

Trisomija 3, onkoprotein BCL 10 i MALT želuca kod infekcije s *Helicobacter pylori*

Gašparov, Slavko

Doctoral thesis / Disertacija

2004

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:610624>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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





Središnja medicinska knjižnica

Gašparov , Slavko (2004) *Trisomija 3, onkoprotein BCL 10 i MALT želuca kod infekcije s Helicobacter pylori.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/346>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Slavko Gašparov

**TRISOMIJA 3, ONKOPROTEIN BCL10 I MALT ŽELUCA
KOD INFEKCIJE S HELICOBACTER PYLORI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Zagreb, 2004.

Rad je izrađen na Odjelu za patologiju i citologiju te Odjelu za molekularnu dijagnostiku Zavoda za kliničku kemiju KB "Merkur" u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Mara Dominis

ZAHVALA

Prof. dr. sc. Mari Dominis, mentoru i glavnom pokretaču izrade i dovršenja ovog rada zahvaljujem na upornosti, zavidnoj strpljivosti i nesebičnoj intelektualnoj potpori.

Posebnu zahvalu dugujem prof. dr. sc. Davoru Ivankoviću na utrošenom vremenu i trudu u obradi podataka i rezultata istraživanja te odabiru strategije prezentacije zaključaka čime je zaokružena smislenost ovog rada.

Sonja Džebro uvijek je bila raspoložena za pomoć brojnim korisnim sugestijama. Hvala.

Zahvaljujem Tatjani Gudelj, med. lab. ing. i Biserki Pleško, med. teh. na pomoći u laboratorijskoj obradi materijala korištenog u ovom radu, Petri Korać, dipl. ing. mol. biologije bez koje bi "FISH na parafinu" bio noćna mora, te svim ostalim članovima Odjela za patologiju i citologiju KB Merkur na potpori i razumijevanju.

Doc.dr.sc. Rajku Kušecu i prof. dr.sc. Miroslavi Katičić zahvaljujem na korisnim savjetima i na materijalnoj potpori.

SADRŽAJ:

1.0	UVOD	1
1.1	Histologija želuca.....	1
1.2	<i>Helicobacter pylori</i>	4
1.3	<i>Helicobacter pylori</i> i sluznica želuca.....	6
1.3.1	Upalni odgovor na infekciju – gastritis.....	6
1.3.2	MALT (mucosa associated lymphoid tissue) – limfatično tkivo sluznice.....	11
1.4	MALT limfom i B – velikostanični limfom želuca.....	13
1.5	BCL10 i limfomi želuca.....	18
1.6	Trisomija 3 i limfomi želuca.....	23
2.0	CILJ ISTRAŽIVANJA	25
3.0	BOLESNICI I METODE	26
3.1	Bolesnici.....	26
3.2	Metode.....	30
3.2.1	Gastroskopija.....	30
3.2.2	Histologija.....	30
3.2.3	Imunohistokemijsko bojenje.....	31
3.2.4	Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) na parafinskim rezovima.....	32
3.2.5	Statistička analiza.....	35
4.0	REZULTATI	36
4.1.	Usporedba endoskopskih nalaza u bolesnika grupe I i grupe II	36
4.2.	Usporedba prisutnosti i količine <i>H. pylori</i> u bolesnika grupe I, II i III ...	37
4.3.	Usporedba ekspresije BCL10 u bolesnika grupe I, II i III.....	39

4.4.	Usporedba prisutnosti trisomije 3 u bolesnika grupe I, II i III	40
4.5.	Usporedba prisutnosti i količine H. pylori s ekspresijom BCL10 u bolesnika grupe I, II i III.....	40
4.6.	Usporedba prisutnosti i količine H. pylori s nalazom trisomije 3 u bolesnika grupe II i III.....	43
4.7.	Analiza preživljenja.....	44
5.0	RASPRAVA.....	48
6.0	ZAKLJUČCI.....	56
7.0	SAŽETAK.....	57
8.0	SUMMARY.....	58
9.0	LITERATURA.....	59
10.0	ŽIVOTOPIS.....	71

Popis kratica:

- H. pylori - Helicobacter pylori
- MALT - limfatično tkivo sluznice (engl. mucosa associated lymphoid tissue)
- VacA - vakuolizirajući citotoksični antigen (engl. vaculating cytotoxin antigen)
- IL - interleukin
- TNF - tumorski nekrotizirajući faktor (engl. tumor necrosis factor)
- LF - limfatični folikul (engl. lymphoid follicle)
- LN - limfatični nodul ili nakupina (engl. lymphoid nodule)
- Ig - imunoglobulin
- LEL - limfoepitelijalna promjena (engl. lymphoepithelial lesion)
- CCL - centrocitima slični limfociti (engl. centrocyte like lymphocytes)
- DLBCL - difuzni velikostanični B limfom (engl. diffuse large B-cell lymphoma)
- MZBCL - limfom marginalne zone (engl. marginal zone B-cell lymphoma)
- NF- κ B - nuklearni faktor kappa B
- d.f. - stupnjevi slobode (engl. degrees of freedom)
- CagA - citotoksični antigen (engl. cytotoxin associated gene A)
- PAI - otoci patogenosti (engl. pathogenicity island)
- CD - razlikovni antigeni (engl. cluster of differentiation)
- FISH - fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. fluorescent *in situ* hybridization)
- DNK - deoksiribonukleinska kiselina

1.UVOD

1.1 HISTOLOGIJA ŽELUCA

Anatomski se u želucu razlikuju četiri dijela: kardija, fundus, korpus i pilorus. Kako su fundus i korpus jednake mikroskopske građe, histološki se govori o tri cjeline želuca. Sluznica želuca je strukturno i funkcionalno najkompleksniji sloj. Najtanja je u području kardije dok je najdeblja, do 2 mm u korpusu. Sluznica je građena od tri komponente: epitela, lamine proprije i muskularis mukoze. Površinski epitel sluznice želuca utiskuje se u lamini propriju te stvara želučane jamice u koje se "otvaraju" tubularne žlijezde specifične za svaku anatomsku cjelinu (kardijalne, specifične i pilorične).

Lamina proprija je najobilnija u površnim dijelovima sluznice, naročito u području kardije i pilorusa, a vrlo je oskudna u korpusu. Histološki je sastavljena od retikulinskih, elastičnih i kolagenih vlakana, kapilarne mreže, arteriola, limfatičnih prostora i nemijeliniziranih živčanih vlakana. U lamini propriji nalaze se fibroblasti, glatke mišićne stanice, histiociti, rijetki B-limfociti, pokoji neutrofilni granulocit te plazma stanice koje uglavnom stvaraju IgA imunoglobuline kao i u preostalom dijelu gastrointestinalnog trakta (1).

Površina sluznice i želučane jamice obložene su površinskim cilindričnim mucinoznim stanicama. Funkcija ovih stanica je produkcija neutralnih glikoproteina i bikarbonata koji štite sluznicu neutraliziranjem kiselog sadržaja želuca. Na granici želučanih jamica i žlijezda (istmus ili vrat) nalaze se stanice slične stanicama površnog epitela, ali uz nešto oskudniju količinu neutralnih glikoproteina, PAS

(periodic acid-Schiff) pozitivnih, mogu sadržavati i nešto kiselih mucina (alcian blue, pH 2,5).

To su tzv. progenitorne, nediferencirane stanice čijom se diferencijacijom nadomještaju sve ostale stanice sluznice. Utvrđeno je da se stanice površnog epitela zamjene svakih 4-8 dana dok se ostale stanice zamjene kroz 1-3 godine (2). Usprkos ubrzane diobe, histološki se ne uočavaju mitoze (3). U korpusu i fundusu se nalaze dugačke, razgranate gusto zbijene tubularne tzv. specifične žlijezde, a foveole čine tek 25% debljine sluznice. Žlijezde su obložene parijetalnim (obložnim), glavnim (zimogenim) te enteroendokrinim stanicama. U kardiji i pilorusu se nalaze kratke, jednostavne, razgranate (kardiopilorične) žlijezde, a foveole su dugačke i čine preko 50% debljine sluznice. Ove su žlijezde obložene pretežno mukoznim i enteroendokrinim stanicama, ali u većeg broja ljudi može se naći i određen broj obložnih stanica, dok se glavne stanice ne nalaze izvan korpusa i fundusa. Granica između korpusa i pilorusa je neoštra, duljine 1-2 cm, te se u toj prijelaznoj zoni često nalaze i korpusne i kardiopilorične žlijezde.

Parijetalne stanice nalaze se pretežno u srednjem i gornjem dijelu žlijezda, ali ih se nađe i u vratu, kao i u bazalnom dijelu žlijezda. One su zaobljene, piramidnog oblika, centralno smještene jezgre i izrazito eozinofilne, granulirane citoplazme. Funkcija ovih stanica je sinteza solne kiseline, te želučanog unutarnjeg faktora (engl. intrinsic factor, IF) neophodnog za apsorpciju vitamina B12.

Glavne su stanice smještene uglavnom u bazalnom dijelu želučanih žlijezda. To su niske kubične stanice s bazalno smještenom jezgrom i bazofilnom citoplazmom, te stvaraju dvije imunološki različite grupe proteolitičkih enzima (pepsinogen I i II) u

neaktivnom (proenzimskom) obliku. Nakon stimulacije iz citoplazmatskih granula neaktivni se pepsinogen izluči u kiseli sadržaj želuca a proenzim se pretvori u vrlo aktivan proteolitički enzim pepsin. Ove stanice stvaraju i veću količinu lipaze (3).

Kardiopilorične mukozne žlijezde stvaraju pretežno neutralne glikoproteine s ciljem neutralizacije kiselog želučanog sadržaja prije pasaže u duodenum. Od stanica površnog epitela razlikuju se po mucinoznim, sekretornim granulama raspoređenim po čitavoj citoplazmi, nepravilnog su oblika, malobrojnije te sadrže pepsinogen II i lizozime.

Mišićni sloj želuca kao i ostali dio gastrointestinalnog trakta građen je od glatkih mišićnih stanica raspoređenih u tri sloja. Seroza želuca je oskudna a čini je tanki sloj veziva prekriven mezotelom.

1.2. HELICOBACTER PYLORI

Helicobacter pylori (*H. pylori*) je kratki, gram-negativni asporogeni štapić koji ima oblik dvostrukog zarez (galebova krila) ili kraće spirale. Širok je 0,3-1,0 μ , a dugačak 1,5-10,0 μ . Pokretan je jer posjeduje mnogobrojne bičeve koji imaju ovojnica, a smješteni su samo na jednom polu bakterije. Uzročnik je jedne od najčešćih kroničnih bakterijskih infekcija u ljudskoj populaciji, prisutne u svim zemljama svijeta. Procjenjuje se da je inficirano više od 50% odraslih stanovnika razvijenih i 80-90% stanovnika zemalja u razvoju. Prevalencija ne varira samo između zemalja, nego i između područja i populacijskih grupa unutar iste zemlje (4). Najviše stope incidencije povezuju se s niskim socioekonomskim statusom i lošim životnim uvjetima u djetinjstvu: prenapučenošću, sanitarnim uvjetima i neadekvatnom opskrbom vodom. Stopa prevalencije infekcije u Hrvatskoj je visoka i iznosi prema preliminarnim istraživanjima 68%. U sjevernim područjima, koja imaju i nekoliko puta višu incidenciju karcinoma želuca nego južni krajevi, nađena je nešto niža stopa inficiranih. Tako Međimurje ima stopu 68,9%, Vrbovec 73,1% dok zadarsko područje ima 66% seropozitivnih (5). Put prijenosa infekcije još uvijek nije sasvim jasan. Povezanost između prenapučenosti i rizika infekcije podupire hipotezu o prijenosu od osobe do osobe, ali bez sigurnih dokaza o načinu prijenosa. Infekcije uzrokovane vodom za piće mogu imati značenje samo u nekim zemljama u razvoju, ali ne i u razvijenim zemljama. Postoji i razlika u mišljenjima da li se *H. pylori* prenosi fekalno-oralnim ili oralno-oralnim putem. Novije činjenice, koje opovrgavaju važnost oralne kontaminacije u prijenosu bolesti, dolaze iz istraživanja u kojima je nađeno da mali broj osoba koje imaju bakteriju u želucu imaju bakteriju i u zubnom karijesu (6).

Nije dokazana mogućnost širenja infekcije seksualnim kontaktom, a nema niti dovoljno dokaza da kućni ljubimci sudjeluju u prijenosu infekcije iako je *H. pylori* nađen u mačaka kod kojih može biti promotor gastritisa (7)

Dokazana je infekcija istim sojem bakterije unutar jedne obitelji s malom djecom što ukazuje da djeca djeluju kao vektor unutar obiteljskog prijenosa. Postoji povezanost između broja djece u domaćinstvu i rizika od infekcije odraslog člana obitelji (8).

Jedan od rizičnih čimbenika je i izloženost želučanom sadržaju inficirane osobe. Česta je kontaminacija endoskopa i drugih instrumenata nakon endoskopskog pregleda inficiranog pacijenta. Tako su u jednoj studiji medicinske sestre imale stopu seroprevalencije od 39% prema 26% seropozitivnih u kontrolnoj skupini (7).

Osim što je *H. pylori* nesumljivo povezan s nastankom karcinoma i limfoma želuca preliminarna istraživanja upućuju na povezanost s kolorektalnim karcinomom (9). Posljednjih godina istražuje se povezanost infekcije *H. pylori* s mnogim drugim bolestima: koronarna bolest srca, autoimune bolesti, dermatološke bolesti i druge (10,11)

1.3. HELICOBACTER PYLORI I SLUZNICA ŽELUCA

1.3.1 UPALNI ODGOVOR NA INFEKCIJU – GASTRITIS

Kolonizacija želuca preduvjet je patogenog djelovanja *H. pylori*. Bakterija mora najprije nastaniti, zatim se održati na sluznici želuca i tek onda može inducirati bolest. *H. pylori* kolonizira sluznicu želuca. Za preživljenje mu je bitna dobra pokretljivost u sluzavom mediju te smještanje između sluzi i epitela, a budući da mu je to omogućeno bičevima, svaka disrupcija gena (*flaA* i *flaB*) za produkciju flagelina onemogućava mutantima kolonizaciju želučane sluznice (12). Važan faktor preživljenja u kiselom mediju je i ureaza koju *H. pylori* producira u velikim količinama i koja bitno utječe na smanjenje kiselosti (13). Kada dospije do epitela, *H. pylori* dolazi u vrlo bliski kontakt s epitelnom stanicom, ali ne ulazi u nju. Budući da katkada može proći do bazalne membrane između pojedinih epitelih stanica, dolazi u kontakt s fagocitima i može biti prisutan u lamini propriji. Pored fibrilarnog hemaglutininskog liganda kao adhezina, kojim se bakterija veže na epitelnu stanicu preko N-acetilneuraminillaktoze (14), poznato je i nekoliko adhezina među proteinima koji čine vanjsku membranu stanične stijenke bakterije: BabA, AlpA, AlpB (15). Ovi adhezini vežu se na Lewis B antigen krvne grupe i na neke još nepotpuno definirane receptore epitela (16).

1997 godine u potpunosti je sekvencioniran genom *H. pylori* (12).

Dosad su otkriveni različiti proteini (enzimi) i antigeni koje sadržava *H. pylori*. Većinu antigena čine nespecifični proteini (flagelarni antigeni, proteini toplinskog šoka) jer se njima slični nalaze i u drugih bakterija. Postoji desetak, za *H. pylori* specifičnih antigena, od kojih su osobito važni ureaza i citotoksini.

Ureaza katalizira hidrolizu ureje pri čemu nastaje amonijak i ugljična kiselina. Zahvaljujući neutralizaciji želučane kiseline prisutnim amonijakom, kolonizacija želučane sluznice je uspješnija. Stanice epitela oštećuje s jedne strane toksični učinak amonijaka, a s druge strane neizravni učinak ureaze induciranjem i stimulacijom upalnog odgovora.

Svi sojevi *H. pylori* sadržavaju *vacA* gen, no samo oko 50% sojeva je toksično zbog sposobnosti stvaranja vakuolizirajućeg citotoksina *vacA*. U ciljnim stanicama *vacA* uzrokuje stvaranje unutarstaničnih vakuola pri nižim vrijednostima pH (30-ak puta veća aktivnost pri pH < 5,0) (17). Među sojevima je izražena razlika u alelima *vacA*. Utvrđena su tri tipa signalnih sekvencija *sla*, *slb*, i *s2*, te dva tipa srednje regije *m1* i *m2*. Sojevi s *vacA m1*-alelima toksičniji su od sojeva s *m2* alelima. Razlika u toksičnosti postoji i u skupini *m1* sojeva: sojevi sa *sla/m1*- alelima toksičniji su od sojeva sa *slb/m1*- alelima. Od osobite je važnosti genotip *vacA* prisutan u soju kojim smo zaraženi, jer sojevi s *vacA m1*- alelima uzrokuju teža oštećenja epitela od sojeva s *m2* alelima (18). Suprotno, *vacA* signalne sekvencije povezuju se s jačinom infiltracije upalnih stanica u sluznici, tako sojevi sa *vacA sla*-alelima uzrokuju jaču upalu od sojeva sa *slb* i *s2*-alelima. U bolesnika s vrijedom želuca najčešće su izolirani sojevi s *vacA sla*-alelima (oko 80%), a nešto manje s *vacA s2*-alelima (oko 20%) (19). U većine sojeva, s vakuolizacijskom citotoksičnom aktivnosti ili bez nje, također je otkriven gen A, tj. *cagA* (engl. cytotoxin associated gene A). Bakterijski geni *vacA* i *cagA* pokazuju jedan osobit oblik funkcionalne povezanosti, tako da svakom genu prisutnost drugoga znači dobitak. *CagA* + sojevi povezuje se s jače izraženom upalom i djelovanjem proupalnih citokina u sluznici želuca (20).

