ,  $M = 2,68$ ,  $SD = 3,30$ ), a srednja vrijednost Foxp3+/VP je 5,44 ( $N = 80$ ,  $M = 5,44$ ,  $SD = 7,80$ ). Distribucije tih varijabli prikazane su na slici 2.

IZBROJENE RELATIVNE VRIJEDNOSTI



IZBROJENE APSOLUTNE VRIJEDNOSTI

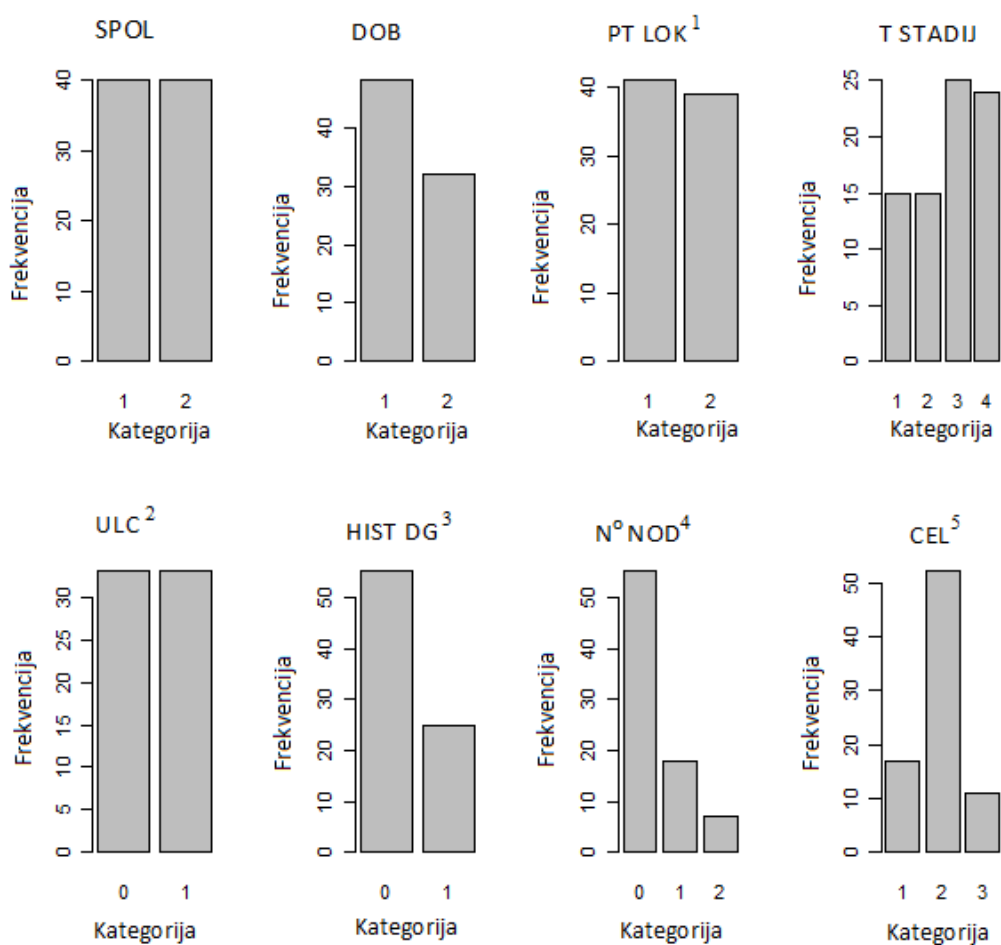


*Slika 2.* Frekvencije kontinuiranih ovisnih varijabli, relativnog i apsolutnog broja Foxp3+ limfocita u otiscima sentinel limfnih čvorova.

Može se vidjeti da obje distribucije frekvencija relativnog i apsolutnog broja Foxp3+ limfocita pokazuju devijaciju. To utječe na ključne pretpostavke planirane regresijske analize. Glavni razlog za nenormalnost tih distribucija je velik broj izmjerenih negativnih vrijednosti.

### 5.3. Frekvencije kategorijskih neovisnih varijabli

Na slici 3 su grafikoni koji prikazuju broj ispitanika po kategorijama pojedinih varijabli. Dobra ravnoteža ispitanika po kategorijama postoji u varijablama spola, lokalizacije primarnog tumora i ulceracije. U dvije varijable, broju zahvaćenih čvorova i celularnosti, vidi se neujednačena raspodjela.

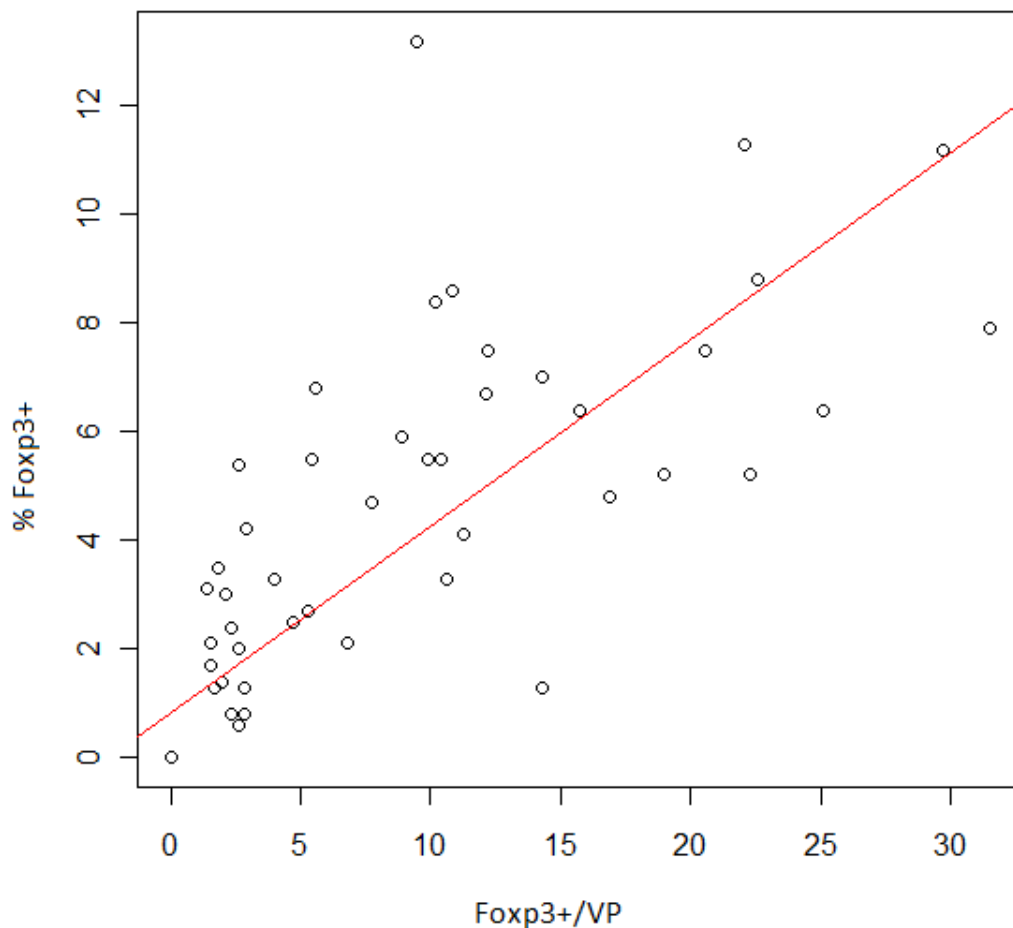


<sup>1</sup>PT lok - lokalizacija primarnog tumora, <sup>2</sup>Ulc - ulceracija, <sup>3</sup>Hist dg - histološka dijagnoza, <sup>4</sup>N° nod - broj zahvaćenih limfnih čvorova, <sup>5</sup>Cel - celularnost

