

# Imunohistokemijska obilježja Hodgkinovog limfoma

---

Galeković, Mia

Master's thesis / Diplomski 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:999049>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Mia Galeković**

**IMUNOHISTOKEMIJSKA OBILJEŽJA**

**HODGKINOVOG LIMFOMA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Mia Galeković**

**IMUNOHISTOKEMIJSKA OBILJEŽJA  
HODGKINOVOG LIMFOMA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

Rad je ostvaren na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek.

Mentorica je rada: doc. dr. sc. Ksenija Marjanović.

Rad sadrži: četrdeset i jedan (41) list, devet (9) tablica i osam (8) slika.

## *Zahvala*

*Na početku željela bih zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Kseniji Marjanović na pruženoj pomoći, uloženom vremenu i strpljenju.*

*Zahvaljujem i svojoj najboljoj prijateljici koja je bila uz mene tijekom cijelog mog obrazovanja i sa mnom „proživljavala“ polaganje državne mature, a kasnije i pisanje mog završnog i diplomskog rada. Prijateljice, ni jedan sažetak na engleskom jeziku ne bi bio isti bez tebe!*

*Posebno zahvaljujem svojim roditeljima koji su me „od malih nogu“ učili kako trebam ulagati u sebe da bi mi se to jednog dana vratilo. Sjećam se kako ste mi govorili da ne učim za vas, nego za sebe. Mama, tata, tada nisam pretjerano shvaćala što mi točno time želite poručiti, ali danas shvaćam!*

*Naravno, željela bih zahvaliti i ostatku obitelji i prijateljima kao i svima onima koji su vjerovali u mene i bili mi potpora.*

*Ovaj bih rad prvenstveno željela posvetiti svojim roditeljima i sestri.*

*Mama, tata, seko, vi ste moja najveća potpora u životu!*

## POPIS KRATICA

<b>BSAP</b>	B-stanični specifični aktivator protein
<b>CHL</b>	klasični Hodgkinov limfom (eng. <i>Classic Hodgkin lymphoma</i> )
<b>CMV</b>	citomegalovirus
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzine
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virus
<b>EMA</b>	epitelni membranski antigen
<b>HE</b>	hemalaun-eozin
<b>HL</b>	Hodgkinov limfom
<b>HRP</b>	peroksidaza hrena (eng. <i>Horseradish Peroxidase</i> )
<b>IgG</b>	imunoglobulin G
<b>IgM</b>	imunoglobulin M
<b>KBC</b>	Klinički bolnički centar
<b>LD</b>	limfocitna deplecija
<b>LDCHL</b>	limfocitna deplecija klasičnog Hodgkinova limfoma (eng. <i>Lymphocyte-depleted classic Hodgkin lymphoma</i> )
<b>LP</b>	limfocit predominantna
<b>LRCHL</b>	limfocitima bogat klasični Hodgkinov limfom (eng. <i>Lymphocyte-rich classic Hodgkin lymphoma</i> )
<b>MC</b>	mješovita celularnost
<b>MCCHL</b>	mješovita celularnost klasičnog Hodgkinova limfoma (eng. <i>Mixed cellularity classic Hodgkin lymphoma</i> )
<b>NHL</b>	non- Hodgkinov limfom
<b>NLPHL</b>	nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma (eng. <i>Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma</i> )
<b>NS</b>	nodularna skleroza

<b>NSCHL</b>	nodularna skleroza klasičnog Hodgkinova limfoma (eng. <i>Nodular sclerosis classic Hodgkin lymphoma</i> )
<b>RS</b>	Reed-Sternberg
<b>SAD</b>	Sjedinjene Američke Države
<b>SZO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija
<b>TNFRSF8</b>	protein iz porodice receptora čimbenika nekroze tumora (eng. <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 8</i> )

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Limfni sustav .....	1
1.2. Hodgkinov limfom .....	2
1.2.1. Etiologija .....	2
1.2.2. Klasifikacija .....	3
1.2.3. Reed-Sternbergove stanice .....	5
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	11
3. MATERIJAL I METODE .....	12
3.1. Ustroj studije.....	12
3.2. Ispitanici .....	12
3.3. Metode .....	12
3.3.1. Bojenje preparata HE tehnikom .....	12
3.3.2. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka tumorskoga tkiva.....	13
3.3.2.1. UltraView Universal DAB detekcijski kit .....	13
3.3.2.1.1. Anti-CD15 mišje monoklonalno primarno protutijelo.....	14
3.3.2.1.2. Anti-CD20 (L26) mišje monoklonalno primarno protutijelo .....	14
3.3.2.1.3. Anti-CD30 (Ber-H2) mišje monoklonalno primarno protutijelo.....	14
3.3.2.1.4. Anti-EMA (E29) mišje monoklonalno primarno protutijelo.....	14
3.3.2.1.5. Anti-PAX5 (SP34) zečje monoklonalno primarno protutijelo.....	15
3.4. Statističke metode.....	15
4. REZULTATI.....	16
5. RASPRAVA .....	22
6. ZAKLJUČAK .....	24
7. SAŽETAK .....	25
8. SUMMARY .....	26
9. LITERATURA .....	27



10.	ŽIVOTOPIS .....	32
-----	-----------------	----

## 1. UVOD

### 1.1. Limfni sustav

Limfni je sustav dio imunološkog sustava čovjeka uz pomoć kojeg se organizam bori protiv infekcija i različitih bolesti. Svojom građom podsjeća na krvožilni sustav, a sastoji se od mreže limfnih žila čija je osnovna uloga transport limfe (tekućina bogata limfocitima) te primarnih (timus, fetalna jetra, koštana srž) i sekundarnih (slezena, limfni čvorovi, limfna tkiva različitih organa) limfnih organa (1,2). Timus ili prsna žlijezda primaran je limfni organ građen od dvaju režnjeva (kora i srž). Ta endokrina žlijezda luči hormone odgovorne za produkciju, sazrijevanje i diferencijaciju T-limfocita (3). Nakon što sazru, T-limfociti napuštaju timus te ulaze u krvotok kojim putuju sve do sekundarnih limfnih organa gdje sudjeluju u obrani organizma od različitih bolesti (4). Proces i mjesto stvaranja krvnih stanica (hematopoeza) različiti su prije i nakon rođenja (5). Tijekom gestacije, glavnu ulogu u hematopoezi ima fetalna jetra, a nakon rođenja tu ulogu preuzima koštana srž koja tada postaje glavni i osnovni krvotvorni organ (5). Koštana se srž, iako nije građena od limfnog tkiva kao ostatak limfnih organa, smatra neizostavnim dijelom limfnog sustava u kojem dolazi do sazrijevanja B-limfocita, a budući da osim B-limfocita sadrži i T-limfocite te plazma stanice, naziva se i sekundarnim limfnim organom (2). Slezena je najveći limfni organ u tijelu (6). Strukturom i izgledom nalikuje limfnim čvorovima te je sastavljena od dviju vrsta tkiva, tzv. crvene i bijele pulpe (2,6). Bijela je pulpa limfno tkivo sastavljeno pretežito od limfocita smještenih oko središnjih arterija (6). S druge strane, crvena se pulpa sastoji od sinusa ispunjenih krvlju i krvnim stanicama (6). Vjerojatno je najvažnija uloga slezene ona u filtraciji krvi od različitih mikroba kao i od oštećenih eritrocita i trombocita (3). Sekundarnim limfnim organima pripadaju i tonzile za koje se kaže da se nalaze na prvoj crti obrane našeg organizma. Riječ je o nakupinama limfnog tkiva koje mogu biti smještene nazofaringealno (ždrijelna tonzila), na korijenu jezika (jezična tonzila) te orofaringealno (nepčane tonzile) (7). Dijelovi su limfnoga sustava i limfni čvorovi, guste nakupine limfocita i makrofaga međusobno razdvojeni limfnim sinusima koji se nalaze duž cijeloga tijela te se uglavnom smještaju uz limfne žile gdje obavljaju svoju osnovnu i glavnu ulogu – filtraciju limfe (8). Osnovna je uloga limfe u opskrbi tkiva hranjivim tvarima te u isto vrijeme filtraciji tkiva od otpadnih produkata razgradnje, bakterija i oštećenih stanica kao i od viška ekstracelularne tekućine čime se sprječava nastanak poremećaja u volumenu tekućina (1,9). To je način pomoću kojeg se organizam rješava toksina i ostalih štetnih tvari te sudjeluje u procesu održavanja homeostaze što je jedna od glavnih uloga limfnog sustava. Limfni se čvorovi, s

## UVOD

obzirom na različit položaj unutar tijela, dijele na limfne čvorove vrata, pazuha, prsa, abdomena i prepona. Osim limfnih žila, limfe i limfnih organa, važnu ulogu u funkcioniranju limfnog sustava imaju i limfne stanice, posebice B i T-limfociti koje izravno sudjeluju u borbi protiv infekcija te uništavaju oštećene i abnormalne kao i tumorske stanice (1,10).

Koliko je uistinu važno i neophodno pravilno funkcioniranje limfnog sustava, pokazuje činjenica da onog trenutka kada jedan od dijelova limfnog sustava zakaže, a organizmu se s vremenom postane teško boriti s različitim patogenima, dolazi do nastanka bolesti što se najčešće događa uslijed različitih infekcija ili začepljenja limfnih žila i limfnih čvorova kao i uslijed nastanka zloćudnih novotvorina limfnog tkiva (3,11).

