

KLINIČKE KARAKTERISTIKE U BOLESNIKA S DIFUZNIM B VELIKOSTANIČNIM LIMFOMOM I DVOSTRUKOM TRANSLOKACIJOM *BCL2/c-MYC*

ŽELJKA ŠKUNCA, MARA DOMINIS¹, ANA PLANINC-PERAICA² i BRANIMIR JAKŠIĆ²

*Opća bolnica "Zadar", Odjel za hematologiju, Zadar,¹Klinička bolnica Merkur,
¹Zavod za kliničku patologiju i ²Klinika za unutarnje bolesti, Zagreb, Hrvatska*

Difuzni B velikostanični limfom (DLBCL) je klasificiran kao limfom različitog entiteta i pomoću genske ekspresije proteina klasificiran je u tri podskupine. Cilj ovog rada je da pojasni kliničke, biološke, imunofenotipske i citogenetske značajke DLBCL s translokacijom t(14;18) i 8q24/c-MYC. Jedanaest bolesnika s DLBCL s dvostrukom translokacijom praćeno je u razdoblju od 2000. do 2009. god. Obilježja tih bolesnika uključuju morfološke, imunohistokemijske i citogenetske analize. Svi bolesnici imaju agresivna obilježja, prisutnost B simptoma (64 %), opće stanje bolesnika prema ECOG ljestvici ≥ 2 (55 %), povišenu aktivnost serumske laktat dehidrogenaze (73 %), klinički stadij III i IV (82 %), ekstrapodalnu zahvaćenost bolesti (73 %), IPI ≥ 2 (73 %). Parcijalna remisija je postignuta kod 73 %, svi su bolesnici (73 %) umrli u kratkom roku. Bolesnici su liječeni CHOP i sličnim protokolima (COP, CVP, CNOP) uz dodatak Mabthere. Učinjena je imunofenotipizacija te određena ekspresija biljega CD20, CD3, CD10, Bcl6 i MUM1. u svih je učinjena citogenetska analiza (fluorescentna hibridizacija in situ - FISH) i nađene su kompleksne kariotipske promjene. Tako smo analizirali prisutnost gena *BCL2*, *BCL6* i *c-MYC*, osam bolesnika je imalo translokacije gena *BCL2* i *c-MYC*, dok je troje imalo translokaciju gena *BCL6* i *c-MYC*. Usprkos provedenoj adekvatnoj terapiji, prognoza bolesnika je loša. Medijan preživljenja tih bolesnika je 1,85 godina. Zaključujemo da je DLBCL s *BCL2* i *c-MYC* preuređenjem podskupina limfoma s vrlo lošim preživljenjem. Prisutnost tih dviju translokacija ima agresivan klinički tijek.

Ključne riječi: difuzni B velikostanični limfom, *BCL2*, *c-MYC*,

Adresa za dopisivanje: Željka Škunca, dr. med.
Odjel za hematologiju
Opća bolnica Zadar
Bože Peričića 5
20000 Zadar, Hrvatska

UVOD

Difuzni B velikostanični limfom (DLBCL) klasificiran je kao limfom različitog entiteta u klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO). Oko 30 % do 40 % svih limfoma u odraslih osoba su difuzni B velikostanični limfomi i čine najčešću podskupinu svih ne-Hodgkinovih limfoma. DLBCL obuhvaća različitu skupinu limfoidnih neoplazmi, koji imaju heterogena klinička, histološka, imunofenotipska, citogenetska i molekularna obilježja (1). Međunarodni prognostički indeks (IPI) je klinički i biološki model koji dijeli bolesnike u četiri prognostičke skupine s različitim medijanom preživljenja. Prema tom prognostičkom modelu bolesnici se na temelju broja negativnih prognostičkih čimbenika prisutnih u vrijeme postavljanja dijagnoze svrstavaju u četiri skupine koje se razlikuju prema preživljenju. Definirano je pet kliničkih čimbenika: dob,

stadij bolesti, povišena aktivnost serumske laktat dehidrogenaze, više od jednog zahvaćenog ekstrapodalnog mjesta i opće stanje bolesnika ocijenjeno prema *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) (2,14). Takva podjela otkriva rizične skupine bolesnika s različitim razdobljem preživljenja. Ipak, jasno je da su razlike u kliničkim karakteristikama i odgovoru na terapiju ovisne o genetskim i molekularnim obilježjima koji određuju agresivnost bolesti (4). DLBCL je klasificiran u tri podskupine prema Hans i sur. (2004.): limfomi stanica germinativnog centra B stanični (GCB – prema engl. "germinal center B cell like" - GCB), limfomi aktiviranih zrelih B limfocita (ABC, prema engl. "activated B cell like") i primarni medijastinalni B stanični limfom (PMBCL, prema engl. "primary mediastinal") (8). Podskupina GCB je karakterizirana čestim REL amplifikacijama, *BCL2* translokacijama i somatskim hipermutacijama imunoglobulinskih gena. Pod-