Slika 3. Broj bolesnika po kategorijama ispitivanih neovisnih varijabli

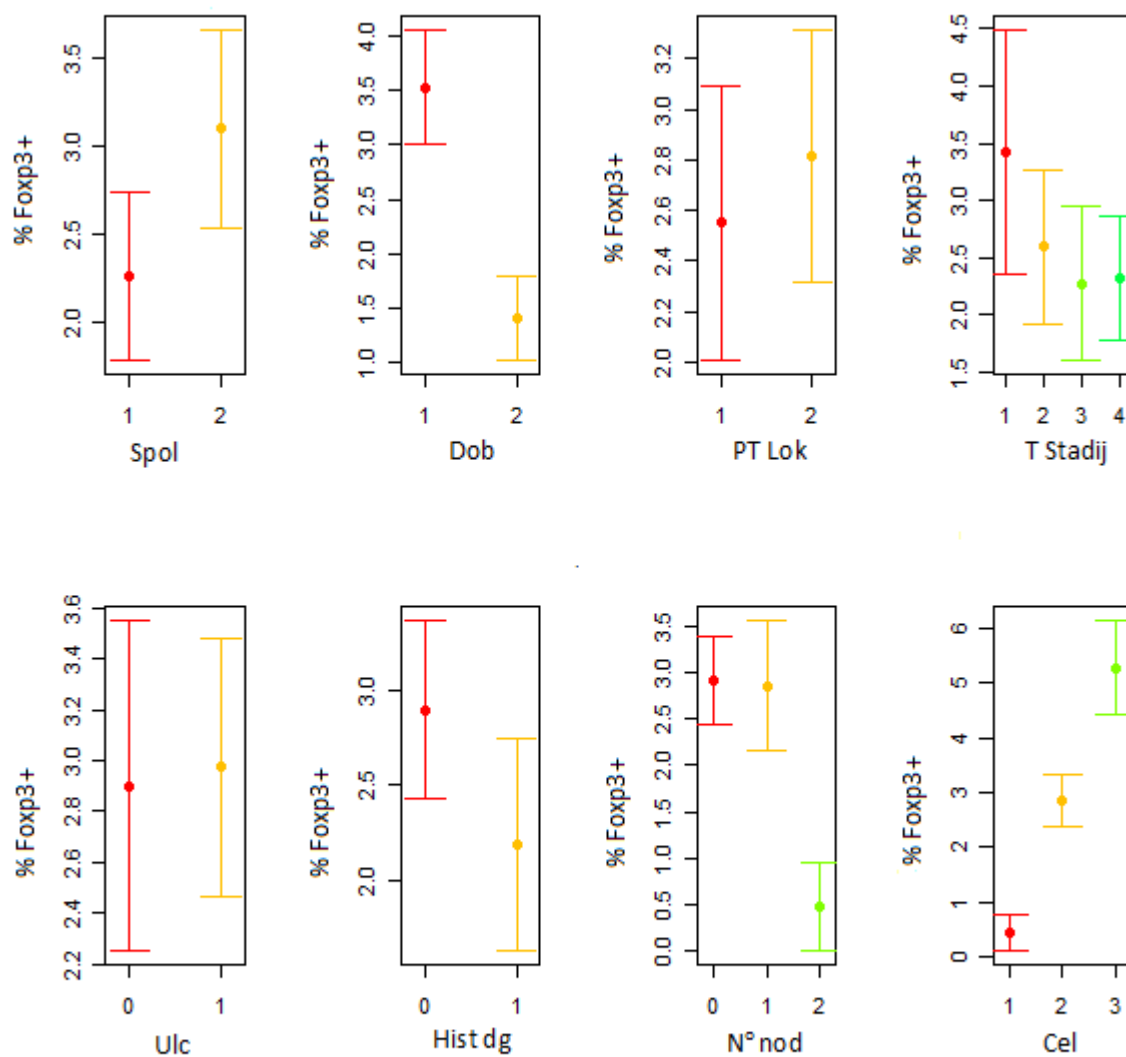
#### 5.4. Usporedbe između dvije varijable

Razmotren je međusobni odnos dvije ovisne varijable % Fexp3+ i Fexp3+/VP i pojedinačno prema svakoj od osam neovisnih varijabli. Prikazana je grafička analiza kao i relevantni izračunati broježani podaci. Linearna regresijska analiza pokazala je statistički značajnu pozitivnu korelaciju između dvije ovisne varijable ( $r = 0.813$ ,  $p < 0.001$ ). Grafički prikaz na slici 4 prikazuje blago povećanje variance kako vrijednosti varijabli rastu.



Slika 4. Grafički prikaz korelacije dvije ovisne varijable, % Fexp3+ i Fexp3+/VP

Slijedi niz grafičkih prikaza ovisnosti među varijablama. Na slici 5 vidi se odnos % Foxp3+ i neovisnih varijabli. Grafički je točkom prikazana srednja vrijednost % Foxp3+ za svaku kategoriju neovisnih varijabli, a stupci predstavljaju 95% interval povjerenja (C.I. prema *engl. confidence interval*) za tu srednju vrijednost. Iz njih je vidljivo da možda postoji ovisnost između % Foxp3+ i dobi, % Foxp3+ i broja zahvaćenih čvorova, te % Foxp3+ i celularnosti.



PT lok - lokalizacija primarnog tumora, Ulc - ulceracija, Hist dg - histološka dijagnoza, N° nod - broj zahvaćenih limfnih čvorova, Cel - celularnost

Slika 5. Grafički prikaz srednjih vrijednosti (točka) i 95% intervali pouzdanosti, C.I. (stupci) za % Foxp3+ po kategorijama ovisnih varijabli

Provedena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) da se utvrdi statistička značajnost svakog od tih odnosa. U tablici 5 prikazani su rezultati ANOVE koji se odnose na % Foxp3+ kao ovisnu varijablu i iz nje se vidi da su samo dob i celularnost statistički značajno povezane s % Foxp3+ limfocita.

Tablica 5. Rezultati jednosmjerne analize varijance (ANOVA) s % Foxp3+ kao ovisnom varijablom

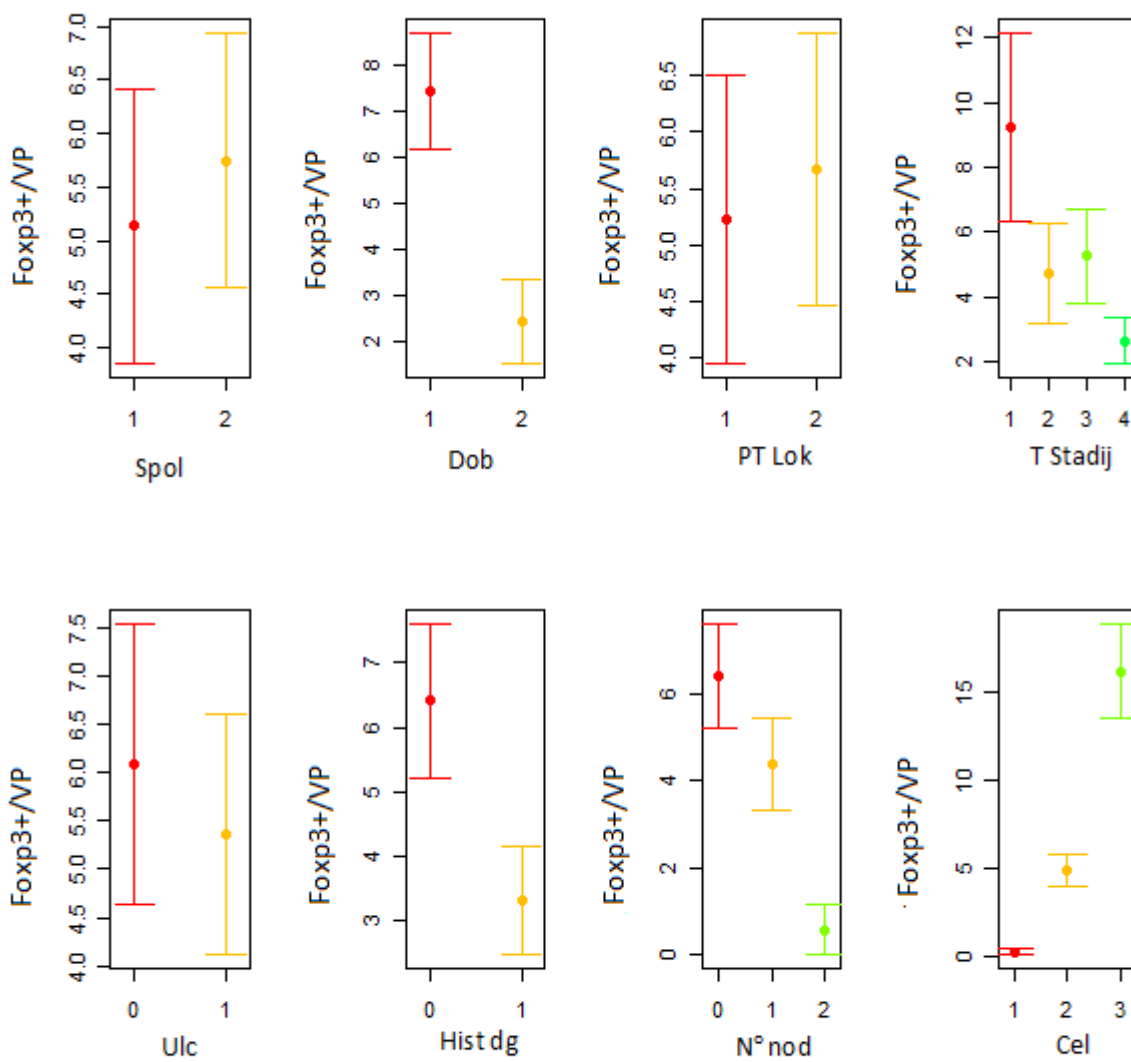
Varijabla	F statistika	Stupnjevi slobode	p-vrijednost	R <sup>2</sup>
Spol	1.29	(1, 78)	0.260	0.02
Dob	8.75	(1, 78)	0.004	0.10
PT lok <sup>1</sup>	0.13	(1, 78)	0.723	0.00
T stadij	0.47	(3, 75)	0.706	0.02
Ulc <sup>2</sup>	0.01	(1, 64)	0.930	0.00
Hist dg <sup>3</sup>	0.81	(1, 78)	0.370	0.01
N <sup>o</sup> nod <sup>4</sup>	1.75	(2, 77)	0.181	0.04
Cel <sup>5</sup>	8.90	(2, 77)	0.000	0.19