### **1.2. Hodgkinov limfom**

Hodgkinov je limfom (HL) zloćudna novotvorina koja nastaje u limfnim čvorovima te se od ostalih tipova limfoma razlikuje s obzirom na prisutnost karakterističnih, velikih, neoplastičnih stanica, tzv. Reed-Sternbergovih (RS) stanica, s upalnim stanicama (limfociti, makrofagi, granulociti) u pozadini (12,13). Važno je napomenuti kako je za pravilnu dijagnozu Hodgkinove bolesti neophodan nalaz isključivo obiju od navedenih komponenti (13). HL je najučestalija zloćudna bolest mlađe odrasle dobi i adolescenata koja se uglavnom javlja u osoba između 15 i 30 godina starosti (12,13). Iako je prosječna dob bolesnika pri dijagnozi 32 godine, bolest se zapravo očituje bimodalnom distribucijom s najvišom incidencijom u kasnim 20-im godinama života te ponovnim povećanjem incidencije nakon 50. godine života (12,13). U bijelaca HL čini 25 – 40 % svih limfoma pokazujući dva dobna vrha, prvi u drugom i trećem desetljeću te drugi u šestom desetljeću života, dok je u azijskim i zemljama u razvoju taj udio manji gdje HL čini svega 5 – 10 % svih limfoma (13). Bolest je nešto učestalija u muškaraca nego u žena (14).

#### **1.2.1. Etiologija**

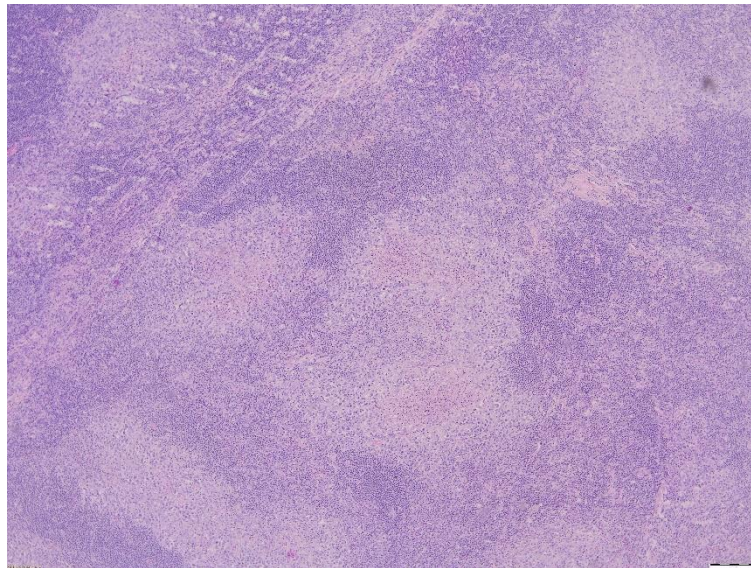
HL može započeti bilo gdje u limfnom tkivu unutar našega tijela, no najčešće nastaje unutar limfnih čvorova i to prvenstveno unutar limfnih čvorova gornjeg dijela tijela (limfni čvorovi u prsima, vratu i unutar pazušne regije) (10). Iako uzrok nastanka te bolesti i dalje ostaje nepoznanica, postoji pretpostavka kako brojni infektivni agensi poput bakterija, protozoa i virusa pridonose njezinu nastanku (15). Naime, u zapadnim se zemljama 40 do 50 % slučajeva HL-a povezuje s infekcijom Epstein-Barr virusom (EBV), odnosno navodi kako

## UVOD

su osobe koje su u prošlosti preboljele infektivnu mononukleozu podložnije obolijevanju od HL-a što dovodi u pitanje ulogu EBV-a u etiologiji HL-a (13,16). U azijskim je zemljama taj udio još i veći (oko 60 %), a najveća povezanost između infekcije EBV-om i posljedičnim nastankom HL-a zabilježena je u zemljama u razvoju te u imunokompromitiranih bolesnika gdje ta povezanost može iznositi i 100 % (13).

### 1.2.2. Klasifikacija

Postoje različiti tipovi HL-a koji se međusobno razlikuju prema načinu rasta te širenju u okolna tkiva pa je zbog toga vrlo bitno odrediti o kojem je točno tipu HL-a riječ budući da se, s obzirom na tip stanica uključenih u bolest, postavlja dijagnoza i određuju postupci liječenja (10,17). Iako postoje različite podjele HL-a, danas je uglavnom prihvaćena klasifikacija prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) koja HL razvrstava na dva osnovna tipa: klasični Hodgkinov limfom (eng. *Classic Hodgkin lymphoma* – CHL) i nodularnu limfocitnu predominaciju Hodgkinova limfoma (eng. *Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma* – NLPHL) (18,19). Klasični se HL dalje može podijeliti na četiri podtipa: nodularnu sklerozu (eng. *Nodular sclerosis classic Hodgkin lymphoma* – NSCHL), mješovitu celularnost (eng. *Mixed cellularity classic Hodgkin lymphoma* – MCCHL), limfocitnu depleciju (eng. *Lymphocyte-depleted classic Hodgkin lymphoma* – LDCHL) te limfocitima bogati klasični Hodgkinov limfom (eng. *Lymphocyte-rich classic Hodgkin lymphoma* – LRCHL) (10,12). Najčešći je tip HL-a u razvijenim zemljama NSCHL koji se javlja u više od 50 % (čak do 80 %) slučajeva (10,13). NSCHL uglavnom zahvaća osobe mlađe odrasle dobi i nešto je češći u žena te se uglavnom javlja u limfnim čvorovima vrata i/ili medijastinuma (80 % slučajeva) (10,12,13,20,21). Prognoza je bolesnika s tim tipom HL-a vrlo dobra, s petogodišnjim preživljenjem od čak 80 % (13). NSCHL određuje prisutnost lakunarnih RS stanica kao i nakupine vezivnog tkiva (kolagena) u obliku vrpce koje prodiru u parenhim i razdvajaju limfne čvorove formirajući brojne čvoriće (Slika 1.1.) (12,13,21,22).



Slika 1.1. NSCHL (biopsija 9061/2018, HE 40X)

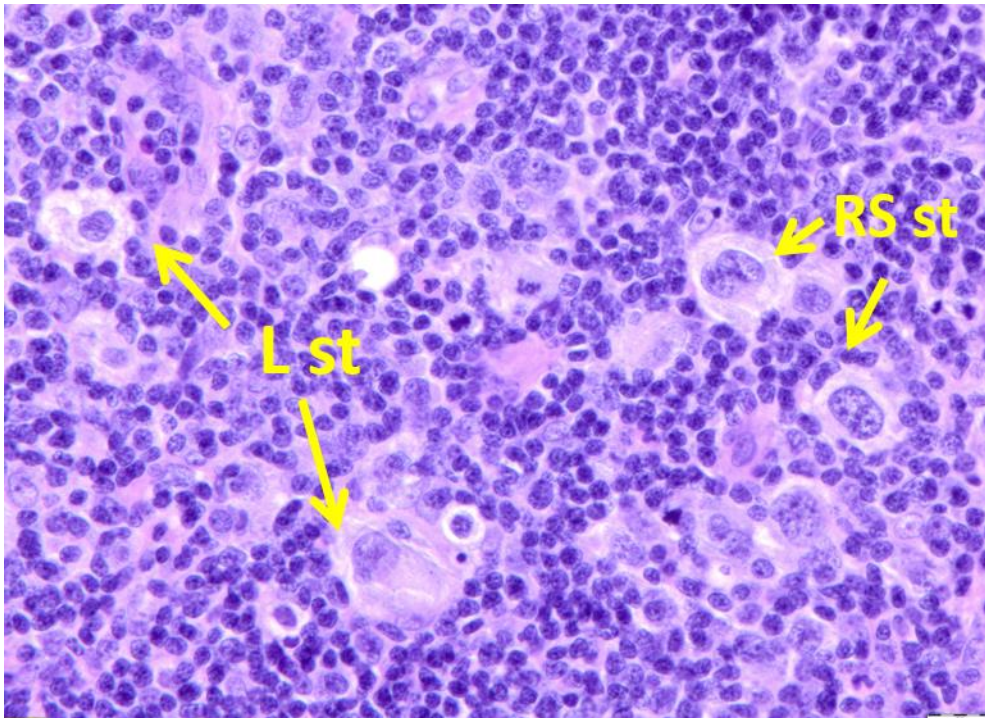
Drugi je po zastupljenosti podtip CHL-a MCCHL koji se javlja u 20 do 25 % slučajeva (12,23). MCCHL češći je u muškaraca starije životne dobi koji, osim cervikalnih i supraklavikularnih, uglavnom zahvaća i intraabdominalne limfne čvorove (12,13). Najčešće pogađa imunokompromitirane osobe, a njegovu najveću pojavnost bilježe zemlje u razvoju (24). Osim RS stanica, koje su uglavnom prisutne u velikom broju i po imunofenotipu odgovaraju RS stanicama u NSCHL-u, u pozadini su također prisutne i različite upalne stanice (T-limfociti, eozinofili, plazma stanice, makrofagi), samo bez izražene fibroze inače obilježne za NSCHL (12,24). Zanimljivo je kako su RS stanice čak u 70 % slučajeva zaražene EBV-om (12). Prognoze su, kao i kod NSCHL-a, vrlo dobre. Međutim, MCCHL nerijetko s vremenom napreduje do LDCHL-a (13). LDCHL je najmanje zastupljen oblik HL-a, s prevalencijom manjom od 5 %, koji se uglavnom javlja u industrijski nerazvijenim zemljama, a ponajviše pogađa osobe starije odrasle dobi kao i imunokompromitirane osobe te je nešto češći u muškaraca za razliku od žena (12,13,25). Za taj je tip HL-a obilježen mali broj neoplastičnih limfocita i relativno velik broj RS stanica koje su u više od 90 % slučajeva zaražene EBV-om (12,24). Posljednji je iz skupine CHL-a LRCHL. To je vrlo rijedak oblik HL-a, s prevalencijom oko 3 – 5 % koji zbog limfocitne predominacije i nodularnog obrasca rasta nalikuje NLPHL-u (13,26,27,28). S druge strane, zbog „klasičnog“ imunofenotipa tumorskih RS stanica može se reći kako oponaša i nodularnu sklerozu (NS) (12,27). Osim uobičajenog velikog broja „malih“ limfocita i nodularnog (rjeđe difuznog) rasta, za dijagnozu LRCHL-a obilježen je i izostanak neutrofila i eozinofila (13,24). LRCHL se u oko 40 % slučajeva povezuje s infekcijom EBV-om te ima vrlo dobru do izvrsnu prognozu (12,26). NLPHL je vrlo rijedak oblik HL-a i čini svega 5 % svih HL-ova (13,29). Najčešće se javlja u

