

Uloga imunohistokemijske obrade u diferencijaciji B staničnih Non-Hodgkin limfoma

Babić, Tea

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:997947>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Tea Babić

**ULOGA IMUNOHISTOKEMIJSKE
OBRADE U DIFERENCIJACIJI B
STANIČNIH NON-HODGKIN LIMFOMA**

Završni rad

Osijek, 2020.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Tea Babić

**ULOGA IMUNOHISTOKEMIJSKE
OBRADE U DIFERENCIJACIJI B
STANIČNIH NON-HODGKIN LIMFOMA**

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Ksenija Marjanović, dr. med.

Rad ima 32 lista, 7 tablica i 12 slika.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem mentorici, doc. dr. sc. Kseniji Marjanović, dr. med. na pruženoj prilici za suradnju, posvećenom vremenu, motivaciji, strpljenju i savjetima pri izradi završnog rada.

Neizmjerne hvala mojoj obitelji, svim prijateljima i kolegama koji su mi uvijek pružali podršku, iznova me motivirali te vjerovali u mene.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Hodgkinov limfom	1
1.2. Non-Hodgkinovi limfomi	2
1.2.1. Etiologija Non-Hodgkinovih limfoma	3
1.2.2. Epidemiologija Non-Hodgkinovih limfoma	3
1.2.3. Lokalizacija Non-Hodgkinovih limfoma	4
1.3. Podjela B-staničnih limfoma	4
1.3.1. Difuzni velikostanični B-limfom (DLBCL)	4
1.3.2. Limfom plaštene zone (MANTLE)	5
1.3.3. Limfom marginalne zone (MALT)	5
1.3.4. Folikularni Non-Hodgkinov limfom (FL)	5
1.3.5. Burkittov limfom	6
2. CILJ	7
3. MATERIJAL I METODE	8
3.1. Ustroj studije	8
3.2. Ispitanici	8
3.3. Metode	8
3.3.1. Bojenje preparata hematoksilin-eozin tehnikom	8
3.3.2. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka tumorskog tkiva	10
3.3.3. Statističke metode	16
4. REZULTATI	17
5. RASPRAVA	22
6. ZAKLJUČAK	25
7. SAŽETAK	26
8. SUMMARY	27
9. LITERATURA	28
10. ŽIVOTOPIS	32

POPIS KRATICA

SZO- Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

HL- Hodgkinov limfom (engl. *Hodgkin lymphoma*)

NHL- Non-Hodgkinov limfom (engl. *Non-Hodgkin lymphoma*)

RS- Reed-Sternbergove stanice (engl. *Reed-Sternberg cells*)

EBV- Epstein-Barrov virus (engl. *epstein-Barr virus*)

NLPHL- nodularna limfocitna predominacija HL-a (engl. *nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma*)

CHL- klasični Hodgkinov limfom (engl. *Classical Hodgkin lymphoma*)

NK- prirodne ubilačke stanice (engl. *natural killer cells*)

iNHL- indolentni Non-Hodgkinov limfom (engl. *indolent Non-Hodgkin lymphoma*)

FL- folikularni limfom (engl. *follicular lymphoma*)

MALT- ektranodalni limfom marginalne zone (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*)

SLL- sitnostanični limfocitni (engl. *small lymphocytic lymphoma*)

DLBCL- difuzni velikostanični B-limfom (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*)

MANTLE- limfom plaštene zone (engl. *mantle cell lymphoma*)

cMANTLE- konvencionalni limfom plaštene zone (engl. *conventional mantle cell lymphoma*)

nnMANTLE- leukemijski nenodalni limfom plaštene zone (engl. *leukemic non-nodal mantle cell lymphoma*)

IHK- imunohistokemija (engl. *immunohistochemistry*)

GCB- B stanice germinalnog centra (engl. *germinal center B-cell*)

ABC- aktivirani podtipovi B-stanica (engl. *activated B-cell*)

HIV- virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)

HZJZ- Hrvatski zavod za javno zdravstvo

HE– hematoksilin-eozin bojenje (engl. *hematoxylin and eosin staining*)

LČ- limfni čvor

GIT- gastrointestinalni trakt

1. UVOD

Limfomi su heterogena skupina neoplazmi limforetikularnog sustava, nastali zloćudnom preobrazbom limfocita. Prema klasifikaciji SZO-a razlikujemo limfoidne neoplazme nastale iz prekursorskih limfoidnih stanica i neoplazme izvedene iz zrelih limfoidnih stanica te se dalje dijele na novotvorine B-staničnog ili T-staničnog porijekla (1, 2). S obzirom na mjesto nastanka limfome dijelimo na nodalne limfome, koji nastaju u limfnim čvorovima te ektranodalne limfome, koji se razvijaju u drugim organima koji sadrže limfatično tkivo. Do zloćudne preobrazbe dolazi uslijed mutacija gena smještenih u limfocitima (3). Klasifikacija limfoma je složena i obuhvaća dvije osnovne skupine: Hodgkinove (HL) i Non-Hodgkinove limfome (NHL) koji se dalje dijele u više od 50 tipova NHL-a i 2 tipa HL-a (4). Prema klasifikaciji SZO-a iz 2017. godine otkriveno je > 40 zrelih B-staničnih neoplazmi i > 25 zrelih T i NK staničnih neoplazmi. Približno 15 % limfoma klasificirano je kao Hodgkinov, a ostali su klasificirani kao Non-Hodgkinov limfom (5). Danas koristimo klasifikaciju SZO-a iz 2017. godine koja dijeli NHL u više od 50 tipova (2). I Hodgkinov i Non-Hodgkinov limfom zloćudne su neoplazme bijelih krvnih stanica, limfocita. Glavna je razlika u Reed-Sternbergovim (RS) stanicama, zrelim malignim B-limfocitima koje su u HL-u prisutne, velike te sadrže jednu, dvije do nekoliko jezgara. U NHL-u Reed-Sternbergove stanice rijetko su prisutne (6, 7). Limfomi se također razlikuju s obzirom na prosječnu dob oboljelih osoba (značajno viša kod NHL-a), broj novodijagnosticiranih slučajeva godišnje (8 puta više NHL-a), prosječno trajanje života oboljelih te broj tipova i podtipova (8).

1.1. Hodgkinov limfom

Hodgkinov limfom je unilokularno ili diseminirano maligno povećanje stanica karakterizirano prisutnošću malog broja kancerogenih Hodgkinovih ili Reed-Sternbergovih stanica i njihovih varijanti. RS stanice okružene su masovnim upalnim infiltratom koji sadrži velik broj eozinofila, neutrofila, plazma stanica te manji ili veći broj upalnih T-limfocita (9, 10). Godišnja incidencija Hodgkinovog limfoma u zemljama zapadnog svijeta je oko 3/100 000 osoba te obuhvaća oko 10 % svih novodijagnosticiranih limfoma. Omjer pojavnosti kod muškaraca i žena iznosi 1,5:1 te se najčešće javlja u dobi između 20 i 34 godine (10, 11). Etiologija nastanka HL-a je nerazjašnjena. Poznato je da nastaje kao posljedica zloćudne pretvorbe stanica B-limfocitnog podrijetla od kojih će se razviti multinuklearne RS stanice, no uzrok je i dalje nepoznat. Značajnu ulogu u razvoju imaju imunodeficientna stanja, okolišni

čimbenici, infekcije Epstein-Barrovim virusom, *Mycobacterium tuberculosis* te brojnim drugim patogenima. EBV sve češće se otkriva u RS stanicama pozitivnih HL uzoraka zemalja u razvoju, a rjeđe u industrijaliziranim zemljama Sjeverne Amerike i zapadne Europe (10, 11). Hodgkinov limfom prema najnovijoj klasifikaciji podijeljen je u dva zasebna tipa: a) nodularna limfocitna predominacija HL-a (NLPHL) i b) klasični Hodgkinov limfom (CHL) koji se dijeli u 4 podtipa (2, 12).

1.2. Non-Hodgkinovi limfomi

Non-Hodgkinovi limfomi (NHL) heterogena su skupina primarnih zloćudnih tumora limfatičnih stanica. Uključuju brojne podtipove od kojih svaki ima različitu epidemiologiju, etiologiju, morfološka, imunofenotipska i klinička obilježja. Najveća incidencija je u razvijenim zemljama Sjeverne Amerike, sjeverne i južne Europe, Australije i Novog Zelanda (13). Klasificirani su na temelju stupnja sazrijevanja (nezreli prema zreloom) i stanicama podrijetla (B-stanica, T-stanica ili NK stanica (prema engl. *natural killer* – prirodne ubilačke stanice) (14). NHL je skupina malignih neoplazmi koja po svojim kliničkim obilježjima može biti indolentna ili agresivna (5). Indolentne limfome (iNHL) karakterizira sporiji rast, dugotrajnija priroda bolesti s učestalim relapsima, ali bolji odgovor na liječenje te niži stupanj zloćudnosti. Godišnje se dijagnosticira u prosjeku 22 000 iNHL-a. Među najčešće vrste iNHL-a ubrajamo folikularni limfom (FL) koji predstavlja oko 25 % svih novodijagnosticiranih NHL-a i oko 70 % iNHL-a, limfom marginalne zone (MALT, prema engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*) i sitnostanični limfocitni (SLL, prema engl. *small lymphocytic lymphoma*) (15, 16). Agresivni limfomi obilježeni su visokim stupnjem zloćudnosti, brzim rastom te ukoliko se ne liječe, brzo dovode do smrti. Međutim, veliki je postotak i potpunog ozdravljenja bez remisija i relapsa primjenom imunokemoterapije. Najčešće vrste agresivnog NHL-a su difuzni velikostanični B-limfom (DLBCL, prema engl. *diffuse large B-cell lymphoma*), Burkittov limfom te limfom plaštene zone (MANTLE, prema engl. *mantle cell lymphoma*) (5).