<sup>1</sup> PT lok - lokalizacija primarnog tumora, <sup>2</sup> Ulc - ulceracija, <sup>3</sup> Hist dg - histološka dijagnoza,

<sup>4</sup> N<sup>o</sup> nod - broj zahvaćenih limfnih čvorova, <sup>5</sup> Cel - celularnost

Cijeli je postupak ponovljen i s drugom ovisnom varijablom Foxp3+/VP. Na slici 6 vidi se grafička evaluacija, a rezultati ANOVE u tablici 6. Iz grafikona je vidljivo da su varijable dobi, T stadija, histološke dijagnoze, broja zahvaćenih čvorova i celularnosti povezane s apsolutnim brojem Foxp3+ pozitivnih limfocita (Foxp3+/VP). Rezultati ANOVE uz razinu značajnosti  $p < 0.05$ , dozvoljavaju zaključak da su samo dob,  $F(1, 78) = 8.59$ ,  $p = 0.004$ , i celularnost,  $F(2, 77)$ ,  $p < 0.001$ , statistički značajno povezane sa zavisnom varijablom, apsolutnim brojem Foxp3+ limfocita. T stadij,  $F(3, 75) = 2.63$ ,  $p = 0.056$ , i prisutnost metastaza,  $F(1, 78) = 2.79$ ,  $p = 0.099$  nisu dosegli postavljenu razinu statističke značajnosti.





PT lok - lokalizacija primarnog tumora, Ulc - ulceracija, Hist dg - histološka dijagnoza, N° nod - broj zahvaćenih limfnih čvorova, Cel - celularnost

Slika 6. Grafički prikaz srednjih vrijednosti (točka) i 95% intervali pouzdanosti, C.I. (stupci) za Foyp3+/VP po kategorijama ovisnih varijabli.

Tablica 6. Rezultati jednosmjerne analize varijance (ANOVA) s Foxp3+/VP kao ovisnom varijablom.

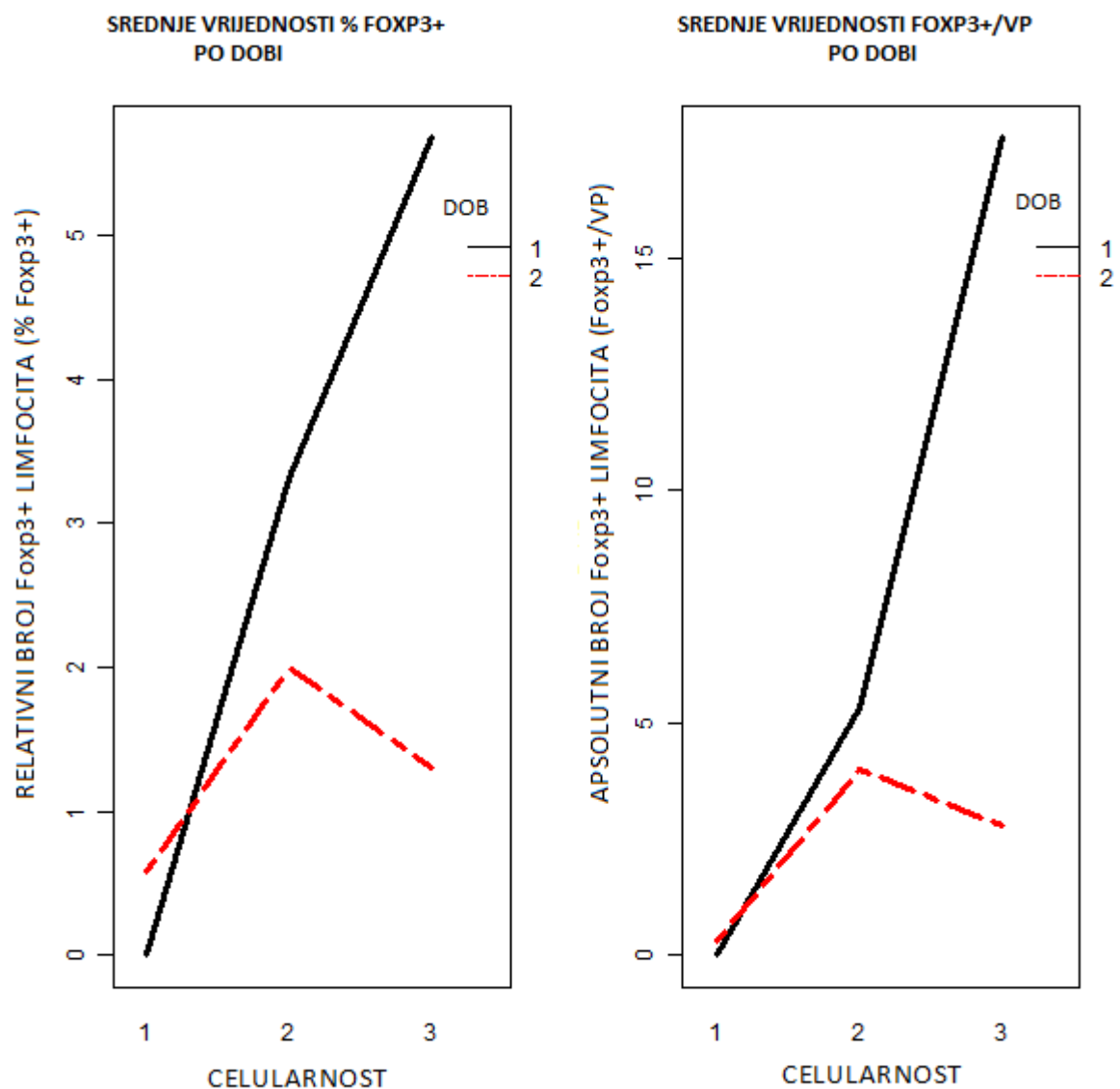
<b>Varijabla</b>	<b>F statistika</b>	<b>Stupnjevi slobode</b>	<b>p-vrijednost</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Spol	0.12	(1, 78)	0.727	0.00
Dob	8.59	(1, 78)	0.004	0.10
PT lok <sup>1</sup>	0.06	(1, 78)	0.802	0.00
T stadij	2.63	(3, 75)	0.056	0.10
Ulc <sup>2</sup>	0.14	(1, 64)	0.708	0.00
Hist dg <sup>3</sup>	2.79	(1, 78)	0.099	0.03
N <sup>o</sup> nod <sup>4</sup>	2.01	(2, 77)	0.141	0.05
Cel <sup>5</sup>	22.22	(2, 77)	0.000	0.37

<sup>1</sup> PT lok - lokalizacija primarnog tumora, <sup>2</sup> Ulc - ulceracija, <sup>3</sup> Hist dg - histološka dijagnoza,

<sup>4</sup> N<sup>o</sup> nod - broj zahvaćenih limfnih čvorova, <sup>5</sup> Cel - celularnost

## 5.5 . Usporedbe između više varijabli

Dvosmjerna ANOVA koristila se za testiranje značajnosti interakcije odnosno međusobnog utjecaja između dobi i celularnosti, varijabli koje su se pokazale najjače povezane s neovisnim varijablama relativnog i apsolutnog broja Foxp3+ limfocita. Na slici 7 vide se grafički prikazi tih interakcija. Zanimljivo je što grafički prikazi (*engl. interaction plots*) upućuju da postoji interakcija između te dvije varijable jer je efekt celularnosti na broj Foxp3+ limfocita različit ovisno o dobi bolesnika, ali regresijskom analizom nije dokazana statistička značajnost.



Slika 7. Interakcijski grafikon između varijabli dobi i celularnosti



Izvor	Tip III Zbroj kvadrata	Stupnjevi slobode	Prosječni kvadrat	F koeficijent	Značajnost	Parcijalni eta kvadrat	Necentrični parametar	Izračunata "Power" <sup>b</sup> vrijednost
Korigirani model	1979.782 <sup>a</sup>	5	395.956	10.362	0.000	0.412	51.812	1.000
Osjećak	594.930	1	594.930	15.570	0.000	0.174	15.570	0.973
DOB	165.451	1	165.451	4.330	0.041	0.055	4.330	0.537
CELULARNOST	339.154	2	169.577	4.438	0.015	0.107	8.876	0.746
DOB * CELULARNOST	169.221	2	84.611	2.214	0.116	0.056	4.429	0.438
Greška	2827.610	74	38.211					
Ukupno	7174.880	80						
Korigirano ukupno	4807.392	79						
a. $R^2 = 0.412$ (Prilagođeni $R^2 = 0.372$ )								
b. Izračunato uz alfa = 0.05								

U tablici 8 prezentirani su rezultati dvosmjerne regresijske ANOVA-e kojoj je Foxp3+/VP ovisna varijabla, a celularnost i dob neovisne varijable. I ta je analiza ukazala na ukupnu značajnost modela,  $F(5, 74) = 10.362$ ,  $p < 0.001$ , ali interakcija nije statistički značajna,  $F(2, 74) = 2.214$ ,  $p = 0.116$ . Za razliku od prethodne analize, u ovom slučaju kada se doda utjecaj celularnosti, dob ostaje statistički značajna,  $F(1, 74) = 4.33$ ,  $p = 0.041$ . Glavni učinak celularnosti je i dalje statistički značajan,  $F(2, 74) = 4.44$ ,  $p = 0.015$ .