U genomu (*H. pylori*) cag područje, zvano cag-PAI (engl. pathogenicity island) je vjerojatno odgovorno za tvorbu faktora sekretornog sustava. Ti tzv. otoci patogenosti, koje tvori dio DNA sastavljen od 40 gena, odgovorni su za tvorbu sekretornog sustava. Proteini kodirani tim genima se prenose kroz staničnu membranu na površinu bakterije ili u njezin okoliš. Akumulacija polimorfonukleara, kao i sekrecija IL-8, zahtjeva aktivaciju transkripcijskog nuklearnog faktora, NF- κ B. Za aktivaciju je potrebno šest gena unutar cag-PAI (21).

Nedavno je otkriven i iceA gen čija indukcija počinje tek nakon kontakta *H. pylori* s epitelnom stanicom (engl. induced by contact with the epithelium). Ovaj gen postoji u dva alelična oblika: iceA1 i iceA2. iceA1 je "marker" peptičke ulkusne bolesti, a posljedica njegova djelovanja je izrazita akumulacija polimorfonuklearnih leukocita (22,23).

Kolonizacija želučane sluznice ima za posljedicu pojavu upalne reakcije koju čine elementi staničnog i humoralnog imunološkog odgovora. Humoralni odgovor, koji predstavlja stvaranje antitijela na infekciju, nedjelotvoran je u potpunom odstranjenju *H. pylori*. Upalni infiltrat u želučanoj sluznici sadržava neutrofilne granulocite te mononuklearne stanice: limfocite i plazma stanice. U akutnom stadiju infekcije bakterijsku kolonizaciju sluznice prati povećan broj neutrofila koji razgrađuju bakterije.

Tijekom procesa eliminacije bakterija, razina toksičnih slobodnih radikala kisika sve više raste i dolazi do oštećenja epitela sluznice. Pod utjecajem IL-1 beta na epitel sluznice želuca, dolazi do stvaranja metaloproteinaze vanstaničnog matriksa (MMP3). Sekrecija MMP3 doprinosi daljnjem oštećenju epitela sluznice (24).

Histološki se taj proces vidi kao gubitak jasnih granica stanične membrane, poremećeni omjer jezgre i citoplazme u korist jezgre, te ispadanje površnih stanica ("drop out" fenomen). Takođe dolazi do gubitka stvaranja sluzi što je gotovo stalni nalaz kod aktivnog gastritisa. Nalaz "drop out" fenomena i smanjeno stvaranje sluzi, ovise o količini bakterija koje se nalaze na površini sluznice želuca, međutim, povezanost s gustoćom kroničnog upalnog infiltrata i granulocita te jačina oštećenja sluznice nije dokazana.

Kod neliječenih bolesnika, kronični gastritis koji se javlja kao reakcija na prisutnost *H. pylori*, ostaje cijeli život. U tom stadiju u lamini propriji prisutan je povećan broj T-limfocita i plazma stanica, a ponekad i eozinofila. Adherencijom na epitelne stanice sluznice *H. pylori* aktivira imunološki odgovor ili stimulira okolne mononuklearne stanice na oslobađanje tumorskog nekrotizirajućeg faktora alfa ($TNF-\alpha$), interferona gama ($IFN-\gamma$), interleukina 1 ($IL-1$), $IL-4$, $IL-6$ te $IL-8$ (25). Citokini potom privlače i aktiviraju T-limfocite, neutrofile i druge upalne stanice, a *H. pylori* također izravno stvara kemotaktične faktore (26).

Bakterijske antigene, prisutne na površini epitelnih stanica među kojima su neki vezani za molekule histokompatibilnog kompleksa (MHC), prepoznaju pomoćne Th 1 stanice i citotoksični $CD8+$ T limfociti, koji stvaraju dodatne količine citokina. Diferencijacijom B-limfocita i stimulacijom citokina nastaju plazma stanice, koje stvaraju lokalna protutijela, uglavnom IgA i IgG. Specifična IgG- protutijela zastupljena su sa sva četiri

IgG-podtipa. Najviše su razine IgG1 i IgG2, što je uobičajena pojava pri odgovoru IgG-protutijelima na bakterijske polisaharide (27). IgA i IgG-protutijela mogu citotoksično djelovati na epitelne stanice aktivacijom polimorfonuklearnih leukocita putem kompleksa antigena i protutijela.

Povezanost *H. pylori* s peptičnom ulkusnom bolesti, karcinomom te limfomom želuca, dovela je do tzv. Sydney-skog sistema klasifikacije gastritisa (28,29,30) . Primjena ovog sistema omogućava neprekidno praćenje endoskopskih promjena i patohistoloških nalaza što omogućava uvid u stanje sluznice čitavog želuca. Primjenom ovog sistema moguće je pratiti i kumulativni rizik za nastanak ulkusa, prekanceroza i malignih bolesti. Prilikom gastroscopskog pregleda uzimaju se rutinski četiri uzorka za patohistološku analizu, po dva iz korpusa i dva iz antruma želuca.

Prema Sydney-skom sistemu gastritis se klasificira u tri entiteta:

- akutni gastritis
- kronični gastritis
- specijalne forme (eozinofilni, limfocitni, granulomatozni te lijekovima izazvan gastritis).

Ovaj sistem daje uvid u topografsku distribuciju gastritisa:

- antralni gastritis
- korpusni gastritis
- pangastritis.

Sydney-ski sistem omogućava pojedinačno stupnjevanje svakog od pet patohistoloških elemenata gastritisa za svaki bioptički uzorak:

- kronična upala
- akutna upala
- atrofija sluznice
- intestinalna metaplazija
- *H. pylori*.

Posljednja revizija Sydney-ske klasifikacije iz 1994. godine, tzv. Huston-ska preporuča uzimanje petog uzorka sluznice iz područja incisura angularis gdje se može naći najjači stupanj atrofije, češća intestinalna metaplazija i displazija (31).

U navedenoj reviziji dane su i detaljne preporuke za određivanje stupnjevanja zadanih varijabli - količine kroničnog i akutnog upalnog infiltrata, količine *H. pylori* i atrofije sluznice - radi točnije reproducibilnosti patoloških nalaza različitih dijagnostičkih centara.

1.3.2. MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) – LIMFATIČNO TKIVO SLUZNICE

U ranoj fazi imunološkog odgovora *H. pylori* infekcije, pored granulocita pojavljuju se i mononukleari. Trajanje kronične antigene stimulacije mijenja omjer upalnih stanica u korist mononukleara, tj. limfocita i plazma stanica. Dolazi do značajnog porasta CD4+, TCR α/β + T limfocita, a količina limfocita korelira sa stupnjem i aktivnošću gastritisa kao i količinom *H. pylori* (32). Posljedica je značajni porast intraepitelnih i citotoksičnih CD8+ limfocita (33).

T- limfociti prepoznaju neke od antigena *H. pylori*, od kojih se neki nalaze i na epitelnim stanicama. Aktivirani T limfociti počinju izlučivati limfokine kao što su IL-2, IL-6 te α -interferon. Istovremeno dolazi i do aktiviranja makrofaga koji dodatno izlučuju IL-1 i TNF - α (tumor nekrotizirajući faktor), koji osim na aktivaciju granulocita utječu i na proliferaciju limfocita B i T. Kao odgovor na *H. pylori* infekciju svakako je jedan od važnih citokina oslobođen iz epitelnih stanica, monocitni

kemoatraktantni protein 1 (MCP-1) koji ima važnu ulogu u T staničnom imunološkom odgovoru (34).

IgA- specifični tkivni imunoglobulin gastrointestinalnog trakta, izrazito je povišen kod infekcije H. pylori i to zbog djelovanja IL-6, koji između ostalog djeluje i na diferencijaciju B-limfocita (35). Na diferencijaciju B-limfocita djeluju i IL-4 i 5, koji aktiviraju IL-2 receptor na B stanicama. Na ovaj način bi se mogla objasniti česta pojava nakupina limfocita (LN), kao i formiranje limfatičnih folikula (LF) kod bolesnika zaraženih s H. pylori (36). Limfatični folikuli se smatraju odgovorom na stalni antigeni podražaj H. pylori.

Kako sluznica želuca nema organizirano limfatično tkivo, ovakav upalni infiltrat limfocita, LN te LF stečeni su MALT koji je gotovo patognomoničan za infekciju H. pylori. Obilniji upalni infiltrat te LF s germinativnim centrima, kao posljedica H. pylori infekcije znatno su brojniji na maloj krivini antruma nego u preostalom dijelu želuca (37). U bolesnika sa želučanim ulkusom LF se nađu znatno češće i u većem broju u odnosu na bolesnike s kroničnim H. pylori gastritisom, a bez ulkusne bolesti. Prevalencija i gustoća LF u korelaciji je s gustoćom kroničnog upalnog infiltrata te aktivnošću tj. infiltratom neutrofilnih granulocita (38). U nekih bolesnika pojedini folikuli mogu zauzimati gotovo cijelu debljinu lamine proprije s gotovo potpunim gubitkom žljezdanog epitela. U ovih bolesnika katkad je prisutna i infiltracija limfocita u žljezdani epitel, destrukcija epitelnih stanica tzv. limfoepitelna lezija (LEL). Nastanak MALT-a je, dakle, uvjet za nastanak primarnih B limfoma želuca poznatih kao MALT-tip limfomi (39).

Wotherspoon je 1993. godine predložio gradiranje količine limfocitnog infiltrata u biopsijskim uzorcima sluznice želuca (40). Prema tom prijedlogu stupanj 0 je uredna sluznica, dok je stupanj 5 MALT-limfom. Stupanj 2 je kronični aktivni gastritis s floridnim LF okruženim “mantle” zonom i plazma stanicama ali bez LEL-a. Stupanj 3 je opsežan infiltrat, suspektan na limfom, uz prisutan LEL. Upravo su stupnjevi 2 i 3 problematični, kako prognostički tako i histološki. Postotak monoklonalnosti, koja je bitan kriterij malignosti, već u ovim fazama kreće se u različitim serijama od 4 – 85% (41)

1.4. MALT-LIMFOM I B-VELIKOSTANIČNI LIMFOM ŽELUCA

Prema klasifikaciji neoplastičnih bolesti hematopoetskog i limfatičnog tkiva (42) Svjetska Zdravstvena Organizacija (WHO klasifikacija), klasificira limfome “marginal” zone (MZBCL) u tri podtipa:

1. limfom “marginal” zone slezene s / bez viloznih limfocita.
2. nodalni “marginal” zone limfom s / bez monocitoidnih B limfocita.
3. “extranodal marginal zone” limfom MALT –tipa.

Sva tri tipa limfoma dijele morfološke i imunofenotipske sličnosti, sugerirajući da se možda radi o različitim kliničkim prezentacijama iste bolesti, a ne o odvojenim entitetima (43,44).

Više od 90% MALT limfoma želuca povezano je s kroničnim H. pylori gastritisom (45). Budući da je u neliječenih bolesnika, uslijed stalne prisutnosti H. pylori, imunološki sustav u “prenapregnutom” stanju, bilo koji vanjski ili unutarnji faktor može dovesti do poremećaja ravnoteže između H. pylori i imunološkog odgovora na antigenu stimulaciju. Jedan od mehanizama koji pridonosi daljnjoj progresiji stanja svakako je i neletalno oštećenje deoksiribonukleinske kiseline (DNK) zbog prisutnog gastritisa. Slobodni radikali kisika i toksini bakterije u kombinaciji s produktima razgradnje amonijaka induciraju nekrozu pojedinačnih epitelnih stanica ili stvaranje nekrotičnih žarišta. Dolazi do oslobađanja sekvestriranih antigena koji ekspresijom preko klase II MHC, dovode do indukcije antigen-specifičnih autoreaktivnih B-limfocita kao dijela poliklonalnog odgovora. Dolazi do neodgovarajuće koordinacije CD4 i CD8 limfocita, upalni odgovor je sve obilniji uz gustu infiltraciju limfocitima i plazma stanicama, prvenstveno u antralnoj regiji, a kasnije i u području korpusa. Posljedica je sve obilnije izlučivanje citokina, limfokina i tumorskog nekrotizirajućeg faktora (TNF). U ovako prenapregnutom imunološkom sustavu lako je moguć i drugi korak (prema teoriji dvostrukog udara) tj. prijelaz poliklonalne u monoklonalnu proliferaciju i nastanak limfoma koji je barem u ovoj ranoj fazi ovisan o prisutnosti H. pylori (46).

“Extranodal marginal zone” – MALT- tip limfoma čine 7-8% svih B-staničnih limfoma pri čemu 50% ima primarno sjelo u želucu. Ukoliko se gleda cijeli gastrointestinalni trakt, želudac je u 85% primarno mjesto bolesti, a preostali dio čine tanko i debelo crijevo. Ostala mjesta gdje se pojavljuje ovaj tip limfoma su: pluća (14%), glava i vrat, očna adneksa, koža, štitna žlijezda i dojka (4%). Opisani su i na drugim mjestima: mokraćni mjehur, timus, prostata, grlić maternice i sl.(47).

MALT- tip limfoma želuca je pretežno bolest kasne srednje dobi i starije populacije, a najčešće se pojavljuje u sedmom desetljeću života, no može se pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi. Nešto češće obolijevaju muškarci, a omjer oboljelih muškaraca prema ženama je 1,1:1 – 1,68:1 (48). Klinička manifestacija obično je nespecifična – dispeptični simptomi, dok se bol u truhu ili gubitak na težini rijetko javljaju. Endoskopski nalaz je različit, ponekad je to hiperemija s ili bez erozija, a ponekad žarišno zadebljanje s jednim ili više vrijedova. Većina bolesnika su kliničkog stadija I E ili II E, prema Musshoff-ovoj modifikaciji Ann Arbor klasifikacije za primarne ektranodalne limfome (49). Ekstraabdominalna diseminacija i infiltracija koštane srži je rijetka iako prema nekim istraživanjima može biti i u trećine bolesnika ako se promatraju MALT –limfomi drugih lokalizacija, a ne samo želuca (50).

Reaktivni LF su sastavni dio MALT- limfoma. U početnoj fazi bolesti, limfom se širi koncentrično oko reaktivnih folikula i difuzno infiltrira sluznicu, a potom i podsluznicu, dok kod uznapredovalijih stadija zahvaća čitavu stijenku želuca i širi se u okolne intraabdominalne strukture. Tumorske stanice morfološki mogu biti različite. Najčešće podsjećaju na male zarezane stanice centra limfatičnih folikula (centrocite) te se zato i zovu centrocitima slični limfociti (centrocyte like– CCL). Također mogu izgledati kao mali limfociti, a katkad poprimaju monocitoidni izgled uz obilniju svijetlu citoplazmu (51). U većini slučajeva subepitelno postoji i plazmocitoidna diferencijacija. Velikih pojedinačnih transformiranih limfocita s istaknutim nukleolima može se naći, te oni, ako su brojniji predstavljaju dijagnostički problem. CCL stanice su imunohistokemijski pozitivne na pan-B marker (CD 20).

Na površini, rjeđe u citoplazmi, se nalaze imunoglobulini i to uglavnom IgM, rjeđe IgA i IgG. Češća je restrikcija *kappa* lakog lanca. CD5, CD10 i CD23 su negativni dok su

CD21 i CD35 pozitivni što odgovara profilu B-stanica marginalne zone. Do sada je opisano tek nekoliko ektranodalnih marginal-zone B-staničnih (MALT) limfoma s pozitivnom ekspresijom CD5 te prisutnom infiltracijom koštane srži, a u jednom slučaju su tumorske stanice nađene i u perifernoj krvi (52).

Vrlo često kod MALT-limfoma je prisutan i LEL - infiltracija i razaranje epitelne struktura sluznice želuca tumorskim stanicama. Morfološki se ova promjena ne razlikuje od limfoepitelne infiltracije kod reaktivnih promjena MALT-a. LEL se definira kao infiltracija žljezdanog epitela s barem tri do šest CCL stanica (53). Epitelne stanice pokazuju u tim slučajevima eozinofilne ili "onkocitne" degenerativne promjene. Najvjerojatnije postoji "tropizam" tumorskih stanica za žljezdani epitel, jer i u slučajevima kada nema LEL-a uočava se koncentrično nagomilavanje tumorskih stanica oko žlijezda.

Postoje tri tipa infiltracije reaktivnih LF tumorskim tkivom (54). U tipu I reaktivni folikuli su okruženi, dijelom ili u potpunosti zamjenjeni tumorskim infiltratima. Tumor ima nodularni izgled, a ostaci se LF katkad uočavaju tek imunohistokemijskim dokazivanjem folikularnih dendritičkih stanica (CD21). U tipu II tumorske stanice koloniziraju centar folikula koji je proširen no mogu se naći "tingible body" makrofazi, a mantle zona folikula ostaje očuvana. U tipu III tumorske stanice u centru folikula pokazuju plazmastičnu diferencijaciju. U ovom tipu morfološki može postojati diferencijalno dijagnostički problem prema folikularnom limfomu, koji je za razliku od MALT-limfoma, CD 10 pozitivan (55).

Histološki, primarni limfomi želuca dijele se na niskomaligne (low-grade, LG) MALT-limfome, te na skupinu visokomalignih (high-grade, HG) limfoma (56,57). Skupina HG limfoma može se podijeliti u tri grupe na temelju prisutnosti ili odsutnosti LG komponente i LEL-a.

1. HG MALT-limfom unutar LG MALT limfoma (LG/HG LIMFOM)
2. Velike stanice, bez LG komponente, LEL s velikim stanicama (HG MALT-limfom)
3. Difuzni velikostanični limfom bez LG komponente i LEL-a (DLBCL)

Niskomaligni, LG MALT-limfomi mogu transformirati u visokomaligne - HG limfome (58). Pretpostavlja se da većina, ako ne i svi velikostanični limfomi želuca - DLBCL nastaju transformacijom MALT –limfoma. U prilog tome govori prisutnost istih citogenetskih aberacija u DLBCL i MALT-limfomu (59). No, isto tako postoji mogućnost da DLBCL želuca nastaje *de novo*. U odsutnosti LG komponente razlika između primarnog - *de novo* DLBCL i nastalog iz LG MALT-limfoma je vrlo teška i gotovo nemoguća (60). Postoji tek nešto bolje preživljenje bolesnika s MALT – limfomom u kojih se nalazi HG ili HG/LG komponenta u odnosu na bolesnike gdje postoji samo slika DLBCL (56).