Ovisno o stanici limfocita u kojoj se događa zloćudna mutacija te imunohistokemijskom (IHK) nalazu, NHL se svrstava u B-limfocitne i T-limfocitne limfome. Incidencija B-staničnih limfoma niža je u zemljama u razvoju, dok je incidencija T-staničnih limfoma viša, nego u razvijenim zemljama. Unatoč razlici u pojavnosti između zemalja, B-limfomi puno su češći u odnosu na T-limfome, s postotkom pojavnosti 85 – 90 % (17).

1.2.1. Etiologija Non-Hodgkinovih limfoma

Etiopatogeneza većine NHL-a nije poznata, no danas se zna da su genetske promjene jedan od uzroka nastanka ove bolesti (9). Povećana incidencija javlja se u imunokompromitiranih osoba (transplantiranih, imunosupresivna terapija), osoba oboljelih od autoimunih bolesti (Hashimotov tiroiditis, Sjögranov sindrom) te u virusnim i bakterijskim infekcijama (18). Dokazana je i povezanost između načina života i čimbenika okoliša. Prema tim istraživanjima pušenje, korištenje boja za kosu, pretilost i dr. potiče na razvoj, dok konzumiranje alkohola smanjuje rizik od razvoja limfoma, međutim ta su se istraživanja u mnogočemu pokazala kontroverznima (19).

1.2.2. Epidemiologija Non-Hodgkinovih limfoma

Godišnje se u svijetu na 100 000 stanovnika dijagnosticira više od 10 novih slučajeva Non-Hodgkinovih limfoma (12). Non-Hodgkinov limfom čini oko 4 % svih malignih neoplazmi u Sjedinjenim Američkim Državama te je ujedno sedma najčešća maligna neoplazma i kod muškaraca i kod žena. Prema analizama *American Cancer Society* pretpostavlja se kako će broj novodijagnosticiranih slučajeva u SAD-u u 2020. godini biti > 77 200. U trenutku dijagnoze više od polovice bolesnika bit će u dobi od 65 ili više godina (20). Velika Britanija godišnje bilježi oko 13 700 novih slučajeva NHL-a, koji u toj državi predstavlja šestu najčešću malignu neoplazmu i čini 4 % svih novih slučajeva malignih neoplazmi. Svake godine više od 1/3 svih NHL-a dijagnosticirano je kod osoba starijih od 75 godina (21).

Konkretni podatci o incidenciji Non-Hodgkinovih limfoma B-stanica u Hrvatskoj na godišnjoj razini nisu izdani. Međutim, Hrvatski zavod za javno zdravstvo (HZJZ) svake godine objavljuje podatke o incidenciji raka u Hrvatskoj za prethodnu godinu, unutar kojih se nalazi i ukupna incidencija pojedine vrste NHL-a, od koje je najzastupljeniji difuzni NHL koji čini više od polovice svih Non-Hodgkinovih limfoma (Tablica 1.1.) (22 – 25).

Tablica 1.1. Incidencija podvrsta NHL-a u Hrvatskoj za razdoblje od 2014. do 2017. godine prema HZJZ-u.

VRSTA NHL-a	2014	2015	2016	2017	UKUPNO
Folikularni (nodalni)	94	62	116	94	366
Difuzni	308	318	370	360	1356
Lymphomata T cellularum peripherica et cutanea	23	27	35	33	118
NHL nespecificirani	179	157	125	136	597
Ukupno	604	564	646	623	2437

1.2.3. Lokalizacija Non-Hodgkinovih limfoma

Non-Hodgkinovi limfomi najčešće zahvaćaju limfne čvorove, ali mogu se razviti i u vannodalnom tkivu. Podatci vezani za učestalost vannodalnih Non-Hodgkinovih limfoma razlikuju se u literaturi i kreću se u rasponu od 24 % do 40 % (18). 30 – 50 % svih vannodalnih limfoma čine Non-Hodgkinovi limfomi gastrointestinalnog sustava. Najčešće zahvaćaju želudac, zatim tanko i debelo crijevo (26). NHL se često javlja i u sinusima, štitnoj žlijezdi, dojci, bubrezima i dr. U prosjeku 25 % vannodalnih limfoma javi se u području Waldejerova prstena, na glavi i vratu (27).

1.3. Podjela B-staničnih limfoma

Klasifikacija SZO-a iz 2017. godine razlikuje > 40 različitih tipova B-staničnih limfoma koji se dijele prema morfologiji (način rasta – folikularni/difuzni) te prema vrsti malignih stanica B-stanične loze. Među najčešće ubrajamo folikularni limfom (FL), limfom marginalne zone (MALT, prema engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*), sitnostanični limfocitni (SLL, prema engl. *small lymphocytic lymphoma*), difuzni velikostanični B-limfom (DLBCL, prema engl. *diffuse large B-cell lymphoma*), Burkittov limfom, te limfom plaštene zone (MANTLE, prema engl. *mantle cell lymphoma*) (2, 5, 12).

1.3.1. Difuzni velikostanični B-limfom (DLBCL)

Difuzni velikostanični B-limfom najčešća je podvrsta Non-Hodgkinovih B-limfoma i predstavlja oko 35 % svih novodijagnosticiranih NHL-a. Na temelju podrijetla stanica podijeljen je u dvije glavne skupine: DLBCL iz stanica germinalnog centra (GCB) i aktivirani podtipovi B-stanica (ABC) (28). B-stanice izrazito su velike i na površini eksprimiraju B-

stanične antigene CD20, CD19, ali i CD10, bcl2, IgM, IgG i dr. Može se pojaviti u bilo kojoj dobi, međutim srednja dob pri dijagnosticiranju je oko 60 godina (12). CD30 pozitivan je u 10 – 20 % slučajeva DLBCL-a, CD5 u 5 – 10 %, a ekspresija Cyclin D1 zabilježena je u 1,5 – 15 % DLBCL slučajeva (28).

1.3.2. Limfom plaštene zone (MANTLE)

Limfom plaštene zone (MANTLE, prema engl. *mantle cell lymphoma*) je zrela, agresivna podvrsta NHL-a B-staničnog podrijetla koja često eksprimira CD5 i predstavlja 5 – 6 % svih NHL-a. Okarakterizirana je prisutnošću translokacije t(11;14)(q13;q32) što uzrokuje prekomjernu ekspresiju cyclina D1. Klasificiran je u dva podtipa: konvencionalni (cMANTLE) i leukemijski nenodalni (nnMANTLE). Medijan oboljelih osoba je oko 60 godina i četiri puta češće obolijevaju muškarci (29, 30). Imunohistokemijom stanice su uglavnom CD5+, CD10-, CD20+, bcl6-, cyclin D1+ (31).

1.3.3. Limfom marginalne zone (MALT)

Limfom marginalne zone (MALT, prema engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*) ekstranodalni je limfom čija histološka značajka uključuje infiltraciju rubne zone i difuzno širenje u okolno tkivo. Čini otprilike 8 % svih NHL-a i nastaje u širokom rasponu različitih izvanstaničnih mjesta, s najvećom učestalošću u želucu, slijede pluća, očna adneksa i štitnjača, a s malim postotkom u tankom crijevu (32). Javlja se kod osoba srednje životne dobi te starijih, s nešto većim postotkom kod žena. Imunohistokemijski tumorske stanice najčešće su CD5-, CD10-, CD20+, CD23-, CD43+/-, cyclin D1- (31).

1.3.4. Folikularni Non-Hodgkinov limfom (FL)

Folikularni limfom (FL) druga je najčešća podvrsta B-staničnih NHL-a i najčešća vrsta indolentnog limfoma koja čini 20 – 30 % svih novodijagnosticiranih NHL-a u zapadnim zemljama. Prosječna dob oboljelih je 65 godina. Podijeljen je u tri stupnja: 1, 2 i 3A stupanj smatraju se histološki niskim stupnjem i indolentnom bolešću, dok se 3B obično tretira kao agresivni stupanj (33). FL nastaje zloćudnom pretvorbom normalnih B-stanica germinalnog centra (GCB). U 85 % slučajeva javlja se translokacija t(14;18)(q32;q21) koja rezultira prekomjernom ekspresijom gena bcl2 koji inače nije zastupljen u normalnim stanicama (34).

Klinički je tijekom heterogen, karakteriziran visokom stopom odgovara na terapiju i očekivanim preživljenjem oko 20 godina. FL ima dugotrajan tijek s višestrukim remisijama i relapsima i ne može se u potpunosti izliječiti (35). Tumorske stanice najčešće su CD10+, CD20+, bcl2+, bcl6+ (31).

1.3.5. Burkittov limfom

Burkittov limfom pripada skupini najbrže rastućih agresivnih Non-Hodgkinovih limfoma s vremenom udvostručenja od 24 do 48 sati (9). Karakterizira ga prisutnost recipročne translokacije (t(8;14)) koja uključuje c-myc gen. S obzirom na epidemiologiju podijeljen je u 3 podtipa: endemični (afrički), sporadični (neendemični), te vezan uz imunodeficienciju. Sporadični tip zastupljen je u SAD-u i zapadnoj Europi s učestalošću od 3 slučaja na milijun ljudi. Endemični je uglavnom ograničen na ekvatorijalnu Afriku s incidencijom 5 slučajeva na 100 000 ljudi. Imunodeficientni Burkittov limfom najčešće je prisutan kod HIV (prema engl. *human immunodeficiency virus*) pozitivnih osoba koje imaju relativno veći broj CD4 limfocita (>200 st/ μ L). Otprilike polovica pacijenata mlađa je od 40 godina (36, 37). Imunohistokemijski tumorske stanice su uglavnom CD5-, CD10+, CD20+, CD23-, bcl2-, bcl6+, TdT- (31).