Najznačajnije neovisne varijable su celularnost i dob u odnosu na apsolutni broj Foxp3+ limfocita u vidnom polju velikog povećanja (Foxp3+/VP). Relativni broj Foxp3+ limfocita (% Foxp3+) gubi značajnu povezanost s dobi ako se u analizu uključi i celularnost, koja u tom slučaju jedina ostaje statistički značajna.

Iako postoji tendencija povezanosti dobi i celularnosti na temelju interakcijskog grafikona, odnosno da efekt celularnosti na broj Foxp3+ limfocita ovisi o dobi bolesnika, regresijskom analizom nije dokazana statistička značajnost te veze.

Dakle, veći apsolutni brojevi Foxp3+ limfocita nalaze se kod mlađih ljudi ( $p=0.004$ ) i kod jače celularnih otisaka ( $p < 0.001$ ), te granično statistički značajno, kod tanjih primarnih tumora ( $p=0.056$ ).

## 6. RASPRAVA

Fokus ovog rada zbivanja su u sentinel limfnim čvorovima koji dreniraju melanom. Ovim istraživanjem ispitan je broj Foxp3+ limfocita u otiscima sentinel limfnih čvorova te povezanost tog broja s prognostičkim čimbenicima kod melanoma. Nađena je statistički značajna veza povećanog broja Foxp3+ limfocita s mlađom životnom dobi bolesnika (tablice 5 i 6), te granično statistički značajno s tanjim primarnim tumorima (tablica 6). Smjer tih veza je obrnuto proporcionalan, u suprotnosti s dosad objavljenim rezultatima istraživanja, ali se može razložno objasniti. Isto tako, nađena je jaka povezanost povećanog broja Foxp3+ limfocita s većom celularnosti otiska kao pokazatelja funkcionalnog stanja čvora (tablice 5 i 6).

Na temelju interakcijskog grafikona bila je očita međusobna povezanost dobi bolesnika i celularnosti otiska, dakle, da efekt dobi bolesnika na broj Foxp3+ limfocita ovisi o stupnju celularnosti otiska. Međutim, regresijskom analizom nije dokazana statistička značajnost te veze. Moguće je da je ta nepodudarnost uzrokovana veličinom ispitivanog uzorka jer je samo jedan bolesnik iz starije dobne grupe imao jaku celularnosti otiska (slika 7).

Za preostale ispitivane prognostičke čimbenike (spol, lokalizacija primarnog tumora, postojanje ulceracije, broj zahvaćenih čvorova) nije nađena statistički značajna povezanost s brojem Foxp3+ limfocita (tablice 5 i 6).

### Promjene uzrokovane starenjem

Slabija celularnost limfnih čvorova kod starijih ljudi je odraz fizioloških promjena uzrokovanih starenjem. U odraslih ljudi parakortikalne i medularne zone limfnih čvorova pokazuju redukciju ovisno o dobi. Često nedostaju zone germinalnih centara čak i u limfnim čvorovima koji se nalaze u zonama stalne antigene stimulacije<sup>104</sup>.

Ta evidentna morfološka promjena limfnih čvorova odražava promjene imunološkog sustava uzrokovane starenjem, tzv. "*immunosenescence*". Bez obzira na individualne varijacije zbog genetske predispozicije, epigenetske promjene tijekom života imaju imunomodulacijski učinak. Zahvaćene su obje grane imunosti, prirođena i stečena. Nalaze se promjene u otpuštanju makrofagnih citokina, redukcija NK

citotoksičnosti, smanjeno stvaranje antitijela protiv novih antigena, te povećano kumuliranje anergičnih memorijskih stanica. Na efekte starenja posebno je osjetljiva imunost posredovana limfocitima T. Nakon rođenja počinje progresivna involucija timusa, što konačno dovodi do atrofije i smanjene produkcije naivnih limfocita T. Starenje uzrokuje poremećaje u staničnom signaliziranju, produkciji citokina (dominacija proupalnih citokinskih profila), smanjuje se broj antigena što ih prepoznaju limfociti T, neadekvatna je proliferacija nakon antigene stimulacije, smanjuje se aktivnost NKT i CTL stanica. Perzistentne virusne i parazitne infekcije doprinose gubitku imunonadzora i preranog iscrpljivanja T stanica<sup>105-107</sup>.

Starenjem dolazi do povećanja razine Treg limfocita u krvi, ali tome doprinosi i opće stanje organizma, a ne samo dob. Funkcionalna sposobnost Treg limfocita poremećena je, smanjen je omjer efektorskih i memorijskih Treg stanica, te je poremećena komunikacija s kostimulacijskim molekulama. Gubi se ravnoteža između naivnih, efektorskih i Treg limfocita T. Iako se u starijoj dobi iz timusa više ne otpuštaju prirodni Treg limfociti, na periferiji i dalje nastaju inducirani Treg limfociti. Kako su rezistentni na apoptozu, inducirani Treg limfociti se kumuliraju. Razine u krvi variraju, ovisno o individualnoj izloženosti različitim antigenima. Proupalni okoliš, koji svojim staničnim i citokinskim sastavom potiče upalnu reakciju, dodatno stimulira kumulaciju Treg limfocita, tako da se i na taj način pokušava objasniti veća incidencija malignoma u starijoj životnoj dobi. Uslijed smanjene funkcionalne sposobnosti imunološkog sustava dolazi do infekcija i bolesti vezanih uz imunost<sup>108,109</sup>.

Starenjem se gubi imunološka kompetencija, a starija životna dob je glavni rizik za razvoj zloćudnih bolesti. Iako se obično razvoj tumora promatra u kontekstu stanične biologije, jer je potrebno određeno vrijeme za razvoj zloćudnih tumora, promjene u imunološkom sustavu uslijed starenja također mu doprinose. Maligni tumori su, makar u inicijalnoj fazi, imunogenični i kompetentan imunološki sustav teoretski može ravnotežu pomaknuti u korist domaćina. U starijoj životnoj dobi melanom ima veću učestalost i biološki je agresivniji. Moguće se to dešava zbog promjena u imunološkom odgovoru uzrokovanih starenjem<sup>42,52</sup>.



### Povezanost mlađe životne dobi i povećanog broja Foxp3+ limfocita

Iako je mlađa životna dob neovisni prediktor bolje prognoze unutar svakog stadija primarnog melanoma<sup>45,52</sup>, vrlo je zanimljiva činjenica da mlađi bolesnici imaju veću vjerojatnost razviti metastaze u sentinel čvoru. Bez obzira što je pozitivnost sentinel čvorova vrlo jaki negativni prognostički pokazatelj, mlađi ljudi i dalje imaju bolje ukupno preživljenje od starijih<sup>110</sup>. To se tumači drugim, povoljnijim kliničko-patološkim parametrima u mlađih bolesnika, te češćom hematogenom diseminacijom i smanjenom mogućnosti imunološke kontrole sistemne bolesti u starijih bolesnika<sup>111</sup>.

Povezanost mlađe životne dobi i veće učestalosti metastaza u sentinel limfnim čvorovima nedavno je objavljena i u rezultatima velike prospektivne randomizirane studije "The Sunbelt Melanoma Trial" koja je obuhvatila 79 centara u Sjevernoj Americi. Dobiveni rezultat istraživači su pokušali objasniti gore navedenim teorijama ili značajnom heterogenosti u biološkom ponašanju melanoma, čak i u grupi relativno tankih primarnih tumora<sup>112</sup>.

Interesantno je da se samo u jednom objavljenom radu spominje veza između dobi i izražaja Foxp3+ limfocita, kod bolesnica s karcinomom dojke. Za razliku od svih ostalih radova gdje nije nađena povezanost, ovaj je rad rađen na vrlo velikom broju od čak 1445 ispitanica. Nađena je statistički značajna ( $p < 0.001$ ), slaba obrnuta korelacija ( $r_s = -0.11$ ) intratumoralne ekspresije Foxp3+limfocita u karcinomu dojke i dobi bolesnica, ali na žalost nije komentirana. Ispitanice su bile podijeljene u četiri starosne grupe; <40, 40-50, 51-60 i >60 godina, što je moguće utjecalo na jakost korelacije<sup>113</sup>.

U sažetku s godišnjeg sastanka American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2008. god., objavljenom u Journal of Clinical Oncology, izvještava o značajno većem broju Foxp3+ limfocita u sentinel limfnim čvorovima kod bolesnica s karcinomom dojke mlađih od 35 godina<sup>99</sup>.

### Morfološke i funkcionalne promjene regionalnih limfnih čvorova

U ovom radu uočena, jaka povezanost celularnosti i Foxp3 ekspresije, ima svoju podlogu u klinički evidentnim promjenama limfnih čvorova uslijed antigene

stimulacije. Logično je da su promjene u limfnim čvorovima koji dreniraju tumor odraz burnih imunoloških zbivanja.