## UVOD

djece i u osoba mlađe do srednje odrasle dobi te je uočeno kako je nešto češća u muškaraca (13). Za razliku od CHL-a, NLPHL raste sporije te se uglavnom dijagnosticira u ranom stadiju zbog čega je i oporavak izvjesniji (29,30). Dominantna je stanica u tom tipu HL-a limfocit predominantna (LP) stanica koja se vrlo često zbog karakterističnog oblika jezgre, koja svojim izgledom podsjeća na „kokice“, naziva još i „popcorn cell“ (12,16). Te su LP stanice uglavnom smještene unutar limfnog čvora i uglavnom su negativne na sve EBV markere (16,31).

### **1.2.3. Reed-Sternbergove stanice**

RS su stanice neoplastične stanice HL-a. Budući da je RS slične stanice osim u HL-u moguće pronaći i u non-Hodgkinovu limfomu (NHL) te reaktivnim limfadenopatijama (infektivna mononukleoza) kao i u ostalim malignim tumorima, morfologija RS stanica nije dovoljno specifična da bi se mogla postaviti sigurna dijagnoza HL-a, već je potrebna korelacija s imunohistokemijskim nalazom (12,13). Stoga se uvijek prilikom postavljanja dijagnoze HL-a traže RS stanice u kombinaciji s pripadajućim upalnim stanicama u pozadini pri čemu je, ako su nalazi obaju tipova stanica pozitivni, moguće sa sigurnošću reći kako je uistinu riječ o HL-u (13). Klasične su RS stanice (Slika 1.2.) koje se nalaze u svim podtipovima CHL-a, velike stanice (20 – 50  $\mu\text{m}$ ) s obilnom, blago acidofilnom do amfofilnom citoplazmom te prepoznatljivom binuklearnom, višenuklearnom ili višelobularnom jezgrom (13,16). Pri opisivanju jezgre RS stanica, zbog karakterističnog izgleda jezgrica koje su izrazito eozinofilne i poput preslike smještene jedna nasuprot drugoj, vrlo se često upotrebljava naziv „sovine oči“ (16,24). Mononuklearne RS stanice, također poznate i pod nazivom Hodgkinove stanice, za razliku od klasičnih RS stanica, sadrže jednu okruglu ili ovalnu jezgru te ih je moguće pronaći u različitim podtipovima HL-a, dok su u NLPHL-u rijetke (13,32). Od ostalih se tipova RS stanica u HL-u javljaju i lakunarne stanice (Slika 1.2.) obilježne za NS, pleomorfne stanice tipične za LDCHL (moguće ih je pronaći i u NSCHL-u i MCCHL-u) te mumificirane nekrobiotske stanice koje, iako se nerijetko javljaju u HL-u, nemaju važniju dijagnostičku vrijednost (13).

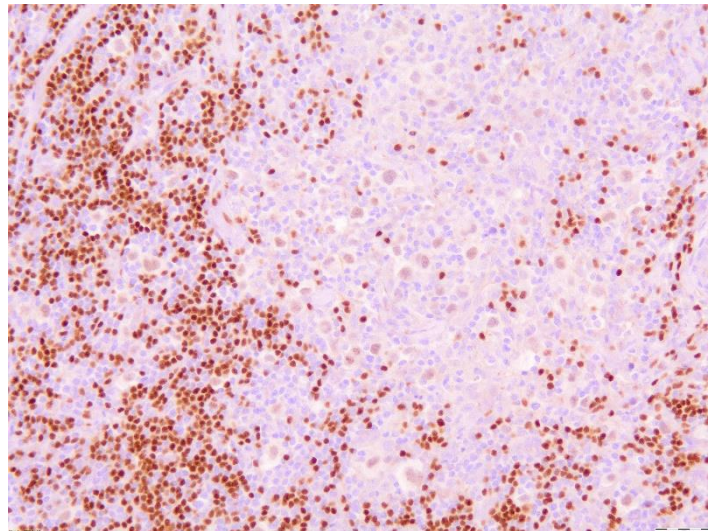


Slika 1.2. Lakunarne stanice (L st) i Reed-Sternbergove stanice (RS st), NSCHL (biopsija 12062/2018, HE 400X)

S obzirom na specifičan imunohistokemijski profil RS stanica, moguće je razlikovati različite podtipove HL-a (12). Tako su RS stanice i njihove inačice u CHL-u uglavnom PAX5+, CD15+, CD30+, a negativne na ostale B-limfocitne markere kao i na T-limfocitne markere i leukocitni CD45 antigen (12,13). PAX5 transkripcijski je čimbenik pozitivan u gotovo svim slučajevima CHL-a, markeri CD15 i CD30 izraženi su u čak 80 – 90 % slučajeva, dok je CD45 marker mnogo rjeđi te se javlja u svega 10 % slučajeva (16).

PAX5, također poznat i pod nazivom B-stanični specifični aktivator protein (BSAP), koristan je imunohistokemijski marker u diferencijalnoj dijagnostici limfoidnih neoplazmi koji ima presudnu ulogu u procesu razvoja i diferencijacije B-limfocita (33,34). Taj je marker otkriven u većini B-staničnih neoplazmi, uključujući i B-limfoblastične neoplazme, te u LP stanica NLPHL-a i u RS stanica CHL-a (Slika 1.3.) (13,16). Osim u tumorskim stanicama, PAX5 je marker eksprimiran i u jezgri „normalnih” hematolimfoidnih stanica kao što su sve stanice B-stanične loze u ranim fazama diferencijacije (osim plazma stanica) (13,34). Prisutnost je PAX5 markera u HL stanica vrlo koristan podatak prilikom samog postupka diferencijacije HL-a (B-stanični limfom) od anaplastičnog, velikostaničnog limfoma (T-stanični limfom), zbog čega se slobodno može govoriti o izrazito vrijednom dijagnostičkom markeru koji se najčešće koristi za potvrdu B-stanične loze limfoblastičnih neoplazmi (13,34).

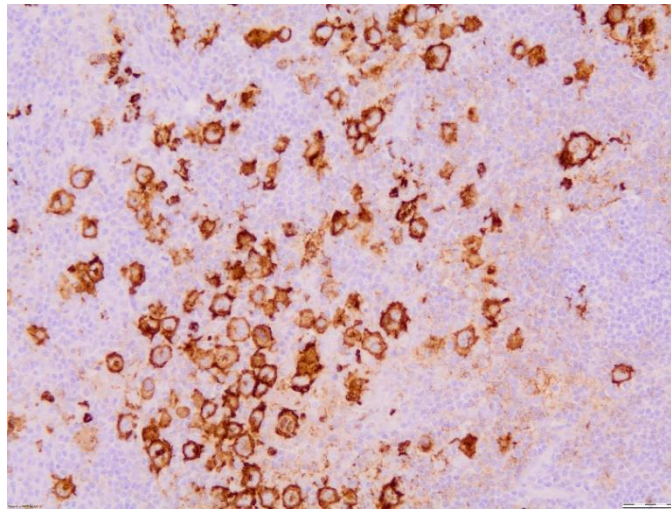




Slika 1.3. PAX5 pozitivni limfociti, NSCHL (biopsija 12062-2018, 200X)