2. CILJ

Cilj ove retrospektivne studije:

1. Utvrditi broj novodijagnosticiranih Non-Hodgkinovih B-limfoma u petogodišnjem periodu u KBC-u Osijek.
2. Ispitati učestalost B-staničnih Non-Hodgkinovih limfoma u odnosu prema spolu, dobi i tipu u petogodišnjem periodu u KBC-u Osijek.

Kod svih B-staničnih Non-Hodgkinovih limfoma određivat će se imunohistokemijski profil, radi diferencijacije i klasifikacije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao presječno, a pri izradi završnog rada koristili smo se retrospektivnim tipom studije.

3.2. Ispitanici

U radu smo koristili postojeću medicinsku dokumentaciju (arhivu) Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu, dijagnosticiranih B-staničnih Non-Hodgkinovih limfoma, operiranih u KBC-u Osijek u razdoblju od siječnja 2014. do prosinca 2018. godine. Ispitanici su se vodili pod zaporkom broja biopsije. Obrada i rezultati korišteni u studiji neće utjecati na dijagnozu i liječenje bolesnika.

3.3. Metode

Na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek u dijagnostici B-staničnih Non-Hodgkinovih limfoma određuje se lokalizacija te histološki tip, zbog kojeg se provodi imunohistokemijska obrada tumorskog tkiva.

Analiza se obavljala na postojećim arhivskim formalinski fiksiranim parafinskim blokovima tumorskog tkiva. Ujedno su se koristila i arhivska stakla sa standardnim (hematoksilin-eozin) kao i imunohistokemijskim bojenjem kod kojih su standardno određeni CD5, CD20, CD3, CD10, cyclin D1, bcl2, bcl6 i Ki67 indeks proliferacije.

Tumorsko tkivo bilo je fiksirano u 10 % formalinu, dehidrirano u različitim koncentracijama alkohola i uklopljeno u parafinske blokove koji su rezani u rezove debljine 4 – 5 mikrometara te bojani standardnom hematoksilin-eozin metodom. Tumorsko je tkivo pregledano svjetlosnim mikroskopom.

3.3.1. Bojenje preparata hematoksilin-eozin tehnikom

Hematoksilin je bazična boja koja plavo boji bazofilne sastojke, npr. jezgru i prikazuje jezgrine detalje. Eozin je kisela boja koja boji acidofilne strukture (citoplazmu i mišićno tkivo) različitim intenzitetima crvene boje. Potrebne su sljedeće kemikalije: Biognost

hematoksilin, 1 %-tna otopina eozina, apsolutni alkohol i supstitut (38). Bojenje hematoksilin-eozin preparata vrši se u automatskom bojaču Tissue-tek prisma (slika 3.1. A i B):

Protokol za automatsko bojenje hematoksilin-eozin:

Deparafinizacija u supstitutu..... 2 x 15 minuta

Ispiranje u apsolutnom alkoholu..... 3 x 5 minuta

Ispiranje pod tekućom vodom..... 5 minuta

Nanošenje Biognost hematoksilin..... 8,5 minuta

Ispiranje pod tekućom vodom..... 3 x 3 minuta

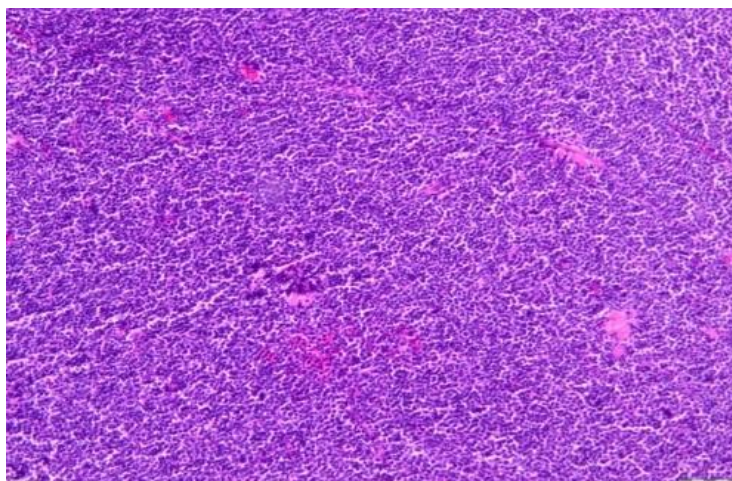
Nanošenje 1 %-tne otopine eozina..... 5 minuta

Ispiranje viška boje pod tekućom vodom 3 x 5 minuta

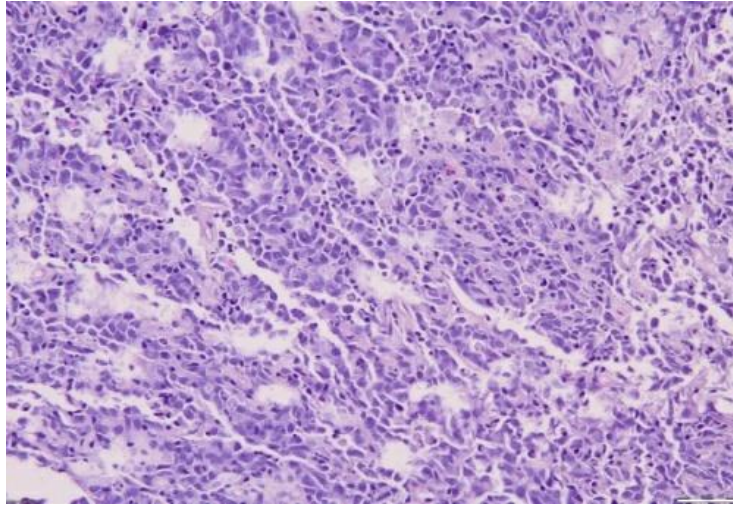
Ispiranje u apsolutnom alkoholu..... 3 x 10 minuta

Izbistravanje u supstitutu 3 x 15 minuta

Pokrivanje u automatskom pokrivaču Tissue-tek film za montiranje trajnih preparata.



Slika 3.1. A- DLBCL, hematoksilin-eozin bojenje (biopsija 8733-17, 100X)



Slika 3.1. B- DLBCL, hematoksilin-eozin bojenje (biopsija 14252-18, 200X)

3.3.2. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka tumorskog tkiva

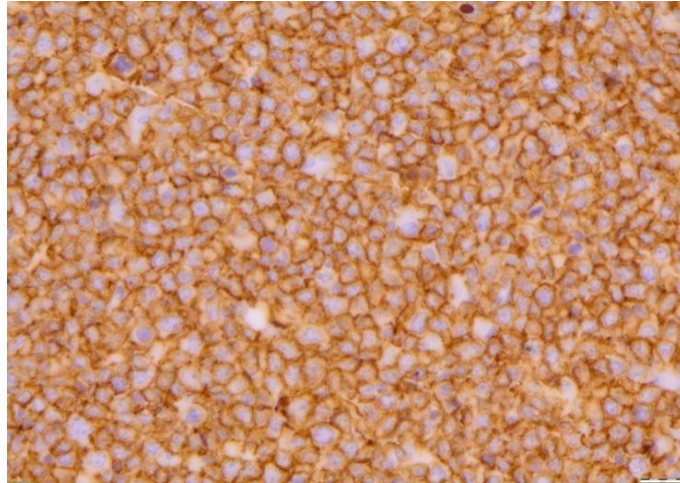
Imunohistokemija (IHK) je sastavni dio dijagnostičke hematopatologije čiji se rad danas zasniva na korištenju više od 50 različitih antitijela s pomoću kojih identificira više od 300 antigena (39). Vrsta korištenog markera u postavljanju dijagnoze određuje se na temelju morfologije (niti jedan pojedinačni marker nije specifičan), a uključuje leukocitni zajednički antigen (LCA), markere specifične za NHL B-stanični tip (CD20 i CD79 α), T-stanične markere (CD3 i CD5), ali i ostale markere poput CD23, bcl-2, CD10, cyclinD1, CD15, CD30, ALK-1, CD138 (na temelju citoarhitektonskog uzorka) (14). Gotovo svi B-stanični Non-Hodgkinovi limfomi pozitivni su na CD20. CD20 negativni NHL rijetki su sa stopom incidencije od 1 % do 2 % svih B-staničnih NHL-a (40). Na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek rutinski se kod Non-Hodgkinovih limfoma imunohistokemijski određuju CD20, CD10, CD5, CD3, cyclin D1, bcl2, bcl6 te Ki67. Za imunohistokemijsko bojenje koristio se stroj za automatsko bojenje Ventana BenchMark Ultra tvrtke Roche.

3.3.2.1. UltraView Universal DAB detekcijski kit

Ventana ultraView Universal DAB detekcijski kit neizravni je sustav bez biotina za detekciju mišjih IgG, IgM te zečjih primarnih antitijela. Kit je namijenjen za identifikaciju antigena u imunohistokemiji kod parafinskih rezova. Sastoji se od inhibitora peroksidaze, HRP multimeri, DAB kromogena, peroksidaze i DAB bakra (41).