Postoje radovi u kojima su histološki analizirani morfološki obrasci regionalnih limfnih čvorova<sup>114,115</sup>. Reaktivna hiperplazija, kao odraz aktivnog imunološkog odgovora naspram limfocitne deplecije, smatrana je povoljnim prognostičkim parametrom u tumorima glave i vrata<sup>116,117</sup>. Veći broj reaktivnih limfnih čvorova kod karcinoma debelog crijeva povezan je s jačim limfocitnim infiltratom primarnog tumora i boljom prognozom<sup>118</sup>.

Uočen je i utjecaj blizine primarnog tumora, odnosno veće izloženosti tumorskim antigenima. Različiti čvorovi pokazuju različitu razinu imunokompetencije. Oni koji su bliže tumoru su supresivni, prijemčljivi za metastaze, a oni smješteni dalje su stimulirani, hiperplastični<sup>119</sup>. Potvrda za to eksperimentalno je dokazana reaktivna hiperplazija čvorova kao i pojačana Ki67 aktivnost, kao rani događaj koji je slijedio nakon inokulacije malignih stanica. Pojačana Ki67 aktivnost je neko vrijeme trajala i gubila se nakon pojave metastaza<sup>120</sup>. Smanjena reaktivnost limfnih čvorova odražava funkcionalne abnormalnosti dominantnih CD3+/CD4+ stanica, s posljedičnim smanjenjem CD8+<sup>121</sup>.

U kontekstu rastućeg tumora prezentacija antigena putem APC izgleda da rezultira prolaznom ekspanzijom efektornih stanica u limfnom čvoru, što bi moglo odgovarati morfološkim promjenama reaktivne hiperplazije, a koja je nedovoljna da stvori funkcionalni CTL odgovor<sup>122</sup>. U eksperimentalnim modelima dokazano je da prisutnost potencijalno reaktivnih limfocita T nije dovoljna za odbacivanje uspostavljenog tumora<sup>123</sup>.

Eksperimentalno, imunološki posredovano, odbacivanje malignog tumora zbiva se u ranim fazama tumorskog rasta. Zapaženo je da su protutumorske vakcine efikasne samo ako se daju profilaktički istodobno s zasijavanjem tumora, a da odbacivanje tumora putem tumor specifičnih CTL ovisi o tome je li transplantirani tumor već uspostavio odgovarajući mikrookoliš, što predstavlja ozbiljnu zapreku djelovanju CTL<sup>122</sup>.

Akumulacija regulacijskih limfocita T je vjerojatno rani događaj, važan u ranim stadijima tumorske progresije, kada se sprečava tumor-specifični CD8+ T stanični odgovori u tumor drenirajućim limfnim čvorovima<sup>124</sup>. Eksperimentalni dokaz tomu

jest što deplecija Treg limfocita prije presađivanja tumora dovodi do eliminacije tumora kod 70% laboratorijskih životinja, dok deplecijom Treg limfocita kod već uspostavljenog tumora to nije moguće<sup>40</sup>. Pretpostavlja se da drugi mehanizmi tumorske tolerancije mogu biti dominantni u uznapredovaloj bolesti<sup>40,125</sup>. Moguće je da su ti mehanizmi jedno vrijeme ovisni o Treg stanicama koje služe kao most između početnog stvaranja anti-upalnih citokina i APC koje toleriraju imunogene tvari i koje su u stanju održavati stanje supresije<sup>40</sup>.

### Rana imunosupresija u sentinel čvorovima

Sentinel limfni čvorovi imaju kritičnu ulogu u razvoju lokalne imunosti i mogu odbaciti, uništiti malignu stanicu. Postoji mnogo objašnjenja zašto su mogućnosti sprečavanja metastaza u tim čvorovima ograničene. Najvjerojatnije je da im je reaktivnost promijenjena, suprimirana, odnosno imunomodulirana tumorskim produktima<sup>75</sup>. Danas se uveliko istražuje stanični i citokinski sastav sentinel limfnih čvorova i poznata je činjenica da prolaze kroz morfološke i funkcionalne promjene. Posljedica jest velika heterogenost sastava u individualnim limfnim čvorovima. Pad broja efektorskih CD8 i CD4 limfocita, promjene u razini NK stanica kao i smanjeni odgovor na mitogene nađen je kako u metastatskim tako i u hiperplastičnim regionalnim čvorovima, za razliku od kontrolnih čvorova kod zdravih ljudi gdje nisu zabilježene takve alteracije<sup>75,121</sup>. Veza između imunološke supresije sentinel limfnog čvora posredovane tumorskim produktima i pojave metastaza može se tumačiti i velikim brojem supresorskih stanica, redukcijom parakortikalne zone čvora u kojoj se zbiva prezentacija antigena, redukcijom gustoće DC, te njihovim morfološkim i funkcionalnim promjenama<sup>75,76,126</sup>.

Jedan od dokaza da tkivo melanoma modulira drenirajuće čvorove je i značajno viša razina IL-10, IFN- $\gamma$ , indoleamin 2,3- dioksigenaze (IDO) i supresijskih citokina u limfnim čvorovima bolesnika s rezidualnim melanomom u usporedbi s čvorovima bolesnika s potpuno odstranjenim melanomom<sup>127</sup>. Ta modulacija izgleda počinje vrlo rano u tijeku bolesti, dakle imunosupresivne promjene prethode metastazama kod melanoma, što Mansfield i sur. podupiru nepostojanjem razlika u nizu celularnih i citokinskih parametara kod malignih i nemalignih sentinel čvorova<sup>101</sup>.

### Sistemne imunološke promjene

Tumorska imunost nije ograničena samo na tumorski okoliš i regionalne čvorove, već je u pitanju i sistemni imuni odgovor. Bolesnici oboljeli od melanoma u fazi diseminirane bolesti, u usporedbi s drugim kliničkim stadijima, *in situ* melanomom i zdravim kontrolama, imaju specifične citokinske profile u perifernoj krvi koji podsjećaju na Th2 stanje kronične upalne stimulacije. Istodobno nije nađena nikakva razlika u NK, T i DC stanicama među svim grupama ispitanika<sup>128</sup>. Druga grupa istraživača također nije našla razliku u staničnom sastavu periferne krvi kod oboljelih od metastatskog melanoma, već samo smanjenu produkciju Th1 citokina IFN- $\gamma$  i TNF $\alpha$ . Nadalje, zabilježili su kod dijela bolesnika anergiju limfocita i sklonost apoptozi koja se nije razlikovala u odnosu na zdrave kontrole iste dobi, starijih od 60 godina. Zanimljivo je da su samo ti bolesnici reagirali na primijenjenu terapiju, vakcinaciju s DC i postigli remisiju bolesti<sup>129</sup>.

Međutim, sistemne promjene vjerojatno još nismo u mogućnosti otkriti. Pogotovo ne one promjene koje bi klinički okultan tumor držale pod kontrolom. Potvrda tomu su primjeri slučajnog prijenosa malignih tumora od davaoca u primatelja transplantiranog organa. Objavljen je slučaj davatelja bubrega, liječenog od melanoma 16 godina ranije i klinički izliječenog, od kojeg su oba imunosuprimirana primatelja razvila diseminirani melanom<sup>130</sup>. Shodno tome, postoji mogućnost da u nekoj fazi tumorskog rasta dolazi do diseminacije malignih stanica, koja se klinički ne može dokazati i koja je u stanju mirovanja sve dok se ne stvore uvjeti za daljnji rast.

U tom svjetlu se može promatrati i poznata pojava intrazitnih melanomskih metastaza, koja se još uvijek tumači zasijavanjem dermalnih i subdermalnih limfatičnih kanala malignim stanicama, te se nakon nekog vremena manifestira metastatska bolest. Iako su postojala mišljenja da je uzrokovana kirurškom intervencijom u lokalni limfni bazen tijekom sentinel limfadenektomije, danas se smatra da su posljedica agresivnog biološkog ponašanja primarnog tumora<sup>131</sup>.

U trenutku dijagnoze većine malignih bolesti imunološka ravnoteža je vjerojatno već pomaknuta u korist tumorskog rasta. Moguće je da se neki tumori, poput melanoma, koji se dijagnosticiraju i u vrlo ranim fazama rasta, još uvijek nalaze u fazi ravnoteže, odnosno u fazi razvoja supresije imunološkog sustava. Znajući da su Treg limfociti

samo dio imunološkog mehanizma koji kontrolira tumorski rast, njihova prisutnost ne mora nužno značiti prognostički indikator, već može samo označavati fazu imunološkog odgovora u razvoju tumora. Ishod te faze možda nije konačan i ovisi o nizu lokalnih i sistemnih čimbenika<sup>132</sup>.

Općenito rečeno, moguće je da u nekom trenutku napredovanju tumora drugi mehanizmi preuzimaju kontrolu i tada više ne postoji potreba za lokalnim obuzdavanjem imunološke reakcije putem Treg limfocita. Time bi se mogla objasniti granično statistički značajna tendencija pada broja Foxp3+ stanica s napredovanjem bolesti, viđena u ovom istraživanju. Slično je uočeno u radu Deng L. i sur.<sup>133</sup> kojim su pokazali da kontrolni limfni čvorovi zdravih ljudi sadrže puno veće apsolutne i relativne brojeve Treg limfocita nego maligni čvorovi, a limfni čvorovi u nižim kliničkim stadijima karcinoma debelog crijeva imali su više Treg limfocita nego čvorovi kod uznapredovalih tumora u III i IV stadiju.