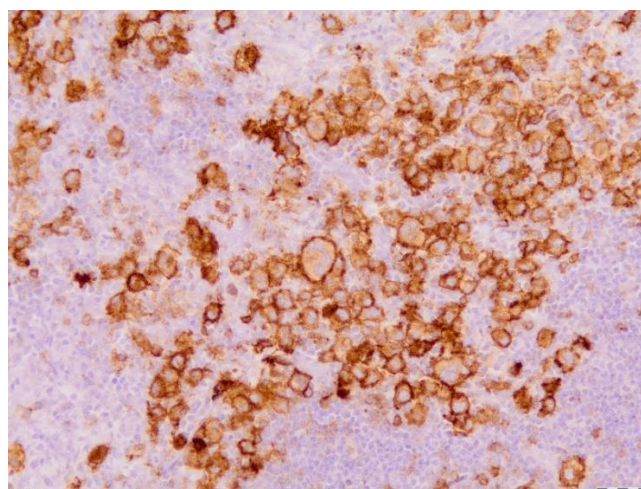
CD15 je marker imunološki značajna molekula, ugljikohidrat, koju je moguće otkriti pomoću LeuM1 protutijela (35,36). Budući da je prisutan na gotovo svim RS stanicama, smatra se vrlo korisnim dijagnostičkim markerom RS stanica, a time i dijagnostičkim markerom HL-a (35,36). Ekspresija CD15 markera zabilježena je, osim u pacijenata s HL-om (RS stanice), u rijetkim slučajevima B i T-staničnog limfoma (velike stanice), histiocitnim neoplazmama kao i u bolesnika s dijagnosticiranim mijeloidnim sarkomom, dok je u većini slučajeva NHL-a negativan (13,35,36). U slučaju CD15 markera, pozitivno obojenje pokazuje Golgijev aparat i/ili stanična membrana (Slika 1.4.) (13). Važno je napomenuti kako pozitivan CD15 marker ne mora nužno značiti kako se radi o neoplazmi budući da njega ne ekspimiraju samo tumorske stanice, već postoje i druge, „normalne” hematolimfoidne stanice poput granulocita, monocita/histiocita te citomegalovirusom (CMV) zaraženih stanica koje i inače, u normalnim uvjetima, ekspimiraju taj marker (13). Analiza se CD15 markera vrlo često koristi i za potrebe diferencijacije HL-a koji je uglavnom pozitivan, za razliku od anaplastičnog velikostaničnog limfoma koji je uglavnom negativan (36,37).





Slika 1.4. CD15 pozitivni limfociti, NSCHL (biopsija 12062-2018, 200X)

CD30 ili Ber-H2 transmembranski je glikoprotein iz porodice receptora čimbenika nekroze tumora (eng. *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 8 – TNFRSF8*) i tumorski marker važan za dijagnozu CHL-a, anaplastičnog velikostaničnog limfoma i embrionalnog karcinoma (37,38,39,40). Normalno ga eksprimiraju aktivirane T i B te poneke plazma stanice (13). CD30 je aktivacijski antigen te je kao takav eksprimiran u velikom broju imunoblasta unutar reaktivnog limfnog čvora, npr. za vrijeme EBV infekcije (infektivna mononukleoza) (40). EBV infekcija „normalnih” B-stanica dovodi do rasta CD30 ekspresije te je čak i u EBV neg. HL-u taj marker prekomjerno eksprimiran (39). CD30 je ekspresija obilježna za tumorske RS stanice većine CHL-a, velike stanice ponekih B i T-limfoma te pojedinačne slučajeve histiocitnih neoplazmi, mijeloičnih leukemija i plazmocitoma (13,16). Uglavnom su pozitivni stanična membrana i/ili Golgijevo tijelo (Slika 1.5.) (13). Za rutinsku se procjenu ekspresije CD30 markera koristi Ber-H2 protutijelo (38).

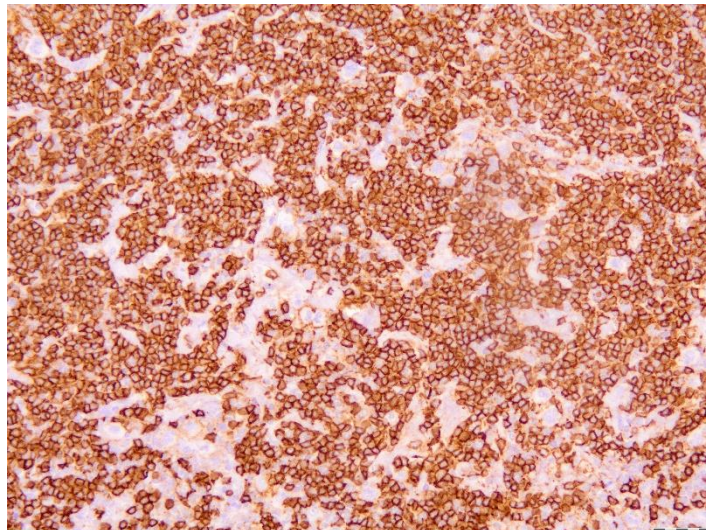


Slika 1.5. CD30 pozitivni limfociti, NSCHL (biopsija 12062-2018, 200X)

## UVOD

S druge strane, imunofenotip LP stanica, obilježnih za NLPHL, značajno se razlikuje od Hodgkinovih i RS stanica u CHL-u jer, za razliku od njih, LP varijante izražavaju niz B-staničnih markera, od kojih su najpoznatiji CD19, CD20, CD22, PAX5 i EMA, dok su uglavnom negativne na CD15 i CD30 stanične markere (12,16,30).

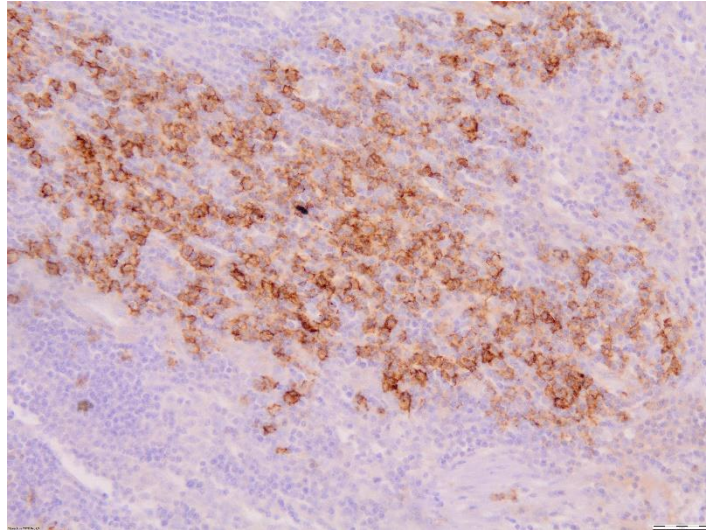
CD20 je (L26) transmembranski protein otkriven kao antigen prisutan na površini B-limfocita koji igra važnu ulogu u razvoju i diferencijaciji B-stanica u plazma stanice (41,42). U CD20 je markeru pozitivna stanična membrana, a normalno ga ekspimiraju B-stanice (sve osim plazma stanica) (Slika 1.6.) (13,16). Kada je riječ o reaktivnosti u neoplazmama, ekspimirira ga 90 % B-staničnih limfoma što ga čini savršenim B-staničnim markerom; zatim LP stanice u NLPHL-u (u čak 80 % slučajeva), RS stanice u otprilike 20 % CHL-a te rijetki T-stanični limfomi (13,16,37,41).



Slika 1.6. CD20 pozitivni limfociti, NSCHL (biopsija 12062-2018, 200X)

Epitelni je membranski antigen (EMA) glikoprotein koji ekspimiraju različite vrste epitela i njihove neoplazme (43). Međutim, ekspresija tog proteina nije isključivo vezana uz epitelne stanice, već postoje i druge stanice poput tumorskih stanica u T-staničnim limfomima, plazma stanica te LP stanica u većini NLPHL-ova koje pokazuju EMA pozitivnost (43). Plazma su stanice jedine neneoplastične stanice sposobne za EMA ekspresiju (13,43). EMA je također ekspimirana u plazma staničnim neoplazmama, anaplastičnim velikostaničnim limfomima te u NLPHL-u (13,43). Kada je u pitanju imunohistokemijska ekspresija, važnu imunoreaktivnost pokazuju stanična membrana i/ili Golgijev aparat (Slika 1.7.) (13).

## UVOD



Slika 1.7. EMA pozitivne plazma stanice, NSCHL (biopsija 9061-2018, 200X)

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj je ovog istraživanja ispitati učestalost HL-a u odnosu na spol i dob te tip HL-a u desetogodišnjem razdoblju u Kliničkom bolničkom centru Osijek (KBC Osijek). Kod svih će se HL-ova određivati imunohistokemijski profil radi diferencijacije i klasifikacije.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Ustroj studije**

Istraživanje je presječno, a pri pisanju rada upotrijebljeni su povijesni podatci.

#### **3.2. Ispitanici**

U radu će se upotrijebiti postojeća medicinska dokumentacija (arhiva) Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu dijagnosticiranih HL-ova operiranih u KBC-u Osijek od siječnja 2009. do prosinca 2018. godine. Ispitanici će se voditi pod zaporkom broja biopsije. Obrada i rezultati upotrijebljeni u studiji neće utjecati na dijagnozu i liječenje bolesnika.

#### **3.3. Metode**

Na Kliničkom se zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek u dijagnostici HL-a određuju lokalizacija te histološki tip zbog kojeg se provodi imunohistokemijska obrada tumorskoga tkiva.

Analiza se obavljala na postojećim arhivskim formalinski fiksiranim, parafinskim blokovima tumorskog tkiva. Ujedno su se koristila i arhivska stakla sa standardnim hemalaun-eozin (HE) kao i imunohistokemijskim bojenjem kod kojih su standardno određeni CD15, CD20, CD30, EMA i PAX5.

Tumorsko je tkivo bilo fiksirano u 10 %-tnom formalinu, dehidrirano u različitim koncentracijama alkohola i uklopljeno u parafinske blokove koji su rezani u rezove debljine 4 – 5  $\mu\text{m}$  te bojani standardnom HE metodom. Tumorsko je tkivo pregledano svjetlosnim mikroskopom.