skupine ABC i PMBCL imaju konstitutivnu aktivaciju nuklearnog faktora -kappaB, (NK-κB), koji je potreban za opstanak limfoma, dok to nije bitno za podskupinu GCB DLBCL (5). Limfomi su genetski karakterizirani različitim kromosomalnim translokacijama.

Limfomi s dvostrukom translokacijom gena *c-MYC* i *BCL2* (*DH-BCL2/c-MYC*) ili *BCL6* (*DH-BCL6/c-MYC*) su rijetki limfomi s vrlo agresivnim kliničkim tijekom, kompleksnim kariotipom, često rezistentni na terapiju (3). Uključeni su u kategoriju limfoma zrelih B limfocita i u klasifikaciji WHO, označeni su kao difuzni B-velikostanični limfomi (DLBCL tzv. sive zone) i kao Burkittov limfom (BL). U zadnjem 4. izdanju klasifikacije WHO malignih hematoloških bolesti, DLBCL i BL su redefinirani. Neki su prijašnji entiteti izbačeni (npr. *Burkitt-like* limfoma), a neki novi su uvršteni (npr. oni sa specifičnim genetskim abnormalnostima – DLBCL ALK pozitivni i oni povezani s virusnim upalama (EBV/DLBCL, HHV8 pozitivni DLBCL). No, pridodana su i dva provizorna entiteta, tj. limfomi tzv. “sive zone” – DLBCL/Burkittov limfom i DLBCL/Hodgkinov limfom – entiteti s preklapajućim morfološkim, imunofenotipskim i kliničkim karakteristikama. “*Double hit*” limfomi se danas klasificiraju unutar DLBCL/Burkittova limfoma. Najveći broj tih tumora slične su ili iste morfolologije, kod svih se mogu dokazati aberacije gena *c-MYC* i *BCL2* ili *BCL6* gena, a vrlo često je prisutan kompleksni kariotip(1).

“*Double hit*” translokacija t(14;18)(q32;q21) i t(8;14)(q24;q32) *c-MYC* gena je najčešća dvostruka translokacija. Translokacija t(14;18)(q32;q21) se nalazi u 85 % do 90 % folikularnih limfoma i u 10 % do 40 % DLBCL (14). To je regulatorna regija protoonkogena *BCL2*, a to dalje vodi ekspresiji Bcl2 proteina. Bcl2 je antiapoptotički protein i njegova ekspresija blokira mitohondrijske puteve koji vode apoptozi. *C-MYC* gen je lociran na 8q24 i povezan je s translokacijom t(8;14)(q24;q32).

To je bila prva ponavljajuća kromosomska abnormalnost ikada objavljena kod limfoproliferativnih bolesti. Postavljanje *c-MYC* gena na mjesto pored imunoglobulina H (IGH) rezultira ekspresijom *c-Myc* proteina, koji je ključni transkripcijski faktor koji potiče stanični ciklus i tumorsku proliferaciju (4). *C-MYC* gen je izražen kod svih normalnih tkiva i u tkivima s visokom proliferacijskim indeksom prisutna je visoka ekspresija (14,15).

U ovom radu opisujemo klinička i biološka obilježja kod 11 bolesnika s DLBCL i translokacijom t(14;18)(q32;q21) i t(8;14)(q24;q32). *C-MYC* translokacije i amplifikacije utječu na agresivni tijek bolesti i ekspresija *c-Myc* proteina znači za bolesnika nepovoljnu prognozu.

BOLESNICI I METODE

U razdoblju od 01. 01. 2000. do 31. 12. 2009. god., u 11 od 99 bolesnika kojima je dijagnosticiran DLBCL, otkrivena je dvostruka translokacija *BCL2* t(14;18)(q32;q21) i t(8;14)(q24;q32) *c-MYC* gena s histomorfološkim karakteristikama DLBCL, a praćeni su do 31. 04. 2011.

Bolest je klasificirana prema klasifikaciji WHO. Isključeni su bolesnici s indolentnim limfomom, bolesnici koji imaju AIDS/HIV infekcije, primarni kutani DLBCL, primarni DLBCL središnjeg živčanog sustava i DLBCL pozitivan na Epstein-Barrov virus.

U trenutku postavljanja dijagnoze učinjene su kliničke i morfološke analize, laboratorijske (hematološke i biokemijske) analize, biopsija kosti, ultrazvučni pregled abdomena, kompjutorska tomografija vrata, toraksa i abdomena. Klinički stadij je određen prema Klasifikaciji Ann Arbor. IPI je ocijenjen na negativnim prognostičkim čimbenicima. Svi bolesnici su liječeni kemoterapijom po shemi CHOP (ciklofosamid, vinkristin, daunorubicin, prednison) s primjenom rituksimaba ili bez primjene. Bolesnici su liječeni i protokolima sličnim CHOP-u poput CNOP (ciklofosamid, mitoksantron, vinkristin, prednison). Uobičajena je podjela procjene odgovora na terapiju u tri osnovne kategorije:

Kompletna remisija:

- a) klonalna (eradikiran je neoplastični klon)
- b) imunofenotipska
- c) imunološka
- d) klinička (nestanak tumorske mase te simptoma uzrokovanih bolešću, kao i normalizacija početno poremećenih testova u zadnjih mjesec dana).

Tablica 1.

Bodovanje bolesnika prema Međunarodnom prognostičkom indeksu (IPI).

Parametar	Vrijednost	Broj bodova
Dob bolesnika	≤60 g	0
	>60 g	1
Ekstranodalna lokalizacija (broj mjesta zahvaćenih bolešću izvan limfnih čvorova)	0,1	0
	> 1	1
Stadij bolesti (Ann Arbor)	I, II	0
	III, IV	1
Opće stanje bolesnika prema ECOG	0,1	0
	> 1	1
LDH	≤ 240 mmol /L	0
	> 240 mmol/L	1

Parcijalna remisija:

- smanjenje tumorske mase ili infiltracije organa za više od 50 %, s nestankom simptoma vezanih uz bolest.
- bez insuficijencije mijelopoeeze
- s insuficijencijom mijelopoeeze.

Progresija bolesti - povećanje tumorske mase za vrijeme terapije.

Najčešće se kompletna remisija (CR) definira potpunom eradikacijom tumorske mase uz oporavak mijelopoeeze. Moguće je i histološki potvrditi remisiju bolesti u koštanoj srži uz oporavak imunološke funkcije, npr. nestanak hipogamaglobulinemije (imunološka remisija) i normalizacija fenotipa (imunofenotipska remisija). Općenito je pravilo da je postizanje remisije preduvjet za duže preživljenje.

Mjesta zahvaćenosti

Bolesnici se obično javljaju s naglo nastalom tumorskom masom na jednom ili na više mjesta s nodalnom i ektranodalnom zahvaćenošću. Jedna trećina do jedna četvrtina otpada na primarno ektranodalnu lokalizaciju bolesti (17), dok neki autori navode da je ektranodalna lokalizacija prisutna u 40 % bolesnika (1). Prisutnost ektranodalne lokalizacije je u stalnom porastu više nego nodalna (17).

Svaka ektranodalna lokalizacija može biti primarno mjesto bolesti. Najčešće ektranodalno mjesto je gastrointestinalni sustav (želudac ili ileocekalna regija) (18,19), ali se može pojaviti u koži, CNS-u (20), kostima, na testisu (21), žlijezdama slinovnicama, genitalnom sustavu, plućima, bubrezima, jetri, tonzili i slezeni. Zahvaćenost kosti kao primarnog mjesta bolesti pojavljuje se u oko 11 % do 27 % slučajeva. Primarna prisutnost u kosti sa zahvaćenošću periferne krvi ili bez zahvaćenosti je rijetka (22). Većina autora smatra da je velika tumorska masa veća od 7 cm mjerenjem najdužeg dijametra, mada neki autori uzimaju 10 cm mjerilom za veliku tumorsku masu. U našem smo radu uzeli najduži dijametar od 5 cm kao mjeru za koju smo smatrali da je velika tumorska masa. To je važan prognostički čimbenik neovisan za preživljenje bolesnika s DLBCL. U kombinaciji s IPI ne dovodi do poboljšanja predviđanja preživljenja. Nije jasno je li to zbog nedostatka snage ili zbog mogućih međusobnih odnosa veličine tumorske mase, LDH i IPI. Veća prospektivna istraživanja bi mogla dati jasniju sliku o veličini tumorske mase i IPI (23).

U upotrebi je veliki broj terapijskih shema druge generacije, ali samo se jedno veliko randomizirano istra-

živanje bavilo usporedbom takvih terapijskih shema. Ta studija je pokazala da je primjena R-ICE i R-DHAP uglavnom dala slične rezultate. Uobičajena je praksa da se doda rituksimab u drugoj liniji liječenja. Brojna istraživanja govore da je u takvim slučajevima preporučena transplantacija, ako bolesnik ima odgovor na *salvage* terapiju. Odgovor se definira s kliničkim i CT kriterijima. Sa PET/CT, koji je danas dostupan, čini se da je transplantacija velika korist samo u onih bolesnika bez metabolički aktivne bolesti (24,25).

Morfološka analiza

Patohistološka analiza je postavljena na temelju histoloških i imunofenotipskih obilježja tumorskog tkiva prema Klasifikaciji WHO (2008.). Iz parafinskih kocki su uzeta dva reprezentativna cilindra tumorskog tkiva bioptičkom iglom (*Tissue microarray* 8010 Sakura Finetek). Rezovi debljine 2 µm obojeni su standardnim bojenjem; H&E, Giemsa, PAS i Gomori. Rezovi iste debljine obrađeni su imunohistokemijskim metodama i fluorescentnom metodom *in situ* (FISH).

Imunohistokemijske metode

Na svim je uzorcima određena ekspresija biljega CD20 (klon 1.26, razrijeđenje 1:200 – Dako Glostrup Danska), CD3 (poliklonalno MoAb razrijeđenje 1:400 – Dako), CD10 (klon 56C6 RTU- Dako), bcl6 (klon PG-bcl6p RTU – Dako) i MUM1 (klon MUM1p RTU – Dako). Postupci deparafiniranja kao i demaskiranja proteina rađeni su u PT-linku (Dako-*Cytomation*) na +97° C tijekom 20 minuta pri pH 9.0. Za vizualizaciju ekspresije biljega korišten je komercijalni kit EnVision™ Flex High pH uz kromogen 3,3' diaminobenidin (DAB) u automatiziranom sustavu Dako Autostainer.

Prema imunohistokemijskom algoritmu Hans i sur. bolesnici s DLBCL podijeljeni su u skupine, kako slijedi (Hans i sur. 2004.):

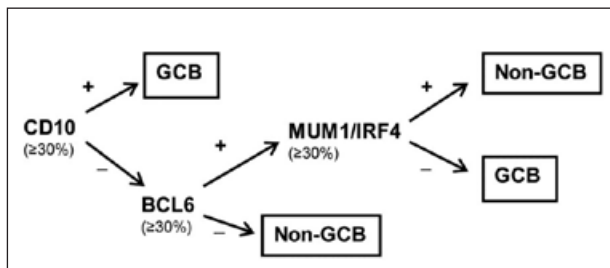
GCB skupina – tumori koji su CD10+ i bcl6+ ili CD10 -, bcl6+, MUM1 –

ABC skupina – tumori koji su CD10 -, bcl6 -, MUM1+ ili CD10 -, bcl6+, MUM1+

Tip3- tumori koji su CD10 -, bcl6 -, MUM1 –.

Fluorescentna hibridizacija *in situ*

Translokacija gena *c-MYC* analizirana je probom LSI *MYC Dual Color Break-apart Rearrangement Probe*



Sl. 1. Klasifikacija DLBCL prema Hans i sur. (2004.)

(Vysis Inc. Abbott Molecular, USA). Translokacija gena BCL2 analizirana je probom LSI BCL2 FISH DNA Split signal Probe (Dako, Danska). Pripremljeni rezovi s probama su, nakon deparafiniranja, dehidracije, rehidracije i denaturacije stavljeni, prema uputama proizvođača, u Hybridizer (Dako Cytomation, Danska). Nakon hibridizacije i ispiranja za kontrastiranje korištena je 10µL otopina Vectashield (Vector Lab. Inc. Burlingame, CA, USA) koja sadrži 10⁻⁵ g/L 4',6-diamino-2fenil-indola (DAPI). Preparati su analizirani fluorescentnim mikroskopom Olympus BX51. U svakom je uzorku analizirano 200 očuvanih tumorskih stanica. Pozitivnim rezultatom smatrane su karakteristične promjene u više od 7 % tumorskih stanica.

REZULTATI

Kliničke karakteristike bolesnika

Klinička obilježja i terapija u 11 prethodno neliječenih bolesnika prikazani su u tablici 2. Svi su bolesnici imali lošu prognozu. Medijan dobi bolesnika je 67 (44 do 86) godina. B simptomi su prisutni u 7 bolesnika. Većina bolesnika ima povišenu aktivnost serumske laktat dehidrogenaze 73 % (8/11), uznapredovali klinički stadij 82 % (9/11), ekstrapodalna zahvaćenost bolesti je prisutna kod 8, a infiltraciju koštane srži ima 8 bolesnika. IPI je visok ili visok intermedijaran u 73 % (8/11). Podjednaki broj bolesnika u podskupinama ABC i GCB ima koekspresiju MYC/BCL2.

Odgovor na terapiju je ocijenjen nakon provedenih 8 ciklusa kemoterapije po protokolu R-CHOP ili CHOP. Kod većine bolesnika (73 %) postignuta je parcijalna remisija, te su bolesnici dalje liječeni po salvage protokolu, koji uključuje agresivniji pristup liječenja. Zbog agresivnog kliničkog tijeka te nemogućnosti postizanja kompletne remisije bolesnici nisu liječeni transplantacijom koštane srži. U našem radu analizirano je 99 bolesnika, a od toga je samo 11 bolesnika imalo dvostruku translokaciju pa na tako malom uzorku nije moguće raditi krivulje preživljenja.

Tablica 2.

Rezultati FISH analize kod bolesnika s DHL DLBCL prema Hans i sur. (2004.)

		Double hit BCL2/MYC
Broj		11
Spol	muški ženski	4 7
Dob	medijan (raspon) ≤60/>60	67 (44-86) 1/10
LDH	normalna povišena	3 8
Opće stanje bolesnika prema ljestvici ECOG	0-1 2-4	6 5
Klinički stadij po Ann Arbor klasifikaciji	I-II III-IV	2 9
Ekstrapodalna zahvaćenost	da ne	8 3
IPI	0-1 ≥2	3 8
Infiltracija koštane srži	Da Ne	8 3
B simptomi	prisutni odsutni	7 4
Velika tm. masa	prisutna odsutna	8 3
Terapija	CHOP R-CHOP	4 7
Ishod	mrtav živ	8 3
Odgovor na terapiju	CR PR	3 8
PHD/Hans i sur.	GCB ABC	5 6

Legenda: LDH: laktat dehidrogenaza, IPI: Međunarodni prognostički indeks, CR: kompletna remisija, PR: parcijalna remisija, NR: bez odgovora na terapiju, CHOP kemoterapijska shema (ciklofosfamid, adriamicin, vinkristin, prednison), R-CHOP: rituksimab + (ciklofosfamid, adriamicin, vinkristin, prednison)

RASPRAVA

U ovom radu retrospektivno je analiziran poremećaj gena BCL2 i MYC na klinički utjecaj u bolesnika s DLBCL liječenih imunokemoterapijom i kemoterapijom.

Dvostruka translokacija kod DLBCL bila je prisutna u 11 % naših bolesnika, a zastupljena je s podjednakim brojem u podskupinama GCB i ABC. U naših su bolesnika prisutna obilježja agresivne kliničke slike, bolesnici su starije životne dobi, prisutni su B simptomi, povišena aktivnost LDH, ekstrapodalna zahvaćenost bolesti prisutna u 73 % bolesnika, bolesnici imaju infiltriranu koštanu srž, stadij III i IV prisutan u 82 % bolesnika, te IPI ≥2 rizična čimbenika u 73 % bolesnika. Velika tumorska masa bila je prisutna u 73 % bolesnika. Bolesnici su liječeni po shemi CHOP ili je primijenjena uz kemoterapiju i imunoterapija-rituksimab.

Preživljenje bolesnika koji su primali kemoterapiju po kemoterapijskoj shemi CHOP iznosilo je 1,4 godina, a bolesnici liječeni R-CHOP-om su imali preživljenje 2,3 god. U 73 % bolesnika postignuta je parcijalna remisija. Budući da se radi o malom uzorku bolesnika, podatke nije bilo moguće statistički analizirati.

Naši se rezultati podudaraju s rezultatima drugih autora. I drugi autori navode da se translokacija BCL2/MYC nalazi u 17 % do 38 % bolesnika na malom uzorku bolesnika s DLBCL (3,4,6,10,12,14-16). Bolesnici imaju agresivnu kliničku sliku bolesti i biološke karakteristike, uznapredovali stadij bolesti, povišenu aktivnost serumske laktat dehidrogenaze, visok IPI, te preživljenje koje je trajalo samo 9 mjeseci (3,4,16). Preživljenje bolesnika s DLBCL najbolje analizira algoritam Hans i sur. Slučajevi s GCB fenotipom i CD10 negativni i BCL6 pozitivni imaju značajno kraće preživljenje nego CD1 negativni i BCL6 negativni ili MUM1 negativni podskupine GCB (26). Profil genske ekspresije (GEP - od engl. *Gene expression profiling*) temelji se na imunohistokemiji koja se može obavljati rutinski i uz relativno mala financijska sredstva. Pretraga se radi na parafinom-obrađenom (FFPE) biopsičkom tkivu i materijal je fiksiran formalinom. GEP se temelji na tri bitna biljega, a to su: CD10, BCL6, MUM1/IRF4, koji su različito izraženi u GCB i ABC podtipovima DLBCL. Algoritam Hans i sur. (2004) se pokazao korisnim u nekim studijama (npr. u predviđanju odgovora DLBCL na određene vrste kemoterapije, dok drugi autori ne nalaze prednost tog algoritma (27)). Algoritmi temeljeni na imunohistokemijskoj analizi su razvijeni s ciljem kliničke primjene GEP, ali su pokazali ograničenu reproducibilnost i do sada nije dokazan način kako bi se tu analizu primijenilo u terapijske svrhe. Konzorcij Lunenburg nije pokazao poboljšanje IPI-a nakon uključivanja imunohistokemijskih biljega, iako neki molekularni biljezi, poput ekspresije *c-MYC*, koji se nalazi kod ograničenog broja bolesnika i povezan je sa značajno slabijom prognozom (28).

Neki autori navode da kada se preživljenje bolesnika s podtipom GCB uspoređi s onima s podtipom ABC, bolesnici s podtipom ABC imaju značajno lošije preživljenje (5). Lošija prognoza se u bolesnika s podskupinom ABC može pripisati stalno prisutnoj aktivnosti NF- κ B, nadgledanom brojnim ciljnim genima uključujući gen *c-MYC* i *BCL2*. Drugi autori nalaze da je koekspresija *c-MYC/BCL2* češće prisutna u podskupini ABC (6). Hu i sur. (2013) ne nalaze značajnu prognostičku razliku u preživljenju između podskupine GCB i ABC kada se izdvoje bolesnici s koekspresijom *c-MYC/BCL2* (6). Kada se analiziraju samo bolesnici s DLBCL s koekspresijom *c-MYC/BCL2* ta dva podtipa ne daju značajnu prognostičku razliku, iako postoji ogromna razlika u genima između podtipova ABC i

GCB. U bolesnika s koekspresijom *MYC/BCL2* razlika u prognozi između GCB i ABC je minimalna, kada se usporede s bolesnicima u kojih je *MYC/BCL2* dvostruko negativan (6). Autori zaključuju da je *MYC/BCL2* koekspresija kod DLBCL povezana s agresivnim kliničkim tijekom i češće se javlja u podskupini ABC te doprinosi lošijoj prognozi bolesnika s podskupinom ABC DLBCL. Podatci ukazuju da je *MYC/BCL2* koekspresija bolji prognostički pokazatelj nego klasifikacija koja se temelji na podrijetlu stanica (6).

Limfomi s dvostrukom translokacijom obuhvaćaju skupinu limfoma zrelih B limfocita s aberacijom gena *c-MYC* udruženog s aberacijama nekih drugih gena koje su česte kod nekih tipova limfoma (npr. *IgH/BCL2*). Do danas nije sasvim jasan mehanizam nastanka limfoma s dvostrukom translokacijom. Predloženo je nekoliko mogućih puteva nastanka tih entiteta (3,16). Najčešća kombinacija aberacije gena kod limfoma s dvostrukom translokacijom je aberacija gena *BCL2* i *c-MYC*. Dok je translokacija t(14;18)(q32;q21) primarni događaj kod folikularnog (FCC) limfoma, a poznata je činjenica da se FCC može transformirati u DLBCL. Uz tada agresivnu kliničku sliku i slab odgovor na terapiju može se pretpostaviti da je za drugi "hit" i posljedičnu kliničku sliku upravo odgovorna aberacija gena *c-MYC*. U literaturi su opisani slučajevi limfoma tipa FCC transformirani u limfome s dvostrukom translokacijom (4,7). No, uvijek treba imati na umu da se aberacija gena *BCL2* može naći u visokom postotku (25 % - 75 % - prema Klasifikaciji WHO) limfocita zdravih ljudi; dakle na već nestabilnom "terenu" drugi "hit", tj. aberacije gena "c-MYC" mogu dovesti do slike agresivnog limfoma. Treba isto tako spomenuti da "double hit" limfomi mogu imati i druge kombinacije aberacija gena. Nešto je rjeđa aberacija gena *CCND1* uz aberaciju gena *c-MYC*. U tim je slučajevima bitno najprije isključiti blastičnu transformaciju "mantle cell" limfoma (7). Mehanizam nastanka tog tipa limfoma je dakako isto nejasan, ali može se povući paralela s *IgH/BCL2* aberacijom. Naime, može se pretpostaviti da je aberacija *IgH/CCND1* ne-onkogeni faktor prisutan u manjem broju limfocita i to bi bio prvi korak na koji se mora nadovezati dodatna abnormalnost, tj. aberacija gena *c-MYC* i inducirati agresivno ponašanje stanica (slično kao kod multiplog mijeloma odnosno "mantle cell" limfoma). Aberacija gena *BCL6* i *cMYC* je relativno znatno rjeđa, a aberacija gena *BCL3* i *c-MYC* iznimno rijetka. Aberacije gena *BCL6* su najčešće udružene s aberacijama gena *BCL2* i *c-MYC* pa se onda govori o "triple hit" limfomima. Ova kombinacija aberacija može rezultirati stalnim antiapoptotičkim signalima s jedne, ali i indukcijom kontinuirane proliferacije tumorskih stanica s druge strane.

Standardna imunokemoterapija za DLBCL poput R-CHOP-a kod DHL ima vrlo slab terapijski odgovor (9,16). DHL je moguć kod svih DLBCL koji imaju visok proliferativni indeks, ili kada je moguće da je prisutan *c-MYC* i *BCL2* gen. Primjena rane agresivne kemoterapije koja uključuje i transplantaciju hematopoetskih matičnih stanica u prvoj remisiji mora se uzeti u razmatranje (10,13,16).

U sažetku, DLBCL s *MYC/BCL2* povezan je s koekspresijom s agresivnim kliničkim tijekom i češće je prisutan u podskupini ABC te pridonosi lošijoj prognozi bolesnika s ABC podtipom. Ovi podatci također pokazuju da je *MYC/Bcl2* koekspresija, umjesto klasifikacije o porijeklu stanica, bolji prediktor za prognozu u bolesnika s DLBCL tretiranih R-CHOP kemoterapijom.

ZAKLJUČAK

DLBCL s translokacijom t(14;18) i 8q24/c-MYC je prisutan kod podskupina GCB i ABC s vrlo lošim ishodom. Kod *BCL2* pozitivnih DLBCL bilo bi potrebno tražiti dodatne dvostruke translokacije zbog mogućeg neobično agresivnog kliničkog tijeka. Limfom s dvostrukom translokacijom je rijetki oblik limfoma zrelih B stanica karakteriziran ektranodalnom zahvaćenošću i progresijom u središnji živčani sustav.

LITERATURA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008, 233-37.
2. Shipp M, Harrington D. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: the International NHL Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-94.
3. Snuderl M, Kolman, OK, Chen YB, Hsu J, Ackerman AM, Cin P. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and Diffuse large B-cell lymphoma. *AJSP* 2010; 34: 327-40.
4. Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C, Moreau A, Garand R, Juge-Morineau N. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica* 2007; 92: 1335-42.
5. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005; 106: 3183 -90.
6. Hu S, Monette X, Tzankov A, Green T, Wu L. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 2013; 121: 4021-31.
7. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2010; 117: 2319-31.
8. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103: 275-82.
9. Barrans S, Crouch S, Smith A i sur. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of Rituximab. *J Clin Oncol* 2010; 20: 3360-64.
10. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Nerian S, Steidl C, Woods R. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin Vincristine and Prednisone. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3452-59.
11. Motlló C, Grau J, Juncà J, Ruiz N, Mate JL, Orna E. Translocation (3;8) (q27;q24) in two cases of triple hit lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 203: 328-32.
12. Tomita N, Tomita N, Tokunaka M i sur. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocation. *Haematologica* 2009; 94: 935-43.
13. Tomita N. BCL2 and MYC Dual-Hit Lymphoma/Leukemia. *J Clin Exp Hematol* 2011; 50: 7-12.
14. Valera A, Guillermo AL, Cardesa-Salzmann T i sur. MYC protein expression and genetic alterations are prognostic impact in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica/The Hematol J* 2013; Mai 28.
15. Pillai RK, Sathanoori M, Van Oss SB, Swerdlow SH. Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 323-32.
16. Perry A, Crockett D, Dave BJ i sur. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma: study of 39 cases. *Br J Hematol* 2013; 162:40-9.
17. Lopez-Guillermo A, Colomo L, Jimenez M i sur. Diffuse large B-cell lymphoma: Clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2797-04.
18. Yeh KH, Kuo SH, Chen LT, Mao TL, Doong SI, Wu MS. Nuclear expression of BCL10 or nuclear factor kappa B helps predict Helicobacter pylori-independent status of low grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas with or without t(11;18)(q21;q21). *Blood* 2005; 106: 1037-41.
19. Yang YL, Wang J, Zhao LZ, Gao ZF, Jing HM, Ke XY. Clinical characteristics cell origin and prognosis of primary gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma: a report of 40 cases]. *Ai Zheng* 2008; 27: 636-41.
20. Lin CH, Kuo KT, Chuang SS, Kuo SH, Chang JH, Chang KC. Comparison of the expression and prognostic significance of differentiation markers between diffuse large B-cell lymphoma of central nervous system origin and peripheral nodal origin. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1152-6.
21. Booman M, Douwes J, Glas AM, de Jong D, Schuurin E, Kluin PM. Primary testicular diffuse large B-cell lymphomas

have activated B-cell-like subtype characteristics. *J Pathol* 2006; 210: 163-71.

22. Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Ståhl E, Torlakovic E, Akerman M, Mitelman F. Prognostic implications of BCL6 rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma—a Nordic Lymphoma Group study. *Int J Oncol* 2006; 20: 161-5.

23. Panwalkar AW, Loberiza R, Vose JM, Bociek RG, Bierman PJ, Armitage JO. Addition of tumor bulk to the International Prognostic Index (IPI) does not improve prognostication in diffuse large B-cell Lymphoma (DLBCL). *J Clin Oncol* 2006; 24: 75-85.

24. Hoppe BS, Moskowitz CH, Zhang Z, Maragulia JC, Rice RD, Reine AS. The role of FDG-PET imaging and involved field radiotherapy in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 941-8.

25. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N. Salvage regimens with autologous transplants for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4184-90.

26. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, Taskinen M, Berglund M, Amini RM. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal centre phenotype in diffuse large B cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood* 2007; 109: 4930-35.

27. Moskowitz CH, Zelenetz AD, Kewalramani T, Hamlin P, Lessac-Chenen S, Houldsworth J. Cell of origin, germinal center versus nongerminal center, determined by immunohistochemistry on tissue microarray, does not correlate with outcome in patients with relapsed and refractory DLBCL. *Blood* 2005; 106: 3383-85.

28. Ghilmini M, Vitolo U, Kimby E i sur. ESMO Guidelines consensus conference on malignant lymphoma 2011 part 1: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Ann Oncol* 2013; 24: 561-76.

SUMMARY

CLINICAL FEATURES IN DLBCL AND TRANSLOCATION *BCL2/c-MYC* “DOUBLE HIT” LYMPHOMA

Ž. ŠKUNCA, M. DOMINIS¹, A. PLANINC-PERAICA² and B. JAKŠIĆ²

*Zadar General Hospital, Department of Hematology, Zadar, Merkur University Hospital,
¹Department of Clinical Pathology and ²Department of Hematology, Zagreb, Croatia*

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is classified as lymphoma and various entities using the gene expression of proteins are classified into three groups. The aim of this study was to clarify the clinical, biological, immunophenotypic and cytogenetic features of DLBCL with translocation t(14; 18) and 8q24/c-MYC. Eleven DLBCL patients with dual translocation were monitored during the 2000-2009 period. The characteristics of these patients included morphological, immunohistochemical and cytogenetic analysis. Study results showed that all patients had aggressive characteristics, presence of B symptoms (64%), general patient condition according to ECOG scale ≥ 2 (55%), elevated serum lactate dehydrogenase activity (73%), clinical stage III and IV (82%), extranodal involvement of the disease (73%), and IPI ≥ 2 (73%). Partial remission was achieved in 73% of all patients and all patients (73%) died within a short time. Patients were treated with CHOP and similar protocols (COP, CVP, CNOP), with the addition of MabThera. Immunophenotyping was performed and determined expression of the CD20, CD3, CD10, BCL6 and MUM1 markers. The cytogenetic analysis/fluorescence in situ hybridization revealed complex karyotype changes. Thus, we analyzed the presence of BCL2, BCL6 and c-MYC genes and found eight patients to have *BCL2* and *c-MYC* translocation genes, while three had translocation of the *BCL6* and *c-MYC* genes. Despite appropriate therapy, the patient prognosis is poor. The median survival in these patients was 1.85 years. DLBCL with *BCL2* and *c-MYC* rearrangement of the subgroups of lymphoma is associated with very poor survival. The presence of these two translocations has an aggressive clinical course.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma, BCL2, c-MYC