### Terapijske mogućnosti

Dosadašnja iskustva s imunoterapijom IL-2 i vakcinacijom tumorskim antigenima pokazala su dvojaki efekt, odnosno osim željenih učinaka stimulacije efektorskih stanica dolazi i do stimulacije i ekspanzije Treg stanica, što dovodi do pojačane supresije i progresivnog rasta tumora<sup>134</sup>. Stoga su Treg stanice jedan od kritičnih čimbenika koje treba uzeti u obzir pri planiranju terapije zloćudnih bolesti. Za neke od konvencionalnih kemoterapijskih sredstava, poput ciklofosfamida i fludarabina, zna se da u malim dozama uzrokuju selektivnu depleciju CD25+Foxp3+ Treg limfocita u tumoru i perifernim odjeljcima (limfni čvorovi, slezena, krv), dok funkcija CD4 i CD8 efektorskih stanica ostaje očuvana<sup>134</sup>. Na žalost, takvi efekti su prolazni jer Treg limfociti imaju veliki kapacitet samoobnavljanja, što je najizrazitije u mikrookolišu progresivno rastućih tumora. Za razvoj anti-tumorskog efekta potreban je visoki stupanj deplecije Foxp3+ Treg limfocita, oko 90%, a današnjom terapijom se postiže tek oko 50%<sup>135</sup>.

Slično djeluju i daclizumab, anti-CD25 monoklonsko antitijelo, te denileukin difitox (Ontak), genetski modificirana bjelančevina koja kombinira IL-2 i difterija toksin, selektivno uništavajući CD25+ stanice<sup>134,135</sup>.

Terapija ipilimumabom odnosno tremelimumabom, blokatorima molekule CTLA-4 u svrhu potenciranja antitumorskog odgovora T efektorskih stanica kod bolesnika u III i IV stadiju melanoma postiže ograničene rezultate. Produžuje život za nekoliko mjeseci samo kod malog dijela bolesnika, i to uz značajne nuspojave<sup>136</sup>.

Korištenjem imunološke terapije javlja se potreba za praćenjem odgovora na takav tip terapije, ali se i postavljaju važna pitanja - tko će odgovoriti na određenu vrstu terapije i kako ona može biti individualno optimizirana<sup>129,137,138</sup>. Predstoji identifikacija biomarkera pomoću kojih će se pokušati procijeniti učinak imunološke terapije u pojedinih bolesnika. Pretpostavlja se da će markeri iz samog tumora biti relevantniji nego oni iz periferne krvi.

Imunološka analiza Foxp3+ možda će se moći iskoristiti i u standardnom kemoterapijskom pristupu. De Kruijf i sur.<sup>139</sup> su utvrdili da iako intratumorska prisutnost Foxp3+ limfocita nije korelirala s relapsom i ukupnim preživljenjem kod ranog karcinoma dojke, u bolesnica koje su imale intratumorske Foxp3+ stanice, kemoterapija bila učinkovitija što tumače restauracijom citotoksičnih limfocita nakon uklanjanja Treg limfocita.

Ono što privlači pozornost u ovom istraživanju je vrlo heterogena prisutnost Treg limfocita unutar ispitivane skupine bolesnika. Nađeno je 44% Foxp3 negativnih i 56% Foxp3 pozitivnih otisaka, s time da su u grupi pozitivnih nađene velike varijacije u njihovom broju. Sličnu raspodjelu dobili su i drugi<sup>113,139</sup>. Stoga se može pretpostaviti da je to ili odraz trenutnog imunološkog zbivanja ili biološke varijabilnosti, što bi moglo utjecati na uspjeh eventualne adjuvantne terapije.

#### *Prednosti, nedostaci i buduće smjernice istraživanja*

Prema dostupnoj literaturi, ovo je prvo istraživanje Foxp3+ limfocita na citološkim otiscima tkiva sentinel limfnih čvorova, kojim se pokušala dobiti informacija o imunološkim zbivanjima u sentinel limfnim čvorovima tijekom progresije melanoma. Uočena je zanimljiva pojava, izrazita povezanost većeg broja Foxp3+ limfocita s većom celularnošću čvora i mlađom dobi. Kao mogući razlog tomu pretpostavljena je veća imunokompetencija mlađih ljudi, s posljedičnom hiperplazijom čvora kao i potrebom za obuzdavanjem te jake imunološke reakcije. Međutim, preostaje

da se značenje te povezanosti provjeri na većem broju bolesnika, te da se obrađeni bolesnici prate kroz određeni vremenski period u kojem će se vidjeti daljnji tijek njihove bolesti, pojava metastaza i preživljenje.

Kao i kod ispitivanja drugih bioloških pojava i u ovom istraživanju je nedostatak nenormalna distribucija dobivenih podataka koji se zbog velikog broja negativnih vrijednosti nisu mogli transformirati, tako da kod analize rezultata treba i to imati na umu.

U budućnosti će se svakako obraditi i podaci o brojevima Foxp3+ limfocita u odgovarajućim nemalignim čvorovima koji su izvađeni istodobno kad i maligni sentinel limfni čvorovi kako bi se moglo analizirati postoji li razlika u ekspresiji Foxp3+ limfocita malignih i nemalignih čvorova u istog bolesnika.

S obzirom da su najveći brojevi Foxp3+ limfocita nađeni kod hiperplastičnih limfnih čvorova, potrebno je procijeniti relativni udio drugih stanica u otiscima čvorova, morfološki jasno raspoznatljivih neutrofilnih i eozinofilnih granulocita, makrofaga, mastocita i plazma stanica i to usporediti s histološkim statusom čvora, celularnošću i ekspresijom Foxp3.

Tijekom imunocitokemijske analize Foxp3, osim u limfocitima sentinel limfnog čvora, u nekim otiscima je uočena je Foxp3 pozitivnost i u metastatskim melanomskim stanicama. Potrebno je ispitati značajnost te ekspresije u odnosu na veličinu metastatskog depozita i broja Foxp3+ limfocita<sup>95-97</sup>.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Ovim istraživanjem nije se potvrdila hipoteza o povezanosti većeg broja Foxp3+ limfocita u otiscima sentinel limfnih čvorova s istraživanim nepovoljnim prognostičkim čimbenicima ( muški spol, starija životna dob, aksijalna lokalizacija, veća debljina i prisutnost ulceracije primarnog tumora, prisutnost malignih stanica u sentinel čvoru, veći broj limfnih čvorova zahvaćenih metastazama ) u bolesnika oboljelih od melanoma kože.
2. Nađena je statistički značajna povezanost većeg broja Foxp3+ limfocita s mlađom životnom dobi bolesnika.
3. Nađena je, statistički granično značajna ( $p=0.056$ ), povezanost većeg broja Foxp3+ limfocita s tanjim primarnim tumorima.
4. Nađena je statistički značajna povezanost većeg broja Foxp3+ limfocita s većom celularnosti otiska kao pokazateljem funkcionalnog stanja čvora.



## 8. SAŽETAK

Sentinel limfni čvor ima ključnu ulogu u aktivaciji imunološke reakcije jer drenira tumorske stanice i mjesto je gdje se tumorski produkti predočavaju naivnim limfocitima T. Tvore ga brojne stanice i topivi imuni medijatori koji usmjeruju imunološku reakciju. CD4+CD25+ limfociti T koji izražavaju transkripcijski faktor Foxp3 smatraju se regulacijskim limfocitima T koji služe kao glavni mehanizam periferne tolerancije i stoga mogu biti odgovorni za oslabljivanje imunološke reakcije protiv tumorskih antigena. U ovom radu uspoređen je broj Foxp3+ limfocita u citološkim otiscima sentinel limfnih čvorova s prognostičkim čimbenicima kod melanoma: dobi, spolom, lokalizacijom, debljinom i ulceracijom primarnog tumora, prisutnošću malignih stanica u limfnom čvoru, te brojem zahvaćenih limfnih čvorova. Osim toga, s brojem Foxp3+ limfocita usporedila se i celularnost otisaka kao pokazatelja funkcionalnog stanja čvora. Provedena analiza utvrdila je značajnu statističku povezanost većeg broja Foxp3+ limfocita s mlađom životnom dobi i celularnijim otiscima. Moguće objašnjenje za to je veća imunokompetencija u mlađih ljudi, samim time i stvaranje jake imunološke reakcije, pa i potrebe za njezinim obuzdavanjem.