##### **3.3.1. Bojenje preparata HE tehnikom**

Hemalaun je boja koja dobro boji jezgru i prikazuje jezgrine detalje. Eozin je kisela boja koja boji acidofilne strukture (citoplazmu, mišićno tkivo) različitim intenzitetima crvene

## MATERIJAL I METODE

boje. Potrebne su kemikalije: Mayerov hematoksin, 1 %-tna otopina eozina, apsolutni alkohol, ksilol (44).

Protokol:

1. Deparafinizacija u supstitutu ..... 2 x 15 minuta
2. Ispiranje u apsolutnom alkoholu ..... 3 x 5 minuta
3. Ispiranje pod tekućom vodom ..... 5 minuta
4. Nanošenje Biognost hematoksilina ..... 8,5 minuta
5. Ispiranje pod tekućom vodom ..... 3 x 3 minuta
6. Nanošenje 1 %-tne otopine eozina ..... 5 minuta
7. Ispiranje viška boje pod tekućom vodom ..... 3 x 5 minuta
8. Ispiranje u apsolutnom alkoholu ..... 3 x 10 minuta
9. Izbistravanje u supstitutu ..... 3 x 15 minuta
10. Pokrivanje u automatskom pokrivaču Tissue-tek film za montiranje trajnih preparata

### **3.3.2. Imunohistokemijsko bojenje uzoraka tumorskoga tkiva**

Na Kliničkome se zavodu za patologiju i sudsku medicinu rutinski u dijagnostici HL-a određuje cijela paleta imunohistokemijskih markera. Međutim, za potrebe su izrade ovoga rada imunohistokemijski određivani oni najčešći: CD15, CD20, CD30, EMA i PAX5.

Za imunohistokemijsko se bojenje rabio stroj za automatsko bojenje Ventana BenchMark Ultra tvrtke Roche.

#### **3.3.2.1. UltraView Universal DAB detekcijski kit**

Ventana ultraView Universal DAB (3,3'-Diaminobenzine) detekcijski kit neizravan je sustav bez biotina za otkrivanje mišjih imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina M (IgM) te zečjih primarnih protutijela. Kit je namijenjen za otkrivanje antigena u imunohistokemiji kod parafinskih rezova. Sastoji se od inhibitora peroksidaze, peroksidaza hrena (eng. Horseradish Peroxidase – HRP) multimera, DAB kromogena, peroksidaze i DAB bakra (45).

### **3.3.2.1.1. Anti-CD15 mišje monoklonalno primarno protutijelo**

Anti-CD15 mišje je monoklonalno, primarno protutijelo usmjereno protiv ugljikohidratnog epitopa prisutnog u većini granulocitnih stanica. Prije svega namijenjeno je kvalitativnom otkrivanju mononuklearnih Hodgkinovih i RS stanica u HL-u u parafinskim rezovima, na imunohistokemijskom, automatskom bojaču Ventana BenchMark Ultra tvrtke Roche. Svjetlosnim se mikroskopom utvrđuje bojenje s pozitivnom membranskom i citoplazmatskom reakcijom (45).

### **3.3.2.1.2. Anti-CD20 (L26) mišje monoklonalno primarno protutijelo**

Anti-CD20 mišje je monoklonalno, primarno protutijelo namijenjeno *in vitro* dijagnostici i usmjereno protiv epitopa prisutnog na humanim B-limfocitima. Anti-CD20 protutijelo namijenjeno je prvenstveno kvalitativnoj dijagnostici prve loze B-limfocita pomoću svjetlosnog mikroskopa, u parafinskim rezovima, na imunohistokemijskom, automatskom bojaču Ventana BenchMark Ultra tvrtke Roche. Svjetlosnim se mikroskopom utvrđuje bojenje s pozitivnom membranskom i citoplazmatskom reakcijom (45).

### **3.3.2.1.3. Anti-CD30 (Ber-H2) mišje monoklonalno primarno protutijelo**

Anti-CD30 je mišje monoklonalno, primarno protutijelo sa širokom laboratorijskom primjenom, a prvenstveno se koristi pri otkrivanju CD30 proteina u parafinskim rezovima na imunohistokemijskom, automatskom bojaču Ventana BenchMark Ultra tvrtke Roche. CD30 pozitivno bojenje pomaže pri CHL-u i anaplastičnom velikostaničnom limfomu (45).

### **3.3.2.1.4. Anti-EMA (E29) mišje monoklonalno primarno protutijelo**

Anti-EMA je mišje monoklonalno, primarno protutijelo usmjereno protiv EMA predočenih na apikalnoj površini žljezdanog epitela. Iako je taj glikoprotein prvenstveno smješten na membrani normalnih i tumorskih stanica, moguće ga je, iako rijetko, pronaći i u citoplazmi manje diferenciranih tumora. Anti-EMA se protutijelo rabi za otkrivanje antigena smještenih na membranama epitelnih stanica adenokarcinoma, malignoga mezotelioma,

bubrežnoga karcinoma i meningioma. Prvenstveno se rabi u kvalitativnoj analizi te ima *in vitro* dijagnostičku primjenu, a sama se dijagnostika provodi na parafinskim rezovima (45).

### **3.3.2.1.5. Anti-PAX5 (SP34) zečje monoklonalno primarno protutijelo**

Anti-PAX5 zečje monoklonalno, primarno protutijelo svoju je primjenu pronašlo u *in vitro* dijagnostici, a usmjereno je protiv jezgrinih epitopa predočenih na humanim B-limfocitima. Prvenstveno se rabi za identifikaciju normalnih i neoplastičnih B-limfocita, a sama se kvalitativna analiza radi na parafinskim rezovima (45).

## **3.4. Statističke metode**

Kategorijski će podatci biti predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički će podatci biti opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike će kategorijskih varijabli biti testirane hi-kvadrat testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost će raspodjele numeričkih varijabli biti testirana Shapiro-Wilkovim testom. Sve će P vrijednosti biti dvostrane. Razina će značajnosti biti postavljena na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku će se obradu rabiti statistički program MedCalc Statistical Software version 19.1.7 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).



## 4. REZULTATI

U razdoblju od deset godina (od siječnja 2009. do prosinca 2018. godine) na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek, kod bolesnika u dobi medijana 40 godina (interkvartilnog raspona od 26 do 52 godine) u rasponu od 15 do 77 godina, dijagnosticiran je ukupno 71 novootkriveni HL. Najviše je ispitanika u dobi od 21 do 30 godina, njih 17 (24 %), žena u dobi od 21 do 30 godina, a muškaraca u dobi od 31 do 40 godina. Muškaraca je 38 (54 %), a žena 33 (46 %), bez značajne razlike u odnosu na dob (Tablica 4.1.).

Tablica 4.1. Raspodjela ispitanika s HL-om prema dobi i spolu

Dob ispitanika (godine)	Broj (%) bolesnika prema spolu			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
11 do 20	3 (8)	3 (9)	6 (8)	
21 – 30	8 (21)	9 (27)	17 (24)	
31 – 40	9 (24)	3 (9)	12 (17)	
41 – 50	7 (18)	6 (18)	13 (18)	0,23
51 – 60	7 (18)	2 (6)	9 (13)	
61 – 70	2 (5)	4 (12)	6 (8)	
71 – 80	2 (5)	6 (18)	8 (11)	
Ukupno	38 (100)	33 (100)	71 (100)	

\*Fisherov egzakti test

S obzirom na tip HL-a, samo 6 (8 %) ispitanika ima NLPHL, i to nešto više muškarci, dok je CHL nešto češći kod žena, no bez statistički značajne razlike (Tablica 4.2.).

Tablica 4.2. Tip HL-a prema spolu

Tip	Broj (%) bolesnika prema spolu			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
NLPHL	5 (13)	1 (3)	6 (8)	0,21
CHL	33 (87)	32 (97)	65 (92)	
Ukupno	38 (100)	33 (100)	71 (100)	

\*Fisherov egzakti test

## REZULTATI

NLPHL javljala se prvenstveno kod muškaraca u dobi od 51 do 60 godina (4 / 6), dok je CHL značajnije češći u dobi od 21 do 30 godina (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,004$ ) (Tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Tip HL-a prema dobnim skupinama

Dob ispitanika (godine)	Broj (%) bolesnika prema tipu			P*
	NLPHL	CHL	Ukupno	
11 do 20	0	6 (9)	6 (8)	
21 – 30	0	17 (26)	17 (24)	
31 – 40	0	12 (18)	12 (17)	
41 – 50	1/6	12 (18)	13 (18)	<b>0,004</b>
51 – 60	4/6	5 (8)	9 (13)	
61 – 70	1/6	5 (8)	6 (8)	
71 – 80	0	8 (12)	8 (11)	
Ukupno	6/6	65 (100)	71 (100)	

\*Fisherov egzaktni test

I NLPHL (6 / 6) i CHL najčešće su dijagnosticirani u biopsijama limfnih čvorova (Tablica 4.4.).

Tablica 4.4. Tip HL-a prema lokalizaciji

Lokalizacija	Broj (%) bolesnika prema tipu			P*
	NLPHL	CHL	Ukupno	
limfni čvor	6/6	61 (94)	67 (94)	
parenhimni organ	0	2 (3)	2 (3)	> 0,99
kost	0	2 (3)	2 (3)	
Ukupno	6/6	65 (100)	71 (100)	

\*Fisherov egzaktni test

NLPHL dijagnosticirana je u 2 / 6 slučajeva u vratnim i u prsnim limfnim čvorovima, a CHL u 41 (67 %) slučajeva u vratnim limfnim čvorovima, bez značajne razlike u odnosu na tip (Tablica 4.5.).