3.3.2.2. Anti CD20

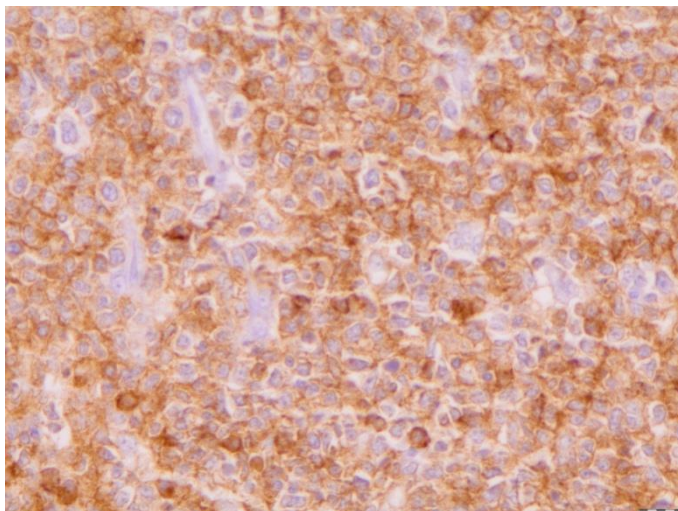
Anti CD20 mišje je monoklonalno primarno antitijelo usmjereno protiv epitopa na humanim B-limfocitima. Namijenjeno je in vitro dijagnostičkoj primjeni za laboratorijsku upotrebu za kvalitativnu detekciju stanica B-limfocitne linije, u parafinskim rezovima na imunohistokemijskom automatskom bojaču Ventana BenchMark Ultra tvrtke Roche. Svjetlosnim se mikroskopom utvrđuje bojenje s pozitivnom membranskom i citoplazmatskom reakcijom (slika 3.2.) (41).



Slika 3.2. DLBCL, CD20 pozitivni B-limfociti (biopsija 8733-17, 400X)

3.3.2.3. Anti CD10 (SP67)

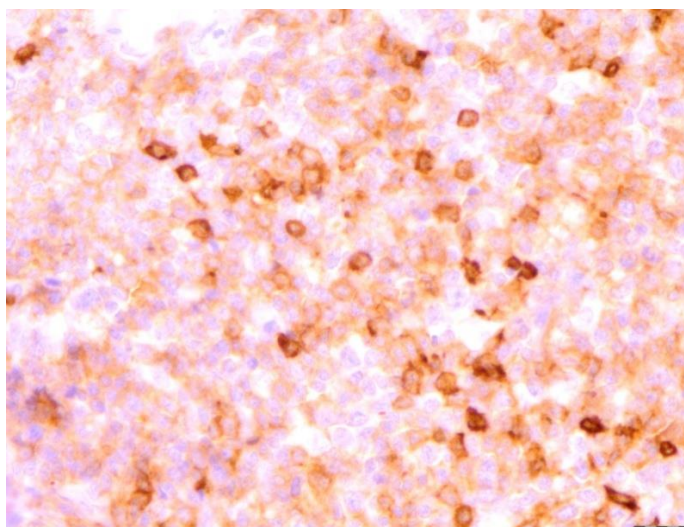
Anti CD10 zečje (kunić) je monoklonalno primarno antitijelo usmjereno protiv molekule CD10, odnosno uobičajenog akutnog antigena limfoblastične leukemije (CALLA), izraženog na površini limfoidnih stanica. Usmjeren je i na razna nelimfoidna tkiva: mioepitelne stanice dojke, kanaliće žuči, fibroblaste, granice bubrežnih tubula i epitela tankog crijeva. Namijenjeno je kvalitativnoj in vitro dijagnostici, pokazuje pozitivno membransko i citoplazmatsko bojenje i može se upotrijebiti za pomoć u identificiranju Burkittovog limfoma, limfoma folikularnih stanica te u klasifikaciji karcinoma bubrežnih stanica (slika 3.3.) (41).



Slika 3.3. DLBCL, CD10 pozitivni B-limfociti (biopsija 8733-17, 400X)

3.3.2.4. Anti CD5 (SP19)

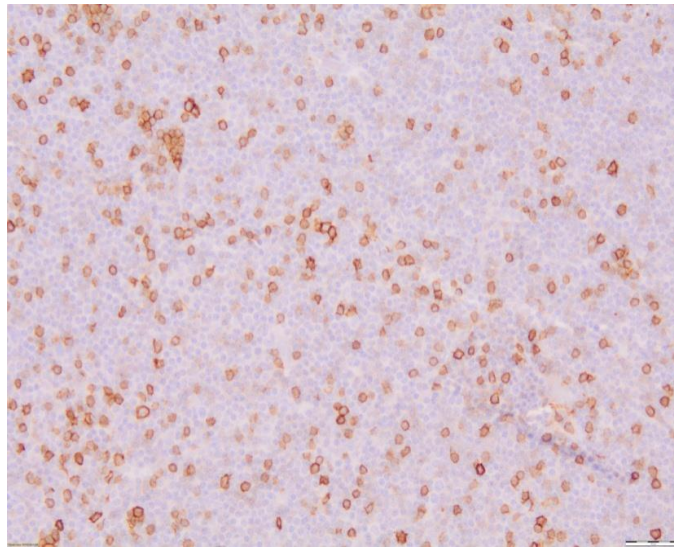
Anti CD5 monoklono je primarno antitijelo kunića, usmjereno protiv molekule CD5 izražene na plazma membrani gotovo svih ljudskih T-stanica i B1a podvrste B-stanica prisutnih u zonama folikularnog plašta, koštane srži i periferne krvi. Bojenje CD5 obično se koristi kao dio nekoliko IHK ploča za određivanje T i B-stanica. Također se može upotrijebiti za pomoć u identificiranju nekih T i B-staničnih limfoma. Pokazuje pozitivno bojenje membrane i citoplazme (slika 3.4.) (41).



Slika 3.4. DLBCL, CD5 pozitivni T-limfociti (biopsija 8733-17, 400X)

3.3.2.5. Anti CD3 (2GV6)

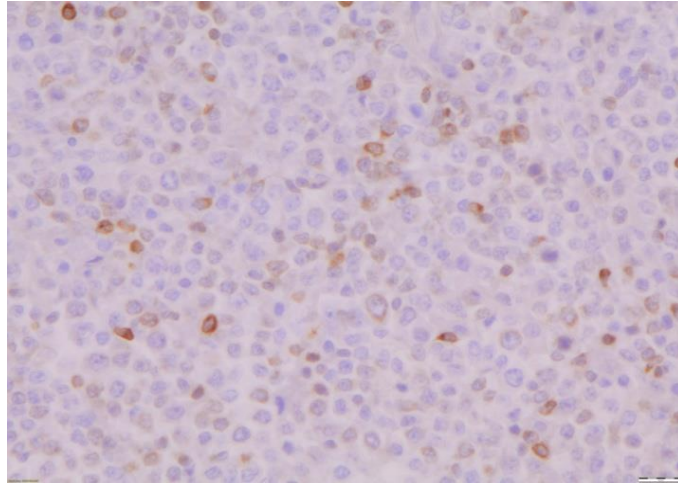
Anti CD3 zečje je monoklonalno antitijelo (IgG) usmjereno protiv neglikoziliranog epsilonskog lanca ljudske molekule CD3. Namijenjeno je in vitro dijagnostičkoj primjeni za laboratorijsku upotrebu u kvalitativnom identificiranju T-stanica svjetlosnom mikroskopijom, u parafinskim rezovima tkiva na automatskom bojaču Ventana BenchMark Ultra tvrtke Roche. Dijagnoza se zasniva na pozitivnom bojenju citoplazme i membrane (slika 3.5.) (41).



Slika 3.5. SLL, CD3 pozitivni T-limfociti (biopsija 3219-18, 200X)

3.3.2.6. Anti bcl2 (124)

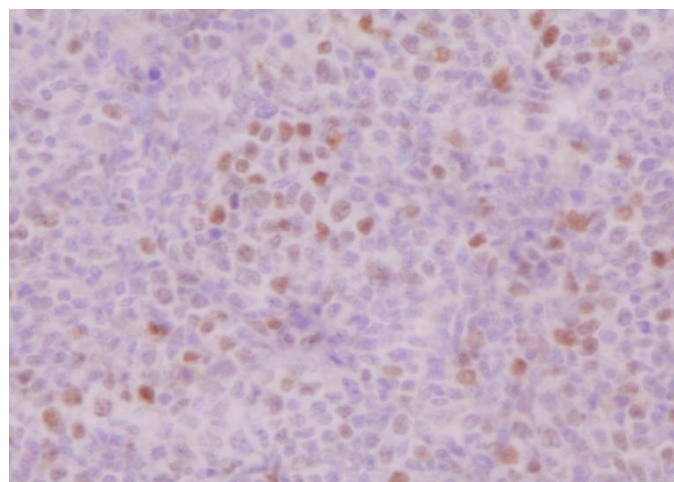
Anti bcl2 mišje je monoklonalno primarno antitijelo, usmjereno protiv humanog bcl2 izraženog na B-stanicama plaštene zone i interfolikularnim T-stanicama. Dizajniran je za in vitro dijagnostiku tako da kvalitativno, na temelju pozitivnog citoplazmatskog bojenja, otkrije prisustvo stanica koje eksprimiraju bcl2 protein pomoću svjetlosne mikroskopije u tkivu fiksiranom formalinom. Može se upotrijebiti za pomoć u identificiranju folikularnih limfoma i difuznih limfomima velikih stanica te za razlikovanje folikularnih limfoma od reaktivnih limfnih čvorova (slika 3.6.) (41).



Slika 3.6. DLBCL, bcl2 pozitivni B-limfociti (biopsija 8733-17, 400X)

3.3.2.7. Anti bcl6 (GI191E/A8)

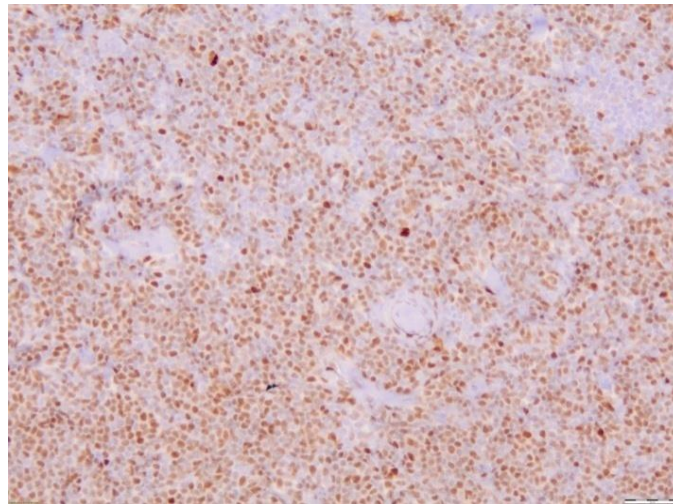
Anti bcl6 gen je za reguliranje transkripcije koji kodira 706 aminokiselinski nuklearni cinkov prstenasti protein. Antitijela na taj protein boje jezgre stanica germinalnog centra u limfoidnim folikulima, na folikularnim i interfolikularnim stanicama folikularnog limfoma, DLBCL limfomima, Burkittovim limfomima i većinu Reed-Sternbergovih stanica u nodularnom limfocitu koji prevladava u Hodgkinovoj bolesti. Suprotno tome, anti bcl6 rijetko boji limfom plašta i MALT limfom. Ekspresija anti bcl6 uočena je u otprilike 45 % CD30+ anaplastičnih velikih staničnih limfoma, ali je stalno odsutna u ostalim perifernim limfomima T-stanica (slika 3.7.) (41).



Slika 3.7. DLBCL, bcl6 pozitivni B-limfociti (biopsija 8733-17, 400X)

3.3.2.8. Anti Cyclin D1 (SP4-R)

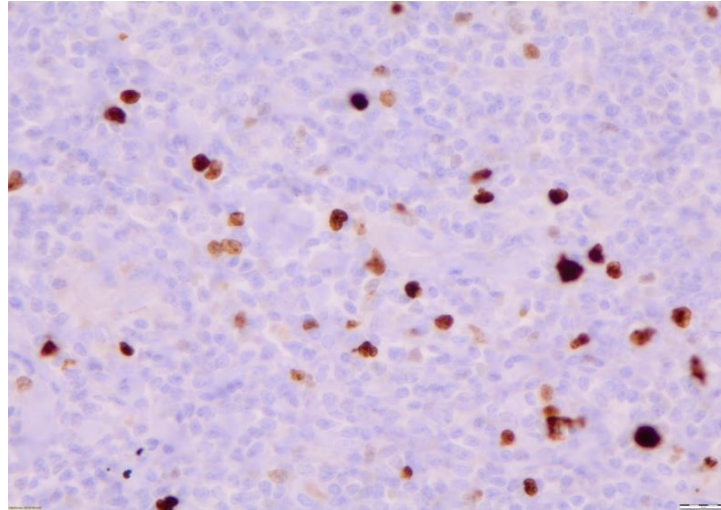
Anti Cyclin D1 monoklonsko je primarno antitijelo kunića, usmjereno protiv molekule Cyclin D1, koja je ključni regulator staničnog ciklusa, izražena prvenstveno tijekom G1 faze ciklusa. Ovo antitijelo boji jezgru, a može se upotrijebiti i za pomoć u identificiranju limfoma plašta i karcinoma dojke. Antitijelo je namijenjeno in vitro dijagnostici u kvalitativnom bojenju u dijelovima tkiva fiksiranog formalinom (slika 3.8.) (41).



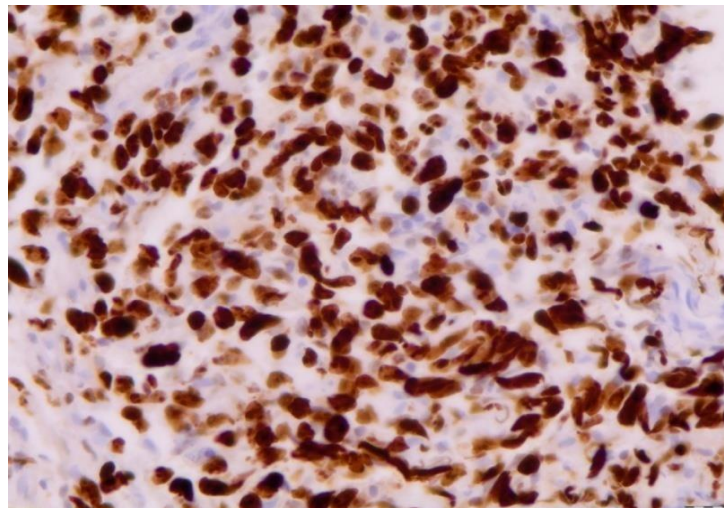
Slika 3.8. MANTLE, Cyclin D1 pozitivni B-limfociti (biopsija 12124-17, 200X)

3.3.2.9 Anti Ki-67 (30-9)

Anti Ki-67 primarno je zečje monoklonalno antitijelo (IgG) usmjereno protiv terminalnog dijela C-67 antigena. Ki-67 antigen (nuklearni nehistski protein koji se sintetizira na početku stanične proliferacije) koristi se u procjeni proliferativne aktivnosti normalnog i neoplastičnog tkiva. Vizualno se boduje po postotku IHK pozitivnih jezgara tumorskih stanica na vidnim poljima velikog uvećanja (x400). Visoka ekspresija Ki67 povezana je s lošijom prognozom NHL-a (slika 3.9. i slika 3.10.) (41, 42).



Slika 3.9. MANTLE, nizak Ki-67 (biopsija 12124-17, 400X)



Slika 3.10. DLBCL, visok Ki-67 (biopsija 14252-18, 400X)

3.3.3. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t-testom, a kod odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Sve P vrijednosti dvostrane su. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Statistical Software version 19.1.7 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

4. REZULTATI

U razdoblju od pet godina (od 1. siječnja 2014. do 31. prosinca 2018. godine) ukupno je dijagnosticirano 218 limfoma, od kojih je 29 (13 %) Hodgkinov, a 189 (87 %) Non-Hodgkinov limfom.

U slučaju Non-Hodgkinovog limfoma, a u ovisnosti o stanici limfocita u kojoj se događa zloćudna mutacija, 6 (3 %) je T-limfocitnih limfoma, a 183 (97 %) B-limfocitnih limfoma. Najveći broj dijagnosticiranih Non-Hodgkinovih B-limfoma bio je u 2014. g. (40/21,8 %), a najmanji u 2017. i 2018. g. (34/18,6 %).

Medijan dobi ispitanika s B-limfocitnim Non-Hodgkinovim limfomom (NH B-limfom) je 64 godine (interkvartilnog raspona od 57 do 73 godine) u rasponu od 30 do 90 godina. Najviše ispitanika u dobi je od 60 do 69 godina, njih 68 (37 %), bez značajne razlike u odnosu na spol (Tablica 4.1.).

Tablica 4.1. Raspodjela ispitanika s NH B-limfomom prema dobi i spolu

Dob ispitanika (godine)	Broj (%) pacijenata prema spolu			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
30 – 39	3 (3)	6 (6)	9 (5)	0,90
40 – 49	5 (6)	7 (7)	12 (7)	
50 – 59	19 (22)	17 (18)	36 (20)	
60 – 69	33 (38)	35 (36)	68 (37)	
70 – 79	19 (22)	24 (25)	43 (23)	
80 – 89	7 (8)	7 (7)	14 (8)	
90 – 99	1 (1)	0	1 (1)	
Ukupno	87 (100)	96 (100)	183 (100)	

*Fisherov egzaktni test

S obzirom na tip NH B-limfoma, najviše ispitanika, njih 92 (50 %) je s DLBCL tipom i to nešto više zastupljenim kod žena, a njih 48 (26 %) s folikularnim tipom, dok su ostali tipovi NH B-limfoma zastupljeni u manjem broju. Nema značajne razlike u tipu NH B-limfoma prema spolu (Tablica 4.2.).

Tablica 4.2. Tip NH B-limfoma prema spolu

Tip	Broj (%) pacijenata prema spolu			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
NHL, folikularni	20 (23)	28 (29)	48 (26)	0,26
NHL, DLBCL	40 (46)	52 (54)	92 (50)	
NHL, SLL	9 (10)	4 (4)	13 (7)	
NHL, marginalne zone	6 (7)	4 (4)	10 (5)	
NHL, mantle zone	10 (11)	7 (7)	17 (9)	
NHL, plazmablastični	1 (1)	0	1 (1)	
NHL, Burkitt	0	1 (1)	1 (1)	
NHL, nespecificirani visokog gradusa	1 (1)	0	1 (1)	
Ukupno	87 (100)	96 (100)	183 (100)	

*Fisherov egzakti test

NH B-limfomi najčešće su dijagnosticirani u limfnom čvoru, kod 105 (57 %) ispitanika, u parenhimalnim organima kod 70 (38 %) ispitanika, te na kosti u 8 (4 %) slučajeva. Najčešće su to bili DLBCL u 92 (50,3 %) slučaja, najviše u sve tri lokalizacije, no bez značajne razlike prema lokalizaciji (Tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Tip NH B-limfoma po lokalizaciji

Tip	Broj (%) pacijenata prema lokalizaciji				P*
	Limfni čvor	Parenh organ	Kost	Ukupno	
NHL, folikularni	36 (34)	11 (16)	1/8	48 (26,2)	0,06
NHL, DLBCL	46 (44)	42 (60)	4/8	92 (50,3)	
NHL, SLL	6 (6)	5 (7)	2/8	13 (7,1)	
NHL, marginalne zone	3 (3)	6 (9)	1/8	10 (5,5)	
NHL, mantle zone	11 (10)	6 (9)	0	17 (9,3)	
NHL, plazmablastični	1 (1)	0	0	1 (0,5)	
NHL, Burkitt	1 (1)	0	0	1 (1)	
NHL, nespecificirani visokog gradusa	1 (1)	0	0	1 (1)	
Ukupno	105 (100)	70 (100)	8/8	183 (100)	

*Fisherov egzakti test

Najveći broj NH B-limfoma dijagnosticiran je u limfnim čvorovima područja vrata, u 45 (43 %) slučajeva. Najčešće dijagnosticirani limfom u tom području je DLBCL otkriven u 20 ispitanika (44 %). Nema značajne razlike u raspodjeli tipa NH B-limfoma prema lokalizaciji (Tablica 4.4.).

Tablica 4.4. Tip NH B-limfoma po lokalizaciji LČ

Tip	Broj (%) ispitanika prema lokalizaciji							P*
	Vrat	Pazuh	Torax	Abdomen	Ingvinalni	Nejasno	Ukupno	
NHL, folikularni	11 (24)	0	5/11	2/11	10/18	8/16	36 (34,3)	0,26
NHL, DLBCL	20 (44)	4/4	3/11	6/11	8/18	5/16	46 (43,8)	
NHL, SLL	5 (11)	0	0	1/11	0	0	6 (5,7)	
NHL, marginalne zone	1 (2)	0	1/11	0	0	1/16	3 (2,9)	
NHL, mantle zone	7 (16)	0	2/11	1/11	0	1/16	11 (10,5)	
NHL, plazmablastični	0	0	0	0	0	1/16	1 (1)	
NHL, Burkitt	1 (2)	0	0	0	0	0	1 (1)	
NHL, nespecificirani visokog gradusa	0	0	0	1/11	0	0	1 (1)	
Ukupno	45 (100)	4/4	11/11	11/11	18/18	16/16	105 (100)	

*Fisherov egzaktni test

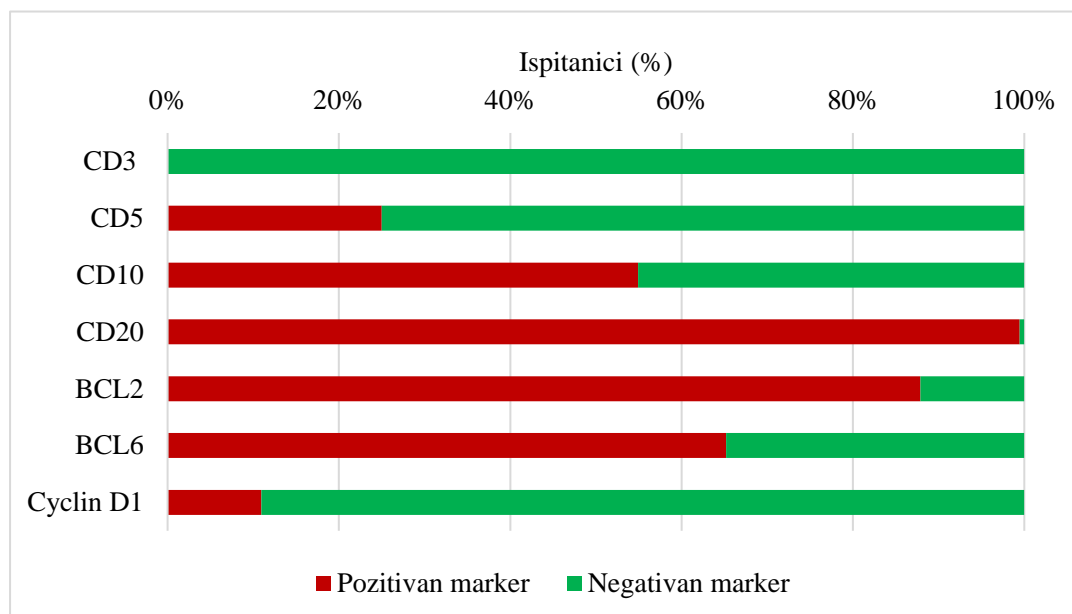
Mjesto najčešćeg vannodalnog dijagnosticiranja NH B-limfoma bio je GIT u 38 (49 %) slučajeva, bez značajne razlike u odnosu na spol (Tablica 4.5.).

Tablica 4.5. Raspodjela mjesta vannodalnog dijagnosticiranja NH B-limfoma u odnosu na spol

Vannodalno mjesto	Broj (%) pacijenata prema spolu			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
Mozak	3 (8)	2 (5)	5 (6)	0,24
Oklo	2 (5)	0	2 (3)	
Nosna i usna šupljina	1 (3)	5 (13)	6 (8)	
Koža	1 (3)	3 (8)	4 (5)	
Tonzila	3 (8)	0	3 (4)	
Parotida	2 (5)	2 (5)	4 (5)	
GIT (želudac i crijeva)	22 (55)	16 (42)	38 (49)	
Gonade (jajnici i testis)	1 (3)	2 (5)	3 (4)	
Kosti	4 (10)	4 (11)	8 (10)	
Ostali sporadični organi	1 (3)	4 (11)	5 (6)	
Ukupno	40 (100)	38 (100)	78 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Za dijagnostiku i klasifikaciju NH B-limfoma koristi se paleta markera (CD3, CD5, CD10, CD20, BCL2, BCL6 i Cycin D1) od kojih se najviše koriste CD20, u 179 (98 %) slučajeva, BCL2 u 165 (90 %) slučajeva i CD10 u 162 (89 %) slučajeva. Najčešći pozitivan marker za NH B-limfom je CD20 s pozitivitetom kod 178 (97 %), dok je najčešći negativan marker za NH B-limfom CD3 s negativitetom kod svih 144 (100 %) ispitanika kojima je rađen taj marker (Slika 4.1.).



Slika 4.1. Udio pozitivnih i negativnih markera u dijagnosticiranju NH B-limfoma

Ispitanici nisu imali niti jedan ili su imali više pozitivnih markera. U najvećem broju slučajeva, kod 74 (40,4 %) ispitanika, radilo se o tri pozitivna markera. Četiri pozitivna markera imalo je 66 (36,1 %) ispitanika, dva pozitivna markera imalo je 32 (17,5 %) ispitanika, dok je u rijetkim slučajevima bio pozitivan samo jedan ili nijedan marker, odnosno svih pet markera (Tablica 4.6.).

Tablica 4.6. Broj pozitivnih markera

Broj pozitivnih markera	Broj (%) ispitanika
0	1 (0,5)
1	8 (4,4)
2	32 (17,5)
3	74 (40,4)
4	66 (36,1)
5	2 (1,1)
Ukupno	183 (100)

5. RASPRAVA

Incidencija Non-Hodgkinovih limfoma u zadnjih se nekoliko desetljeća u svijetu povećala. Procjenjuje se da je u prethodnom desetljeću u Ujedinjenom Kraljevstvu broj novootkrivenih osoba s NHL-om porastao za oko 13 %, vjerojatno zbog starenja stanovništva te boljeg dijagnosticiranja i izvještavanja (21). Incidencija NHL-a u Hrvatskoj varira, međutim prema dostupnim podacima od 2014. g. nadalje, vidljiv je porast broja novih slučajeva. U ovom istraživanju, provedenom na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek, u razdoblju od siječnja 2014. do prosinca 2018. godine dijagnosticirano je 218 novootkrivenih limfoma, od kojih je kod 29 ispitanika (13 %) dijagnosticiran Hodgkinov, a kod 189 ispitanika (87 %) Non-Hodgkinov limfom. Ovi podatci podudaraju se s dokazanom činjenicom da HL čini oko 10 % svih dijagnosticiranih limfoma (10, 43). Za razliku od podataka o incidenciji na državnom nivou Republike Hrvatske, u KBC-u Osijek uočava se blagi pad pojavnosti NH B-limfoma (40/21,8 % verificiranih u 2014. g. naspram 34/18,6 % u 2018. g.).

Kod 189 ispitanika (87 %) kod kojih je dijagnosticiran Non-Hodgkinov limfom, a u ovisnosti o stanici limfocita u kojoj se događa zloćudna mutacija, 6 (3 %) je T-limfocitnih limfoma, a 183 (97 %) B-limfocitnih limfoma. Ovi podatci ispitanika u skladu su s literaturnim podacima provedenog istraživanja kojim je dokazano da je zastupljenost NH B-limfoma, kako u zemljama u razvoju tako i u razvijenim zemljama, znatno veća u odnosu na Non-Hodgkinov T-limfom. U razvijenim zemljama B-limfomi zastupljeni su u više od 90 % slučajeva, dok je kod zemalja u razvoju postotak nešto niži (87 %), međutim i dalje znatno veći u odnosu na T-limfome. Ovo istraživanje također je pokazalo kako se pojavnost B i T Non-Hodgkinovih limfoma razlikuje ovisno o razvijenosti zemlje u kojoj se istraživanje provodi (17).

Najveći broj ispitanika s NH B-limfomom stariji je od 60 godina, s najvišim postotkom u dobi od 60 do 69 godina, njih 68 (37 %) i medijanom dobi 64 godine. Literaturni podatci o epidemiologiji NH B-limfoma koji govore kako je incidencija NH B-limfoma češća kod ljudi starijih od 65 godina (najveća između 65 i 69 godina), potvrđuju naše rezultate (44). Izvodi iz literature navode kako su stope incidencije oko 1,5 puta veće kod muškaraca nego kod žena (19, 44). U našem istraživanju nije bilo značajnije razlike u odnosu na spol.

Dva najčešće zastupljena tipa NH B-limfoma su difuzni velikostanični B-limfom (DLBCL) i folikularni limfom (FL). Prema literaturnom istraživanju DLBCL je najčešći od

agresivnih Non-Hodgkinovih limfoma i čini 30 % - 58 % svih NHL-a. To je zapaženo i u studiji u kojoj je DLBCL činio 46,8 % svih NHL-a (13). Ovi podatci podudaraju se i s našim istraživanjem u kojem je s obzirom na tip NH B-limfoma najveći broj ispitanika, njih 92 (50 %) s DLBCL tipom s nešto većom zastupljenošću kod žena. DLBCL tip u našem istraživanju čini 42 % svih otkrivenih limfoma, te 49 % svih NHL-a. 48 ispitanika (26 %) u našem istraživanju bilo je s folikularnim tipom što je u korelaciji s podacima koji kažu da folikularni limfom, kao najčešći indolentni limfom te drugi najčešći Non-Hodgkinov limfom u zapadnom svijetu, predstavlja od 20 % do 30 % svih slučajeva NHL-a s godišnjom incidencijom od 5/100 000 (45). Ostali tipovi NH B-limfoma u našem istraživanju zastupljeni su u manje od 10 % ispitanika što je približno jednako istraživanju u literaturi (13).

NH B-limfomi najčešće su dijagnosticirani u limfnom čvoru, kod 105 ispitanika (57 %). Najčešće su to bili DLBCL limfomi, kod 46 ispitanika (44 %), te folikularni limfomi kod 36 ispitanika (34 %). U parenhimalnim organima NH B-limfom dijagnosticiran je u 70 ispitanika (38 %), te u kostima u 8 slučajeva (4 %). I u ova dva područja najčešća vrsta bio je DLBCL. Najveći broj NH B-limfoma dijagnosticirano je u limfnim čvorovima područja vrata, u 45 slučajeva (43 %), od kojih je DLBCL limfom dijagnosticiran kod 20 ispitanika (44 %). U 18 ispitanika (17 %) NH B-limfom otkriven je u ingvinalnim limfnim čvorovima gdje je najčešće dijagnosticiran NH B-folikularni limfom kod 10 ispitanika (56 %). Vannodalno, NH B-limfomi najčešće su otkriveni u GIT-u u 38 ispitanika (49 %) bez značajne razlike u odnosu na spol, dok je u ostalim područjima dijagnosticiran tek poneki slučaj NH B-limfoma. Literaturno istraživanje pokazalo je kako raspodjela različitih tipova NH B-limfoma uvelike ovisi o vrsti zahvaćenog limfnog čvora i vannodalnog područja, međutim zaključeno je kako se i Non-Hodgkinovi i Hodgkinovi limfomi najčešće javljaju u cervikalnim limfnim čvorovima s 36,8 % slučajeva te u ingvinalnim limfnim čvorovima sa 16,4 % (46). Visoku vannodalnu zastupljenost u GIT-u potvrdila je i studija u kojoj je otkriveno 39 ispitanika (23 muškarca i 16 žena) s novodijagnosticiranim NHL-om u gastrointestinalnom traktu. Najčešće mjesto dijagnosticiranja bio je želudac kod 29 ispitanika (74 %), a potom tanko i debelo crijevo s 5,13 % (26).

IHK obrada NHL-a uključuje antitijela protiv B-staničnih (CD20, CD79 α) i T-staničnih (CD3, CD5) antigena, međutim na temelju morfologije, ako postoji promjena B ili T-staničnih područja, razni drugi markeri pomažu u identifikaciji vrste NHL-a (14). Kako bismo dijagnosticirali i klasificirali NH B-limfome, koristili smo paletu imunohistokemijskih markera (CD3, CD5, CD10, CD23, CD20, CD79 α , BCL2, BCL6, Cyclin D1 i dr.), slično

drugim literaturnim podacima (13, 14). Kod 179 ispitanika (98 %) ispitivao se CD20, BCL2 ispitivao se u 165 (90 %), a CD10 u 162 slučaja (89 %). Dokazano je da je CD20 najčešći pozitivan marker za NH B-limfom s pozitivitetom kod 178 ispitanika (97 %), što je i potvrđeno literaturnim izvorima koji navode kako su gotovo svi NH B-limfomi pozitivni na CD20, odnosno da je poznato samo 1 – 2 % slučajeva NH B-limfoma s negativnim CD20 markerom (40). U ovom istraživanju niti jedan ispitanik nije bio pozitivan na CD3. Takvi su podatci u korelaciji s izvorima jer je CD3 marker karakterističan za T-limfome (39).

Najveći broj ispitanika, njih 74 (40,4 %), imalo je tri pozitivna markera, četiri pozitivna markera imalo je 66 ispitanika (36,1 %), dok je 32 ispitanika (17,5 %) imalo dva pozitivna markera. Slični rezultati zabilježeni su i u drugim studijama (13, 14).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. U razdoblju od 1. siječnja 2014. godine do 31. prosinca 2018. godine na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek dijagnosticirano je 218 novootkrivenih limfoma. Kod 189 ispitanika (87 %) dijagnosticiran je Non-Hodgkinov limfom.
2. Kod 183 ispitanika (97 %) s NHL-om, od kojih su 96 (53 %) žene, otkriven je Non-Hodgkinov B-limfom. Medijan dobi ispitanika s NH B-limfomom je 64 godine. Najviše ispitanika u dobi je od 60 do 69 godine, njih 68 (37 %).
3. Najviše ispitanika, njih 92 (50 %) je s DLBCL tipom, i to nešto više zastupljenim kod žena (52/54 %).
4. NH B-limfomi najčešće su dijagnosticirani u limfnim čvorovima, kod 105 (57 %) ispitanika. U najvećem broju, 45 slučajeva (43 %), riječ je o limfnim čvorovima područja vrata. Najzastupljeniji tip u tom području je DLBCL, otkriven u 20 ispitanika (44 %).
5. Vannodalno mjesto s najvećom incidencijom NH B-limfoma je GIT (želudac i crijeva) u 38 ispitanika (49 %), od kojih su 22 (55 %) muškog spola.
6. Najviše korišteni IHK marker u dijagnosticiranju NH B-limfoma bio je CD20 koji se koristio u 179 (98 %) slučajeva. CD20 je ujedno i najčešći pozitivan marker s pozitivitetom kod 178 ispitanika (97 %). Svi ispitanici, njih 144 (100 %), kojima je rađen CD3 marker, pokazali su negativan rezultat.
7. Najveći broj ispitanika, njih 74 (40,4 %), imalo je tri pozitivna IHK markera od najčešće korištenih.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Utvrditi broj novodijagnosticiranih Non-Hodgkinovih B-limfoma u petogodišnjem periodu, na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek. Ispitati učestalost B-staničnih Non-Hodgkinovih limfoma u odnosu prema spolu, dobi i tipu.

Nacrt studije: Istraživanje je bilo presječno s povijesnim podacima.

Ispitanici i metode: Istraživanje je obuhvatilo 183 ispitanika s novootkrivenim Non-Hodgkinovim B-limfomom. Analizirala se postojeća medicinska dokumentacija (arhiva) zajedno s arhivskim histološkim staklima sa standardnim (hematoksilin-eozin) i imunohistokemijskim bojenjem. Za imunohistokemijsku obradu tkiva koristio se automatski bojač Ventana Benchmark Ultra tvrtke Roche i monoklonalna primarna antitijela tvrtke Roche. Kod svih uzoraka određivao se tip i lokalizacija NH B-limfoma pomoću mikroskopa marke Olympus®, model CX40.

Rezultati: U razdoblju od 1. siječnja 2014. godine do 31. prosinca 2018. godine dijagnosticirano je 183 B-stanična NHL-a. Najveći broj ispitanika bio je u dobnoj skupini od 60 do 69 godina (68/37 %), s medijanom dobi 64 godine. Najzastupljeniji tip NH B-limfoma bio je DLBCL (50 %). Najveći broj NH B-limfoma dijagnosticiran je u limfnim čvorovima (57 %), od kojih je u 43 % slučajeva riječ o čvorovima vrata. Vannodalno, NH B-limfom najčešće je dijagnosticiran u GIT-u (49 %). Najčešće korišteni marker bio je CD20 s pozitivitetom kod 178 ispitanika (97 %). Svi ispitanici, njih 144 (100 %), kojima je rađen CD3 marker, pokazali su negativan rezultat.

Zaključak: Ova retrospektivna studija ukazuje na potrebu za stvaranjem registra oboljelih od B-staničnih NHL-a prema važećoj klasifikaciji SZO-a.

Ključne riječi: B-stanični limfom; imunohistokemija; klasifikacija; markeri; Non-Hodgkinov limfom.

8. SUMMARY

Role of immunohistochemical processing in differentiation of B cell Non-Hodgkin lymphomas

Objectives: The aim of this study was to determine the number of newly diagnosed Non-Hodgkin's B lymphomas in a five-year period at the Clinical Institute for Pathology and Forensic Medicine at the Clinical Hospital Center Osijek. To determine the frequency of B-cellular Non-Hodgkin's lymphomas in relation to gender, age and type.

Study design: Cross sectional study with the archive data.

Participants and methods: The research included 183 examinees with the newly discovered Non-Hodgkin's B lymphoma. Existing medical documentation (archive) was analyzed together with archival histological samples stained using both standard (haematoxylin-eozin) and immunohistochemical (IHC) methods. For immunohistochemical tissue processing a Ventana Benchmark Ultra automated stainer from the company Roche and monoclonal primary antibodies from the company Roche were used. In all samples the type and localization of NH B lymphomas were determined with the help of an Olympus® microscope, model CX40.

Results: In the period from January 1st, 2014 to December 31st, 2018, 183 B-cellular NHLs were diagnosed. The majority of examinees belonged to the 60 - 69 age group (68/37 %), with the median age of 64 years. The most common type of NH B lymphoma was DLBCL (50 %). The largest number of NH B lymphomas was diagnosed in the lymph nodes (57 %), of which 43 % were neck nodes. Extranodally NH B lymphoma is most commonly diagnosed in the GIT (49 % of cases). The most commonly used marker was CD20 with positivity in 178 subjects (97 %). All subjects, 144 of them (100 %), who underwent a CD3 marker showed a negative result.

Conclusion: This retrospective study indicates the need to create a registry of patients with B-cell Non-Hodgkin's lymphoma according to the current WHO classification.

Key words: B-cell lymphoma; classification; immunohistochemistry; markers; Non-Hodgkin's lymphoma.

9. LITERATURA

1. Jian M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert Rev Hematol.* 2017;10(3):239–49.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, i sur. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4. izd. Lyon: WHO; 2017. str. 189-344.
3. Damjanov I, Jukić S, Seiwerth S. Patologija. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 341-51.
4. England CG, Rui L, Cai W. Lymphoma: current status of clinical and preclinical imaging with radiolabeled antibodies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2017;44(3):517–32.
5. Ninkovic S, Lambert J. Non-Hodgkin lymphoma. *Medicine.* 2017;45(5):297-304.
6. Pruthi RK. What's the difference between Hodgkin's lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma? Dostupno na adresi:<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/hodgkins-lymphoma/expert-answers/lymphoma/faq-20058546>. Datum pristupa: 25.06.2020.
7. Dana-Farber Cancer Institute. Non-Hodgkin Lymphoma and Hodgkin Lymphoma: What's the Difference? Dostupno na adresi:<https://blog.dana-farber.org/insight/2015/07/what-is-the-difference-between-hodgkin-lymphoma-and-non-hodgkin-lymphoma/>. Datum pristupa: 25.06.2020.
8. Cancer Treatment Centers of America. What's the difference? Hodgkin lymphoma and non-Hodgkin lymphoma. Dostupno na adresi:<https://www.cancercenter.com/community/blog/2017/01/whats-the-difference-hodgkin-lymphoma-and-non-hodgkin-lymphoma>. Datum pristupa: 26.06.2020.
9. Fletcher CDM. Diagnostic Histopathology of Tumors. 4. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. str. 1359-81.
10. Shanbhag S, Ambinder R. Hodgkin Lymphoma: a review and update on recent progress. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(2):116–32.
11. Küpper R, Engert A, Hansmann ML. Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest.* 2012;122(10):3439–447.
12. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 9. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. str. 429-49.
13. Sharma M, Mannan R, Madhukar M, Navani S, Manjari M, Bhasin TS, i sur. Immunohistochemical (IHC) Analysis of Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) Spectrum

- According to WHO/REAL Classification: A Single Centre Experience from Punjab, India. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(1):46–9.
14. Rao IS. Role of immunohistochemistry in lymphoma. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2010;31(4):145–7.
15. Lunning M, Vose JM. Management of Indolent Lymphoma: Where Are We Now and Where Are We Going. *Blood Rev.* 2012;26(6):279–88.
16. Sehn LH. Introduction to a review series: the paradox of indolent B-cell lymphoma. *Blood.* 2016;127(17):2045–6.
17. Perry AM, Diebold J, Nathwani BN, MacLennan KA, Müller-Hermelink HK, Bast M, et al. Non-Hodgkin lymphoma in the developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Haematologica.* 2016;101(10):1244–50.
18. Gabrić Pandurić D, Kuna T, Katane D. Primarni ekstranodularni Non-Hodgkinov limfom usne šupljine prikriven boli nakon vađenja zuba. *Acta stomatologica Croatica.* 2007;41(4):366–74.
19. Zhang Y, Dai Y, Zheng T, Ma S. Risk Factors of Non-Hodgkin Lymphoma. *Expert Opin Med Diagn.* 2011;5(6):539–50.
20. Cancer.Net Editorial Board. Lymphoma - Non-Hodgkin: Statistics. Dostupno na adresi: <https://www.cancer.net/cancer-types/lymphoma-non-hodgkin/statistics>. Datum pristupa: 30.06. 2020.
21. Cancer Research UK. Non-Hodgkin lymphoma statistics. Dostupno na adresi: https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/non-hodgkin-lymphoma?_ga=2.15998322.552570461.1594244735-1394114963.1591998474#heading-Zero. Datum pristupa: 01.07. 2020.
22. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014. godine. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2016.
23. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015. godine. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2018.
24. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016. godine. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2019.
25. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017. godine. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2020.
26. Radić-Krišto D, Planinc-Peraica A, Ostojić S, Vrhovac R, Kardum-Skelin I, Jakšić B. Primary Gastrointestinal non-Hodgkin Lymphoma in Adults: Clinicopathologic and Survival

- Characteristics. *Collegium antropologicum*. 2010;34(2):413-17.
27. Koble P, Borčić J, Filipović-Zore I, Nola M, Sertić D. Pojava non-Hodgkin limfoma u usnoj šupljini - prikaz slučaja. *Acta stomatologica Croatica*. 2004;38(4):277.
28. Chen BJ, Fend F, Campo E, Quintanilla-Martinez L. Aggressive B-cell lymphomas-from morphology to molecular pathogenesis. *Ann Lymphoma*. 2019;3:1.
29. Inamdara AA, Goy A, Ayoub NM, Attia C, Oton L, Taruvai V, i sur. Mantle cell lymphoma in the era of precision medicine-diagnosis, biomarkers and therapeutic agents. *Oncotarget*. 2016;7(30):48692–731.
30. Veloza L, Ribera-Cortada I, Campo E. Mantle cell lymphoma pathology update in the 2016 WHO classification. *Ann Lymphoma*. 2019;3:3.
31. Nola M, Dominis M. Klasifikacija limfoidnih tumora prema SZO. *Medicinar*. str. 15-9.
32. Troppan K, Wenzl K, Neumeister P, Deutsch A. Molecular Pathogenesis of MALT Lymphoma. *Gastroenterol Res Pract*. 2015;2015:102656.
33. Matasar MJ, Luminari S, Barr PM, Barta SK, Danilov AV, Hill BT, i sur. Follicular Lymphoma: Recent and Emerging Therapies, Treatment Strategies, and Remaining Unmet Needs. *Oncologist*. 2019;24(11):1236–50.
34. Sugimoto T, Watanabe T. Follicular Lymphoma: The Role of the Tumor Microenvironment in Prognosis. *J Clin Exp Hematop*. 2016;56(1):1–19.
35. Pavanello F, Steffanoni S, Ghielmini M, Zucca E. Systemic Front Line Therapy of Follicular Lymphoma: When, to Whom and How. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1):e2016062.
36. Dozzo M, Carobolante F, Donisi PM, Scattolin A, Maino E, Sancetta R, i sur. Burkitt lymphoma in adolescents and young adults: management challenges. *Adolesc Health Med Ther*. 2017;8:11–29.
37. Kalisz K, Alessandrino F, Beck R, Smith D, Kikano E, Ramaiya NH, i sur. An update on Burkitt lymphoma: a review of pathogenesis and multimodality imaging assessment of disease presentation, treatment response, and recurrence. *Insights Imaging*. 2019;10:56.
38. Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology. 1994. str.53-5.
39. Higgins RA, Blankenship JE, Kinney MC. Application of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Non-Hodgkin and Hodgkin Lymphoma. 2008;132(3):441-61.
40. Katchi T, Liu D. Diagnosis and treatment of CD20 negative B cell lymphomas. *Biomark Res*. 2017;5:5.
41. Atlas Antibodies. IHC Protocol – Ventana Discovery XT. Dostupno na

adresi:<https://www.atlasantibodies.com/resources/antibody-applications/protocols/ihc-protocol-ventana/>. Datum pristupa: 10.07. 2020.

42. Tang YL, Zhou Y, Cheng LL, Su YZ, Wang CB. BCL2/Ki-67 index predict survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Lett.* 2017;14(3):3767–73.
43. Vassilakopoulos TP, Asimakopoulos JV, Konstantopoulos K, Angelopoulou MK. Optimizing outcomes in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma: a review of current and forthcoming therapeutic strategies. *Ther Adv Hematol.* 2020;11:2040620720902911.
44. National Guideline Alliance (UK). Non-Hodgkin's Lymphoma: Diagnosis and Management. National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2016.
45. Hübel K, Ghielmini M, Ladetto M, Gopal AK. Controversies in the Treatment of Follicular Lymphoma. *Hemasphere.* 2020;4(1).
46. Laurent C, Do C, Gourraud PA, Russano de Paiva G, Valmary S, Brousset P. Prevalence of Common Non-Hodgkin Lymphomas and Subtypes of Hodgkin Lymphoma by Nodal Site of Involvement. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(25):e987.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Tea Babić

Datum rođenja: 03.10.1998.

Adresa: I. Mažuranića 1, 32100 Vinkovci

E-mail: babictea1@gmail.com

Mobitel: 099 590 4129

OBRAZOVANJE:

2017. – 2020. Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko
laboratorijska dijagnostika
2013. – 2017. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića Vinkovci
2005. – 2013. Osnovna škola Vladimira Nazora Vinkovci