## **9. SUMMARY**

### **Foxp3+ lymphocyte counts in cytologic imprints of sentinel lymph nodes in relation to prognostic factors in cutaneous melanoma, Gordana Kaić, 2012.**

The sentinel lymph node has a crucial role in the induction of an immunologic response as the first structure which drains lymph from the tumour. T regulatory lymphocytes are a CD4+CD25+ T-cell subset characterized by expression of transcription factor Foxp3. They serve as a principal mechanism to maintain self-tolerance and may be largely responsible for attenuating antitumor immune responses. The aim of this study was to assess the relationship between Foxp3+ lymphocytes and key prognostic factors for melanoma. An assumption was made by previous investigations that quantity of Foxp3+ lymphocytes is related to worse prognostic features. In this study Fox3+ lymphocyte counts were related to age, gender, localisation, thickness and ulceration of the primary tumor, presence of metastases and number of affected nodes. Additional comparison was done against imprint cellularity. The results indicate that only age and cellularity are significantly related to the number of Foxp3+ lymphocytes. Both variables inversely correlated to Foxp3+ count. It is suggested that younger people are more able to produce stronger immune response, with hyperplastic lymph nodes. Foxp3+ lymphocytes mediate immune reactions in order to stop them, to protect tissue from inflammation damage, or to serve tumor evasion.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Andriole G, Crawford E, Grubb R, et al. Seven year mortality results and related findings from the prostate component of the PLCO randomized cancer screening trial. *N Eng J Med* 2009;360:1310-1319.
2. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Eng J Med* 2009;360:1320-1328
3. Gøtzsche PC, Nielsen M. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;18:CD001877
4. Black WC, Welch G. Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy. *N Engl J Med* 1993;328:1237-1243.
5. Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 1991;64:631-644.
6. Almog N. Molecular mechanism underlying tumor dormancy. *Cancer Lett* 2010;294:139-146.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.
9. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970;13:1-27.
10. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1993.
11. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 2006;6:127-135.
12. Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006;354:1166-1176.
13. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8:523-532.
14. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. Lymphatic tissue, lymphatic organs and the immune system. In: Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI (eds) *Histology: a text and atlas*, 3rd ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p. 330-369.
15. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112:1557-1569.

16. Van Kaer L, Joyce S. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol* 2005;15:429-431.
17. Weiss A, Samelson LE. T-lymphocyte activation. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003:321-363.
18. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. 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.
19. Means GD, Toy DY, Baum PR, Derry JMJ. A transcript map of a 2-Mb BAC Contig in the proximal portion of the mouse X chromosome and regional mapping of the scurfy mutation. *Genomics* 2000;65:213-223.
20. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S, et al. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. *Science* 2003;299:1057-1061
21. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68-73
22. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20-21.
23. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001;27:18-20.
24. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.
25. Chatila T. Molecular mechanisms of regulatory T cell development. *J Clin Immunol* 2008;28:625-630.
26. Nakamura R, Sakakibara M, Nagashima T, et al. Accumulation of regulatory T cells in sentinel lymph nodes is a prognostic predictor in patients with node-negative breast cancer. *Eur J Cancer* 2009;45:2123-2131.
27. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969-1980.

28. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: More questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400
29. Vence L, Palucka AK, Fay JW et al. Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20884-20889.
30. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scan J Immunol*. 2009;70:326-336.
31. Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol*. 2009;39:2331-2336.
32. Finn OJ. Molecular origins of cancer. *Cancer Immunology*. *N Engl J Med* 2008;358:2704-2715.
33. Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumor antigens: Immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol*. 2007;178:1975-1979.
34. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004;21:137-148.
35. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121:1-14.
36. Matzinger P. The Danger model: A renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-305.
37. Hu M, Polyak K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:27-34.
38. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;4:239-252.
39. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315:1650-1659.
40. Elpek KG, Lacelle C, Singh NP, Yolcu ES, Shirwan H. CD4+CD25+ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model. *J Immunol*. 2007;178:6840-6848.
41. Swetter SM. Malignant melanoma. dostupno na:  
<http://emedicine.medscape.com/article/1100753-overview>
42. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol* 2009;129:1666-1674.

43. De Vries E, Bray F, Coebergh JW, et al. Malignant melanoma: Introduction. In: Le Boit PE, Burg G, Weedon G and Sarasin A (eds). Pathology and genetics of skin tumours. WHO Classification of Tumours, Lyon: IARC Press, 2006; p:52-65.
44. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2007., Zagreb 2009., Bilten br.32, str. 23.
45. Lasithiotakis K, Leiter U, Meier F et al. Age and gender are significant independent predictors of survival in primary cutaneous melanoma. *Cancer* 2008;112:1795-1804.
  
46. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-300.
  
47. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med* 2006;355:51-65
48. Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev.* 2006;20:2149-2182.
49. Omholt K, Platz K, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res* 2003;9:6483-6488.
50. Haas NK, Smaley KSM, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment cell Res.* 2005;18:150-159.
51. McGary EC, Lev DC, Bar-Eli M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol Ther.* 2002;1:459-465.
52. Balch CM, Soong S-J, Gershenwald JE et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. *J Clin Oncol.* 2001;19:3622-3634.
53. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* 2006;203:1651-1656.
54. Zbytek B, Carlson JA, Granese J, et al. Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev Dermatol* 2008;3:569-585.
55. Flaherty KT. Is it good or bad to find a BRAF mutation? *J Clin Oncol* 2011;29:1229-1230.

56. Melanocytic tumours In: Le Boit PE, Burg G, Weedon G and Sarasin A (eds). Pathology and genetics of skin tumours. WHO Classification of Tumours, Lyon: IARC Press, 2006; p:50-51.
57. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of malignant melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-908.
58. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: The role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin* 1985;35:130-151.
59. Rigel DS, Russak J, Friedman RJ. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA Cancer J Clin*. 2010;60:301-316.
60. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27(36):6199-6206.
  
61. Ross MI. Early-stage melanoma: Staging criteria and prognostic modeling. *Clin Cancer Res* 2006;12(7 Suppl):2312-3219.
62. Spatz A. The biology of melanoma prognostic factors. *Discov Med* 2010;(50):87-93.
63. UICC International Union Against Cancer. Sobin LH, Wittekind C. (eds.) TNM Classification of Malignant Tumours, 6th ed., Wiley-Liss, 2002. p 10-11.
64. Morton DL, Wen D, Wong JH et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992;127:392-399.
65. Takeuchi H, Kitajima M, Kitagawa Y. Sentinel lymph node as a target of molecular diagnosis of lymphatic micrometastasis and local immunoresponse to malignant cells. *Cancer Sci* 2008;99(3):441-450.
66. Phan GQ, Messina JL, Sonda VK, Zajger JS. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: indications and rationale. *Cancer Control* 2009;16(3):234-239.
67. Jakub JW, Pendas S, Reintgen DS. Current status of sentinel lymph node mapping and biopsy: facts and controversies. *Oncologist* 2003;8:59-68.
68. Weaver DL. Assessing the significance of occult micrometastases in axillary lymph nodes from breast cancer patients. *Breast J* 2006;12(4):291-293.

69. De Boer M, Van Deurzen CHM, Van Dijck JAAM, et al. Micrometastases or isolated tumor cells and the outcome of breast cancer. *N Engl J Med* 2009;361(7):653-656.
70. Tan LK, Giri D, Hummer AJ, et al. Occult Axillary Node Metastases in Breast Cancer Are Prognostically Significant: Results in 368 Node-Negative Patients With 20-Year Follow-Up. *J Clin Oncol* 2008;26(11):1803-1809.
71. Motomura K, Inaji H, Komoike Y, et al. Intraoperative sentinel lymph node examination by imprint cytology and frozen sectioning during breast surgery. *Br J Surg* 2000;87:597-601.
72. Hocevar M, Bracko M, Pogacnik A, Vidergar-Kralj B, Besic N, Zgajnar J. Role of imprint cytology in the intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes for malignant melanoma. *Eur J Cancer* 2003;39(15):2173-2178.
73. Creager AJ, Shiver SA, Shen P, Geisinger KR, Levine EA. Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes for metastatic melanoma by imprint cytology. *Cancer* 2002;94(11):3016-3022.
74. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Immunobiology of the sentinel lymph node and its potential role for antitumour immunity. *Lancet Oncol* 2006;7:1006-1016.
75. Takeuchi H, Kitajima M, Kitagawa Y. Sentinel lymph node as a target of molecular diagnosis of lymphatic micrometastasis and local immunoresponse to malignant cells. *Cancer Sci* 2008;99:441-450.
76. Cohran AJ, Morton DL, Stern S et al. Sentinel lymph nodes show profound downregulation of antigen-presenting cells of the paracortex: implications for tumor biology and treatment. *Mod Pathol* 2001;14:604-608.
77. Jochems C, Schlom J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med.* 2011;236:567-579.
78. Bates GJ, Fox SB, Han C et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 2006;24:5373-5380.
79. Bohling SD, Allison KH. Immunosuppressive regulatory T cells are associated with aggressive breast cancer phenotypes: a potential therapeutic target. *Mod Pathol.* 2008;21:1527-1532.



80. Ohara M, Yamaguchi Y, Matsuura K, Murakami S, Arihiro K, Okada M. Possible involvement of regulatory T cells in tumor onset and progression in primary breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58:441-447.
81. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T et al. Prevalence of Foxp3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5423-5434.
82. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer.* 2006;107:2866-2872.
83. Battaglia A, Buzzonetti A, Baranello C et al. Metastatic tumour cells favour the generation of a tolerogenic milieu in tumor draining lymph node in patients with early cervical cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58:1363-1373.
84. Nakamura T, Shima T, Saeki A et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci.* 2007;98:874-881.
85. Salama P, Phillis M, Grieu F, et al. Tumor-infiltrating FOXP3 T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:186-191.
86. Badual C, Hans S, Rodriguez J et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* 2006;12:465-472.
87. 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;93:193-200.
88. Miracco C, Mourmouras V, Biagioli M et al. Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol Rep.* 2007;18:1115-1122.
89. Ladányi A, Mohos A, Somlai B. et al. FOXP3+ cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res.* 2010;16:303-309.