## REZULTATI

Tablica 4.5. Regija limfnog čvora prema tipu HL-a

Regija limfnog čvora	Broj (%) bolesnika prema tipu			P*
	NLPHL	CHL	Ukupno	
vrat	2/6	41 (67)	43 (64)	0,12
pazuh	0	4 (7)	4 (6)	
prsa	2/6	5 (8)	7 (10)	
abdomen	1/6	8 (13)	9 (13)	
prepone	1/6	2 (3)	3 (4)	
nejasno	0	1 (2)	1 (1)	
Ukupno	6/6	61 (100)	67 (100)	

\*Fisherov egzakti test

NS pokazala se kao najučestaliji podtip CHL-a s učestalošću od 36 (55 %) ispitanika pri čemu su muškarci, za razliku od žena, obolijevali nešto više, njih 20 (61 %) u odnosu na 16 (50 %) žena.

Od ostalih podtipova, značajniju je pojavnost pokazala mješovita celularnost (MC) s učestalošću od 16 (25 %) ispitanika, bez značajne razlike u odnosu na spol. Limfocitna deplecija (LD) ne bilježi se ni kod jednog ispitanika (Tablica 4.6.).

Tablica 4.6. Podtip CHL-a prema spolu

Podtip CHL-a	Broj (%) bolesnika prema spolu			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
NS	20 (61)	16 (50)	36 (55)	0,72
MC	7 (21)	9 (28)	16 (25)	
limfocitima bogat CHL	3 (9)	2 (6)	5 (8)	
neklasificirani	3 (9)	5 (16)	8 (12)	
Ukupno	33 (100)	32 (100)	65 (100)	

\*Fisherov egzakti test

NS najčešće se javljala u dobi od 21 do 30 godina, kod 13 (36 %) ispitanika, podjednako kod muškaraca i kod žena. Za razliku od NS-a, MC se najčešće javljala (kod 5 / 16 ispitanika) u dobnoj skupini 41 – 50 godina te kod najstarijih ispitanika u dobi od 71 do 80 godina (18,75 %) kod kojih je to ujedno i najučestaliji podtip CHL-a.

Nema značajne razlike u dobi ispitanika u odnosu na podtip CHL-a (Tablica 4.7).

## REZULTATI

Tablica 4.7. Podtip CHL-a prema dobnim skupinama

Dob ispitanika (godine)	Broj / ukupno (%) bolesnika prema podtipu					P*
	CHL-a					
	NS	MC	Limfocitima bogat CHL	Neklasificirani	Ukupno	
11 do 20	5 (14)	1/16	0	0	6 (9)	
21 – 30	13 (36)	2/16	1/5	1/8	17 (26)	
31 – 40	8 (22)	2/16	1/5	1/8	12 (18)	
41 – 50	5 (14)	5/16	1/5	1/8	12 (18)	0,32
51 – 60	1 (3)	2/16	1/5	1/8	5 (8)	
61 – 70	2 (6)	1/16	0	2/8	5 (8)	
71 – 80	2 (6)	3/16	1/5	2/8	8 (12)	
Ukupno	36 (100)	16/16	5/5	8/8	65 (100)	

\*Fisherov egzakti test

Od svih regija iz kojih je moguće dijagnosticirati podtipove CHL-a, daleko je najvažnija vratna regija (limfni čvorovi vrata) u kojoj su značajno češće dijagnosticirani podtipovi HL-a NS kod 26 (72 %) ispitanika i MC kod 12 / 16 ispitanika (Fisherov egzakti test, P = 0,04) (Tablica 4.8.).

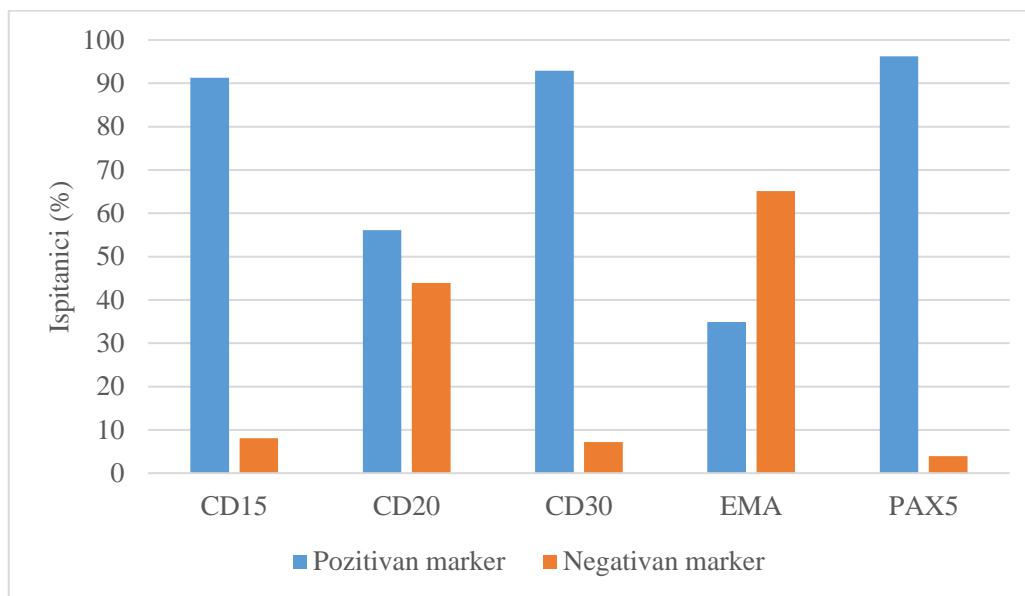
Tablica 4.8. Podtip CHL-a prema lokalizaciji limfnog čvora

Lokalizacija limfnog čvora	Broj / ukupno (%) bolesnika prema podtipu					P*
	CHL-a					
	NS	MC	Limfocitima bogat CHL	Neklasificirani	Ukupno	
vrat	26 (72)	12/16	2/5	¼	41 (67,2)	
pazuh	2 (6)	0	2/5	0	4 (6,6)	
prsa	3 (8)	1/16	1/5	0	5 (8,2)	
abdomen	4 (11)	1/16	0	¾	8 (13,1)	<b>0,04</b>
prepone	1 (3)	1/16	0	0	2 (3,3)	
nejasno	0	1/16	0	0	1 (1,6)	
Ukupno	36 (100)	16/16	5/5	4/4	61 (100)	

\*Fisherov egzakti test

## REZULTATI

U svrhu dijagnostike i klasifikacije HL-a, svakodnevno se rutinski određuje cijela paleta imunohistokemijskih markera (CD3, CD15, CD19, CD20, CD30, CD45 LCA, CD68, CD79 alfa, EMA, EBV, PAX5...), no za potrebe izrade ovoga rada određivani su standardni markeri (CD15, CD20, CD30, EMA i PAX5). Od standardnih markera najviše su upotrebljavani CD30, u 70 (99 %) slučajeva i CD15 u 69 (97 %) slučajeva. Od ukupno 69 (97 %) učinjenih CD15 markera, njih su 63 (91 %) pozitivna, a pozitivne rezultate daje i CD30 marker koji je bio pozitivan u 65 (93 %) slučajeva. Marker CD20 koristio se u 57 (80 %) ispitanika i bio je pozitivan u 32 (56 %) slučaja; marker EMA koristi se u 43 (61 %) slučaja, a pozitivan je u 15 (35 %) slučajeva, dok se PAX5 koristio kod 26 (37 %) ispitanika, a pozitivan je u 25 (96 %) slučajeva (Slika 4.8.).



Slika 4.8. Udio pozitivnih i negativnih markera u dijagnosticiranju HL-a

Ispitanici su imali jedan ili više pozitivnih markera. U najvećem broju slučajeva, kod 34 (48 %) ispitanika, radilo se o trima pozitivnim markerima, dok je u rijetkim slučajevima bio pozitivan samo jedan marker, kod jednog (1 %) ispitanika, odnosno svih pet markera kod dvaju (3 %) ispitanika (Tablica 4.9.).

## REZULTATI

Tablica 4.9. Broj pozitivnih markera

Broj pozitivnih markera	Broj (%) Ispitanika
1	1 (1)
2	25 (35)
3	34 (48)
4	9 (13)
5	2 (3)

## 5. RASPRAVA

Na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek u razdoblju od deset godina (od siječnja 2009. do prosinca 2018. godine) dijagnosticiran je 71 novootkriveni HL.

HL je najučestalija bolest mlađe odrasle dobi, odnosno najčešće pogađa osobe između 15. i 30. godine života te se očituje bimodalnom distribucijom s najvišom incidencijom u kasnim dvadesetim godinama života kao i ponovnim povećanjem nakon 50. godine života (12,13). Raspon je dobi naših ispitanika bio od 15 do 77 godina, s prosječnom životnom dobi 42,5 godine. Najviše je ispitanika bilo u dobi od 21 do 30 godina, njih 17 (24 %), od kojih žena u dobi od 21 do 30 godina, a muškaraca u dobi od 31 do 40 godina.