U REAL klasifikaciji limfoma (61) zapravo ne postoji HG MALT-limfom, dok se u WHO klasifikaciji limfoma (42) preporuča podjela na LG MALT-limfom, koji za onkologe i kliničare znači mogućnost liječenja antibiotskom terapijom, te DLBCL koji zahtjeva agresivniju terapiju. Nakupina više od 20 velikih transformiranih limfocita unutar LG MALT-limfoma ponaša se klinički kao DLBCL.

WHO klasifikacija preporuča da se u patohistološkom nalazu odredi postotak velikih stanica, budući da postoje različita stajališta o utjecaju na preživljenje (više od 5% stanica –lošija prognoza) što zahtjeva daljnja ispitivanja.

1.5 BCL10 I LIMFOMI ŽELUCA

Poznavanje genetskih mehanizama važno je za razumjevanje patogeneze i progresije tumora. To vrijedi i za skupinu limfoma MZBCL, kako nodalnih tako i spleničnih te ekстранodalnih tj. MALT-limfoma. U nekim istraživanjima MALT-limfomi te progresija u HG MALT-limfome i DLBCL povezuje se s preuredbom c-myc gena, kompletnom inaktivacijom P53 gena kao i homozigotnom delecijom P16 gena (62,63,64). S druge strane, nalaz koji izdvaja MZBCL u posebnu skupinu limfoma je uvjerljiva odsutnost nekih translokacija koje dovode do pojačane ekspresije onkogeni u drugih limfoma: t (11;18) / BCL1, t (14;18) / BCL2 ili t (14;19) / BCL3

Jedna od citogenetskih abnormalnosti koja je gotovo patognomonična za MZBCL MALT-tipa je t (1;14) (p22;q32) / BCL 10. Učestalost ove translokacije u MALT – tipu limfoma želuca je oko 50% (65). Gen za regulaciju apoptoze - BCL 10 nalazi se na 1p22 kromosomu, homologan je konjskom herpes virusu-2 E 10, te kodira protein od 233 aminokiseline. 13-101 aminokiselina tog proteina tvore amino – terminalnu CARD domenu (caspase recruitment domain) koja je građena od šest zbijenih antiparalelnih alfa heliksa (66).

Velika skupina CARD proteina podjeljena je u četiri podgrupe (67). BCL10 (poznat i kao CLAP/CIPER/cE10/CARMEN) pripada podgrupi bipartitnih CARD proteina. Osim spomenute N-terminalne domene čini ga C-terminalna domena bogata serin-treoninom. Divlji tip BCL 10 djeluje pro-apoptično i može aktivirati NF- κ B, vezni faktor DNK (deoksiribonukleinske kiseline). Aktivacija NF- κ B je konačni cilj mnogih unutarstaničnih signalnih puteva. Do ove aktivacije dolazi vjerojatno preko MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase) skupine proteina koji funkcioniraju na određenim dijelovima stanične membrane kao "ljestve" na koje se sakupljaju i slažu multiproteinski kompleksi. U skupinu MAGUK proteina spadaju CARD9, CARD10 (CARMA3/Bimp1), CARD11(CARMA1/Bimp2) i CARD14 (CARMA2/Bimp3) koji su građeni od N-terminalne CARD domene, centralne CC (Coiled-Coil) domene te C-terminalne tripartitne domene. Sastavni dijelovi C-terminalne domene su PDZ-domena, Src i GUK-domena homologna gvanilat kinazi (68). MAGUK proteini funkcioniraju kao tzv. uzvodni, "upstream" regulatori BCL10. Organiziraju komplekse signala na membrani i svaki od njih vežući se na CARD domenu BCL10 inducira njegovu fosforilaciju te translaciju iz citoplazme u perinuklearne strukture što ima za posljedicu aktivaciju NF- κ B (69). Divlji tip BCL 10 pokazuje tumor supresorsku sposobnost te *in vitro* inhibira onkogenu staničnu transformaciju (70). Translokacijom t(1;14), gen BCL 10 na lokusu 14q32 dolazi u regiju koja kodira teške lance imunoglobulina (Ig). Premještanjem u ovu izrazito aktivnu regiju dolazi do pojačane ekspresije BCL 10 kao i do gubitka kontrolne regulacije. Osim pojačane ekspresije t(1;14) (p22;q32) nastaju i mutirani tj. skraćeni oblici BCL 10, na nivou C-terminalnog dijela ili unutar CARD domene.

Posljedica skraćenog (truncated) oblika CARD domene je gubitak i proapoptične funkcije i aktivacije NF- κ B, dok mutacija C-terminalnog dijela zadržava sposobnost

aktivacije NF- κ B (71). Pretpostavlja se da su upravo to dva mehanizma djelovanja BCL10 u nastanku limfoma (69).

Tumorske stanice MALTtip -limfoma s t(1;14)(p22;q32) rastu spontano u kulturi bez B-stanične stimulacije, dok nasuprot njima stanice bez translokacije ubrzano odumiru apoptozom. Nakon stimulacije B-staničnim mitogenima, proliferativni odgovor tumorskih stanica s t(1;14)(p22;q32) je 50 puta veći u odnosu na stanice bez translokacije. Ovo ukazuje da t(1;14)(p22;q32) ima važnu ulogu u preživljenju i rastu malignih B-limfocita (72).

Od 21 ispitivanog solidnog normalnog tkiva jedino je u dojci dokazana ekspresija BCL10, i to u luminalnom dijelu epitelnih stanica. Intracitoplazmatska ekspresija BCL10 postoji i u limfatičnom tkivu (slezena, crvuljak, timus, limfni čvor, tonzila). U normalnim LN i LF postoji jasna intracitoplazmatska ekspresija BCL10 u germinativnom centru, srednje izražena ekspresija u "marginal" zoni te vrlo slaba u "mantle" zoni B-limfocita.

Intracitoplazmatska ekspresija BCL10 nađena je i u mantle-cell limfomu, folikularnom limfomu, kao i u DLBCL sluznice želuca, no do nuklearne ekspresije dolazi uglavnom u MALT-tip limfoma. Ovakva ekspresija je tipična u svih MALT-tip limfoma sa t(1;14)(p22;q32), ali isto tako i u oko 50% slučajeva kod kojih nije dokazana translokacija t(1;14). Tumori koji pokazuju nuklearnu ekspresiju BCL10, infiltriraju cijelu debljinu stijenke želuca i serozu u znatno većem postotku od onih kod kojih postoji samo citoplazmatska ekspresija BCL10 (73). Kako se poremećena (intranuklearna) stanična lokalizacija BCL10 nalazi u tumorima s t(1;14)(p22;q32) kao i u tumorima bez te translokacije, pretpostavlja se da bi upravo ta intranuklearna ekspresija BCL10 mogla

biti odgovorna za nastanak tumora. Pravo objašnjenje i mehanizam djelovanja BCL10 i limfomageneze zapravo još ne postoji (74,65).

API2 (cIAP2) spada u skupinu od pet gena proteina inhibitora apoptoze (AIP) koji igraju važnu ulogu u regulaciji programirane smrti stanica inhibicijom kaspase i aktivacijom NF- κ B. Prvi puta je otkriven u Baculovirusima. Gen za API2 nalazi se na 11q21 a građen je od BIR (**B**aculovirus **I**AP **R**epeat) motiva, CARD domene i C-terminalne zink vezujuće ring ("finger") domene (69).

Gen za MALT1 ili MLT (**M**ALT **L**ymphoma-associated **T**ranslocation) se nalazi na kromosomu 18q21. Spada u skupinu "parakaspaza", proteaza sličnih kaspazi, a građen je od DD (Death Domain), dviju domena sličnih imunoglobulinu i domene slične kaspazi (caspase-like domain) ali nema CADR domenu (75).

MALT1 i BCL10 u fiziološkim uvjetima povezani su preko domene slične imunoglobulinu MALT1, te sinergistički utječu na aktivnost NF- κ B, no razina ekspresije gena održava tek normalni signalni put.

Kromosomska translokacija t(11;18) (p21;q21) prisutna je u oko 40% MALT tip NHL želuca. Ovom translokacijom nastaje kimerička fuzija C-terminalne domene slične kaspazi MALT1 i N-terminalne BIR domene API2. Lom 11-og kromosoma na mjestu API2 gena je samo u području introna 7, dok na 18-om kromosomu MALT1 gena lom može biti na različitim mjestima. Posljedica su brojne varijacije fuzijskog transkripta API2-MALT1, no kod svih lomova su konstantne BIR sekvence na API2 koje imaju antiapoptotičnu funkciju (71). Prekomjerna ekspresija fuzijskog proteina API2-MALT1 izrazito pojačava aktivnost NF- κ B.

NF- κ B je član REL obitelji gena i transkripcijski je faktor s važnom ulogom u aktivaciji gena uključenih u aktivaciju limfocita tj. imunološki odgovor kod upale i apoptoze (68).

U nestimuliranim stanicama NF- κ B se nalazi u inaktivnom obliku vezan za inhibitorne proteine I κ B α . Kao odgovor na stimulaciju npr. interleukinom 2 (IL-2), TNF α , bakterijskim lipopolisaharidima i kod virusnih infekcija dolazi do fosforilacije i degradacije I κ B α , djelovanjem proteosoma, što rezultira u translokaciji NF- κ B u jezgru. Veže se na promotore, što dovodi do transkripcije i ekspresije gena bitnih za aktivaciju limfocita i imunološkog odgovora. Fosforilacija I κ B α je pod utjecajem I κ B kinaza kompleksa (IKK) koji je građen od dvije aktivne kinaze, IKK α i IKK β te jedne regulatorne podjedinice IKK γ (NEMO) (76).

Za normalnu funkciju BCL10 potreban je MALT1 s kojim stvara kompleks za oligomerizaciju i aktivaciju domene MALT1 slične kaspazi koja vodi indukciji i aktivaciji NF- κ B. Kod mutacije ili prekomjerne ekspresije uslijed t(1;14) BCL10 se veže na MALT1, te zajedno izrazito pojačavaju aktivnost IKK što rezultira translokacijom NF- κ B u jezgru. Na isti način djeluje i fuzijski transkript API2-MALT1, ali on ne zahtijeva prisustvo BCL10 za stimulaciju aktivnosti IKK, iako API2-MALT fuzija korelira s neuobičajenom intranuklearnom lokalizacijom BCL10 (76).

1.6 TRISOMIJA 3 I LIMFOMI ŽELUCA

Infekcija sluznice želuca, zbog djelovanja štetnih faktora (slobodni radikali kisika) uzrokuje pojavu stanica osjetljivih za nastanak genetskih abnormalnosti te malignu transformaciju reaktivnih B limfocita. Prekobrojni treći kromosom (trisomija 3) jedan je od genetskih poremećaja koji se smatra mogućim odgovornim faktorom za nastanak limfoma želuca (77,78,79,80).

Genetski mehanizam kojim bi trisomija 3 mogla igrati ulogu u genezi MALT limfoma je nejasan. Jedan od mehanizama bi mogao biti protoonkogen bcl-6 koji se nalazi na 3q27 lokaciji. Bcl-6 pripada skupini "zinc-finger" transkripcijskih faktora. Važan je u regulaciji proteina koji sudjeluju u kontroli aktivacije B limfocita, njihovoj diferencijaciji i apoptozi. Preuredba regije za bcl-6 proto-onkogene javlja se u oko 35% ektranodalnih DLBCL i povezana je s boljom prognozom (81,82,83). Kako je proliferacija tumorskih stanica MALT-limfoma ovisna o prisutnosti antigenom aktiviranih T limfocita, mogući mehanizam djelovanja prekobrojnog kromosoma mogla bi biti prekomjerna ekspresija molekule ili receptora uključenih u interakciju B i T limfocita. Gen za α lanac receptora interleukina -5 (IL-5) smješten je na 3p26. IL-5 djeluje sinergistički s drugim citokinima (IL-2, IL-4) stimulirajući rast i diferencijaciju B limfocita, a stimulira i sintezu imunoglobulina A (IgA). Gen za B7 nalazi se također na 3. kromosomu i to na 3q13-3q21. B7 je aktivacijski antigen koji se nalazi na aktiviranim B limfocitima, ujedno je i ligand za CD28 na T limfocitima. Nakon antigene stimulacije, posredovane preko MHC klase II, receptor B7- CD28 je odgovoran za prekomjernu produkciju IL-2, a koji stimulira proliferaciju B limfocita.

Posljedica trisomije 3 je prekomjerna produkcija B7, koja bi mogla imati važnu ulogu u nastanku MALT-tip limfoma (84).

Trisomija 3 se nalazi u 25 – 85% LG MALT limfoma (85,86). Trisomija 3 je nađena i u oko 20% slučajeva DLBCL (87). Postoje neslaganja o tome da li DLBCL nastaje transformacijom iz LG MALT limfoma, u prilog čemu govore neka istraživanja (88), ili nastaje *de novo* kao posebni entitet. Ako se pretpostavi transformacija iz niskomalignog u visokomaligni limfom, za očekivati je nalaz identičnih genetskih aberacija u oba tumora, štoviše kompleksnija genetska oštećenja u DLBCL, kao pretpostavka limfomogeneze iz LG MALT limfoma.

2.0.CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi postojanje citogenetskih abnormalnosti u bolesnika s:
 - a) H. pylori gastritisom i prisutnim LF,
 - b) LG MALT limfomom želuca
 - c) DLBCL želuca
2. Utvrditi utjecaj tih abnormalnosti na tijek i ishod bolesti.

U tu svrhu primjenit ćemo u sve tri skupine bolesnika određivanje:

1. Trisomije 3, kao mogući utjecaj:

- a) na klonalnu transformaciju limfocita, tijek bolesti te eventualno njen utjecaj na rezistenciju na “triple” terapiju kod H. pylori gastritisa.
- b) na proširenost bolesti kao i njen ishod u bolesnika s LG MALT limfomom.
- c) u limfomogenezi i transformaciji u DLBCL.

2. Ekspresije BCL 10, kao mogući utjecaj:

- a) na malignu transformaciju i akumulaciju tumorskih stanica, te neefikasnost “triple” terapije u H. pylori gastritisa.
- b) na tijek i ishod u bolesnika s LG MALT limfomom.
- c) na progresiju bolesti i moguću transformaciju u DLBCL.

3.0 BOLESNICI I METODE

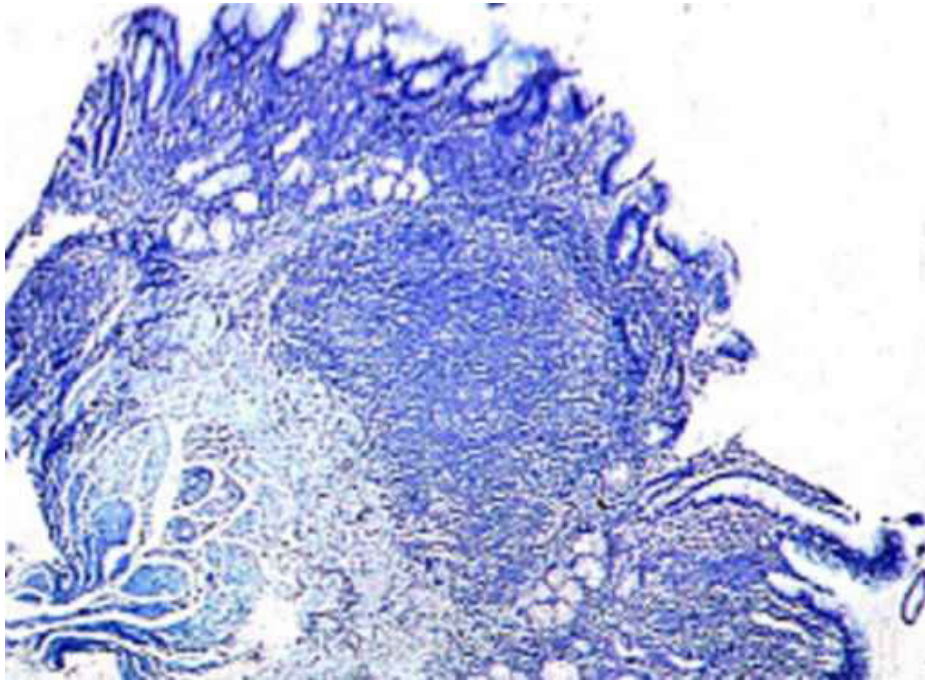
3.1 BOLESNICI

Skupini od 2430 bolesnika učinjen je gastroskopski pregled zbog dispeptičkih tegoba. Svakom bolesniku uzeti su biopsijski uzorci sluznice želuca prema Sydney-skoj klasifikaciji (2 biopsije iz korpusa i 2 biopsije iz antruma) uz detaljan endoskopski nalaz. Za ovo je istraživanje izdvojena skupina od 20 bolesnika (grupa I). Kriterij za bolesnike grupe I bio je kronični aktivni gastritis uz pozitivan nalaz *H. pylori* i prisutnost LN ili LF u sluznici želuca (slike 1.i 2.). Prosječna životna dob bolesnika grupe I je 53,5 godina. U grupi ima 13 muškaraca (65%) i 7 žena (35%). Svi su bolesnici primili antibakterijsku trostruku terapiju ("triple-therapy"). U svih bolesnika učinjena je i kontrolna gastroskopija s biopsijama. Pregled je učinjen u razmaku između 32 i 150 dana nakon prve gastroskopije odnosno najmanje 15 dana nakon provedene terapije. Druga kontrolna gastroskopija s biopsijama učinjena je u četiri bolesnika u razmaku od 148 do 230 dana nakon ponovno provedene terapije.