90. Viguier M, Lemaitre F, Verola O et al. FoxP3 expressing CD4+CD25+high regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004;173:1444-1453.
91. Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S, et al. Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:1169-1177.
92. Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002;169:2756-2761.
93. Ascierto PA, Napolitano M, Celentano E et al. Regulatory T cell frequency in patients with melanoma with different disease stage and course, and modulating effects of high-dose interferon- $\alpha$  2b treatment. *J Transl Med* 2010;8:76
94. Lu H. Foxp3 expression and prognosis: role of both the tumor and T cells. *J Clin Oncol*. 2009;11:1735-1736.
95. Ladoire S, Arnould L, Mignot G et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Canc Res Treat* 2011;125:65-72.
96. Ekbert LM, Tan BS, Browning J, et al. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res* 2008;68(8):3001-3009.
97. Niu J, Jiang C, Li C, Liu L et al. Foxp3 expression in melanoma cells as a possible mechanism of resistance to immune destruction. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60(8):1109-1118.
98. Mansfield AS, Heikkila PS, Vaara AT et al. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC Cancer* 2009; 9:231
99. Thorat MA, Saxena R, Badve SS. Regulatory T cells (T-Regs) in breast cancer sentinel nodes (SN): Foxp3 expression analysis. *J Clin Oncol*. 2008;26(Supplement):22175. ABSTRAKT
100. Polak ME, Borthwick NJ, Gabriel FG, et al. Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. *Br J Cancer* 2007;96(12):1879-1887.

101. Mansfield AS et al . Regional immunity in melanoma: immunosuppressive changes precede nodal metastasis *Mod Pathol* 2011;24:487-494.
102. Woo YL, Sterling J, Crawford R, Van der Burg SH, Coleman N, Stanley M. Foxp3 immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin-embedded tissue: poor correlation between different antibodies. *J Clin Pathol*. 2008;61:969-971.
103. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
104. Luscieti P, Hubschmid T, Cottier H, Hess MW, Sobin LH. Human lymph node morphology as a function of age and site. *J Clin Pathol* 1980;33:454-461.
105. Aspinall R, Goronzy JJ. Immune senescence. *Curr Opin Immunol*. 2010;22:497-499.
106. Pawelec G, Akbar A, Beverley P et al. Immunosenescence and cytomegalovirus: where do we stand after a decade? *Immun Ageing* 2010;7:13
107. Nikolich-Zugich J, Rudd BD. Immune memory and aging: an infinite or finite resource? *Curr Opin Immunol*. 2010;22:535-540.
108. Wang L, Xie Y, Zhu L-J, Chang T-T, Mao Y, Li J. An association between immunosenescence and CD4+CD25+ regulatory T cells: a systematic review. *Biomed Environ Sci*. 2010;23:327-332.
109. Haas J, Fritzsching B, Trübswetter P et al. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2007;179:1322-1330.
110. Paek SC, Griffith KA, Johnson TM et al. The impact of factors beyond Breslow depth on predicting sentinel lymph node positivity in melanoma. *Cancer*. 2007;109:100-108.
111. Chagpar RB, Ross MI, Reintgen DS et al. Factors associated with improved survival among young adult melanoma patients despite a greater incidence of sentinel lymph node metastasis. *J Surg Res* 2007;143:164-8.
112. Mays MP, Martin RCG, Burton A et al. Should all patients with melanoma between 1 and 2 mm Breslow thickness undergo sentinel lymph node biopsy? *Cancer* 2010; 116:1535-44.

113. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;127:99-108.
114. Black MM, Kerpe S, Speer FD. Lymph node structure in patients with cancer of the breast. *Am J Pathol* 1953;29:505-521.
115. Lee YB, Kim CS. Cell reactions to metastatic tumors in the regional lymph nodes—light and electron microscopic studies. *Yonsei Med J* 1976;17:1-14.
116. Manfro G, Cernea C, da Faria PAS et al. Can the lymph node reactivity pattern in the pN0 neck analysis provide any additional prognostic information in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Einstein* 2010;8:68-74
117. Ring AH, Sako K, Rao U, Razack MS, Reese P. Immunologic patterns of regional lymph nodes in squamous cell carcinoma of the floor of the mouth. Prognostic significance. *Am J Surg* 1985;150:461-465.
118. George S, Primrose J, Talbot R et al. Will Rogers revisited: prospective observational study of survival of 3592 patients with colorectal cancer according to number of nodes examined by pathologists. *Br J Cancer* 2006;95:841-847.
119. Hoon DSB, Bowker RJ, Cohran AJ. Suppressor cell activity in melanoma-draining lymph nodes. *Cancer Res.* 1987;47:1529-33.
120. Nagata H, Arai T, Soejima Y, Suzuki H, Ishii H, Hibi T. Limited capability of regional lymph nodes to eradicate metastatic cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:8239-48.
121. Verastegui E, Morales R, Barrera JL. Immunological approach in the evaluation of regional lymph nodes of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Immunol* 2002;102:37-47
122. Ganss R, Arnold B, Hämmerling GJ. Overcoming tumor-intrinsic resistance to immune effector function. *Eur J immunol* 2004;34:2635-2641.
123. Wick M, Dubey P, Koeppen H et al. Antigenic cancer cells grow progressively in immune host without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *J Exp Med* 1997;186:229-238.
124. Liu Z, Kim JH, Falo LD, You Z. Tumor regulatory T cells potently abrogate antitumor immunity. *J Immunol.* 2009; 182:6160-6167.122.
125. Xu L, Xu W, Jiang Z, Zhang F, Chu Y, Xiong S. Depletion of CD4(+)CD25(high) regulatory T cells from tumor infiltrating lymphocytes predominantly induces Th1 type

immune response in vivo which inhibits tumor growth in adoptive immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2009;8:66-72.

126. Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SP, Essner R. Tumor induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nature Rev Immunol* 2006; 6: 659–670.

127. Lee JH, Torisu-Itakara H, Cochran AJ et al. Quantitative analysis of melanoma-induced cytokine-mediated immunosuppression in melanoma sentinel nodes. *Clin Cancer Res* 2005;11:107-112.

128. Nevala WK, Vachon CM, Leontovich AA et al. Evidence of systemic Th2 driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15:1931-1939.

129. Marshal JA, Forster TH, Purdie DM et al. Immunological characteristics correlating with clinical response to immunotherapy in patients with advanced metastatic melanoma. *Immunol Cell Biol* 2006;84:295-302.

130. MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med.* 2003;348:567-568.

131. Pawlik TM, Ross MI, Thompson JF, Eggermont AMM, Gershenwald JE. The risk of in-transit melanoma metastasis depends on tumor biology and not the surgical approach to regional lymph nodes. *J Clin Oncol* 2005;23:4588-4590.

132. Matsuura K, Yamaguchi Y, Ueno H, Osaki A, Arihiro K, Toge T. Maturation of dendritic cells and T-cell responses in sentinel lymph nodes from patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2006;106:1227-1236.

133. Deng L, Zhang H, Luan Y et al. Accumulation of Foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:4105-4112.

134. Qin FX. Dynamic behavior and function of Foxp3+ regulatory T cells in tumor bearing host. *Cell Mol Immunol.* 2009;6:3-13.

135. Li X, Kostareli E, Suffner J, Garbi N, Hämmerling GJ. Efficient Treg depletion induces T-cell infiltration and rejection of large tumors. *Eur J Immunol.* 2010;40:3325-3335.

136. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363:711-723.
137. Ribas A, Comin-Anduix B, Economou JS et al. Intratumoral immune cell infiltrates, Foxp3, and indoleamine 2,3-dioxygenase in patients with melanoma undergoing CTLA4 blockade. *Clin Canc Res.* 2009;15:390-399.
138. Callahan MK, Wolchok JD, Allison JP. Anti-CTLA-4 antibody therapy: Immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. *Semin Oncol.* 2010;37:473-484.
139. De Kruijf EM, Van Nes JGH, Sajat A et al. The predictive value of HLA class I tumor cell expression and presence of intratumoral Tregs for chemotherapy in patients with early breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1272-1280.

## **11. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 1965.g. u Zenici. Udata sam i majka dvoje djece. Osnovnu i srednju školu završila sam u Zagrebu. 1984.g. upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i diplomirala 1990.g. Nakon pripravničkog staža i položenog stručnog ispita radila sam u Domu zdravlja Zaprešić u hitnoj medicinskoj pomoći i jedinici opće medicine. 1995.g. dobila sam specijalizaciju iz kliničke citologije za Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice. Specijalistički ispit položila sam 2000.g, a magistrirala na Sveučilištu u Zagrebu 2005.g. Od 1996. do početka 2012. godine bila sam zaposlena sam na Odjelu za kliničku citologiju i citometriju Kliničke bolnice Dubrava. Od siječnja 2012.g. radim u Zavodu za kliničku citologiju i citogenetiku Kliničke bolnice Merkur.