Prema statističkim podacima Cancer Research UK, u Ujedinjenom je Kraljevstvu u 2017. godini od HL-a oboljelo ukupno 2 145 osoba, od kojih 41 % žena i 59 % muškaraca, s vidljivom muškom predominacijom (46). Također, American Cancer Society procjenjuje kako će u 2020. godini od HL-a u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) oboljeti približno 8 480 ljudi, od kojih će u nešto većoj mjeri biti zastupljeni muškarci (55,31 %), za razliku od žena (44,69 %) (47). Među našim je ispitanicima bilo 38 (54 %) muškaraca, a žena 33 (46 %), bez značajne razlike u odnosu na dob.

NLPHL je češća u muškaraca nego u žena, a kako je uistinu riječ o bolesti s većom incidencijom u muškaraca (muškarci / žene = 3 : 1), potvrđuju i rezultati istraživanja provedenog u Teksasu i Georgiji (SAD) (13,48). Među našim je ispitanicima incidencija NLPHL-a također nešto veća u muškaraca nego u žena, dok je CHL nešto češći u žena, no bez statistički značajne razlike.

CHL se najčešće javlja kao unifokalna bolest, s obilježnim obrascem širenja od jedne do druge skupine limfnih čvorova, koja u iznimnim slučajevima završava u slezeni te ostalim ekстранodalnim područjima (13,16). Iako se uglavnom radi o perifernim limfnim čvorovima, u pojedinim podtipovima CHL-a moguća je i abdominalna te mediјastinalna lokalizacija limfnih čvorova (49). Rezultati našeg istraživanja pokazali su kako je svih šest NLPHL-ova dijagnosticirano u biopsijama limfnih čvorova, gdje je najčešće dijagnosticiran i CHL, te da je uglavnom riječ o limfnim čvorovima vrata. NLPHL je dijagnosticirana u 2 / 6 slučajeva u vratnim i u prsnim limfnim čvorovima, dok je CHL u 41 (67 %) slučajeva dijagnosticiran u vratnim limfnim čvorovima, no bez značajne razlike u odnosu na tip.

## RASPRAVA

NS je češća u žena za razliku od ostalih podtipova s jasno izraženom muškom predominacijom (16,49). Prema rezultatima našeg istraživanja, NS se pokazala kao najučestaliji podtip HL-a s učestalošću od 36 (55 %) ispitanika gdje su muškarci, za razliku od žena, obolijevali nešto više. Od ostalih podtipova, značajniju pojavnost pokazala je MC s učestalošću od 16 (25 %) ispitanika bez značajne razlike u odnosu na spol. No, veći je broj studija pokazao kako je MC ipak nešto češća u muškaraca nego u žena (13,16,49,50,51).

NS se uglavnom javlja u osoba mlađe odrasle dobi i vrlo je rijetka u osoba nakon 50. godine života (52). Među našim ispitanicima NS se najčešće javljala u dobi od 21 do 30 godina, kod 13 (36 %) ispitanika, podjednako kod muškaraca i kod žena, za razliku od MC-a koja se najčešće javljala (kod 5 / 16 ispitanika) u dobnoj skupini 41 – 50 godina te kod najstarijih ispitanika u dobi od 71 do 80 godina (18,75 %) kod kojih je to ujedno i najučestaliji podtip CHL-a. S druge strane, prema rezultatima istraživanja provedenog u Indiji u razdoblju od pet godina (od siječnja 2006. do listopada 2009. godine), najučestaliji podtip HL-a bila je MC s najvećom incidencijom u najmlađoj skupini ispitanika (1 – 10 godina) u kojoj su prevladavali muškarci (79 %) te u ispitanika u dobi od 21 – 30 godina, također s većom učestalošću u muškaraca (71 %) (50).

Za dijagnostiku i klasifikaciju se HL-a koriste standardni imunohistokemijski markeri (CD15, CD20, CD30, EMA i PAX5) od kojih se, prema rezultatima našeg istraživanja, najviše koriste CD30 u 70 (99 %) slučajeva i CD15 u 69 (97 %) slučajeva. Naši su ispitanici imali jedan ili više pozitivnih markera. U najvećem se broju slučajeva, kod 34 (48 %) ispitanika, radilo o trima pozitivnim markerima, dok je u rijetkim slučajevima bio pozitivan samo jedan marker, odnosno svih pet markera. CD15 je marker bio pozitivan u 63 (91 %) od ukupno 69 (97 %) učinjenih CD15 markera, dok je CD30 marker bio pozitivan u 65 (93 %) slučajeva. Studije su pokazale kako su upravo ti markeri dva najčešće pozitivna markera u osoba s HL-om, odnosno da je CD15 eksprimiran u više od 80 %, a CD30 u više od 90 % slučajeva HL-a (16). Iz tog se razloga, zbog svoje velike učestalosti kod osoba s HL-om, CD15 i CD30 markeri najčešće određuju zajedno te je većina osoba s HL-om pozitivna na oba markera (50).



## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, može se zaključiti:

1. U razdoblju od siječnja 2009. do prosinca 2018. godine na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek dijagnosticiran je 71 HL. Najveći je broj ispitanika bio u dobi od 21 do 30 godina, od kojih je muškaraca bilo nešto više u odnosu na žene.

2. NLPHL se češće javljala u muškaraca, dok je CHL nešto češći bio u žena.

3. NLPHL se prvenstveno javljala u dobi od 51 do 60 godina, dok je CHL bio značajnije češći u dobi od 21 do 30 godina.

4. Najučestaliji je podtip CHL-a bila NS, od koje su muškarci, za razliku od žena, oboljevali nešto više. Od ostalih podtipova, značajnija pojavnost zabilježena je kod MC-a, no bez značajne razlike u odnosu na spol.

5. NS se najčešće javljala u dobi od 21 do 30 godina, podjednako kod muškaraca i žena. Za razliku od NS-a, MC se najčešće javljala u dobnoj skupini 41 – 50 godina te kod najstarijih ispitanika u dobi od 71 do 80 godina. Nije postojala značajnija razlika u dobi ispitanika u odnosu na podtip CHL-a.

6. Najčešće su određivani imunohistokemijski markeri u dijagnostici i klasifikaciji HL-a bili CD30 i CD15. CD15 je marker bio pozitivan u 91 % slučajeva, a CD30 marker u 93 % slučajeva.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati učestalost HL-a u odnosu prema spolu i dobi te tipu HL-a u desetogodišnjem razdoblju u KBC-u Osijek. Kod svih je HL-ova određivan imunohistokemijski profil radi diferencijacije i klasifikacije.

**Ustroj studije:** Presječna s povijesnim podacima.

**Ispitanici i metode:** Istraživanjem je obuhvaćen 71 HL, dijagnosticiran na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek u razdoblju od deset godina, kod kojeg je provedena imunohistokemijska obrada tumorskoga tkiva koja se temeljila na određivanju standardnih markera CD15, CD20, CD30, EMA i PAX5. Za imunohistokemijsku je obradu korišten stroj za automatsko bojenje Ventana BenchMark Ultra tvrtke Roche.

**Rezultati:** Najviše je ispitanika bilo u dobi od 21 do 30 godina (24 %). Muškaraca je bilo 54 %, a žena 46 %. NLPHL je bila češća u muškaraca, prvenstveno u dobi od 51 do 60 godina, dok je CHL bio češći u žena, značajnije češći u dobi od 21 do 30 godina. I NLPHL i CHL su najčešće dijagnosticirani u biopsijama limfnih čvorova. Najučestaliji podtip CHL-a bila je NS (55 %) koja se uglavnom javljala u dobi od 21 do 30 godina, a značajniju pojavnost pokazala je i MC (25 %) s najvećom učestalošću u dobi od 41 do 50 godina te u dobi od 71 do 80 godina. U limfnim su čvorovima vrata značajno češće dijagnosticirani NS (72 %) te MC (12 / 16). Najčešće su upotrijebljeni markeri bili CD30 i CD15. CD15 je marker bio pozitivan u 91 %, a CD30 marker u 93 % ispitanika.

**Zaključak:** Imunohistokemijska je obrada neophodna za dijagnostiku i klasifikaciju HL-a.

**Ključne riječi:** Hodgkinov limfom, imunohistokemija, markeri, klasifikacija

## 8. SUMMARY

**Objective:** The aim of this study was to determine the prevalence of HL according to sex, age and HL type in a ten-year period at Clinical Hospital Centre Osijek. Immunohistochemical profiling was performed on all HL for the purpose of differentiation and classification.

**Structure of the study:** Cross-sectional study with historical data.

**Participants and methods:** The study included 71 case of HL diagnosed at Clinical Institute for Pathology and Forensic Medicine at Clinical Hospital Centre Osijek in a ten-year period using immunohistochemical method based on determination of a standard markers CD15, CD20, CD30, EMA and PAX5. For immunohistochemical method an automated stainer Ventana BenchMark Ultra and monoclonal antibodies of the company Roche have been used.

**Results:** Majority of participants (24 %) was at the age of 21 – 30. 54 % of all participants was male and 46 % was female. The NLPHL was more common in men, especially at the age of 51 – 60, while the CHL was more common in women, significantly more common at the age of 21 – 30. Both NLPHL and CHL were mostly diagnosed inside lymph nodes. The most common subtype of CHL was NS (55 %) with the highest prevalence at the age of 21 – 30. The MC also showed significant incidence (25 %) with the highest prevalence at the age of 41 – 50 as well as at the age of 71 – 80. Inside neck lymph nodes, significantly more often diagnoses were NS (72 %) and MC (12 / 16). The most frequently used markers were CD30 and CD15. CD15 showed positivity in 91 % of the cases, while CD30 was positive in 93 % of them.