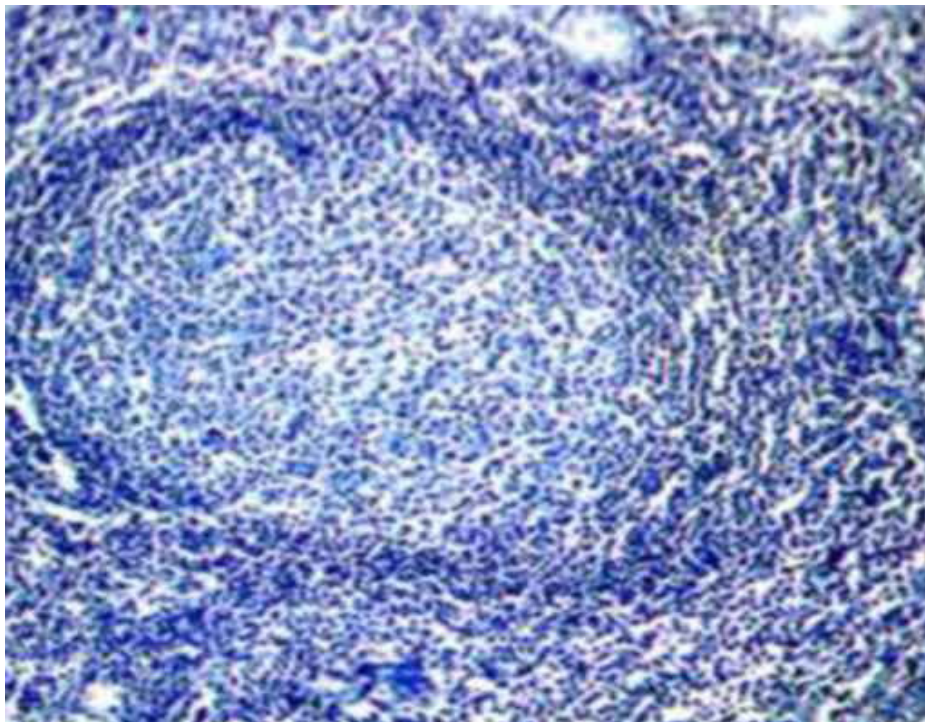
Druga skupina od 20 bolesnika (grupa II) je ona s MALT-tip limfomom želuca (slika 3.) U ovoj grupi ima 12 muškaraca (60%) i 8 žena (40%). Prosječna životna dob bolesnika grupe II je 60,9 godina. U 15 bolesnika učinjena je gastroskopija te su tom prilikom uzeti uzorci suspektne lezije za analizu, dok je u preostalih 5 bolesnika učinjena parcijalna ili totalna gastrektomija. U 14 bolesnika ove grupe nađen je i *H. pylori*. U sedam bolesnika učinjena je kontrolna gastroskopija s biopsijama u razmaku od 35 do 600 dana te je u svih sedam i dalje nađen MALT-tip limfom. Drugi kontrolni gastroskopski pregled učinjen je samo u tri od ranije spomenutih sedam bolesnika i to u

razmaku od 50 do 510 dana od prethodnog pregleda. U sva tri bolesnika i dalje se radilo o limfomu.

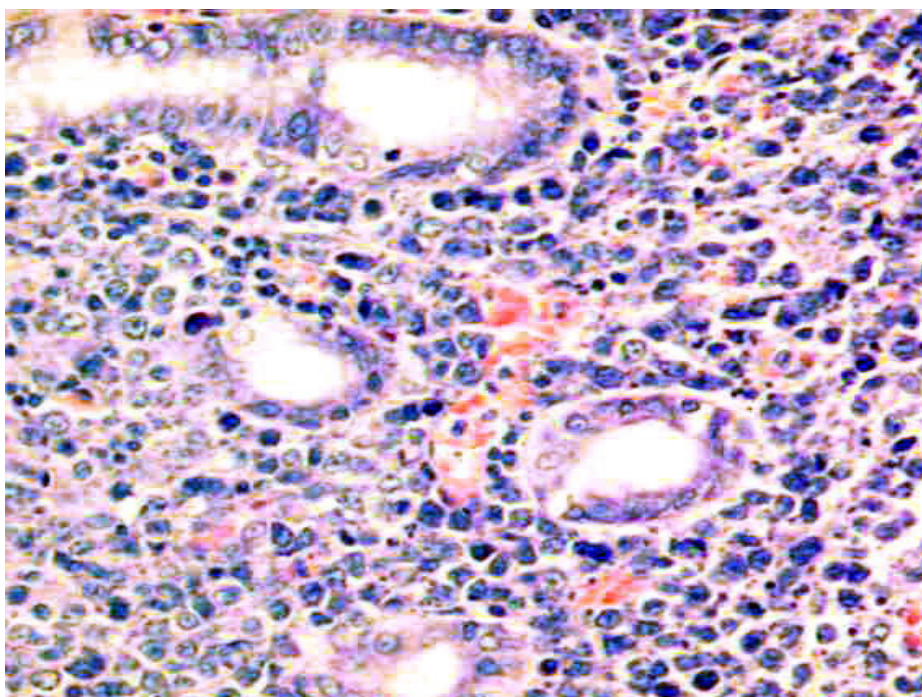
U trećoj skupini bolesnika (grupa III) prosječna životna dob je 58,6 godina. Radi se o skupini od 20 bolesnika s DLBCL želuca (slika 4.). U 17 bolesnika u razmaku od 8 do 120 dana prije operativnog zahvata učinjena je gastroskopija s biopsijama suspektne lezije. U dva bolesnika preoperativna gastroskopija nije učinjena dok je u jednog gastroskopski pregled učinjen 710 dana prije operativnog zahvata. U grupi ima 12 žena (60%) te 8 muškaraca (40%). U svih bolesnika učinjena je totalna gastrektomija. Analizirana je veličina tumora, dubina infiltracije stijenke želuca te zahvaćenost limfnih čvorova u masnom tkivu male i velike krivine želuca. U 11 bolesnika nađen je i *H. pylori*. Osam bolesnika bilo je na kontrolnom endoskopskom pregledu nakon operacije u razmaku između 50 i 550 dana. U svih se radilo o urednom endoskopskom nalazu anastomoze tankog crijeva i jednjaka.



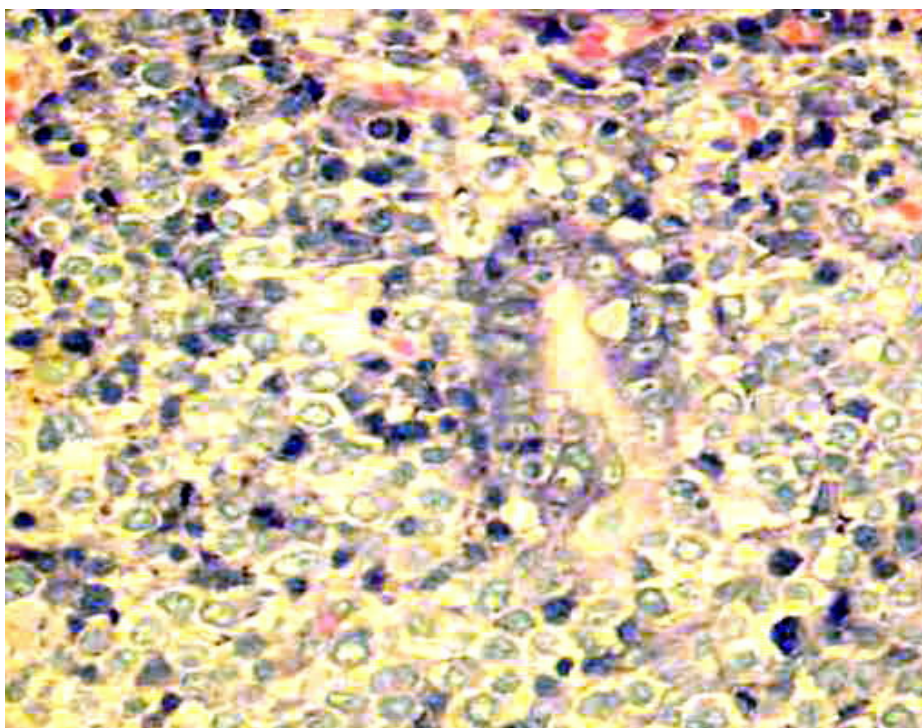
Slika 1. Limfatični nodul, Giemsa, x 90



Slika 2. Limfatični folikul, Giemsa, x 90



Slika 3. MALT-tip limfom, Giemsa, x120



Slika 4. Velikostanični limfom želuca (DLBCL) Giemsa, x 120

2 METODE

3.2.1 GASTROSKOPIJA

Gastroskopiya je učinjena fiberoptičkim ezofagogastroduodenoskopom (Olympus, GIF-Q145), koji je opremljen kliještima za uzimanje bioptičkih uzoraka. Endoskopski nalazi bili su opisani s podacima o mjestu promjene, veličini i izgledu a označeni su slijedećim pojmovima: hiperemija, erozija, vrijed, ožiljak i infiltrat.

3.2.2 HISTOLOGIJA

Bioptički i resekcijski materijal fiksiran je u 10% ili standardnom 4% neutralnom puferiranom formalinu, uklapan u parafin te izrezan u rezove debljine 3 do 4 mikrona. Rezovi su rutinski obojeni hemalaun-eozinom. Prisutnost i količina H. pylori određena je semikvantitativno u rezovima bojenim modificiranom metodom – 2 % Giemsa (89).

Vrijednosti za prisutnost i količinu H. pylori bili su:

- a) 0 = nema H. pylori
- b) 1 = rijetko H. pylori
- c) 2 = osrednje H. pylori
- d) 3 = obilno H. pylori

Prisutnost i gustoća infiltrata limfocita i plazma stanica procjenjena je i gradirana prema Wotherspoon-u (40). Zanimali su nas gradus 2 (grupa I) i gradus 5 (grupa II).

Gradiranje limfocitnog infiltrata prema Wotherspoon-u:

- 0 = normalna sluznica, rijetke plazma stanice u lamini propriji, bez LF.
- 1 = kronični gastritis, male nakupine limfocita, bez LF i LEL-a.
- 2 = kronični gastritis s LF koji su okruženi “mantle” zonom i plazma stanicama, ali bez LEL-a.**
- 3 = opsežan limfocitni infiltrat, sumnjiv na limfom, vjerojatno reaktivan, LF okruženi malim limfocitima koji difuzno infiltriraju laminu propriju i epitel žlijezda (LEL).**
- 4 = obilan limfocitni infiltrat, vjerojatno limfom. LF okruženi s centrocitima sličnim limfocitima (CCL) koji difuzno infiltriraju laminu propriju.
- 5 = MALT limfom, difuzni gusti infiltrat CCL.**

Osim spomenutih kriterija definitivna dijagnoza grupe II bolesnika je definirana i imunohistokemijski prema WHO kriterijima za dijagnozu MALT limfoma. Također su WHO kriteriji zadovoljeni i za grupu III bolesnika odnosno dijagnozu DLBCL (42).

3.2.3 IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJENJE

Izvršeno je imunohistokemijsko bojenje s primarnim protutijelima (DAKO, Danska): CD3 (A 0452), CD20 (M0755), CD5 (M7194), CD23 (V1617) te CD10 (NOVOCASTRA Lab, NCL-CD10-270) prema uputama proizvođača, klasičnim načinom ili koristeći uređaj za automatizirano imunohistokemijsko bojenje “TechMateTM Horizon” (DAKO, Danska)

Imunohistokemijsko bojenje za BCL10 izvršeno je s koncentriranim anti-BCL-10 monoklonalnim protutijelom, klon 151 (ZYMED[®]Laboratories Inc. USA) u razrijeđenju 1:50.

Nakon deparafinizacije, demaskiranje antigena stanica na histološkim rezovima učinili smo kuhanjem u loncu pod tlakom a u 0,01 M citratnom puferu pH 6,00. Sekundarno i tercijarno antitijelo (streptavidin s peroksidazom) koristili smo iz seta “LSAB+System, HRP” (K 0609, DAKO, Danska). Preparate smo kontrastirali hematoksilinom, najdulje 1min. Kao pozitivnu kontrolu koristili smo tkivo tonzile.

3.2.4 FLUORESCENTNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA (FISH) NA PARAFINSKIM REZOVIMA

FISH (eng. fluorescent *in situ* hybridization) je citogenetska metoda kojom se fluorescencijski označenom nukleinskom probom istražuju željene nukleinske sekvence unutar kromosoma. Nakon pročišćavanja stanice od proteina i denaturacije deoksiribonukleinske kiseline (DNK) dolazi do hibridizacije označene probe i istraživane sekvence DNK. Boja kojom je označena proba apsorbira jedan, a propušta drugi dio spektra pa se specifične sekvence DNK na kromosomima pod mikroskopom mogu vidjeti kao jasni signali crvene/zelene/žute boje. Kako bi slika pod mikroskopom bila jasnija za jači kontrast koristi se bojanje jezgara DAPI-em (4',6 – diamidino-2-fenil-indol). Tako se mogu vidjeti oštro ograničene jezgre unutar kojih se nalazi signal boje koja ovisi o dizajnu same probe.

U našem istraživanju koristili smo CEP (Chromosome Enumeration Probes) DNA FISH Probe za detekciju centromere trećeg kromosoma proizvođača VYSIS Inc. USA (VYS CEP3 PRBSET 31-130003).

OTOPINE I POSTUPAK

OTOPINE:

TN (121,4 g Tris HCl + 87,4 g NaCl u 1 l destilirane vode, pH 7,5)

- 20x SSC (175,3 g NaCl + 88,2 g natrij-citrat-dihidrat u 1 l destilirane vode, pH 7)
- DEPC voda: 1 ml dietilpirokarbonata (DEPC) u 1 l destilirane vode promješati i ostaviti preko noći na 37°C. Drugi dan autoklavirati. DEPC inaktivira RNA-ze

POSTUPAK:

DEPARAFINIZACIJA:

- ispiranje parafinskih rezova debljine 2-3 μ histoclearom 2 x 5 min.
- rehidracija kroz apsolutni, 90%-tni i 70%-tni etanol, po 3 min.
- ispiranje destiliranom vodom 3 min.
- ispiranje 2xSSC-om, 3min

PREDTRETMAN:

- 100 μ l radne otopine proteinaze K (1ml 2xSSC + 5 μ l proteinaze K) dodati po uzorku i staviti u vlažnu komoru na 37°C, 1 sat.
- isprati 2x SSC-om, 5 min na 37°C.
- 100 μ l radne otopine RNA-ze (1ml 2x SSC + 10 μ l RNA-ze) dodati po uzorku i staviti u vlažnu komoru na 37°C, 1 sat.
- isprati 2x SSC-om, 5 min. na 37°C.
- u otopinu za pepsin (1ml 1M HCL + 99 ml destilirane vode) koja se grije u kupelji dodati 50 μ l pepsina; u tome inkubirati uzorke 30 min u vodenoj kupelji na 37°C.
- isprati uzorke 1x PBS-om, 1x 3 min.
- inkubirati 10 min u otopini formaldehida bez kiselina
(100 ml 1xPBS + 5 ml 50 Mm MgCl₂ + 2,6 ml 36%-tne otopine formaldehida)
- isprati uzorke 1x PBS-om, 3min.
- dehidrirati u alkoholima 70%-om, 90%-om i apsolutnom etanolu po 3 min.

DENATURACIJA:

- denaturirati na grijanoj ploči na 75°C 1 min 45 sec 100 µl otopine formamida (10 ml 20x SSC + 20 ml destilirane vode + 70 ml formamida) koja se grije u vodenoj kupelji na 75°C.
- nakon denaturacije uzorke brzo prebaciti u hladni 2 x SSC na + 4°C 3 min
- 70% - tni etanol na -20°C, 3 min.
- nakon toga uzorke staviti redom u 90%-tni i apsolutni etanol na 3 min.
- sušiti uzorke na zraku 5 min.
- denaturirati probu prema uputstvu dobivenom od proizvođača (po 1 staklu 7µl pufera + 2µl DEPC vode + 1µl probe, 2 min na 80°C)
- staviti 10 µl probe po uzorku, prekriti pokrovnicom 18 x 18 mm (može i sa 20 x 20 mm), zalijepiti pokrovnicu i staviti u vlažnu komoru (papirnati ručnik natopljen 60%-tnim formamidom razrijeđenim sa 1xSSC-om) preko noći na 37°C

POSTHIBRIDIZACIJA:

- isprati uzorke sa otopinom 100 ml 2xSSC + 1 ml 10%-tni tween20, 5 min u vodenoj kupelji na 37°C.
- isprati 2xSSC-om 2 x 3 min u vodenoj kupelji na 37°C uz miješanje.
- isprati TNT – om (50 ml 10x TN + 450 ml destilirane vode + 2,5 ml 10%-tnog tweena 20) 1 x 5 min.
- dehidratacija kroz 70%-tni, 90%-tni i apsolutni etanol po 3 min.
- staviti 10 µl DAPI-a po uzorku, prekriti pokrovnicom i ostaviti 1 h u mraku.

3.2.5 STATISTIČKA ANALIZA

Podaci su prikazani prikazani tabelarno i grafički. Kvalitativni podaci analizirani su postupcima za analizu tablica kontingencije (χ^2 test, Fisher exact test). Preživljenje je analizirano Kaplan – Meierovim postupkom a potencijalna prediktivna vrijednost nekih varijabli u procijeni preživljenja istražena je Coxovom regresijskom analizom (90).

4. REZULTATI

4.1 USPOREDBA ENDOSKOPSKIH NALAZA U BOLESNIKA GRUPE I i GRUPE II.

Uspoređujući endoskopske nalaze bolesnika grupe I i grupe II zanimalo nas je postoje li tipične endoskopske promjene koje odgovaraju histološkoj slici gastritisa tj. ranoj imunološkoj reakciji s vidljivim LN i/ili LF. Još veću pažnju posvetili smo pitanju mogućeg endoskopskog prepoznavanja MALT-tip limfoma. Rezultati su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Endoskopski nalazi bolesnika grupe I i II.

GR	hi+er	b.o+oži.	vrijed	infil.	Σ
I	4	5	11	0	20
II	14	0	0	6	20
Σ	18	5	11	6	20

$\chi^2 = 27,55$; d.f. = 3; P = 0,001

Legenda: GR = grupa bolesnika, hi+er = hiperemija i/ili erozije, b.o+oži.= uredan nalaz, ožiljak želuca ili dvanaesnika, infil. = tumorski infiltrat, Σ = ukupan broj bolesnika

Statistički postoji značajna razlika između grupe I i II u endoskopskim promjenama. Histološki nalazi LN/LF u našem materijalu endoskopski su svrstani u različite promjene a najučestaliji nalaz je bio vrijed. Promjena koja endoskopski odgovara tumorskom infiltratu nije nađena niti u jednog bolesnika s histološkim nalazom LN/LF.

MALT – tip limfom je endoskopski najčešće opisan slikom hiperemije i erozija. Vrijed nije nađen niti u jednog bolesnika, a samo u 6 bolesnika je endoskopski nalaz odgovarao tumorskoj infiltraciji sluznice želuca.

U 7 bolesnika grupe II učinjen je kontrolni endoskopski pregled, 70 do 600 dana nakon prvog pregleda. U 2 bolesnika endoskopski je nalaz odgovarao tumorskom infiltratu. U ostalih 5 bolesnika endoskopski nalaz hiperemije i erozija nije se mijenjao iako se histološki i dalje radilo o MALT-tip limfomu. Time je potvrđeno ranije mišljenje da ovaj tumor endoskopski ne pokazuje distinktivnu promjenu.

4.2. USPOREDBA PRISUSTNOSTI I KOLIČINE H. PYLORI U BOLESNIKA GRUPE I, II i III

Semikvantitativnom metodom utvrđena količina H. pylori u sluznici želuca bolesnika grupe I, II i III prikazana je u tablici 2.

Tablica 2. Usporedba količine H. pylori u bolesnika grupe I, II i III.

<i>Hp</i>	grupa I		grupa II		grupa III
	bio.1	bio.2	bio.1	bio.2	res.
NU	0	0	0	13	0
0	0	14	6	7	9
1	15	4	14	0	11
2	4	2	0	0	0
3	1	0	0	0	0
Σ	20	20	20	7	20

a) $\chi^2 = 19,050$; d.f = 6; P = 0,004 b) $\chi^2 = 5,431$ d.f. = 4; P = 0,246

Legenda: Hp = H. pylori (NU = nije učinjeno, 0 = nema, 1 = rijetko, 2 = osrednje, 3 = obilno)
 bio.1 = prva biopsija, bio.2 = druga biopsija, res = reseciran želudac, Σ=broj bolesnika
 a) = usporedba gr. I i II, b) = usporedba grupe II i III.

Iz tablice 2 je vidljivo da je H. pylori bio pozitivan u svih bolesnika grupe I. Kontrolna biopsija učinjena je u svih bolesnika, a u 6 bolesnika H. pylori je bio prisutan i nakon provedene terapije. U bolesnika grupe II tj. bolesnika s morfološkom dijagnozom MALT-tip limfoma, H.pylori je bio prisutan u 14 bolesnika, a u preostalih 6 bolesnika H. pylori nije nađen. Od svih bolesnika, druga kontrolna biopsija je učinjena samo u 7 bolesnika a histološki niti u jednog H. pylori nije nađen.

U trećoj skupini bolesnika (grupa III) s resekcijom želuca, H. pylori je histološki nađen u 11 bolesnika.

Statistički postoji značajna razlika u količini H. pylori između grupe I i II ($\chi^2 = 19,050$; d.f = 6; P = 0,004), međutim takva razlika nije dokazana u usporedbi grupe II i III

($\chi^2 = 0,960$; d.f. = 1; P = 0,327).

Interesantno je napomenuti da je u sve tri grupe semikvantitativnom procjenom količina H. pylori uglavnom odgovarala kategoriji 1, tj. nađeni su samo rijetki H. pylori mikroorganizmi.

4.3 USPOREDBA EKSPRESIJE BCL10 U BOLESNIKA GRUPE I, II i III.

U svim uzorcima praćena je prisutnost citoplazmatske i/ili intranuklearne ekspresije BCL10. Pozitivan nalaz je definiran intranuklearnom ekspresijom BCL10 u više od 5% stanica. Rezultati za sve tri grupe bolesnika prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Ekspresija BCL10 u bolesnika grupe I, II i III.

<i>BCL10</i>	grupa I		grupa II		grupa III
	A	B	A	B	A
neg.	0	0	0	0	5
ic.	18	18	8	2	13
ic.+ in.	2	2	12	5	2
Σ	20	20	20	7	20

A – gr I/II ($\chi^2 = 10,989$; d.f. = 1; P = 0,001) **A – gr II/III** ($\chi^2 = 13,333$; d.f. = 2; P = 0,001)

LEGENDA: neg.=negativan, ic. = pozitivan u citoplazmi, in.= pozitivan u jezgri
A = prva biopsija, B = kontrolna biopsija

Zanimljiv je podatak da su dva bolesnika grupe I imala intranuklearni i intracitoplazmatski BCL10 pozitivitet i da je takav nalaz potvrđen u istih bolesnika i nakon provedene terapije (slika 5).

Intranuklearni pozitivitet je nađen u 12 (60%) bolesnika grupe II s MALT-tip limfomom (slika 6.), dok je u grupi III nađen samo u 2 (10%) bolesnika.

Iz tablice 3 je vidljivo da 5 bolesnika grupe III ima negativan nalaz, tj. ekspresija BCL10 nije dokazana niti u citoplazmi niti u jezgri. Samo citoplazmatski pozitivitet nađen je u 13 bolesnika (slika 7.)

4.4. USPOREDBA PRISUTNOSTI TRISOMIJE 3 U BOLESNIKA GRUPE I, II i III.

U dokazivanju prisutnosti trisomije 3 korištena je FISH metoda, a u svakom uzorku analizirano je 200 stanica. Pozitivan nalaz definiran je pozitivnim signalom u više od 3% stanica.

Tablica 4. Prisustvo trisomije 3 u bolesnika grupe I, II i III.

Gr.	TRISOMIJA 3		Σ
	pozitivno	negativno	
I	0	20	20
II	7	13	20
III	3	17	20

I/II/III ($\chi^2 = 8,880$; d.f. = 2; P = 0,012) II/III ($\chi^2 = 2,133$; d.f. = 1; P = 0,144)

Legenda: Gr = grupe bolesnika, Σ = broj bolesnika

U grupi I nijedan bolesnik nije imao dokazanu trisomiju 3. U grupi MALT-tip limfoma u 7 bolesnika nalaz je bio pozitivan (slika 8.), dok je u grupi III samo u 3 bolesnika nađena trisomija 3.

4.5. USPOREDBA PRISUTNOSTI I KOLIČINE H. PYLORI S EKSPRESIJOM BCL10 U BOLESNIKA GRUPE I, II i III.

Daljnji interes u ovom istraživanju usmjerili smo u traženju odgovora o mogućoj povezanosti prisutnosti i količine H. pylori s ekspresijom BCL10 u svim grupama naših bolesnika. Rezultati za prikazani u tablicama 5,6 i 7.

Tablica 5. Odnos H. pylori i BCL10 u 1. biopsiji , grupa I

Hp	BCL10			Σ
	neg.	ic	in+ic	
1	0	13	2	15
2	0	4	0	4
3	0	1	0	1
Σ	0	18	2	20

$$\chi^2 = 0,741; \text{d.f.} = 2; P = 0,690$$

Legenda: Hp = H. pylori (1 = rijetko, 2 = osrednje, 3 = obilno) Σ = broj bolesnika
BCL10 (neg = negativan, ic = poz. u citoplazmi, in = poz. u jezgri)

Tablica 6. Odnos H. pylori i BCL10 u 1. biopsiji, grupa II

Hp	BCL10			Σ
	neg.	ic.	in.+ic.	
0	0	3	3	6
1	0	5	9	14
Σ	0	8	12	20

$$\chi^2 = 0,357; \text{d.f.} = 1; P = 0,550$$

Legenda: Hp = H. pylori (0 = nema, 1 = rijetko), Σ = broj bolesnika
BCL10 (neg. = negativan, ic = poz. u citoplazmi, in = poz. u jezgri)

Tablica 7. Odnos Hp i BCL10 u 1. biopsiji, grupa III

Hp	BCL10			Σ
	neg.	ic.	in.+ic.	
0	2	6	1	9
1	3	7	1	11
Σ	5	13	2	20

$$\chi^2 = 0,078; \text{d.f.} = 2; P = 0,962$$

Legenda: Hp = H. pylori (0 = nema, 1 = rijetko), Σ = broj bolesnika
BCL10 (neg. = negativan, ic = poz. u citoplazmi, in = poz. u jezgri)

Iz tablica 5, 6 i 7 je vidljivo, da je u bolesnika s ekspresijom BCL10, (intracitoplazmatskom i/ili intranuklearnom) kolonizacija sluznice s *H. pylori* bila minimalna.

U grupi II i III, intracitoplazmatska i intranuklearna ekspresija BCL10 bila je pozitivna u 3, odnosno u jednog bolesnika s *H. pylori* negativnim histološkim nalazom.

**4.6. USPOREDBA PRISUTNOSTI I KOLIČINE H. PYLORI S NALAZOM TRISOMIJE 3
U BOLESNIKA GRUPE II i III.**

U bolesnika grupe I nije nađena trisomija 3. Rezultati povezanosti prisustva i količine H. pylori s trisomijom 3 u bolesnika grupe II i III prikazani su u tablicama 8 i 9.

Tablica 8. H. pylori i trisomija 3, grupa II.

Hp	Trisomija 3		Σ
	neg.	poz.	
0	3	3	6
1	10	4	14
Σ	13	7	20

$\chi^2 = 0,848$; d.f. = 1; P = 0,357

Legenda: Hp = H. pylori (0 = nema, 1 = rijetki) Σ = broj bolesnika
neg. = negativno; poz. = pozitivno,

Tablica 9. H. pylori i trisomija 3, grupa III.

Hp	Trisomija 3		Σ
	neg.	poz.	
0	8	1	9
1	9	2	11
Σ	17	3	20

$\chi^2 = 0,194$; d.f. = 1; P = 0,660

Legenda: Hp = H. pylori (0 = nema, 1 = rijetki), Σ = broj bolesnika
neg. = negativno; poz. = pozitivno

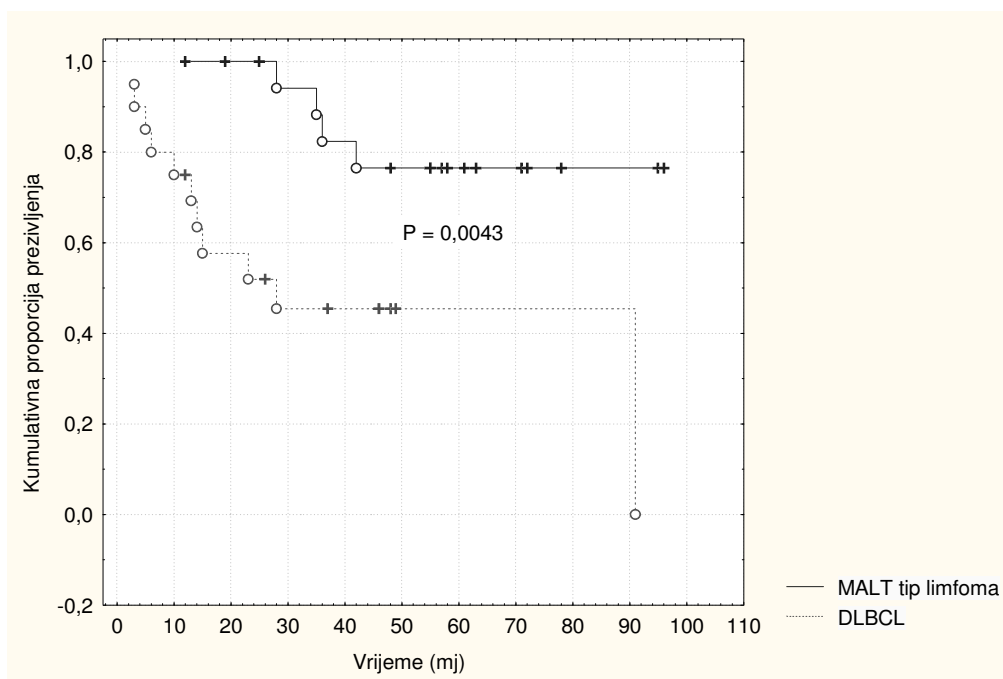
U grupi II trisomija 3 nađena je u 3 bolesnika s negativnim nalazom H. pylori i u 4 bolesnika s pojedinačnim mikroorganizmima uz površinu želučane sluznice.

U grupi III, rijetki H. pylori i trisomija 3 nađeni su u 2 bolesnika, a negativan nalaz H. pylori uz trisomiju 3 u jednog bolesnika.

4.7 ANALIZA PREŽIVLJENJA.

U grupi I svi su ispitanici preživjeli. Usporedba preživljenja je stoga načinjena između bolesnika grupe II i grupe III. Prosječno trajanje preživljenja bolesnika u grupi II je 53 mjeseca sa standardnom devijacijom 23,1. Bolesnici su živjeli između 12 i 96 mjeseci s medijanom 55 mjeseca. Prosječno trajanje preživljenja u bolesnika grupe III je 26,9 mjeseci sa standardnom devijacijom 22,96. Bolesnici su živjeli između 3 i 91 mjeseci sa medijanom 19 mjeseci.

Grafikon 1. preživljenje grupe II i III (Kaplan – Meier)



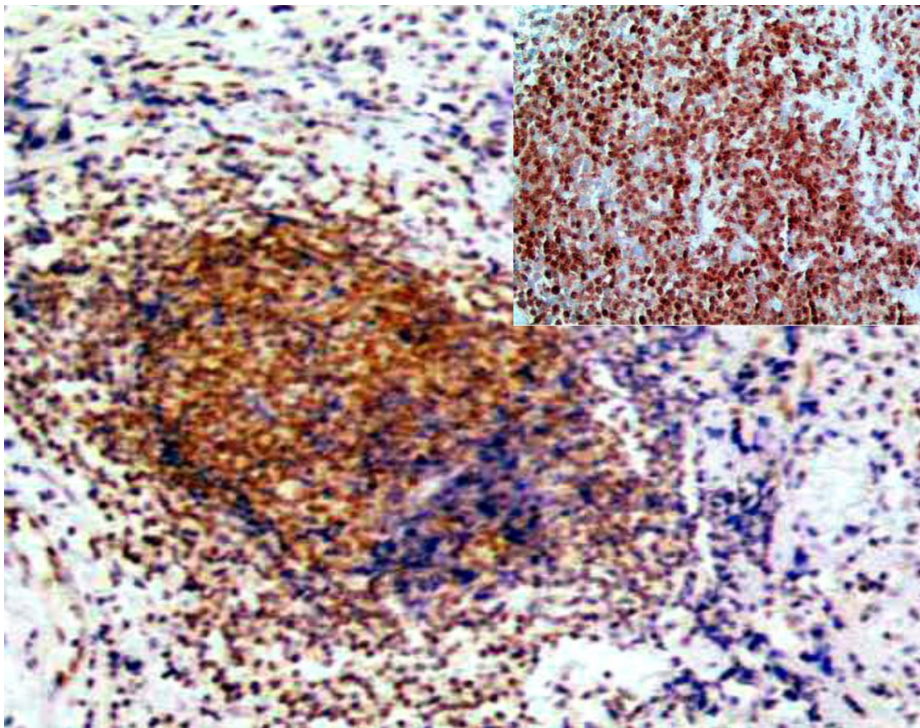
Legenda: mj = mjeseci; DLBCL = difuzni B velikostanični limfom

Razlika je statistički značajna ($z = 2,86$; $P = 0,0043$)

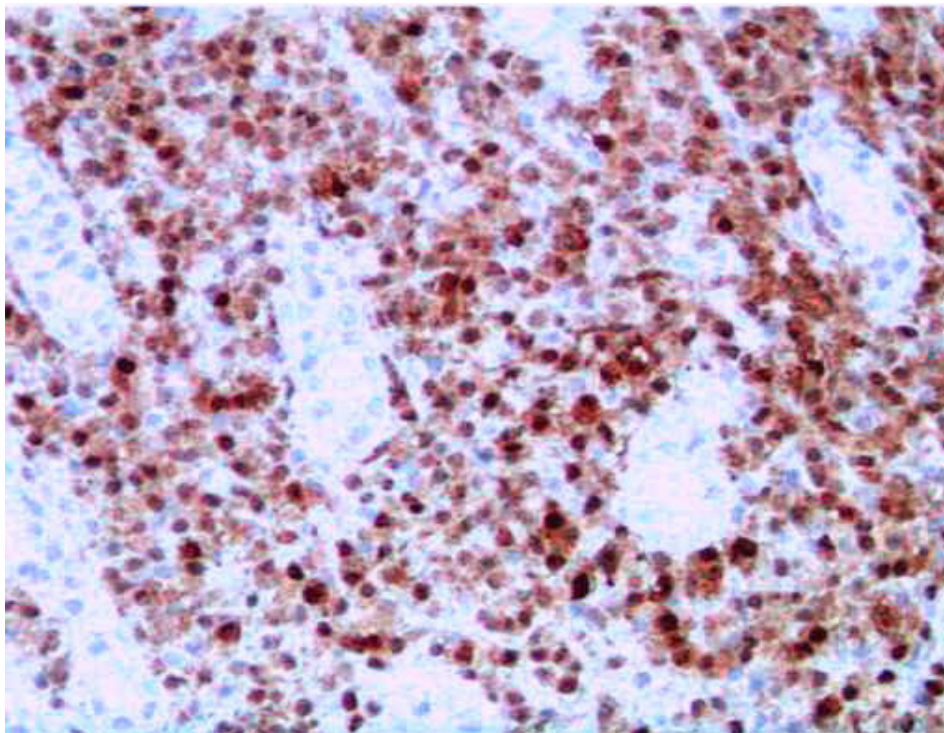
Analiza preživljenja učinjena je i Cox-ovom regresijskom analizom s namjerom procjene relativne važnosti “osumnjčenih” prediktora.

Kao prediktori korišteni su spol i dob bolesnika, veličina i raširenost (“staging”) tumora, prisutnost trisomije 3 te ekspresija BCL10. Utvrđena je statistički značajna razlika u preživljenju između ispitivanih grupa bolesnika ($\chi^2=15,46$; d.f = 6; P = 0,017).

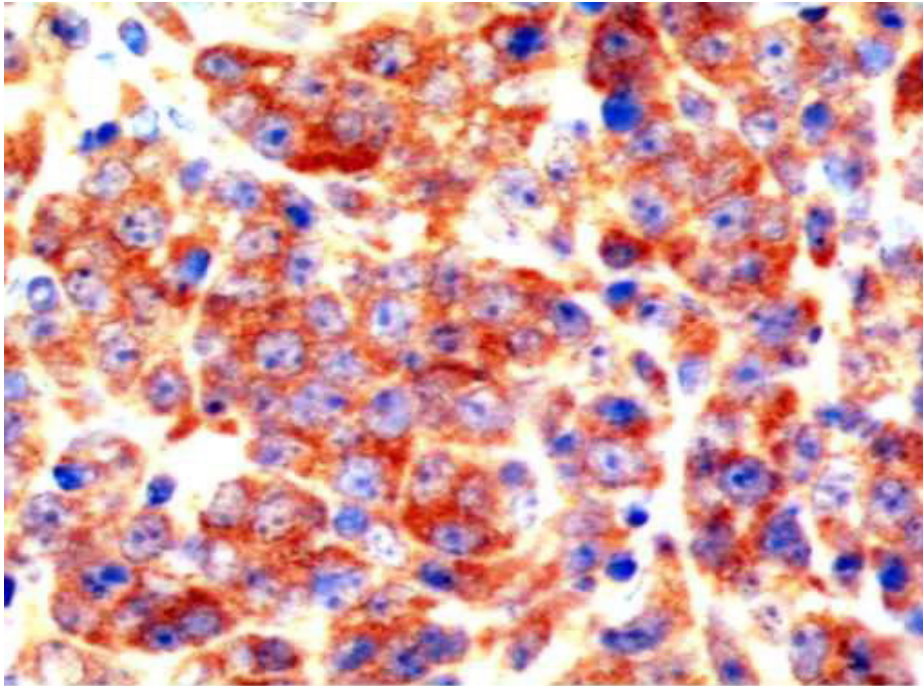
Od predmnijevanih prediktora samo se dob bolesnika pokazala kao statistički značajan prediktor. Za ekspresiju BCL10 bi se moglo reći da je statistički značajan prediktor na 6% - noj razini značajnosti.



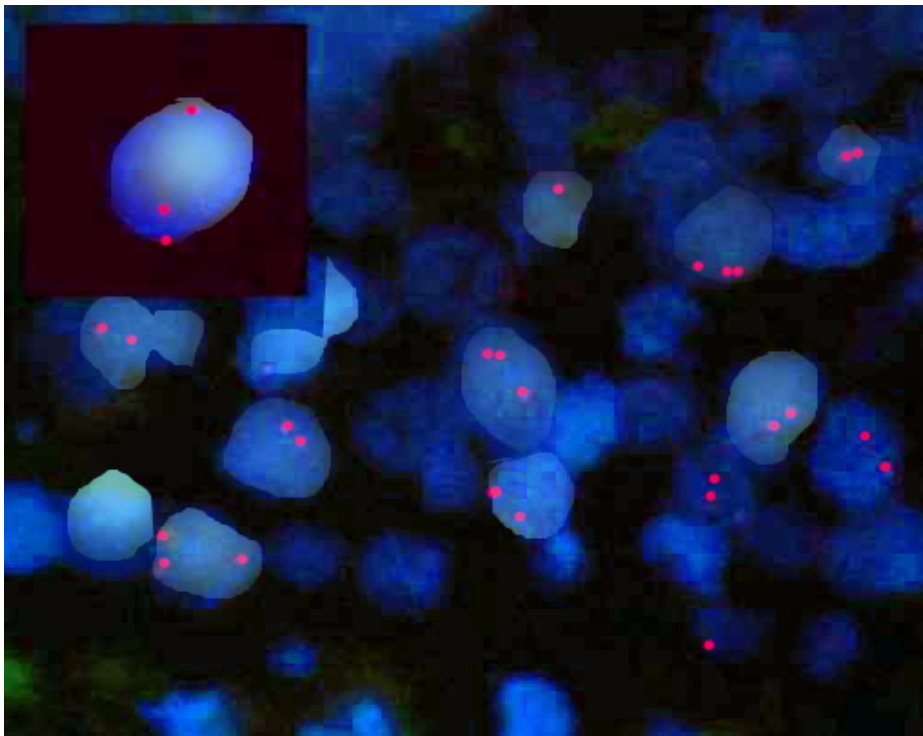
Slika 5. Ekspresija BCL10 u jezgri – LN, BCL10-PAP, x90
Insert – LN, veće povećanje BCL10 u jezgri.



Slika 6. Ekspresija BCL10 u jezgri, MALT-tip limfom, BCL10-PAP, x120



Slika 7. Ekspresija BCL10 u citoplazmi, DLBCL, BCL10-PAP, x300



Slika 8. FISH, tri signala centromere kromosoma 3, MALT-tip limfom, x200
Insert – veće povećanje, x 1000

5.0 RASPRAVA

H. pylori kolonizira sluznicu antralnog dijela želuca i uzrokom je akutnih i kroničnih upalnih promjena (91,92,93). Kao i u drugim upalnim bolestima, prirođeni, ali i stečeni imunološki odgovor domaćina na infekciju H. pylori ima odlučujuću ulogu na ishod bolesti. Humoralni odgovor na različite antigene komponente H. pylori rezultira stvaranjem antitijela. H. pylori inducira i stanično posredovane mehanizme odgovora, tj. upalne stanice, antigen prezentirajuće stanice i njihove citokine.

Fiziološki se u sluznici želuca nalazi mali broj T limfocita, dok B limfocita uglavnom nema. Kako kolonizacija H. pylori uzrokuje lokalni i sistemski imunološki odgovor, pretpostavlja se da su LN/LF posljedica kronične antigene stimulacije sluznice želuca. Limfatični folikuli su prema tome posljedica specifičnog imunološkog odgovora na infekciju H. pylori. Limfatični folikuli i LN se najčešće nalaze u antralnoj sluznici, no nađeni su i u ostalim dijelovima sluznice želuca. Morfološki odgovor organizma na H. pylori s formiranjem LF i LN opažen je u 20-50% bolesnika. U našem uzorku od 2430 H. pylori pozitivnih bolesnika s gastritisom, nađeni su LN i LF kao predominantni imunološki odgovor u 8% bolesnika.

Kako se LN i LF nalaze značajno češće u antrumu, gdje u pravilu nastaju i maligni limfomi želuca, postavlja se pitanje jesu li LF i LN u nekih bolesnika predhodnici limfoma želuca.

Prema literaturnim podacima MALT-tip limfoma želuca nastaje na podlozi kroničnog upalnog odgovora na prisustvo H. pylori, koji dovodi do nastanka MALT-a (36,39,40,94,95). U prvoj fazi, nastanak MALT- tip limfoma iz MALT-a rezultat je kontinuirane akumulacije B limfocita uslijed antigene stimulacije.

Progresijom u fazu autonomne proliferacije nastaje nisko maligni limfom. Ovaj tip limfoma može, u nekim slučajevima progredirati i u visokomaligni limfom (DLBCL) (59).

Kao i kod drugih neoplazmi, i za nastanak MALT-tip limfoma, mora se dogoditi niz genomskih promjena, koje korak po korak pridonose nestabilnosti genoma, što na kraju rezultira populacijom autonomnih tumorskih stanica.

Određene kromosomske translokacije: t(1;14) i t(11;18), drže se odgovornim u patogenezi MALT-tip limfoma (60,73,96,97). Translokacijom, t(1;14) transferira se cijeli gen za BCL10 u blizinu gena za teški lanac imunoglobulina na 14 kromosomu. Rezultat t(11;18) je kimerički onkoprotein API2-MALT1 (75). U fiziološkim okolnostima BCL10 i API2-MALT1 čine jaki i specifični kompleks, i proteini tog kompleksa djeluju sinergistički na aktivaciju NF- κ B. NF- κ B je transkripcijski faktor koji ima ključnu ulogu u ekspresiji gena koji reguliraju aktivaciju limfocita i imunološkog odgovora (68).

Tako pojačana ekspresija BCL10 aktivira NF- κ B, koji signalnim putem utječe na produljeni život B limfocita, te na taj način može doći do transformacije i eventualne progresije tumora.

Najinteresantniji nalazi u ekspresiji BCL10 u našem uzorku, su slučajevi dva bolesnika s LN u kojih je nađena intranuklearna i citoplazmatska ekspresija BCL10. U oba bolesnika kolonizacija sluznice s *H. pylori* je bila oskudna, što govori da količina *H. pylori* ne utječe na pojačanu ekspresiju BCL10. Rezultat je sukladan nalazima drugih autora (98,99).

Ekspresija BCL10 u prvoj, dijagnostičkoj, kao i u kontrolnoj biopsiji je perzistirala a u bolesnika nije bilo morfoloških niti kliničkih kriterija maligne bolesti. Ovo se može objasniti mutacijom unutar BCL10 gena, a ne translokacijom cijelog BCL10 gena na 14 kromosom. Ako je ta pretpostavka točna, onda su bolesnici sa ovakvom ekspresijom BCL10 rizični bolesnici, jer je dokazano da mutacija BCL10 gena ima onkogene funkcije (72,73)

Drugi interesantan nalaz je da samo dva od 20 bolesnika s DLBCL intranuklearno izražavaju BCL10. Iako se MALT-tip limfoma smatra indolentnim limfomom, dio ovih limfoma može transformirati u visoko maligni limfom. Velike stanice i veći broj mitozu unutar klasične morfološke slike MALT-tip limfoma govore za visokomalignu komponentu. Najveći broj velikostaničnih B-limfoma želuca ne pokazuje genetske karakteristike MALT-tip limfoma: t(1;14), t(11;18) (60,73,96,97). Na temelju tih dokaza smatra se da je DLBCL želuca uglavnom *de novo* nastala neoplazma, a samo manji dio nastaje transformacijom MALT-tip limfoma. U naša dva bolesnika DLBCL želuca nastao je, prema tome, najvjerojatnije transformacijom MALT-tip limfoma. U ostalih bolesnika velikostanična neoplazma, nastala je vjerojatno kao *de novo* tumor.

Kako dijagnostički algoritam u našim uvjetima, za H. pylori pozitivne i H. pylori negativne bolesnike ne uključuje citogenetske analize, u naših 12 bolesnika s verificiranim MALT-tip limfomom, intranuklearna ekspresija BCL10 može se tumačiti na nekoliko načina. Može se razmišljati, o mogućoj mutaciji BCL10 kao i u bolesnika grupe I, ali isto tako i o mogućim drugim translokacijama, t(11;18) ili manje vjerojatno t(1;14) (100,101,102).

Kako ove dvije različite translokacije imaju zajedničku karakteristiku - pojačanu ekspresiju BCL10, obje mogućnosti su jednako vrijedne (103,104). Obzirom da su pojedini autori mišljenja da je t(11;18) povezana s agresivnijim kliničkim tijekom uz činjenicu da ti bolesnici slabo ili uopće ne reagiraju na H. pylori eradikacijsku terapiju (65,105), nameće se jedini mogući zaključak ovog nalaza, da je BCL10 "screening" metoda čije se značenje mora valorizirati i nadopuniti citogenetskom analizom.

Najčešća numerička kromosomska anomalija u MALT-tip limfomu, smatra se trisomija 3, bilo da je kompletna ili nekompletna (84-87,106). Podaci o učestalosti trisomije 3 su različiti i kreću se od 20% (85) do čak 85% slučajeva (86). Postoji mišljenje da je trisomija 3 rani fenomen u tijeku MALT-tip limfoma i da je ta numerička aberacija vrlo važan događaj u nastanku MALT-a. Ipak nije sasvim jasno kako bi prekobrojni kromosom djelovao u tumorogenezi odnosno progresiji tumora. Jedno je objašnjenje, da povećani broj kopija gena utječe na pojačanu ekspresiju gena. Drugo objašnjenje je da dodatni kromosom, ili više njih, poremeti normalni smještaj gena u interfaznoj jezgri i na taj način pojača ili smanji normalnu ekspresiju gena (85). Kako niti u jednog bolesnika grupe I nije nađena trisomija 3, iako je u dva bolesnika dokazana nestabilnost imunološkog sustava, prisutnom intranuklearnom ekspresijom BCL10, može se zaključiti da trisomija 3 nije rani znak ili prediktor maligne bolesti. Takvi dokazi postoje i u drugih autora (86,106).

U 7 bolesnika grupe II (35%) s trisomijom 3 nisu postojali znakovi transformacije tj. "high grade" MALT-tip limfom (velike stanice, mitoze), stoga je malo vjerojatno, da trisomija 3 pogoduje transformaciji u maligniji oblik bolesti. U 3 bolesnika s DLBCL (15%) želuca nalaz trisomije 3 odgovara rijetkim opažanjima drugih autora o toj numeričkoj aberaciji (79,87).

Iako je trisomija 3 prisutna prema drugim autorima u čak do 36% bolesnika s DLBCL želuca, u tom tumoru je gotovo jednako česta i trisomija 7 (22%), odnosno 12 (31%) i trisomija 18 (21%) što govori o mogućoj drugačijoj genetskoj pozadini nastanka primarnih DLBCL (85,86,87). Ipak ne može se zanemariti niti mogućnost da je u tri bolesnika iz ispitivane skupine, DLBCL nastao transformacijom iz MALT-tip limfoma.

Poznato je da upalne promjene sluznice želuca, uzrokovane *H. pylori* infekcijom, prema Sydney-skoj klasifikaciji, varijabilno koreliraju s endoskopskim nalazom (28,29,30,107). Dill i Labenz i sur. su opisali nodularne promjene antralne sluznice kao jedan od dokaza infekcije s *H. pylori* (108,109), a posljedica su stvaranja LN i LF u sluznici želuca.

Calabrese i sur. endoskopski su dokazali nodularne promjene u 51/186 bolesnika s *H.pylori* infekcijom, ali u 17/186 bolesnika takva promjena nije nađena unatoč *H. pylori* infekcije (110). Gašparov u svom magistarskom radu nije niti u jednog od 30 bolesnika s LN/LF, i *H. pylori* infekcijom našao endoskopski nodularni izgled sluznice (111).

U grupi bolesnika s prisutnim LN/LF, u ovom istraživanju, endoskopski nalaz je odgovarao vrijedu u nešto više od polovine bolesnika (11/20). Od preostalih bolesnika gotovo jednak broj ima uredan nalaz, nalaz nakon sanacije vrijeda (5/20) ili hiperemiju sluznice odnosno erozije (4/20).

U grupi II, s histološkom slikom MALT-tip limfoma, endoskopskim pregledom se posumnjalo na tumorski infiltrat samo u 6 bolesnika. U preostalih 14 bolesnika endoskopski nalaz je bio nespecifičan, tj. nađene su hiperemija i erozije sluznice želuca.

Kontroverzna mišljenja da jačina upale ovisi o količini H. pylori u sluznici želuca, danas su prevladana.

Postoje dokazi da količina H. pylori ne utječe na imunološki odgovor organizma, već je za to odgovoran genotip H. pylori i imunološki potencijal lokalnog odgovora kao i cijelog organizma (37).

U sve tri grupe bolesnika količina H. pylori semikvantitativnom metodom određena, bila je svrstana u grupe oskudne ili srednje obilne kolonizacije sluznice. U svih bolesnika grupe I u prvoj biopsiji nađen je H. pylori. U grupi II i III dio bolesnika (14 odnosno 11) bili su H. pylori pozitivni. U svih bolesnika grupe I i II bila je prisutna jasna citoplazmatska ekspresija BCL10. Intranuklearna ekspresija kao dokaz mutacije ili mogućih translokacija, nađena je u dva bolesnika grupe I u prvoj biopsiji, uz prisutne rijetke H. pylori mikroorganizme. U grupi II H. pylori nije nađen u 3 bolesnika, ali je BCL10 bio lokaliziran u jezgri, dok su u preostalih 9 bolesnika uz intranuklearnu ekspresiju nađeni i rijetki H. pylori. Ovi nalazi ukazuju da je u H. pylori pozitivnih bolesnika ekspresija BCL10 izraženija ne samo u citoplazmi nego i intranuklearno. Također je moguće zaključiti da su te promjene vjerojatno uzrokovane s H. pylori iako nije utvrđena statistički značajna povezanost tih nalaza – kao dokaz nastanka mutacije.

Iako je pojačana ekspresija BCL10 nađena u citoplazmi svih bolesnika s MALT –tip limfomom, nije nađena statistički značajna povezanost između količine H. pylori i toga tumora, a pored toga u 3 bolesnika H. pylori nije niti nađen. Ako pokušamo objasniti ove nalaze, treba uzeti u obzir da je semikvantitativna analiza relativno neprecizna metoda, dakle 3 H. pylori negativna bolesnika treba uzeti s rezervom i svakako H. pylori provjeriti i drugim metodama (CLO test, ureza izdisajni test). Druga mogućnost je spontana eliminacija H. pylori koja se spominje u literaturi (112).

Postavlja se odmah i pitanje ako je imunološki sustav uspio odstraniti uzročnike, kako je nastala klonalna proliferacija?

Objašnjenje je u ovom slučaju više teoretsko, ne i nemoguće, jer je upravo prenapregnuti imunološki sustav vrlo osjetljiv na tzv. "second hit" tj. aberacije/mutacije gena, pa to nije nerazumno objašnjenje za negativni nalaz uzročnika u klonalnoj populaciji limfocita.

Ostaje i treća mogućnost, da osim *H. pylori* i drugi faktori mogu aktivirati i stalno inducirati gen za BCL10 na pojačanu aktivnost.

Ova i slična objašnjenja su logična u slučaju DLBCL i 5 bolesnika koji su opetovano pokazali negativan nalaz BCL10 intranuklearno i citoplazmatski. U ovih bolesnika očito nije došlo do mutacije ili translokacije BCL10, u *H. pylori* pozitivnih i negativnih bolesnika, već je za to odgovoran neki drugi faktor. U ovoj grupi tek je u dva bolesnika BCL10 prisutan intranuklearno, a samo u jednog je nađen i *H. pylori*. Iako je poznato da je kod DLBCL histološki teško uočiti *H. pylori* (112) i ovi nalazi govore u prilog da DLBCL u većine bolesnika nastaje *de novo*, a samo u nekih transformacijom MALT-tip limfoma u visoko maligni limfom (59,60).

Trisomija 3 nije nađena niti u jednog bolesnika grupe I. Kako je u toj grupi BCL10 bio pozitivan u dva bolesnika, što govori za prenapregnutost imunološkog sustava, a u literaturi se navodi da je trisomija 3 rani događaj u aberaciji imunološkog sustava, naši nalazi u grupi I tu mogućnost ne potvrđuju (97).

U grupi II trisomija 3 je nađena u bolesnika s prisutnim *H. pylori* i u bolesnika s negativnim *H. pylori*. Ako se razmišlja kao i kod analize BCL10 nalaza, može se zaključiti da je naš rezultat od 35% svakako niži od 60-85% iz literaturnih podataka (86). Naš nalaz bliži je novijim podacima, gdje je trisomija 3, određena FISH tehnikama, nađena u 20-40% MALT- limfoma (85).

Uz ovakav nalaz, iako se radi o postotku koji nije zanemariv, ostaje otvoreno pitanje uloge te numeričke aberacije u genezi MALT-tip limfoma.

Trisomija 3 u tri bolesnika s DLBCL može predstavljati slučajeve transformacije MALT-tip limfoma u velikostanični limfom, ali isto tako i numeričke aberacije *de novo*

nastalih DLBCL, iako je u tih limfoma daleko češća trisomija 7, 12 i 18 (79,86). Negativan nalaz *H. pylori* u jednog bolesnika s DLBCL, vjerojatno je posljedica istog mehanizma kao što je to opisano kod BCL10 i DLBCL.

Kako MALT-tip limfom pripada skupini indolentnih limfoma, diseminacija tumorskih stanica, događa se u kasnijem tijeku bolesti nego je to slučaj u DLBCL. Iako se MALT-tip limfom uglavnom širi lokalno u marginalnu zonu limfnih čvorova i slezene, sistemna diseminacija je češća nego što se ranije mislilo. MALT-tip limfomi imaju tendenciju diseminacije u druge dijelove gastrointestinalnog trakta. Tumorske stanice sekundarnih gastrointestinalnih MALT-tip limfoma ekspiriraju tzv. "mucosal homing receptor" $\alpha_4\beta_7$ integrin. Tumorske stanice primarnih tumora želuca, međutim, ne ekspiriraju ovaj protein (69). Dokazano je da *H. pylori* može preko T staničnog odgovora, inducirati povišenu ekspresiju $\alpha_4\beta_7$ na tumorskim stanicama, koji bi uz prisutnost MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule) – liganda za $\alpha_4\beta_7$, ostale vezane na mjestu nastanka, tj. u želucu (113,114). Time se može objasniti medijan preživljenja od 55 mjeseci grupe bolesnika s MALT-tip limfomom.

Kako postoji sve više dokaza da DLBCL želuca nastaje kao *de novo* tumor, a uloga *H. pylori* u nastanku tog limfoma je upitna, taj se limfom ponaša i ima svojstva nodalnih DLBCL. Kako je petogodišnje preživljenje bolesnika s tim limfomom oko 60%, medijan preživljenja od 19 mjeseci za našu skupinu bolesnika s DLBCL nije neočekivan.

6.0 ZAKLJUČCI

1. Intranuklearnu ekspresiju BCL10 našli smo u dva (10%) bolesnika s LN.
Pretpostavljamo da se radi o rizičnim bolesnicima.
2. U 12 (60%) bolesnika s MALT-tip limfomom našli smo intranuklearnu ekspresiju BCL10 što govori za mutaciju i/ili translokaciju kromosoma u tih bolesnika.

Mišljenja smo da treba mjenjati dijagnostički algoritam u ovakvih bolesnika, te uvesti citogenetsku analizu u rutinske dijagnostičke pretrage.
3. Intranuklearna ekspresija BCL10 u dva (10%) bolesnika s DLBCL indirektno ukazuje da se radi o transformaciji MALT-tip limfoma u velikostanični limfom. Nalaz ovako malog broja DLBCL s intranuklearnom ekspresijom BCL10 ide u prilog mišljenja da je DLBCL *de novo* nastali tumor želuca.
4. Trisomija 3 nije rani događaj, u nastanku autonomne proliferacije stečenog limfatičnog tkiva, u *H. pylori* pozitivnoj sluznici želuca.
Trisomiju 3 smo našli u 7 (35%) bolesnika s MALT-tip limfomom, i u 3 (15%) bolesnika s DLBCL. Razlika nije značajna, no ipak pretpostavljamo da trisomija 3 u tri bolesnika s DLBCL predstavlja slučajevne transformacije iz MALT-tip limfoma.
5. Količina *H. pylori* u sluznici želuca nije povezana s intenzitetom upale. Prisutnost i količina *H. pylori* nije povezana niti s intranuklearnom ekspresijom BCL10 i nalazom trisomije 3.
Ovaj zaključak treba uzeti s rezervom jer je u grupi II 30%, a u grupi III 45% bolesnika bilo *H. pylori* negativno. Kako se u ovom radu *H. pylori* određivao samo semikvantitativnom metodom, upitno je da li je *H. pylori* negativan nalaz zaista točan.
6. Endoskopski nalaz je insuficijentan u dijagnostici rane aberantne imunološke reakcije – LN/LF, i MALT- tip limfoma.

7. Od promatranih prediktora (dob, spol, veličina tumora, trisomija 3, BCL10), samo je dob bolesnika statistički značajan prediktor preživljenja.

7.0 SAŽETAK

U rad je uključeno 60 bolesnika koji su na temelju histološkog nalaza podijeljeni u tri grupe a u svakoj grupi imamo 20 bolesnika. Glavno morfološko obilježje grupe I je prekomjerna imunološka reakcija tj. LN/LF, a u svih bolesnika prisutan je *H. pylori*. MALT-tip limfoma je karakteristika grupe II, gdje je od 20 bolesnika *H. pylori* bio prisutan u 14. U grupi III, od 20 bolesnika s DLBCL želuca *H. pylori* je nađen u 11. Osim prisutnosti i količine *H. pylori* zanimali su nas i endoskopski nalazi svih bolesnika. Cilj nam je bio utvrditi u sve tri grupe bolesnika, postojanje citogenetskih (BCL10) i kromosomskih abnormalnosti (trisomija 3), te eventualno, njihov utjecaj na rezistenciju na "triple" terapiju. Također nas je zanimalo utjecaj ovih abnormalnosti na tijek i ishod bolesti, povezanost s nastankom tumora, te njihov eventualni utjecaj na transformaciju MALT-tip limfoma u DLBCL.

H. pylori smo odredili histološki semikvantitativnom metodom, ekspresiju BCL10 imunohistokemijski a prisutnost trisomije 3 FISH metodom.

Na temelju rezultata, pokazalo se da je endoskopski nalaz insuficijentan u dijagnostici LN/LF i MALT-tip limfoma. Zaključili smo da količina *H. pylori* nije povezana s intenzitetom upale, s intranuklearnom ekspresijom BCL10, kao niti s trisomijom 3.

Kako smo intranuklearnu ekspresiju BCL10 našli u 2 bolesnika s LN, mišljenja smo da se radi o bolesnicima rizičnim za nastanak limfoma. Pozitivna intranuklearna ekspresija BCL10 u 60% bolesnika s MALT-tip limfomom govori za mutaciju i/ili translokaciju kromosoma, te bi citogenetsku obradu trebalo uvesti u rutinske dijagnostičke pretrage. U prilog transformacije MALT-tip limfoma u visokomaligni limfom, indirektno govori prisustvo intranuklearne ekspresije BCL10 u 2 bolesnika s DLBCL.

Kako trisomiju 3 nismo našli niti u jednog bolesnika s LN/LF, očito je da ova kromosomska promjena nije odgovorna za ranu fazu autonomne proliferacije limfatičnog tkiva. Učestaliji nalaz trisomije 3 u bolesnika grupe II (35%) u odnosu na grupu III (15%) govori u prilog mišljenju da dio DLBCL nastaje transformacijom MALT-tip limfoma, dok drugi dio najvjerojatnije nastaje *de novo*.

Trisomija 3, i intranuklearna ekspresija BCL10 se nisu pokazali kao statistički značajni prediktori preživljenja.

8.0 SUMMARY

Sixty patients were included in the study, divided in three test groups of 20 patients in each. The main pathomorphological feature of the first group was excessive immunological reaction with the lymphoid nodules or follicles formation (LN/LF) in the gastric mucosa and *H. pylori* infection present in all subjects of this group. The second group was characterized by the MALT-type lymphoma and 14 of 20 patients had *H. pylori*. The third group consisted of 20 high grade diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) of the stomach of who 11 had also *H. pylori* infection. Incidence and severity of *H. pylori* infection as well as endoscopic findings were evaluated.

Aim of the study was to determine the incidence of a specific chromosomal abnormality of trisomy 3 and oncoprotein BCL10 incidence and expression pattern. We were also eventually interested in the correlation of these data with the emergence of therapeutic resistance to the specific "triple" anti-*H. pylori* treatment. Further aims were to evaluate the importance of these abnormalities on the course and outcome of the disease, relation to the formation of the neoplasm and their possible influence on the transformation of MALT-type lymphoma into DLBCL. *H. pylori* and BCL10 were evaluated by the histological and immunohistological methods respectively that included

semiquantitative grading. Trisomy 3 detection was done by FISH on paraffin sections of the endoscopic biopsies.

The results have shown that endoscopy is insufficient for the diagnosis of LN/LF and MALT-type lymphoma. We have also found that severity of *H. pylori* infection does not correlate with the intensity of inflammation, intranuclear expression of BCL10 or presence of trisomy 3 in the cells.

Two LN patients exhibited intranuclear expression of BCL10 which we believe, makes them at risk of lymphoma development. Intranuclear expression of BCL10 oncoprotein points to the possible mutation in the BCL10 gene or its rearrangement through chromosomal translocation which all suggests the necessity of introducing cytogenetic and molecular genetic tests in the diagnostic workup. The existence of intranuclear expression of BCL10 in two DLBCL lymphoma patients supports the MALT lymphoma transformation possibility.

As no trisomy 3 was found in patients with LN/LF it is most likely that this chromosomal aberration is not responsible for the early phase of autonomous proliferation of lymphoid tissue. More frequent (35% vs. 15%) finding of trisomy 3 in the group II compared to group III argues for the hypothesis that a part of the DLBCL comes from the transformed MALT lymphoma while the rest arises *de novo*.

Trisomy 3 and intranuclear expression of BCL10 were not statistically significant predictors of patients' survival.

9.0 LITERATURA

1. Toner PG, Watt PCH, Boyd SM. The gastric mucosa. U: Whitehead R. Gastrointestinal and Oesophageal Pathology. Edinburg: Churchill Livingstone 1989, 14-28.
2. Owen DA. Normal histology of the stomach. *Am J Surg Pathol* 1986;10(1):48-61.
3. Antonioli DA, Madora LJ. Functional anatomy of the gastrointestinal tract. U: Ming Si-Chun, Goldman H. Pathology of the gastrointestinal tract. Baltimore, Maryland USA: William Wilkins 1998, 13-33.
4. Graham KS, Graham DY. Contemporary diagnosis and management of *H. pylori*. Associated Gastrointestinal Diseases. Newtown; Pennsylvania, USA, 1998.
5. Presečki V, Strnad M, Smilović V, Payerl – Pal M, Đogić A, Kozić M, Kalenić S, Katičić M. Seroprevalencija infekcije s *Helicobacter pylori* na izabranim područjima Hrvatske. U: Zbornik sažetaka. I. hrvatski epidemiološki kongres. Hrvatski liječnički zbor, Hrvatsko epidemiološko društvo. Split, 12-5. svibnja 1999:87-88.
6. Oshowo A, Tunio M, Gillam D, Botha AJ, Holton J, Boulos P. Oral colonization is unlikely to play an important role in *Helicobacter pylori* infection. *Br J Surg* 1998;85:850-2.
7. Broutet N, Gisbert P, Pajares JM. The year in *Helicobacter pylori* 1999. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;15(suppl. 1):S43-S47.
8. Roma-Giannikou E, Karameris A, Balatsos B, Panayiouton J, Manika Z, Van-Vliet C, Rokkas T, Skandalis N, Kattanis C. Intrafamilial spread of *Helicobacter pylori*: a genetic analysis. *Helicobacter* 2003 Feb;8(1):15-20.
9. Basynat PS, Evans G, Warburton VJ, McNulty CAM, Stock D, Woodward A, Foster ME. Is there an association between *Helicobacter pylori* and colorectal cancer? Abstracts. XIIth international Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*. *Gut* 1999;45(Suppl III):A73.
10. De Luis DA, Lahera M, Cauton R, Boixeda D, San Roman AL, Aller R. Association of *Helicobacter pylori* infection with cardiovascular and cerebrovascular disease in diabetic patients. *Diabetes Care* 1998;21:1129-32.

11. Gasbarrini A, Franceschi F, Boixeda D, Miguel D, Martin de Argila C, Gasbarrini G. Role of *Helicobacter pylori* in extradigestive diseases. The year in *Helicobacter pylori* 1999. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;15(suppl 1):S29-S33.
12. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischman RD. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539-47.
13. Morgan AP, Wadström T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol* 1998;14(suppl 1):S9-S14.
14. Evans DG, Evans DJ, Moulds JJ, Graham DY. N-Acetylneuraminylactase – binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect Immun* 1998;56:2896-2906.
15. Suerbaum S, Hur C, Josenhans C, Michetti P. Pathogenesis and virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;15(suppl 1):S11-S16.
16. Ilver D, Arnqvist A, Ögren J, Boren T. Adherence of *Helicobacter pylori* mechanism and relevance to pathogenesis. U: Morgan AP, O'Morain CA. Pathogenesis and host response in *Helicobacter pylori* infections. Bad Homburg: Normad Verlag, 1997:16-27.
17. Papini E, DeBernard M, Milia E. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9720-4.
18. Atherton JC. *H. pylori* virulence factors. *British Medical Bulletin* 1998;54(1):105-20.
19. Presečki V, Katičić M, Marušić M, Kalenić S, Strnad M, Plečko V, Babuš V, Dominis M. Serološka dijagnostika infekcije *Helicobacter pylori*. *Liječ Vjesn* 2002;124 (suppl1):23-28.
20. Rad R, Prinz C, Neu B, Neuhofer M, Zeitner M, Volland P, Becker I, Schepp W, Gerhard M. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphism for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. *J Infect Dis* 2003;188(2):272-81.

21. Guillemin K, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. Cag pathogenicity island – specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(23):15136-41.
22. Van Doorn L-J, Henskens Y, Nouhan N, Verschuuren A, Vreede R, Herbink P, Ponjee G, Van Krimpen K, Blankenburg R, Scherpenisse J, Quint W. The efficacy of laboratory diagnosis of *Helicobacter pylori* infections in gastric biopsy specimens is related to bacterial density and *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes. *J Clin Microbiol* 2000;38(1):13-17.
23. Rudnicka W, Anderson LP. Inflammation and host response. *Curr Opin Gastroenterol* 1999;15(suppl 1):S17-S21.
24. Gooz M, Shaker M, Gooz P, Smolka AJ. Interleukin 1 beta induces gastric epithelial cell matrix metalloproteinase secretion and activation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2003;52(9):1250-6.
25. Ceponis PJ, McKay DM, Menaker RJ, Galindo-Mata E, Jones NL. *Helicobacter pylori* infection interferes with epithelial Stat6-mediated interleukin-4 signal transduction independent of *cagA*, *cagE*, or *VacA*. *J Immunol* 2003;171(4):2035-41.
26. Crabtree JE. Role of cytokines in pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced mucosal damage. *Dig Dis Sci* 1998;43(suppl 9):S46-S55.
27. Vajdy M, Singh M, Ugozzoli M, Briones M, Soenawan E, Cuadra L, Kazzaz J, Ruggiero P, Peppoloni S, Norelli F, Del Giudice G, O'Hagan D. Enhanced mucosal and systemic immune responses to *Helicobacter pylori* antigens through mucosal priming followed by systemic boosting immunizations. *Immunology* 2003;110(1):86-94.
28. Misiewicz JJ, Tytgat GNJ, Goodwin CS, Price AB, Sipponen P, Strickland RG, Cheli R. The Sydney System: A new classification of gastritis. Summary WorkingParty Reports, 9th World Congress of Gastroenterology, Sydney 1990:1-10.
29. Price AB. The Sydney System: histological division. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:209-22.
30. Correa P, Yardley JH. Grading and classification of chronic gastritis: one american response to the Sydney System. *Gastroenterology* 1992;102:355-59.

31. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading gastritis. The Update Sydney System. The International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Huston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20(10):1161-81.
32. Hatz RA, Meinarakis G, Bayerdorffer E, Stolte M, Kirchner T, Enders G. Characterization of lymphocytic infiltrates in *Helicobacter pylori* – associated gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1996;31(3):222-8.
33. Suzuki T, Ito M, Hayasaki N, Ishihara A, Ando T, Ina K, Kusugami K. Cytotoxic molecules expressed by intraepithelial lymphocytes may be involved in the pathogenesis of acute gastric mucosal lesions. *J Gastroenterol* 2003;38(3):216-21.
34. Futagami S, Hiratsuka T, Tatsuguchi A, Suzuki K, Kusunaki M, Shingi Y, Shinoki K, Jizumi T, Akamatsu T, Nishigaki H, Wada K, Miyake K, Gudis K, Tsukui T, Sakamoto C. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) released from *Helicobacter pylori* stimulated gastric epithelial cells induces cyclooxygenase 2 expression and activation in T-cells. *Gut* 2003;52(9):1257-64.
35. Schmausser B, Eck M, Greiner A, Luhrs H, Vollmers HP, Müller-Hermelink HK. Disparity between mucosal and serum IgA and IgG in *Helicobacter pylori* infection. *Virchows Arch* 2002;441(2):143-7.
36. Ma ZQ, Tanizawa T, Nihei Z, Sugihara K, Nakamura K. Follicular gastritis associated with *Helicobacter pylori*. *J Med Dent Sci* 2000;47(1):39-47.
37. Genta RM, Hamner HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum Pathol* 1993;24:577-583.
38. Chen XY, Liu WZ, Shi Y, Zhang DZ, Xiao SD, Tytgat GN. *Helicobacter pylori* associated gastric diseases and lymphoid tissue hyperplasia in gastric antral mucosa. *J Clin Pathol* 2002;55(2):133-7.
39. Genta RM. The gastritis prevention and early detection of gastric neoplasms. *J Clin Gastroenterol* 2003;36(suppl 5):S44-S49;discussion S61-S62.
40. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, De Boni M, Isaacson PG. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993;342:575-77.
41. Wündisch T, Neubauer A, Stolte M, Ritter M, Thiede C. B-cell monoclonality is associated with lymphoid follicles in gastritis. *Am J Surg Pathol* 2003;27(7):882-87.

42. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology* 2000;36:69-87.
43. Dierlamm J, Pittaluga S, Wlodarska I, Stul M, Thomas J, Boogaerts M, Michaux L, Driessen A, Mecucci C, Cassiman JJ, DeWolf-Peeters C, Van den Berghe H. Marginal zone B-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood* 1996;1:299-307.
44. Morse HC, Kearney JF, Isaacson PG, Carroll M, Fredrickson TN, Jaffe ES. Cells of the marginal zone – origins, function and neoplasia. *Leukemia Research* 2001;25:169-178.
45. Yamashita H, Watanabe H, Ajioka Y, Nishikura K, Maruta K, Fujino MA. When can complete regression of low-grade gastric lymphoma of mucosa – lymphoid tissue be predicted after *Helicobacter pylori* eradication? *Histopathology* 2000;37:131-140.
46. Greiner A. Pathogenesis of MALT – type lymphoma. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2002;86:145-52.
47. Gospodarowicz M, Tsang R. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Current Oncology Reports* 2000;2:192-198.
48. Fischbach W, Dragosics B, Kolve – Goebeler ME, Ohmann C, Greiner A, Yang Q, Böhme S, Verreet P, Horstmann O, Busch M, Dühmke E, Müller-Hermelink HK, Wilms K. Primary gastric B-cell lymphoma: Results of a prospective multicenter study. *Gastroenterology* 2000;119:1191-202.
49. Radaszkiewicz T, Dragosics B, Bauer P. Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa – associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. *Gastroenterology* 1992; 102:1628-38.
50. Thieblemont C, Berger F, Dumontet C, Moullet I, Bouafia F, Felman P, Salles G, Coiffier B. Mucosa – associated lymphoid tissue lymphoma is a disseminated disease in one third of 158 patients analyzed. *Blood* 2000;95(3):802-6.
51. Isaacson PG. Lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract. U: Ming Si-Chun, Goldman H. *Pathology of the gastrointestinal tract*. Baltimore, Maryland USA: William Wilkins 1998, 339-59.

52. Ferry JA, Yang WI, Zukerberg LR, Wotherspoon AC, Arnold A. CD5+ extranodal marginal zone B-cell (MALT) lymphoma. A low grade neoplasm with a propensity for bone marrow involvement and relaps. *Am J Clin Pathol* 1996;105:31-7.
53. Zukerberg LR, Ferry JA, Southern JF, Harris NL. Lymphoid infiltrates of the stomach. Evaluation of histologic criteria for the diagnosis of low – grade gastric lymphoma on endoscopic biopsy specimens. *Am J Surg Pathol* 1990;14(12):1087-99.
54. Isaacson PG, Wotherspoon AC, Diss T, Pan LX. Follicular colonisation in B – cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Surg Pathol* 1991;112:1466-74.
55. Arends JE, Bot FJ, Gisbertz IAM, Schouten HC. Expression of CD10, CD75 and CD43 in MALT lymphoma and their usefulness in discriminating MALT lymphoma from follicular lymphoma and chronic gastritis. *Histopathology* 1999;35:209-215.
56. His ED, Eisbruch A, Greenson JK, Singleton TP, Ross CW, Schnitzer B. Classification of primary gastric lymphomas according to histologic features. *Am J Surg Pathol* 1998;22(1):17-27.
57. De Jong D, Boot H, Van Heerde P, Hart GAM, Taal BG. Histological grading in gastric lymphoma: pretreatment criteria and clinical relevance. *Gastroenterology* 1997;112:1466-74.
58. Peng H, Du M, Diss TC, Isaacson PG, Pan L. Genetic evidence for a clonal link between low and high – grade components in gastric MALT B – cell lymphoma. *Histopathology* 1997;30:425-29.
59. Starostik P, Patzner J, Greiner A, Schwarz S, Kalla J, Ott G, Müller-Hermelink HK. Gastric marginal zone B – cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood* 2002;1(1):3-9.
60. De Wolf – Peeters C, Achten R. The histogenesis of large – cell gastric lymphoma. *Histopathology* 1999;34(1):71-5.

61. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Isaacson PG, Knowles DM, Mason DY, Müller – Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E, Warnke RA. A Revised European – American classification of lymphoid neoplasms. A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84(5):1361-92.
62. Van Krieken JHJM, Raffeld M, Raghoebier S, Jaffe ES, Van Ommen GJB, Kluin PM. Molecular genetics of gastrointestinal non-Hodgkin's lymphomas: unusual prevalence and pattern of c – myc rearrangements in aggressive lymphomas. *Blood* 1990; 76:797-800.
63. Du M, Peng H, Singh N, Isaacson PG, Pan L. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 1995;86:4587-93.
64. Neumeister P, Hoefler G, Beham-Schmid C. Deletion analysis of the p16 tumor suppressor gene in gastrointestinal mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Gastroenterology* 1997;112:1871-75.
65. Liu H, Ye H, Dagan A, Ronaldi R, Hamoudi RA, Bearzi I, Isaacson PG, Du MQ. t(11;18) (p21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. *Blood* 2001;98:1182-87.
66. Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, Stefanova M, Hinz K, Van den Berghe H, Hagemeijer A, Hossfeld DK. Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2000;18:1-13.
67. Bouchier-Hayes L, Martin SJ. CARD games in apoptosis and immunity. *EMBO reports* 2002;3(7)616-21.
68. Bertin J, Wang L, Guo Y, Jacobson MD, Poyet JL, Srinivasula SM, Merriam S, DiStefano PS, Alnemri ES. CARD11 and CARD14 are novel Caspase Recruitment Domain (CARD) Membrane-associated Guanylate Kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NF-κB. *J Biol Chem* 2001;276(15):11877-82.
69. Cavalli F, Isaacson PG, Gascoyne RD, Zucca E. MALT lymphomas. *Hematology, American Society of Hematology, Education Program Book*. 2001(1):241

70. Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N, McAllister – Lucas L, Abazeed ME, Chen FF, Yamaoka S, Seto M, Nunez G. BCL10 and MALT lymphoma, cooperate in a novel NF- κ B signaling pathway. *J Biol Chem* 2001;276(22):19012-19.
71. Ohshima K, Muta H, Kawasaki C, Muta K, Deyer V, Kanda M, Kumano Y, Podack ER, Kikuchi M. BCL10 expression, rearrangement and mutation in MALT lymphoma: Correlation with expression of nuclear factor- κ B. *Inter J Oncology* 2001;19:283-289.
72. Willis TG, Jadayel DM, Du MQ, Peng H, Perry AR, Abdul – Rauf M, Price H, Karran L, Majekodunmi O, Wlodarska I, Pan L, Crook T, Hamoudi R, Isaacson PG, Dyer MJS. BCL10 is involved in t(1;14) (p22;32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 1999;96:35-45.
73. Ye H, Dogan A, Karran L, Willis TG, Chen L, Wlodarska I, Dyer MSJ, Isaacson PG, Du MQ. BCL10 expression in normal and neoplastic lymphoid tissue. Nuclear localization in MALT lymphoma. *Am J Pathol* 2000;157:1147-54.
74. Maes B, Demunter A, Peeters B, De Wolf-Peeters C. BCL10 mutation does not represent an important pathogenic mechanism in gastric MALT-type lymphoma, and the presence of the API2-MLT fusion is associated with aberrant nuclear BCL10 expression. *Blood* 2002;99:1398-404.
75. Uren GA, O'Rourke K, Aravind L. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol cell* 2000;6:961-67.
76. Thome M, Tschopp J. TCR-induced NF- κ B activation: a crucial role for Carma1, BCL10 and MALT1. *Trends in immunology* 2003;24(8):419-24.
77. Du MQ, Isaacson PG. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *Lancet Oncol* 2002;3(2):97-104.
78. Tsuchiyama J, Yashino T, Imajo K, Kondou E, Hamada E, Tomiyada Y, Toba K, Furukawa T, Fuse I, Aizawa Y, Harada M, Tsubota T. Lymphomatous polyp of mantle cell type in the duodenum complicated by gastric cancer: a case of trisomy 3 and t(11;14) (q13;q32). *Ann Hematol* 2002;81(4):224-27.

79. Skacel M, Paris PL, Pettay JD, Tsiftsakis EK, Tubbs RR, Casey G, His ED. Diffuse large B-cell lymphoma of the stomach: assessment of microsatellite instability, allelic imbalance, and trisomy of chromosomes 3,12, and 18. *Diagn Mol Pathol* 2002;11(2):75-82.
80. Du MQ. Molecular biology of gastric MALT lymphoma: application in clinical management. *Hematology* 2002;7(6):339-44.
81. Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu HF, Klein U, Basso K, Guglielmino R, Cattoretti G, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: The role of Bcl-6. *Leukemia Lymphoma* 2003;44(suppl 3):S5-S12.
82. Offit K, Lococo F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A, Ladanyi M, Jhanwar S, Dallafavera R, Chaganti RSK. Rearrangement of the Bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *New Eng J Med* 1994;331(2):74-80.
83. Ye BH, Rao PH, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome translocation affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res* 1993;53:2732-5.
84. Wotherspoon AC, Finn TM, Isaacson PG. Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* 1995;85(8):2000-4.
85. Ott G, Kalla J, Steinhoff A, Rosenwald A, Katzenberger T, Roblick U, Ott MM, Müller-Hermelink HK. Trisomy 3 is not a common feature in malignant lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Pathol* 1998;153:689-694
86. Brynes RK, Almagner PD, Leathery KE, McCourty A, Arber DA, Medeiros J, Nathwani BN. Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3,7 and 12 in marginal zone B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 1996;9(10):995-1000.
87. Hoeve MA, Gisbertz IAM, Schouten HC, Schuurin E, Bot FJ, Hermans J, Hopman A, Kluin P, Arends JW, Van Krieken JHJM. Gastric low-grade lymphoma, high-grade MALT lymphoma and diffuse large B cell lymphoma show different frequencies of trisomy. *Leukemia* 1999;13(5):799-807.
88. Peng H, Du M, Diss TC, Isaacson PG, Pan L. Genetic evidence for a clonal link between low and high-grade components in gastric MALT B-cell lymphoma: *Histopathology* 1997;30:425-429.

89. Gray SF, Wyatt JI, Rathbone BJ. Simplified techniques for identifying *Campylobacter pyloridis*. *J Clin Pathol* 1986;39:1279-80.
90. Ivanković D. Statističke analize za medicinare. Biblioteka udžbenici i priručnici, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svezak 24, Zagreb 1988.
91. D'Elis MM, Andersen LP, Del Prete G. Inflammation and host response. *Curr Opin Gastroenterol* 1998;14(suppl 1):S15-S19.
92. Correa P, Ruiz B, Hunter F. Clinical trials as etiologic research tools in *Helicobacter*-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1991;26(suppl 181):15-19.
93. Dominis M, Džebro S, Gašparov S, Buljevac M, Čolić Cvrlje V, Banić M, Katičić M. Morfološka slika gastritisa i infekcije *Helicobacterom pylori*. *Liječ Vjesn* 2002;124(suppl 1):36-42.
94. Wotherspoon AC, Ortiz Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991;338:1175-76.
95. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994;330:1267-71.
96. Nomura K, Yoshino T, Nakamura S, Akano Y, Tagawa H, Nishida K, Seto M, Ueda R, Yamagishi H, Taniwaki M. Detection of t(11;18) (q21;q21) in marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphocytic tissue type on paraffin-embedded tissue section by using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003;140:49-54.
97. Blanco R, Lyda M, Davis B, Kraus M, Fenoglio-Preiser C. Trisomy 3 in gastric lymphomas of extranodal marginal zone B-cell (mucosa-associated lymphoid tissue). Origin demonstrated by FISH in intact paraffin tissue sections. *Hum Pathol* 1999;30:706-11.
98. Eidt S, Stolte M. Prevalence of lymphoid follicles and aggregates in *Helicobacter pylori* gastritis in antral and body mucosa. *J Clin Pathol* 1993;46:832-5.
99. Du MQ, Peng H, Liu H, Hamoudi RA, Diss ZC, Willis TG, Ye H, Dogan A, Wotherspoon AC, Dyer MJS, Isaacson PG. BCL10 gene mutation in lymphoma. *Blood* 2000;95:3885-90.

100. Luminari S, Intini D, Baldini L, Berti E, Bertoni F, Zucca E, Cro L, Maiolo AT, Cavalli F, Neri A. BCL10 gene mutations rarely occur in lymphoid malignancies. *Leukemia* 2000;9:5-8.
101. Wotherspoon AC, Dogan A, Du MQ. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Curr Opin Hematol* 2002;9:50-5.
102. Bertoni F, Cavalli F, Cotter FE, Zucca E. Genetic alterations underlying the pathogenesis of MALT lymphoma. *The Hematology Journal* 2002;3:10-13.
103. Lee SH, Shin MS, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee HK, Park JY, Oh RR, Jang JJ. Point mutations and deletions of the BCL10 gene in solid tumors and malignant lymphomas. *Cancer Res* 1999;59:5674-77.
104. Dierlamm J, Beans M, Stefanova-Ouzounova M, Hinz K, Wlodarska I, Maes B, Steyls A, Driessen A, Verhoef G, Gaulard P, Hagemeijer A, Hossfeld DH, De Wolf-Peeters C, Marynen P. Detection of t(11;18) (q21;q21) by interphase fluorescence in situ hybridization using API2 and MLT specific probes. *Blood* 2000;96:2215-18.
105. Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmestreaux A, De Jong D, Pileri S, Thiede C, Lavergne A, Boot H, Caletti G, Wündisch T. T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to H. pylori eradication. *Gastroenterology* 2002;122:1286-94.
106. Zhang Y, Cheung ANY, Chan ACL, Shen DH, Xu WS, Chung LP, Ho FCS. Detection of trisomy 3 in primary gastric B-cell lymphoma by using chromosome in situ hybridization on paraffin sections. *Am J Clin Pathol* 1998;110:347-53.
107. Hendrix TR, Yardley JA. Campylobacter gastritis and associated disorders. *Southern Med J* 1988;81:859-62.
108. Dill JE. Visual endoscopic indicator of Helicobacter pylori infection. *Am J Gastroenterol* 1992;8:1062-3.
109. Labenz J, Gyenes E, Rühl GH, Wiczorek M, Börsh G. Ist die Helicobacter pylori gastritis eine makroskopische diagnose? *D Med Wschr* 1993;118:176-80.

110. Calabrese C, Di Febo G, Brandi G, Morselli-Labate AM, Areni A, Scialpi C, Biasco G, Miglioli M. Correlation between endoscopic features of gastric antrum, histology and *Helicobacter pylori* infection in adults. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:1359-65.
111. Gašparov S. Značenje limfatičnih folikula i limfoepitelne promjene kod gastritisa povezanog s *Helicobacter pylori*. Magistarski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2000.
112. Nakamura S, Yao T, Aoyagi K, Iida M, Fujishima M, Tsuneyoshi M. *Helicobacter pylori* and primary gastric lymphoma. *Cancer* 1997;79:3-11.
113. Dogan A, Du M, Koulis A. Expression of lymphocyte homing receptors and vascular addressins in low-grade gastric B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Pathol* 1997;151:1361-69.
114. Briskin MJ, Winsor Hines D, Shyjan AM. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissues. *Am J Pathol* 1997;151:97-110.

10.0 ŽIVOTOPIS

Rođen sam 20.svibnja 1962. u Virovitici gdje sam završio srednju školu. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao sam 1989. Obvezni liječnički staž obavio sam u MC Virovitica. Državni ispit sam položio 1990. Radio sam u MC Virovitica do 1993.g kada sam započeo specijalizaciju iz patološke anatomije specijalistički ispit iz Patološke anatomije položio sam 1997. pod mentorstvom prof dr.sc Mare Dominis, za potrebe KB Merkur gdje sam i danas zaposlen u Odjelu za patologiju i citologiju.

Od 1996.god sam suradnik istraživač na znanstvenom projektu Ministarstva znanosti i tehnologije Republike Hrvatske i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod nazivom "Helicobacter pylori, epidemiologija infekcije u Hrvatskoj, optimalna dijagnostika i terapija, posebno sa stajališta suzbijanja recidiva ulkusne bolesti i moguće prevencije karcinoma želuca" (br.108104) te na njegovom nastavku, novom projektu "Evolucija bolesti povezanih s Helicobacter pylori infekcijom" (broj 0108126) a voditeljica projekta je prof. dr. sc. Miroslava Katičić.

Poslijediplomski studij iz Patologije završio sam 1998. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu a magistarski rad pod nazivom "Značenje limfatičnih folikula i limfoepitelne promjene kod gastritisa povezanog s Helicobacter pylori" obranio sam 2000. god.