**Conclusion:** Immunohistochemistry is essential in diagnostic and classification of HL.

**Keywords:** Hodgkin lymphoma, immunohistochemistry, markers, classification.

## 9. LITERATURA

1. Cancer Research UK. The lymphatic system and cancer. Dostupno na adresi: <https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/body-systems-and-cancer/the-lymphatic-system-and-cancer>. Datum pristupa: 22.02.2020.
2. Abbas AK, Lichtman AU. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 3. izd. Philadelphia: Saunders; 2011.
3. Medical News Today. What does the lymphatic system do? Dostupno na adresi: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/303087>. Datum pristupa: 22.02.2020.
4. National Cancer Institute. Thymus. Dostupno na adresi: <https://training.seer.cancer.gov/index.html>. Datum pristupa: 21.08.2020.
5. Periša N. Citomorfološke karakteristike akutnih leukemija dječje dobi. (završni rad) Split 2015.
6. National Cancer Institute. Spleen. Dostupno na adresi: <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/lymphatic/components/spleen.html>. Datum pristupa: 21.08.2020.
7. National Cancer Institute. Tonsils. Dostupno na adresi: <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/lymphatic/components/tonsils.html>. Datum pristupa: 21.08.2020.
8. National Cancer Institute. Lymph nodes. Dostupno na adresi: <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/lymphatic/components/nodes.html>. Datum pristupa: 21.08.2020.
9. Britannica. Lymphatic system. Dostupno na adresi: <https://www.britannica.com/science/lymphatic-system>. Datum pristupa: 22.02.2020.
10. American Cancer Society. What is Hodgkin lymphoma? Dostupno na stranici: <https://www.cancer.org/cancer/hodgkin-lymphoma/about/what-is-hodgkin-disease.html>. Datum pristupa: 02.05.2020.
11. Live Science. Lymphatic System: Facts, Functions & Diseases. Dostupno na adresi: <https://www.livescience.com/26983-lymphatic-system.html>. Datum pristupa: 22.02.2020.
12. Kumar V, Abbas AK, Aster AC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9. izd. Philadelphia: Saunders; 2014. str. 606-11.
13. Fletcher CDM. Diagnostic Histopathology of Tumors. 4. izd. Philadelphia: Saunders; 2013. str. 1345-76.

## LITERATURA

14. Cancer. Net. Lymphoma-Hodgkin: Risk Factors. Dostupno na adresi:  
<https://www.cancer.net/cancer-types/lymphoma-hodgkin/risk-factors>. Datum pristupa:  
14.08.2020.
15. Britannica. Hodgkin Lymphoma. Dostupno na adresi:  
<https://www.britannica.com/science/Hodgkin-lymphoma>. Datum pristupa: 24.04.2020.
16. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10. izd. Maryland Heights: Mosby; 2011. str. 1772-819.
17. Mayo Clinic. Hodgkin's lymphoma (Hodgkin's disease). Dostupno na adresi:  
<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/hodgkins-lymphoma/symptoms-causes/syc-20352646>. Datum pristupa: 22.08.2020.
18. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
19. Ivančević Ž, Rumboldt Z, Bergovec M, Silobričić V. MSD-priručnik dijagnostike i terapije. Split; Placwbo; 2000.
20. Science Direct. Nodular Sclerosis. Dostupno na adresi:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/nodular-sclerosis>. Datum pristupa: 16.08.2020.
21. Verywell Health. An Overview of Nodular Sclerosing Hodgkin Lymphoma. Dostupno na adresi: <https://www.verywellhealth.com/nodular-sclerosing-hodgkins-lymphoma-2252198>. Datum pristupa: 02.05.2020.
22. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma (NScHL). Dostupno na adresi:  
<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/NodulSclerosClassicHodgkinID1565.html>. Datum pristupa: 20.04.2020.
23. Verywell Health. Overview of Mixed Cellularity Hodgkin Lymphoma. Dostupno na adresi: <https://www.verywellhealth.com/mixed-cellularity-hodgkins-lymphoma-2252196>. Datum pristupa: 02.05.2020.
24. Pathology Outlines. Lymphoma & related disorders. Dostupno na adresi:  
<http://www.pathologyoutlines.com/topic/lymphomanonBmixed.html>. Datum pristupa: 02.05.2020.
25. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Lymphocyte depletion classical Hodgkin lymphoma. Dostupno na adresi:

## LITERATURA

- <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/LymphoDepletClassicHodgkinID1568.html>.  
Datum pristupa: 20.04.2020.
26. Nam-Cha SH, Montes-Moreno S, Salcedo MT, Sanjuan J, Garcia JF, Piris MA.  
Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: distinctive tumor and microenvironment markers. *Mod Pathol*. 2009;22:1006-15.
27. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Lymphocyte-rich classical Hodgkin Lymphoma. Dostupno na adresi:  
<http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/LymphRichClassicHodgkinID1567.html>.  
Datum pristupa: 20.04.2020.
28. Science Direct. Lymphocyte-Rich Classical Hodgkin Lymphoma. Dostupno na adresi:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/lymphocyte-rich-classical-hodgkin-lymphoma>. Datum pristupa: 16.08.2020.
29. Lymphoma action. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. Dostupno na adresi: <https://lymphoma-action.org.uk/types-lymphoma-hodgkin-lymphoma/nodular-lymphocyte-predominant-hodgkin-lymphoma>. Datum pristupa: 14.05.2020.
30. Eichenauer DA, Engert A. Nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma: a unique disease deserving unique management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017;1:324-8.
31. Orphanet. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. Dostupno na adresi:  
[https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=GB&Expert=86893](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB&Expert=86893). Datum pristupa: 20.04.2020.
32. NCBI. Reed Sternberg Cells. Dostupno na adresi:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542333/>. Datum pristupa: 02.05.2020.
33. Desouki MM, Post GR, Cherry D, Lazarchick J. PAX-5: a valuable immunohistochemical marker in the differential diagnosis of lymphoid neoplasms. *Clin Med Res*. 2010;8:84-8.
34. Science Direct. PAX5. Dostupno na adresi:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/pax5>. Datum pristupa: 14.07.2020.
35. Science Direct. CD15. Dostupno na adresi:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/cd15>. Datum pristupa: 14.07.2020.
36. Humpath.com – Human pathology. CD15. Dostupno na adresi:  
<https://www.humpath.com/spip.php?article4543>. Datum pristupa: 10.07.2020.
37. Pathology Outlines. CD Markers. Dostupno na adresi:  
<http://www.pathologyoutlines.com/cdmarkers.html>. Datum pristupa: 10.07.2020.

## LITERATURA

38. Van der Weyden CA, Pileri SA, Feldman AL, Whisstock J, Prince HM. Understanding CD30 biology and therapeutic targeting: a historical perspective providing insight into future directions. *Blood Cancer J.* 2017;7.
39. Gottesman SR. CD30: receptor, marker, target. *PLMI.* 2016;8:27-36.
40. Science Direct. CD30. Dostupno na adresi:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/cd30>. Datum pristupa: 14.07.2020.
41. Science Direct. CD20. Dostupno na adresi:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/cd20>. Datum pristupa: 11.07.2020.
42. Verywell Health. CD20 Marker and Relevance to Lymphoma. Dostupno na adresi:  
<https://www.verywellhealth.com/cd20-cd-marker-2252140>. Datum pristupa: 02.05.2020.
43. Science Direct. Epithelial Membrane Antigen. Dostupno na adresi:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/epithelial-membrane-antigen>. Datum pristupa: 11.07.2020.
44. Armed Forces Institute of Pathology. Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology. 1994. str. 53-5.
45. Atlas Antibodies. IHC Protocol – Ventana Discovery XT. Dostupno na stranici:  
<https://www.atlasantibodies.com/resources/antibody-applications/protocols/ihc-protocol-ventana/>. Datum pristupa: 25.08.2020.
46. Cancer Research UK. Hodgkin Lymphoma incidence statistics. Dostupno na adresi:  
<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/hodgkin-lymphoma/incidence#heading-Zero>. Datum pristupa: 14.08.2020.
47. Cancer.Net. Lymphoma-Hodgkin: Statistics. Dostupno na adresi:  
<https://www.cancer.net/cancer-types/lymphoma-hodgkin/statistics>. Datum pristupa: 23.08.2020.
48. Flowers CR, Nastoupil LJ. Identifying racial differences in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Cancer.* 2015;121(19):3387-9.
49. Mani H, Jaffe ES. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with newer insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009;9(3):206-16.
50. Konkay K, Paul TR, Uppin SG, Rao DR. Hodgkin lymphoma: A clinicopathological and immunophenotypic study. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2016;37(1):59-65.
51. Science Direct. Mixed Cellularity Hodgkin Lymphoma. Dostupno na adresi:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/mixed-cellularity-hodgkin-lymphoma>. Datum pristupa: 16.08.2020.

## LITERATURA

52. Science Direct. Nodular Sclerosis Hodgkin Lymphoma. Dostupno na stranici:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/nodular-sclerosis-hodgkin-lymphoma>. Datum pristupa: 16.08.2020.



## **10. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODATCI**

Ime i prezime: Mia Galeković

Datum i mjesto rođenja: 22. svibnja 1996., Osijek

### **OBRAZOVANJE**

2003. – 2011. Osnovna škola Jagode Truhelke

2011. – 2015. II. gimnazija Osijek

2015. – 2018. Medicinski fakultet Osijek, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2018. – 2020. Medicinski fakultet Osijek, diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika