

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Snježana Dotlić

**Imunohistokemijski algoritmi
subklasifikacije difuznog B-
velikostaničnog limfoma**

DISERTACIJA



Zagreb, 2012.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Snježana Dotlić

**Imunohistokemijski algoritmi
subklasifikacije difuznog B-
velikostaničnog limfoma**

DISERTACIJA

Zagreb, 2012.

Disertacija je izrađena na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju KB Merkur i Zavodima za hematologiju Klinika za unutarnje bolesti KBC Zagreb i KB Merkur u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof.dr.sc. Slavko Gašparov

Istraživanje je provedeno u sklopu znanstvenih projekata „CD43 – prognostički biljeg za predviđanje ishoda oboljelih od limfoma“ i „Prognostička vrijednost FOXP1 i FOXP3 u limfoproliferativnim bolestima“ koje financira Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske.

Ovaj rad je posvećen prijatelju i učitelju prof.dr.sc. Marinu Noli.

Zahvaljujem mentoru, prof.dr.sc. Slavku Gašparovu na velikoj podršci od prvog dana i pomoći u svim fazama realizacije ovog rada. Doc.dr.sc. Petri Korać zahvaljujem na beskrajnom strpljenju, uloženom trudu i važnim savjetima. Hvala prof.dr.sc. Davoru Ivankoviću i dr.sc. Milivoju Škiljeviću na svim sugestijama i pomoći oko statističke analize podataka. Zahvaljujem prof.dr. Dennisu D. Weisenburgeru i prof.dr. Wing C. Chanu na odličnim idejama, stručnim savjetima i poklonjenom protutijelu. Dr. Sandri Bašić-Kindi zahvalna sam na nesebično poklonjenom vremenu i velikoj pomoći u prikupljanju kliničkih podataka. Hvala Suzani Hančić, bacc.med.lab.diagn, Tanji Gudelj, bacc.med.lab.diagn i Katarini Ražnjević, bacc.med.lab.diagn. bez kojih bi sve ostalo na smeđim mrljama u preparatima. Zahvalna sam dr.sc. Semiru Vraniću i dr. Anamariji Morović Perry na pomoći s teško dostupnom literaturom. Posebno hvala mojoj obitelji na podršci, ohrabrenju i financijskoj pomoći.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD.....	1
1.1. Difuzni velikostanični limfom B imunofenotipa.....	1
1.1.1. Epidemiologija i patogenez DLBCL.....	1
1.1.2. Definicija i klasifikacija DLBCL.....	2
1.1.3. Kliničke osobine bolesnika s DLBCL.....	4
1.1.4. Terapijski pristup DLBCL.....	4
1.2. Prognostički parametri kod DLBCL.....	5
1.2.1. Međunarodni prognostički indeks (IPI).....	5
1.2.2. Podjela na temelju razlika u ekspresiji gena.....	6
1.2.3. Imunohistokemijski algoritmi.....	7
1.2.4. Ekspresija proteina diferencijacijskih gena.....	9
1.2.5. CD43.....	10
1.2.6. CD5.....	11
1.2.7. Citogenetske aberacije.....	12
1.2.7.1. Translokacija c-MYC.....	12
1.2.7.2. Translokacija BCL2.....	13
1.2.7.3. Translokacija BCL6.....	14
2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	15
3. BOLESNICI I METODE.....	16
3.1. Bolesnici.....	16
3.2. Materijali i metode.....	18
3.2.1. Histološka analiza.....	18
3.2.2. Imunohistokemijske metode.....	19

3.2.3. Podjela prema imunohistokemijskim algoritmima.....	20
3.2.4. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH).....	23
3.3. Statistička analiza.....	24
4. REZULTATI.....	25
4.1. Rezultati histološke analize.....	25
4.2. Rezultati imunohistokemijske analize.....	25
4.3. Rezultati podjele prema imunohistokemijskim algoritmima.....	31
4.4. Rezultati analize fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH).....	32
4.5. Rezultati statističke analize.....	33
4.5.1. CD5.....	33
4.5.2. CD43.....	33
4.5.3. Translokacija c-MYC.....	35
4.5.4. Imunohistokemijski algoritmi.....	36
4.5.5. Ostali prognostički parametri.....	42
5. RASPRAVA.....	43
6. ZAKLJUČCI.....	50
7. SAŽETAK.....	51
8. SUMMARY.....	52
9. LITERATURA.....	53
10. ŽIVOTOPIS.....	67

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABC – tip DLBCL podrijetla aktiviranih B-limfocita (engl. activated B cell-like)

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije (engl. acquired immunodeficiency syndrome)

CHOP – akronim za terapiju ciklofosamidom, doksorubicinom, vinkristinom i prednizonom

CNS – središnji živčani sustav (engl. central nervous system)

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

EBV – Epstein Barrov virus

ECOG – Eastern Oncology Cooperative Group

EFS – preživljenje bez događaja (engl. event-free survival)

FISH – fluorescentna in situ hibridizacija

FOXP1 – forkhead protein P1

GCB – tip DLBCL podrijetla limfocita germinativnog centra (engl. germinal center-like)

GEP – gene expression profiling

H&E – hemalaun-eozinsko bojenje

HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. human immunodeficiency virus)

IPI – Međunarodni prognostički indeks (engl. International Prognostic Index)

LDH – laktat-dehidrogenaza

NHL – non-Hodgkinov limfom

NOS – bez osobitosti (engl. not otherwise specified)

OS – ukupno preživljenje (engl. overall survival)

p – vjerojatnost

PS – opće stanje (engl. performance status)

RTU – ready to use

R – rituksimab

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TMA – tissue microarray

1. UVOD

Non-Hodgkinovi limfomi (NHL) su zloćudne novotvorine limfatičkog sustava koje čine oko 3-4% svih zloćudnih bolesti i po učestalosti zauzimaju peto mjesto (1). Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) dijele se na limfome porijekla B-limfocita i T-limfocita/NK stanica, te prema zrelosti limfocita iz kojih nastaju (tumori nezrelih i zrelih limfatičnih stanica) (2).

Prema službenim podacima Registra za rak, stopa incidencije NHL-a u Republici Hrvatskoj u 2009. godini iznosila je 11/100 000 stanovnika, a iste godine dijagnosticirano je 490 novih bolesnika s NHL-om (3).

1.1. DIFUZNI VELIKOSTANIČNI LIMFOM B IMUNOFENOTIPA

1.1.1. Epidemiologija i patogeneza DLBCL

Difuzni velikostanični limfom B imunofenotipa (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) je najčešći tip NHL i čini oko 30% svih NHL. Javlja se u svim dobnim skupinama, s medijanom 64 godine. Zabilježena je nešto veća učestalost kod muškaraca nego kod žena (u omjeru 1.2:1) (4,5). DLBCL je najčešći tip NHL koji se pojavljuje u osoba s AIDS-om, s ekстранodalnom lokalizacijom u čak 60% slučajeva (4,6). Kod ovih bolesnika obično se javljaju specifični tipovi DLBCL kao što su plazmablastični limfom i primarni efuzijski limfom. DLBCL se također češće pojavljuje u bolesnika s prirođenim imunodeficijencijama (7-10). U imunokompromitiranih bolesnika DLBCL je često povezan s infekcijom Epstein-Barrovim virusom (EBV). Važnost imunološkog statusa u podlozi razvoja DLBCL očituje se i načinom definiranja specifičnih entiteta iz kategorije DLBCL u današnjoj klasifikaciji SZO, kao što su EBV-pozitivni DLBCL u starijoj dobi (engl. *EBV-positive DLBCL of the elderly*) i DLBCL povezan s kroničnom upalom (engl. *DLBCL associated with chronic inflammation*). (2)

1.1.2. Definicija i klasifikacija DLBCL

DLBCL je tumor građen od difuznih nakupina velikih neoplastičnih B-limfocita čija je jezgra jednaka ili veća od jezgre histiocita ili više nego dvostruko veća od zrelog limfocita (2). Osim primarnog oblika (ili *de novo*) DLBCL, postoji i rjeđi, sekundarni DLBCL koji nastaje transformacijom različitih indolentnih limfoma B-imunofenotipa kao što su folikularni limfom, limfom marginalne zone, limfom malih limfocita/kronična limfocitna leukemija, limfoplazmocitni limfom ili nodularna limfocitna predominacija Hodgkinovog limfoma.

Klasifikacija limfoma, kao i subklasifikacija DLBCL često se mijenjala zbog novih spoznaja o patogenezi, biološkim i kliničkim osobinama različitih vrsta limfoma, te zbog

različitih metoda i ciljeva zbog kojih su nastajale. Prema današnjoj klasifikaciji SZO (2008) postoji nekoliko morfoloških varijanti, precizno definiranih podtipova DLBCL i kliničko-patoloških entiteta koji pripadaju porodici DLBCL (tablica 1).

Specifični podtipovi DLBCL i ostali kliničko-patološki entiteti iz ove skupine čine manjinu svih DLBCL. Svi ostali DLBCL ubrajaju se u najveću skupinu DLBCL, bez osobitosti (engl. *not otherwise specified*, DLBCL-NOS).

Tablica 1. Varijante i podtipovi DLBCL, te podgrupe B-velikostaničnog limfoma

DLBCL, bez drugih osobitosti (NOS)
<ul style="list-style-type: none">• Uobičajene morfološke varijante Centroblastična Imunoblastična Anaplastična• Rijetke morfološke varijante• Molekularne podgrupe Nalik B-limfocitima germinativnog centra (GCB) Nalik aktiviranim B-limfocitima (ABC)• Imunohistokemijske podgrupe CD5-pozitivni DLBCL Nalik B-limfocitima germinativnog centra (GCB) Bez obilježja B-limfocita germinativnog centra (non-GCB)
PODTIPOVI DLBCL
<ul style="list-style-type: none">• Velikostanični B limfom bogat T-limfocitima i histiocitima• Primarni DLBCL CNS-a• Primarni kožni DLBCL, nožni tip• EBV-pozitivni DLBCL u starijoj dobi
OSTALE PODGRUPE B-VELIKOSTANIČNOG LIMFOMA
<ul style="list-style-type: none">• Primarni medijastinalni (timični) velikostanični B limfom• Intravaskularni velikostanični B limfom• DLBCL povezan s kroničnom upalom• Limfomatoidna granulomatoza• ALK-pozitivni velikostanični B limfom• Plazmablastični limfom• Velikostanični B limfom nastao u Castlemanovoj bolesti povezanoj s HHV8• Primarni efuzijski limfom
INTERMEDIJARNE KATEGORIJE
<ul style="list-style-type: none">• Neklasificirani B limfom s osobinama između DLBCL i Burkittovog limfoma• Neklasificirani B limfom s osobinama između DLBCL i klasičnog Hodgkinovog limfoma

Preuzeto po uzoru na literaturu (2), str. 234. Tablica 10.14.

1.1.3. Kliničke osobine bolesnika s DLBCL

Bolest se obično očituje povećanim limfnim čvorovima u jednoj ili više regija, odnosno brzo rastućom tvorbom ekстранodalne lokalizacije. Otprilike 40% DLBCL su primarni ekстранodalni limfomi, a najčešće je zahvaćen probavni sustav (želudac i ileocekalna regija) (11, 12). Primarno sjelo može biti bilo koji organ, a ostale uobičajene ekстранodalne

lokalizacije su testis, slezena i koža. Ekstranodalni DLBCL pojedinih organa kao što su koža i CNS predstavljaju posebne kliničko-patološke entitete unutar ove kategorije limfoma. Koštana srž je infiltrirana u 11-27% bolesnika (13, 14). Otprilike trećina bolesnika ima i opće simptome (tzv. B simptome) koji se odnose na vrućicu višu od 38.5°C, profuzno noćno znojenje, gubitak na težini (više od 10% u posljednjih 6 mjeseci) te svrbež. Prema kliničkom ponašanju DLBCL se ubraja u skupinu agresivnih limfoma.

Proširenost bolesti određuje klinički stadij koji se procjenjuje prema Cotswoldskoj reviziji Ann Arbor klasifikacije (2).

1.1.4. Terapijski pristup DLBCL

U liječenju ove bolesti današnji terapijski standard je kemoterapija bazirana na antraciklinu, po shemi CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin i prednizolon) u kombinaciji s imunoterapijom monoklinalnim protutijelom na CD 20 (rituximab) (15). Odgovor bolesnika na terapiju je različit, a dio bolesnika pokazuje loš odgovor na terapiju i bolest brzo napreduje. Do danas ne postoje biljezi kojima bi se pouzdano predvidio odgovor bolesnika na terapiju.

1.2. PROGNOŠTIČKI PARAMETRI KOD DLBCL-NOS

1.2.1. Međunarodni prognostički indeks (IPI)

DLBCL-NOS je heterogena kategorija limfoma koji se razlikuju po svojim morfološkim, imunofenotipskim i molekularnim osobinama. Istraživani su brojni prognostički parametri koji bi omogućili izdvajanje skupine bolesnika s lošijom prognozom, a među najvažnijima je Međunarodni prognostički indeks (engl. *International Prognostic Index*, IPI) prema kojemu su bolesnici svrstani u četiri prognostičke skupine (16). Čimbenici uključeni u IPI su: dob, razina serumske laktat-dehidrogenaze (LDH), opće stanje bolesnika (engl. *performance status*, PS), stadij bolesti i broj zahvaćenih ekstranodalnih organa (tablica 2). IPI se smatra zlatnim standardom s kojim se uspoređuju svi ostali prognostički čimbenici.

Tablica 2. Međunarodni prognostički indeks (IPI)

Parametar		
Dob	≥ 60 godina	1 bod
Klinički stadij	III ili IV	1 bod
LDH	>240 mmol/L	1 bod
PS (ECOG)	>1	1 bod
Broj zahvaćenih ekstranodalnih mjesta	≥ 2	1 bod

Tablica 3. Određivanje rizika prema broju bodova

Broj bodova (<i>IPI score</i>)			
0,1	2	3	4,5
Niski rizik	Niski/srednji rizik	Srednji/visoki rizik	Visoki rizik

Visoki *IPI score* povezan je s lošom prognozom. U periodu prije uvođenja rituximaba u standardnu terapiju za bolesnike s DLBCL 5-godišnje preživljenje bolesnika s viskom *IPI score*-om bilo je 22%, za razliku od bolesnika u kategoriji niskog rizika kod kojih je 5-godišnje preživljenje bilo 73% (17). Moderni terapijski protokoli koji uključuju rituximab značajno su poboljšali prognozu svih bolesnika, iako značajne razlike s obzirom na IPI i dalje postoje (4-godišnje preživljenje bolesnika s visokim *IPI score*-om je 59%, a za bolesnike s niskim rizikom 82%) (18).

1.2.2. Podjela na temelju razlika u ekspresiji gena

Razvojem tehnologije genskog čipa (engl. *gene microarray*) omogućena je analiza velikog broja gena na tumorskim stanicama (engl. *gene expression profiling*, GEP). Ovom metodom utvrđene su tri podgrupe unutar DLBCL: GCB (engl. *germinal center B-cell like*) podgrupa s ekspresijom gena kao kod B-limfocita germinativnog centra, ABC (engl. *activated B-cell like*) podgrupa s ekspresijom gena izraženih kao kod aktiviranih B-limfocita i treća, heterogena podgrupa u kojoj stanice pokazuju kombinaciju aktiviranih gena prethodno navedene dvije grupe (19-21). Dokazano je da bolesnici u GCB skupini imaju značajno bolju prognozu od onih u ABC i u trećoj skupini (među kojima nema značajne razlike u preživljenju). Prognostička vrijednost ovakve klasifikacije potvrđena je u studijama i nakon uvođenja imunoterapije rituximabom u rutinski terapijski protokol (22-25, 63). Uslijedile su i studije koje su otkrile 6 ključnih gena (*LMO2*, *BCL6*, *FNI*, *CCND2*, *SCYA3*, *BCL2*) s prognostičkim značenjem kod bolesnika s DLBCL liječenih R-CHOP protokolom (26, 27). Osim toga Lossos i sur. utvrdili su da je visoka razina ekspresije gena *HGAL* (izraženom u limfocitima podrijetlom iz germinativnog centra i tumorima koji nastaju iz tih limfocita) povoljan prognostički pokazatelj za bolesnike s DLBCL, neovisan o IPI (28). U studiji Bea i sur. komparativnom genomskom hibridizacijom je utvrđeno da umnožene kopije regije 3p11-p12 koreliraju s lošijom prognozom (29).

Navedenim, i brojnim drugim molekularnim studijama otkriveni su signalni putevi karakteristični za ABC skupinu DLBCL, koji nisu aktivirani u GCB skupini (30-33). Krajnji cilj suvremenih znanstvenih istraživanja iz područja limfoma je identificirati gene i proteine ključne za navedene aktivacijske procese koji mogli bi biti potencijalne mete novih terapijskih protokola.

1.2.3. Imunohistokemijski algoritmi

S obzirom na zahtjevnu tehnologiju i visoku cijenu, zbog kojih tehnika genskog čipa danas nije dostupna u rutinskoj kliničkoj praksi, pojavile su se studije koje su pokušale

korelirati ekspresiju gena s ekspresijom proteina na i u tumorskim stanicama. U tu svrhu razvijeni su imunohistokemijski algoritmi koji bi omogućili podjelu bolesnika s DLBCL na prognostički povoljnu (GCB) i nepovoljnu grupu (non-GCB, ABC). Jedan od prvih predloženih algoritama objavili su Hans i suradnici (34), a temelji se na ekspresiji diferencijacijskih biljega CD10 i BCL6, kao biljega germinativnog centra, te MUM 1, kao biljega aktiviranih B-limfocita. Ovaj algoritam klasifikacije najzastupljeniji je u različitim studijama, od kojih su neke potvrdile navedene rezultate (35-39), dok brojna druga istraživanja nisu potvrdila povezanost ovako definiranih podskupina DLBCL i prognoze (40-46). Uslijedili su novi prijedlozi imunohistokemijskih algoritama, od kojih se u nekima predlaže čak osam biljega za klasifikaciju, ali niti jedan nije potvrđen na velikim multicentričnim studijama i nije postao opće prihvaćen (47-51). Zbog nedovoljne reproducibilnosti imunohistokemijskih metoda i analize rezultata, SZO za sada ne priznaje imunohistokemijske algoritme kao metodu subklasifikacije pacijenata koja bi utjecala na rutinsku kliničku praksu (2).

2009. godine objavljeni su rezultati studije Choija i suradnika koji predlažu novi imunohistokemijski algoritam, temeljen na biljezima FOXP1 i GCET1, uz do sada korištene CD10, BCL6 i MUM1 (52). Njihovo istraživanje pokazalo je da ovaj algoritam znatno preciznije stratificira bolesnike s DLBCL u prognostički različite skupine i bolje korelira s rezultatima analize metodom GEP (na razini podudarnosti 93% s rezultatima GEP, za razliku od algoritma prema Hans i sur. gdje je razina podudarnosti bila oko 70-86%) (52, 53). Rezultati su objašnjeni uvođenjem novih, specifičnijih biljega; GCET1 (poznat i kao centerin ili serpin A9) je protein izražen na tumorima čije stanice potječu od B-limfocita germinativnog centra (54, 55), a FOXP1 je protein izražen u normalnim aktiviranim B-limfocitima (56-58). Više studija utvrdilo je da ekspresija FOXP1 u DLBCL korelira s lošijom prognozom (59-61). Choijev algoritam također se razlikuje po graničnoj vrijednosti za biljeg MUM1; pozitivnim rezultatom smatran je nalaz ekspresije biljega u više od 80% tumorskih stanica, dok je u algoritmu prema Hans dovoljno bilo više od 30% pozitivnih tumorskih stanica. Uslijedila je studija koja je potvrdila da Choijev algoritam uspješno stratificira bolesnike s DLBCL na prognostički povoljnu i nepovoljnu skupinu s obzirom na korelaciju s GEP analizom i na preživljenje (53), ali su objavljene i studije s različitim rezultatima (62,63).

Meyer i sur. su na 262 bolesnika s DLBCL liječena R-CHOP protokolom utvrdili značajnu korelaciju oba algoritma s rezultatima GEP i utvrdili da podjela bolesnika pomoću oba algoritma ima prognostičko značenje na ukupno preživljenje bolesnika, neovisno o IPI (53). S obzirom da se interpretacija imunohistokemijskog bojenja protutijelom na BCL6 pokazala problematičnom (64) i pretpostavlja se da je jedan od uzroka kontradiktornih rezultata implementacije algoritama u različitim studijama, u svom istraživanju autori su konstruirali modifikacije algoritama prema Hans i Choiju, iz kojih je izbačena analiza biljega BCL6. Modificirani algoritmi pokazali su podjednaku korelaciju s rezultatima GEP i zadržali prognostičku vrijednost u odnosu na ukupno preživljenje.

Međutim, Gutierrez-Garcia i sur. usporedili su nekoliko imunohistokemijskih algoritama, uključujući onaj prema Hans i Choiju, s rezultatima GEP i preživljenjem (63). Njihovi rezultati potvrdili su značajnu korelaciju imunohistokemijskog algoritma prema Hans i sur. s analizom GEP, ali ne i Choijevog algoritma. U ovoj studiji prema Choijevom algoritmu, čak 60% bolesnika u GCB-skupini i 16% bolesnika u ABC-skupini nije odgovaralo molekularno definiranim skupinama GCB i ABC prema GEP. Osim toga, niti jedan od imunohistokemijskih algoritama nije pokazao prognostičko značenje u odnosu na preživljenje bez znakova progresije ili ukupno preživljenje, za razliku od rezultata GEP.

Gu i sur. proveli su istraživanje na skupini bolesnika s DLBCL liječenih u prvoj liniji CHOP ili R-CHOP protokolom, a nakon toga autolognom transplantacijom matičnih stanica (62). Nakon podjele na GCB i ABC skupinu prema algoritmima Hans i Choija nije utvrđena značajna razlika s obzirom na preživljenje.

1.2.4. Ekspresija proteina diferencijacijskih gena

DLBCL je tumor podrijetla B-limfocita i difuzna ekspresija biljega CD20 jedna je od najkonstantnijih fenotipskih osobina ovoga limfoma. Postoje i brojni drugi proteini čija je ekspresija karakteristična za većinu, ili za određene podtipove DLBCL, a za neke od njih danas je potvrđeno i prognostičko značenje.

CD10 (poznat i kao CALLA, engl. *common acute lymphoblastic leukaemia antigen*) je membranska metaloproteinaza koja se nalazi u različitim vrstama stanica i tkiva. Ima važnu ulogu u sazrijevanju limfocita i nalazi se u pro- i pre-B limfocitima, nakon čega njegova ekspresija nestaje i postaje aktivan u zrelih B-limfocitima germinativnog centra (65).

BCL6 je normalno izražen u B-limfocitima i dijelu CD4⁺ T-limfocita germinativnog centra i neophodan je za formiranje germinativnog centra (66, 67). BCL6 je gotovo uvijek izražen kod folikularnih limfoma, a nalazi se i u velikom postotku DLBCL (između 70-90%). Neke studije pokazale su povezanost translokacije i mutacija gena *BCL6* s ektranodalnim DLBCL i s prognozom. (68, 69)

MUM1 pripada skupini interferonskih regulatora transkripcije. Ima važnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji B-limfocita i plazma stanica, te u regulaciji genske ekspresije povezane s djelovanjem signalnih molekula kao što su interferoni ili drugi citokini (70, 71). Osim toga nalazi se i u aktiviranim T-limfocitima u kojima potiče lučenje citokina (70). S obzirom da IgM⁺/IgD⁺ stanice zone plašta ne pokazuju ekspresiju MUM1 (72), te na rezultate GEP analize koji grupiraju tumore s mRNA MUM1 ekspresijom u ABC skupinu (18), danas se smatra da gen MUM1 ima važnu ulogu u terminalnim fazama diferencijacije B-limfocita. Zbog toga se ekspresija biljega MUM1 povezuje s B-limfocitima porijekla post-germinativnog centra.

CD138 je nespecifičan biljeg koji se osim na plazma stanicama i B-limfocitima koji su prošli germinativni centar, nalazi i na epitelnim stanicama. Poznata je njegova uloga u migraciji stanica preko adhezije na stromalne stanice (73, 74). Smatra se karakterističnim biljegom za novotvorine plazma stanica, ali može biti izražen i u nekim podvrstama DLBCL, osobito u imunoblastičnoj varijanti DLBCL i u plazmablastičnom limfomu.

1.2.5. CD43

Imunohistokemijski biljeg čija je prognostička vrijednost do sada ispitana samo u jednoj objavljenoj studiji o DLBCL je CD43 (75). Autori su u svom istraživanju utvrdili da je ekspresija CD43 na tumorskim stanicama neovisan nepovoljni prognostički parametar za bolesnike s DLBCL. CD43 (poznat i kao leukosijalin) je transmembranski glikoprotein izražen na većini hematopoetskih stanica, ali ne nalazi se na zrelim B-limfocitima zdravih osoba u perifernoj krvi (77). CD43 djeluje na migraciju leukocita, monocita i T-limfocita tako da omogućava kotrljanje uz stijenku žile, prianjanje uz endotelne stanice, izlazak iz krvne žile i kretanje prema kemoatraktantu. Ova molekula također sudjeluje u sazrijevanju T-limfocita u kojima regulira apoptozu (78). Uloga CD43 u limfocitima B imunofenotipa do danas nije razjašnjena. Nalazi se na ranim prekursorima B-limfocita (pre-pro-B-limfociti i pro-B-limfociti), inaktiviran je u zrelim limfocitima i ponovno se pojavljuje tek na plazma stanicama. Aberantna ekspresija ovog proteina nalazi se u brojnim zrelim i nezrelim NHL B imunofenotipa (kao što su limfom/leukemija malih limfocita, limfom plaštene zone, Burkittov limfom, limfoblastični limfom/leukemija), a prema dostupnim podacima iz literature, nalazi se i u 16-28% DLBCL (25,26). Dosadašnje studije upućuju na to da se CD43 na tumorskim stanicama pojavljuje rano u procesu tumorigeneze s obzirom da je ekspresija CD43 dokazana i u dobroćudnim tumorima kao što su adenom debelog crijeva ili cistadenom jajnika (79). Uloga CD43 u tumorigenezi objašnjava se uglavnom kočenjem apoptoze. U studiji Misawe i sur. (80) na kulturi mišjih stanica otkriveno je da ekspresija CD43 smanjuje osjetljivost B-limfocita u non Hodgkinovim limfomima B-imunofenotipa na zastoj u G1 fazi staničnog ciklusa, čime se produžava preživljenje tumorske stanice.

O prognostičkoj vrijednosti CD43 objavljena je, osim spomenute studije o DLBCL, samo još jedna studija koja je pokazala da je CD43 nepovoljni prognostički parametar na maloj seriji bolesnika s orbitalnim limfomom marginalne zone (76).

1.2.6. CD5

CD5 je membranski glikoprotein izražen na T-limfocitima i na podgrupi normalnih, naivnih B-limfocita. Glavna uloga CD5+ B-limfocita je stvaranje polireaktivnih protutijela s niskim afinitetom i niskom specifičnošću (57). U fiziološkom procesu aktivacije B-limfocita, prilikom ulaska u germinativni centar CD5+ B-limfociti iz zone plašta gube CD5 i izražavaju biljeg CD10 (27). Aberantna ekspresija CD5 karakteristična je za neke limfome B-imunofenotipa poput limfoma/leukemije malih limfocita i limfoma plaštene zone. Smatra se da CD5 produžava vijek B-limfocita stimulacijom autokrine produkcije interleukina 10 (57A-58). Međutim proliferacija ne-tumorskih CD5+ B-limfocita dokazana je i kod bolesnika s autoimunim bolestima (58). Malobrojne studije na velikom broju bolesnika s DLBCL utvrdile su da je biljeg CD5 izražen na površini tumorskih stanica u otprilike 10% bolesnika (77,79), a druga istraživanja pokazala su da je CD5+ DLBCL heterogena podvrsta limfoma koja se genetski razlikuje od transformiranih limfoma/leukemija malih limfocita i agresivnih varijanti limfoma plaštene zone (76,80). Rijetke studije proučavale su prognostičku vrijednost ovog biljega u bolesnika s DLBCL i utvrdile da je CD5 nepovoljni prognostički parametar (76,77). Ennishi D. i suradnici u svom su istraživanju po prvi puta pokušali odrediti distribuciju ekspresije CD5 s obzirom na imunohistokemijsku klasifikaciju DLBCL prema algoritmu Hans i sur. (82). Za razliku od sličnih studija koje su molekularnim metodama utvrdile da se CD5+ DLBCL uglavnom nalaze u prognostički nepovoljnoj skupini (ABC) (83,84), rezultati Ennishi i sur. nisu potvrdili povezanost ekspresije CD5 i GCB ili ABC skupine.

1.2.7. Citogenetske aberacije

1.2.7.1. Translokacija *C-MYC*

c-MYC gen (engl. *myelocytomatosis viral oncogene homolog*) nalazi se na kromosomu 8, regiji q24. Translokacija t(8;14)(q24;q32) je prva karakteristična kromosomska aberacija otkrivena u limfoproliferativnim bolestima (36), a rezultat je prekomjerna ekspresija proteina c-Myc, važnog transkripcijskog faktora koji potiče stanični ciklus i proliferaciju tumorskih stanica. Osim toga, ima važnu ulogu u metabolizmu stanica, sintezi proteina, regulaciji mRNA te induciranju apoptoze povećavajući ekspresiju p53 ili pojačavanjem proapoptotičnih signalnih puteva (85-87). Ova translokacija najčešća je i karakteristična za Burkittov limfom, međutim translokacija *c-MYC* može se dokazati u otprilike 5-10% DLBCL (88), kao i u neklasificiranom B-limfomu s osobinama između Burkittovog limfoma i DLBCL, plazmablastičnom limfomu te limfoblastičnom limfomu/akutnoj limfoblastičnoj leukemiji (2). U navedenoj translokaciji partner genu *c-MYC* je gen za imunoglobulin teškog lanca, međutim katkada u translokaciji sudjeluju neki drugi geni, primjerice gen za imunoglobulin

kappa lakog lanca (2p12/IGK) kao t(2;8)(p12;q24) ili gen za imunoglobulin lambda lakog lanca (22q11/IGL) kao t(8;22)(q24;q11) (2). Kao partnerski geni u translokaciji opisani su i ne-imunoglobulinski geni kao *BCL6*, *BCL11A*, *PAX5* i *IKAROS49* (69). Tumori s morfologijom karakterističnom za DLBCL i translokacijom *c-MYC* prema klasifikaciji SZO (2008) svrstavaju se u heterogenu skupinu DLBCL-NOS (2). Većina studija koje su istraživale prognostičku vrijednost *c-MYC* translokacije utvrdile su da ovi pacijenti imaju znatno agresivniju bolest, lošiji odgovor na terapiju i kraće preživljenje (88-91). Niitsu i sur. analizirali su translokaciju *c-MYC* u 252 DLBCL s genetskim anomalijama dokazanim aberantnim kariotipom (92). Savage i sur. ispitivali su translokaciju *c-MYC* na 135 uzoraka DLBCL na TMA rezovima metodom FISH (93). Barrans i sur. istraživanje su radili na 245 uzoraka DLBCL metodom FISH na otiscima tumora i rezovima tkiva uklopljenog u parafinske kocke (94). Značajne razlike u metodologiji vjerojatno su dio objašnjenja za nepodudarnosti dobivenih rezultata, stoga biologija i patogeneza *de novo* DLBCL s translokacijom *c-MYC* danas nisu potpuno razjašnjene. Međutim u studiji Kramera i sur. utvrđeno je da se *c-MYC* translokacija najčešće nalazi kod bolesnika s ekstranodalnim DLBCL, osobito primarnim limfomima gastrointestinalnog sustava i da ovi bolesnici imaju bolju prognozu (95). Slične rezultate objavili su i Gualco i sur. koji su na pacijentima s DLBCL dječje dobi (10 do 18 godina) potvrdili korelaciju *c-MYC* translokacije s povoljnijom prognozom (98). Za razliku od njih, Tibiletti i sur. utvrdili su da translokacija *c-MYC* nema prognostičko značenje kod bolesnika s DLBCL, ali ta studija obuhvaća mali broj analiziranih uzoraka (99).

1.2.7.2. Translokacija *BCL2*

BCL2 gen (engl. *B-cell CLL/lymphoma 2*) smješten je na kromosomu 18, regiji q21. Njegova je funkcija kodiranje proteina smještenog na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, koji ima važnu antiapoptotsku ulogu (101-104). Postoje dvije izoforme proteina *BCL2*, za koje se zbog specifičnih interakcija s proteinima Bad i Bak smatra da imaju ulogu u najmanje dva različita antiapoptotska mehanizma (105). Ova translokacija nađena je u DLBCL, ali i u drugim limfomima B-imunofenotipa poput folikularnog limfoma, primarnog kožnog limfoma marginalne zone, kroničnoj limfocitnoj leukemiji/limfomu malih limfocita, spleničnom limfomu marginalne zone, monoklonalnoj limfocitozi B-stanica te histiocitnom sarkomu koji nastaje transformacijom folikularnog limfoma. U svim navedenim tumorima translokacija *IGH/BCL2* rezultira konstitutivnom ekspresijom proteina *BCL2* (106-111).

Osim važne uloge u limfomagenezi, translokacija *BCL2* dokazana je i kod zdravih ljudi. Perzistentni klon normalnih, zrelih B-limfocita s ovom translokacijom češće se javlja u starijoj populaciji (112). Prisutnost translokacije kod zdravih ljudi, kao i njezina relativno rana pojava tijekom sazrijevanja B-limfocita (tijekom V(D)J rekombinacije), upućuje na važnu ulogu translokacije *BCL2* u limfomagenezi, kao i na zaključak da sam nastanak translokacije nije dovoljan za razvoj zloćudne limfoproliferativne bolesti (113). U klasifikaciji SZO također se ističe važnost utvrđivanja translokacije *BCL2* prilikom postavljanja dijagnoze agresivnih

limfoma s dvostrukim translokacijama (engl. *double hit lymphoma*) koje je potrebno razlikovati od DLBCL-NOS (2).

1.2.7.3. Translokacija *BCL6*

BCL6 gen (engl. *B-cell CLL/lymphoma 6*) smješten je na kromosomu 3, regiji q27 i kodira transkripcijski faktor koji pomoću interakcije s različitim proteinima ima važnu ulogu u represiji transkripcije (114-117). Ekspresija *BCL6* osobito je važna za formiranje i normalnu funkciju germinativnih centara. *BCL6* ima ulogu u zaustavljanju apoptoze inducirane prekidima dvostruke uzvojnice DNA u B-limfocitima (prekidi su potrebni za somatsku hipermutaciju i rekombinaciju imunoglobulinskih lanaca) (118, 119). *BCL6* također sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, u različitim mehanizmima popravka DNA, apoptozi, staničnoj proliferaciji i diferencijaciji (120). Osim toga ima direktan utjecaj na kontrolu brojnih gena, kao što su *BCL2* i *p53* (119, 121). Genetske aberacije *BCL6* u obliku translokacija ili točkastih mutacija najčešće se nalaze kod DLBCL i kod folikularnog limfoma (2, 122). Translokacija *BCL6* s nekim od brojnih mogućih partnerskih gena smatra se obilježjem podskupine tzv. „*double-hit*“ limfoma (2, 123).

2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog istraživanja je da se u prognostički nepovoljnoj skupini DLBCL (ABC/non-GCB skupini) nalazi značajno veći broj tumora s ekspresijom biljega CD5 i CD43, te veći broj tumora s translokacijom gena *c-MYC*.

Na temelju postavljene hipoteze ciljevi istraživanja su:

- Usporediti imunohistokemijske algoritme subklasifikacije DLBCL prema Hans i sur. i prema Choiju i sur. na skupini bolesnika iz naše dvije ustanove i utvrditi postoje li značajne razlike u preživljenju bolesnika nakon podjele limfoma u GCB i non-GCB (ABC) podskupinu.
- Utvrditi postoji li korelacija između ekspresije biljega CD5 i CD43 i preživljenja bolesnika s DLBCL te korelacija translokacije gena *c-MYC* s preživljenjem.
- Utvrditi postoji li značajna korelacija podjele na GCB i non-GCB (ABC) podskupinu bolesnika prema algoritmima Hans i sur. i Choija i sur. s nekim od kliničkih parametara i/ili do sada poznatim prognostičkim biljezima.

3. BOLESNICI I METODE

3.1. BOLESNICI

U istraživanje su uključeni bolesnici s novodijagnosticiranim, histološki potvrđenim, nodalnim ili ektranodalnim DLBCL-NOS kod kojih je dijagnoza postavljena u KBC Zagreb ili KB Merkur u razdoblju od 2002. do 2008. godine. Bolesnici su liječeni uglavnom terapijskim prokolima koji uključuju CHOP i slične antraciklinske protokole s rituksimabom (71 bolesnik) ili bez rituximaba (27 bolesnika), te 9 bolesnika liječenih drugim kemoterapijskim protokolima (R-CVP, R-CVP, COP). Svrha je bila ispitati učinkovitost dvaju imunohistokemijskih algoritama za razlikovanje prognostički povoljne i nepovoljne skupine bolesnika, bez obzira na vrstu terapije. Studija je obuhvatila bolesnike za koje je postojalo dovoljno materijala u arhiviranim parafinskim kockama, koji nisu primili nikakvu terapiju prije dijagnostičke biopsije, te kod kojih su iz povijesti bolesti bili dostupni klinički podaci. Isključeni su bolesnici sa sekundarnim DLBCL-om i HIV pozitivni bolesnici. Tako je nakon revizije histoloških preparata i kliničkih podataka kod 110 bolesnika postavljena dijagnoza primarnog DLBCL-NOS.

Na tumorima u kojima je metodom FISH dokazana translokacija *c-MYC* analiza je proširena na ispitivanje translokacija *BCL2* i *BCL6*. Tri bolesnika s DLBCL u kojima je dokazana dvostruka translokacija (*c-MYC* i *BCL2* ili *BCL6*) također su isključena iz istraživanja.

Iz povijesti bolesti sa Zavoda za hematologiju KBC Zagreb i KB Merkur prikupljeni su slijedeći klinički podaci: spol, dob pri dijagnozi, razina serumske LDH, klinički stadij bolesti, međunarodni prognostički indeks (IPI), Karnofsky indeks, vrsta terapije, odgovor na terapiju, datum posljednjeg kontrolnog pregleda ili smrti.

U konačnici je u studiju uključeno 107 bolesnika. U tablici 4 prikazane su kliničke značajke bolesnika, vrsta terapije i odgovor na terapiju.

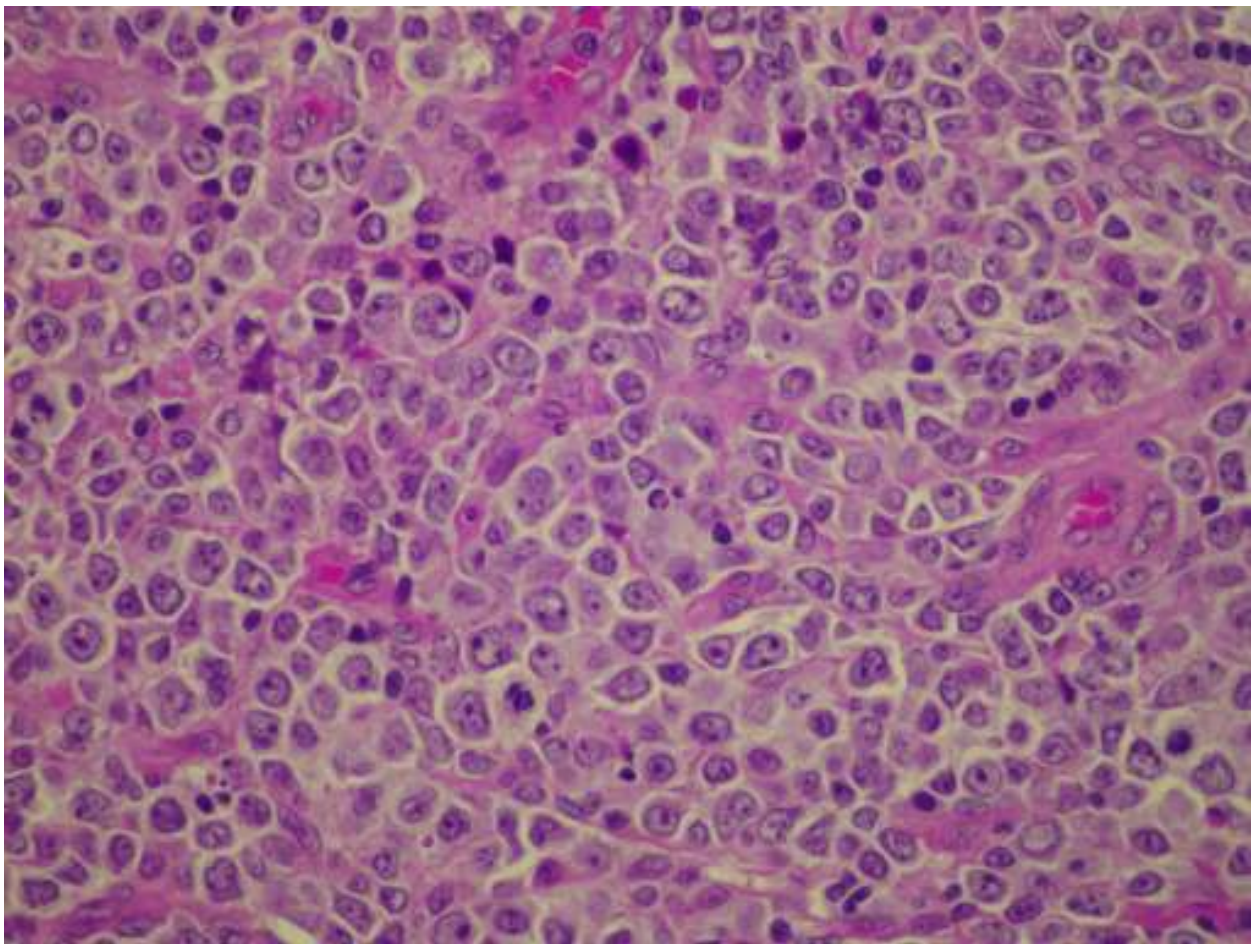
Tablica 4. Značajke bolesnika

ZNAČAJKE	N	%
Dob (medijan, raspon u godinama)	61(18-87)	
Starost \geq 60 godina	54	50
Muški spol	54	50
Klinički stadij III i IV	41	38
>1 zahvaćena ekстранodalna lokalizacija	8	8
Primarni ekстранodalni limfom	28	26
Povišen LDH	44	41
IPI		
0-2	79	73
3-5	28	26
Terapija		
R-CHOP	71	67
CHOP	27	25
drugo	9	8
Odgovor na terapiju		
Kompletna remisija	77	73
Parcijalna remisija	19	18
Bez odgovora na terapiju	10	9
Relaps bolesti (nakon kompletne remisije)	41	38
Ishod		
Živi	70	65
Umrli	37	35

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Histološka analiza

Revizija svih dijagnoza DLBCL-NOS napravljena je na histološkim preparatima obojenim hemalaun-eozinom (H&E). Patohistološka dijagnoza je postavljena na temelju histoloških i imunofenotipskih karakteristika tumorskog tkiva prema kriterijima klasifikacije SZO (2008) (2).



Slika 1. Morfologija DLBCL, bojenje H&E, povećanje 400x

Iz parafinskih kocaka s dovoljnom količinom tumorskog tkiva napravljen je tkivni *microarray* (engl. *tissue microarray*, TMA). Iz reprezentativne regije tumora obilježenih na histološkim H&E preparatima uzeta su dva cilindra tkiva bioptičkom iglom *Tissue microarray* sistema (8010 *Sakura Finetek*). Svaki cilindar postavljen je na određeno obilježeno mjesto u novom parafinskom bloku i uklopljen u tekući parafin. Pojedini TMA ukupno sadrži do 16 tkivnih cilindara promjera 5 mm. Iz parafinskih kocaka s TMA napravljeni su serijski rezovi debljine 2 μm i obojeni standardnom metodom H&E kako bi se provjerila kvaliteta dobivenih cilindara. Rezovi svih ispitivanih uzoraka jednako su obrađeni imunohistokemijskom metodom i fluorescentnom *in situ* hibridizacijom.

3.2.2. Imunohistokemijske metode

Standardnom imunohistokemijskom metodom na tkivnom *microarray*-u u svim uzorcima određena je ekspresija biljega CD20, CD3, CD10, BCL6, MUM1, FOXP1, GCET1, CD5 i CD43. Korištena su protutijela: CD20 (klon L26, razrjeđenje 1:200, *Dako*, Glostrup, Danska), CD3 (poliklonalno, razrjeđenje 1:400, *Dako*), CD10 (klon 56C6, RTU, *Dako*), BCL6 (klon PG-B6p, RTU, *Dako*), MUM1 (klon MUM1p, RTU, *Dako*), FOXP1 (klon JC12, razrjeđenje 1:100, *eBioscience*, San Diego, CA, USA), GCET1 (klon RAM341, razrjeđenje 1:100, *Abcam*, Cambridge, MA, USA), CD5 (klon 4C7, RTU, *Dako*), CD43 (klon DF-T1, RTU, *Dako*).

Na svim tumorima s pozitivnom imunohistokemijskom reakcijom na anti-CD5 određena je ekspresija biljega ciklin D1 (klon SP4, razrjeđenje 1:25, *Neomarkers*, Freemont, CA, USA) kako bi se isključila dijagnoza pleomorfnog limfoma plaštene zone.

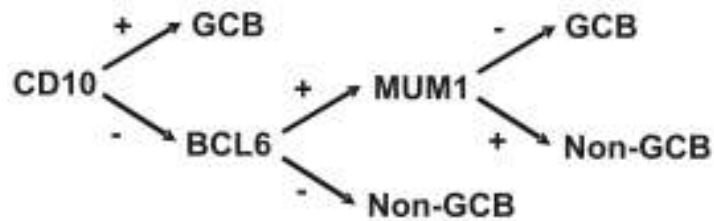
Postupci deparafiniranja i demaskiranja proteina odvijao se u aparatu PT-link (*DakoCytomation*, Danska), na +97°C/20 minuta (pH 9.0). Za vizualizaciju ekspresije biljega korištena je indirektna metoda bazirana na polimeru komercijalnim kitom *Dako, EnVision™ FLEX High pH* uz kromogen 3,3'-diaminobenzidin (DAB) u automatiziranom sustavu *Dako Autostainer (Dako)*.

3.2.3. Podjela prema imunohistokemijskim algoritmima

Na temelju imunofenotipskog profila, uzorci su podijeljeni u prognostički povoljnu (GCB) skupinu i prognostički nepovoljnu (non-GCB ili ABC) skupinu prema oba algoritma.

Prema algoritmu Hans i sur. (slika 2) kriteriji podjele bili su:

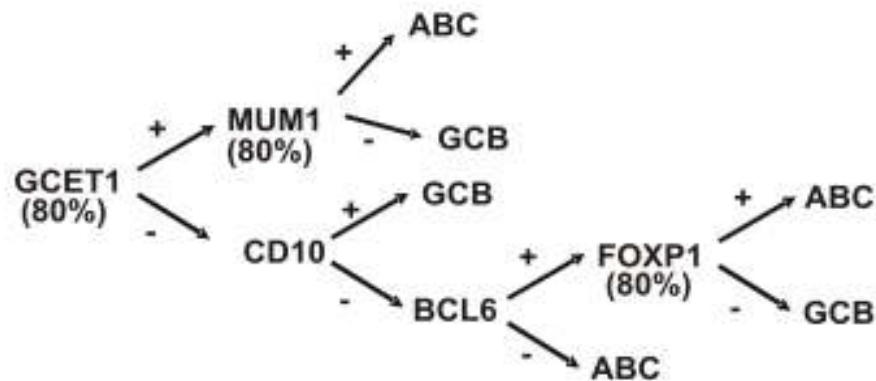
- A) GCB skupina: tumori s fenotipom CD10+BCL6+ ili CD10-BCL6+MUM1-.
- B) Non-GCB skupina: tumori s fenotipom CD10-BCL6-MUM1-, CD10-BCL6-MUM1+ i CD10-BCL6+MUM1+.



Slika 2. Algoritam prema Hans i sur.

Prema algoritmu Choija i sur. (slika 3) uzorci su klasificirani u skupine GCB i ABC:

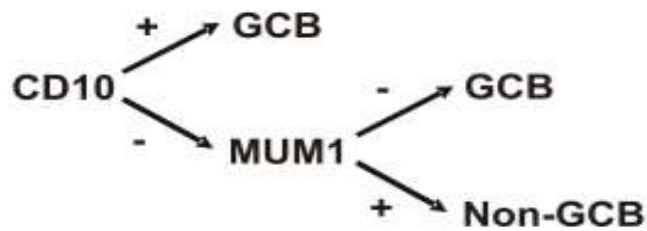
- A) GCB skupina: tumori s fenotipom GCET1+MUM1-, GCET1-CD10+ i GCET1-CD10-BCL6+FOXP1-.
- B) ABC skupina: tumori s fenotipom GCET1+MUM1+, GCET1-CD10-BCL6+FOXP1+ i GCET1-CD10-BCL6-.



Slika 3. Algoritam prema Choiju i sur.

U modifikaciji algoritma Hans i sur. prema studiji Meyera i sur. (53) (slika 4) izbačen je biljeg BCL6, a tumori su podijeljeni u dvije skupine prema kriterijima:

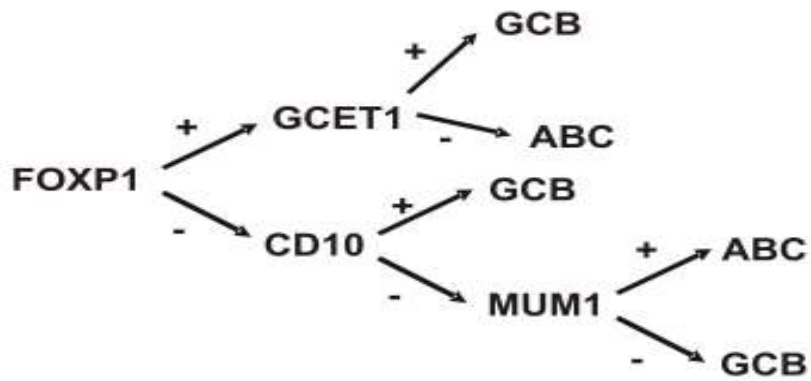
- A) GCB skupina: tumori s fenotipom CD10+ ili CD10-MUM1-.
- B) Non-GCB skupina: tumori s fenotipom CD10-MUM1+



Slika 4. Modificirani algoritam prema Hans i sur.

Modifikacija algoritma Choija i sur. prema Meyeru i sur. (slika 5) donosi promjenu redosljeda interpretacije biljega, uz izbacivanje biljega BCL6. Za razliku od izvornog algoritma, pozitivnim rezultatom smatrala se pozitivna ekspresija u 30% ili više tumorskih stanica za sve biljege. Kriteriji podjele su:

- A) GCB skupina: tumori s fenotipom FOXP1+GCET1+, FOXP1-CD10+ i FOXP1-CD10-MUM1-.
- B) ABC skupina: tumori s fenotipom FOXP1+GCET1- i FOXP1-CD10-MUM1+.



Slika 5: Modificirani algoritam prema Choiju i sur.

Rezultati podjele DLBCL u dvije skupine prema različitim imunohistokemijskim algoritmima uspoređeni su s kliničkim parametrima bolesnika, odgovorom na terapiju, pojavom recidiva bolesti, prisutnošću biljega CD43 i CD5 i preživljenjem.

U čitavoj skupini od 107 uzoraka određena je i ekspresija CD43 i CD5, a rezultati su uspoređeni s kliničkim značajkama promatranih bolesnika, distribucijom u GCB i ABC skupinama bolesnika prema oba algoritma, odgovorom na terapiju, pojavom recidiva i preživljenjem.

3.2.4. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

Analiza translokacije gena *c-MYC* metodom FISH provedena je na svih 110 uzoraka. U tumorima s potvrđenom translokacijom *c-MYC* provjereno je da li je translokacijski partner lokus *IGH* te postoje li i translokacije *BCL2* i *BCL6*.

Analiza je rađena na rezovima tkivnih *microarraya* debljine 2 μm , fiksiranim na adhezivna *PLUS ULTRA Vitrognost* predmetna stakla (*Biognost*, Hrvatska). Rezovi su tretirani otopinom *Borg Decloaker*, RTU (*Biocare Medical*, LLC, USA) u loncu pod pritiskom *Pascal* (*DakoCytomation*) na $+125^{\circ}\text{C}$ / 2 minute, pri čemu se odvija postupak deparafinizacije, rehidracije i kuhanja. Slijedi tretiranje pepsinom 0.1 g/mL (*Sigma*, Njemačka) na $+37^{\circ}\text{C}$ / 20 minuta, kako bi se uklonili proteini te dehidracija i sušenje na zraku prije stavljanja probe. Direktno obilježene probe pripremljene su prema uputama proizvođača. Pripremljeni rezovi s probama stavljeni su u aparat za hibridizaciju *Hybridizer* (*DakoCytomation*), gdje su uzorci i proba denaturirani na $+82^{\circ}\text{C}$, 5 minuta, nakon čega je slijedila hibridizacija preko noći na temperaturi $+45^{\circ}\text{C}$. Nakon hibridizacije rezovi se ispiru tri puta slijedom pufera: 0.0003% Tween/0.4xSSC, 0.0001% Tween/2xSSC, 2xSSC. Za kontrastiranje DNA korišteno je 10 μL otopine *Vectashield* (*Vector Laboratories Inc.*, Burlingame, CA, USA) koja sadrži 10^{-5} g/L fluorescentne boje 4',6-diamidino-2-fenil-indol (*DAPI*). (ref -Ventura et al 2006)

Translokacija gena *c-MYC* analizirana je probom *LSI MYC Dual Color Break-apart Rearrangement Probe* (*Vysis Inc, Abbott Molecular, USA*). Za dokazivanje translokacije *IGH/MYC* korištena je proba *LSI IGH/MYC/CEP-8 Dual Fusion Probe* (*Vysis Inc, Abbott Molecular, USA*). Translokacija gena *BCL2* analizirana je probom *LSI BCL2 FISH DNA probe, Split Signal* (*Dako, Denmark*), a translokacija gena *BCL6* probom *LSI BCL6 Dual Color Break-apart Rearrangement Probe* (*Vysis Inc, Abbott Molecular, USA*).

Za analizu preparata korišten je fluorescentni mikroskop Olympus BX51. U svakom uzorku analizirano je 200 morfološki očuvanih tumorskih stanica. Pozitivnim rezultatom smatrane su karakteristične promjene signala u više od 7% tumorskih stanica.

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Kvalitativni podaci opisani su i analizirani tablicama kontingencija (χ^2 test i po potrebi Fisherov egzaktni test).

Kaplan-Meierovom analizom procijenjeno je preživljenje bolesnika. Promatrani su odgovor na terapiju, preživljenje bez događaja (engl. *event free survival*, EFS) i ukupno preživljenje (engl. *overall survival*, OS). EFS se računa kao period od postavljanja dijagnoze do događaja – neuspjeha liječenja (progresija bolesti, započinjanje nekog drugog, neplaniranog anti-limfomskog liječenja, relaps bolesti ili smrt od bilo kojeg uzroka) ili do zadnje kontrole. Ukupno preživljenje (OS) se računa od postavljanja dijagnoze do smrti ili do zadnje kontrole. Bolesnici koji su bili živi i bez znakova relapsa u vrijeme zadnje kontrole uključeni su kao cenzurirano praćeni. Usporedba preživljenja između uspoređivanih skupina analizirana je Log-rank testom. Od opisnih varijabli korišteni su medijan i 95% intervali pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI). Rezultati su interpretirani na 5%-tnoj razini značajnosti. Za statističku analizu podataka korišten je informatički program STATISTICA® (verzija 8.0, *StatSoft, Inc.*, Tulsa, USA)

4. REZULTATI

4.1. Rezultati histološke analize

Nakon revizije uzoraka svih novodijagnosticiranih bolesnika s primarnim DLBCL iz KBC Zagreb i KB Merkur u razdoblju od 2002-2008. godine, iz studije su isključeni bolesnici s primarnim medijastinalnim DLBCL, s DLBCL bogatim T-limfocitima i histiocitima te bolesnici s CD20 negativnim tumorima. Neki bolesnici isključeni su jer u parafinskim kockama nije bilo dovoljno tumorskog tkiva za imunohistokemijsku analizu i FISH, zbog nedostataka važnih kliničkih podataka ili podataka o praćenju.

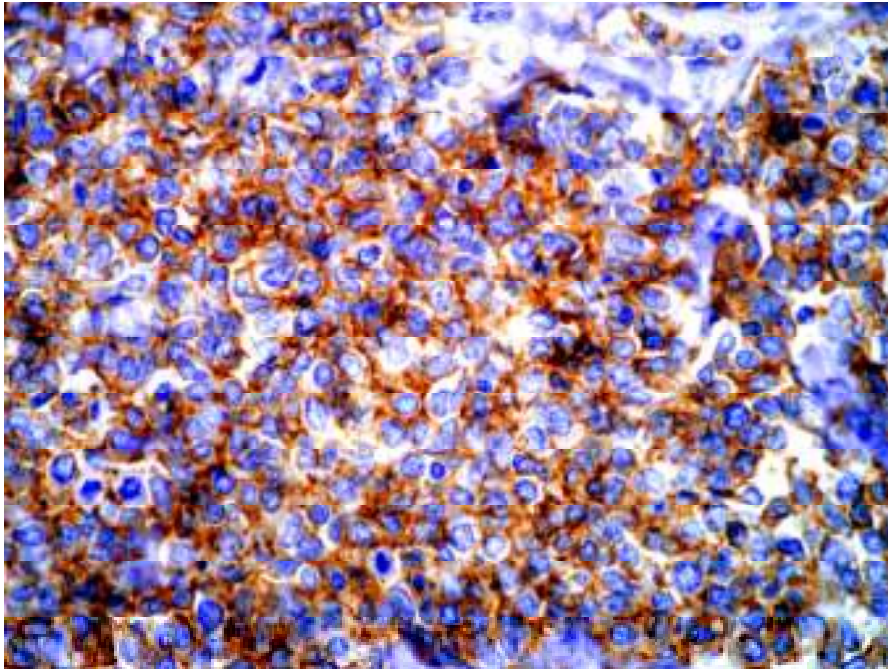
4.2. Rezultati imunohistokemijske analize

U svim analiziranim uzorcima u tumorskim stanicama dokazana je difuzna ekspresija biljega CD20, te negativna reakcija imunohistokemijskim bojenjem na anti-CD3. U tablici 5 prikazana je raspodjela prisutnosti ekspresije ostalih analiziranih biljega.

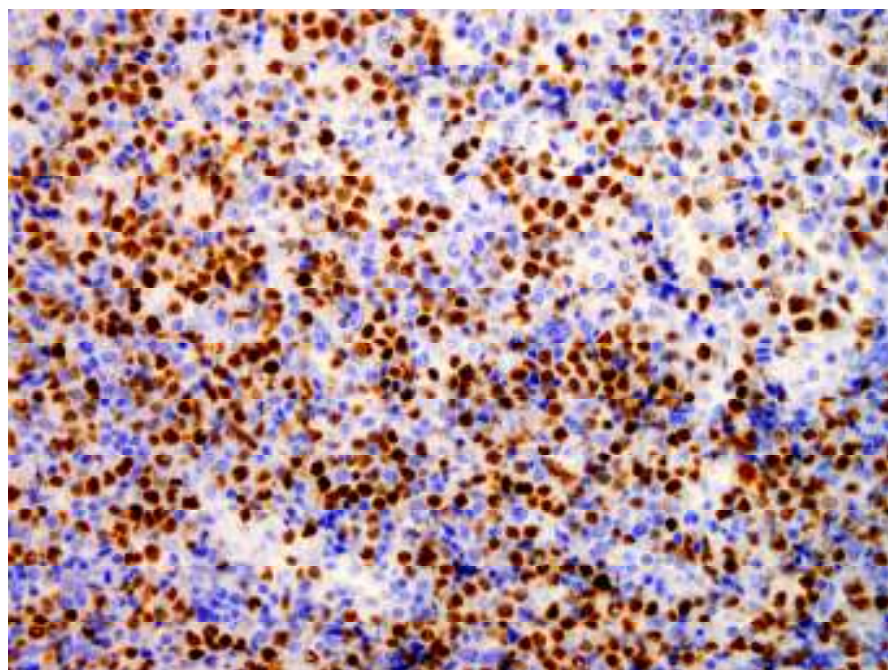
Tablica 5: Prisutnost ekspresije biljega na 107 DLBCL.

Biljeg N (%)	CD10	BCL6	MUM1	FOXP1	GCET1	CD43	CD5
+	24 (22)	74 (69)	64 (60)	77 (72)	42 (39)	26 (24)	8 (7)
-	83 (78)	33 (31)	43 (40)	30 (28)	65 (61)	81 (76)	99 (93)

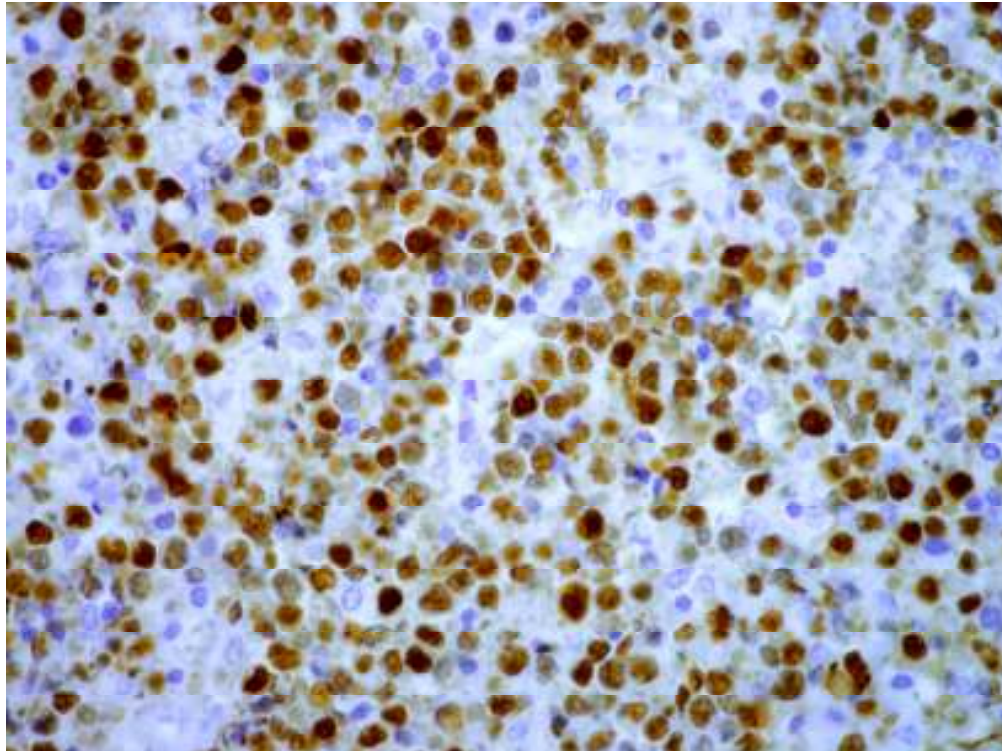
Za biljege CD10, BCL6, MUM1 pozitivnim rezultatom smatrana je specifična ekspresija u više od 30% tumorskih stanica za algoritam prema Hans i sur. (34)



Slika 6. Membranski pozitivna reakcija imunohistokemijskim bojenjem na CD10, povećanje 400x

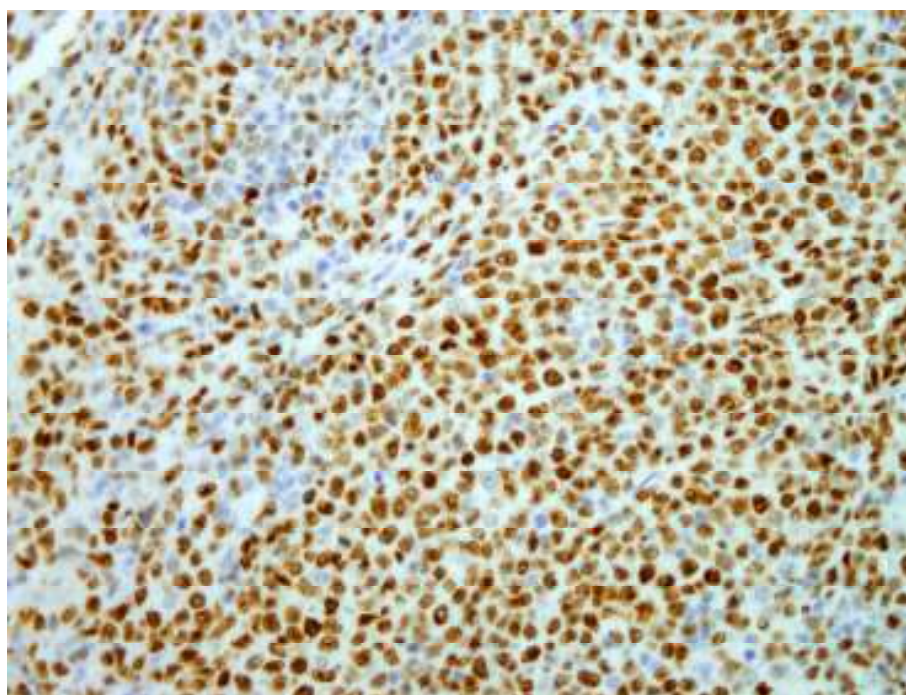


Slika 7. Prisutnost biljega BCL6 vidi se kao smeđe obojenje u jezgrama tumorskih stanica, povećanje 200x.

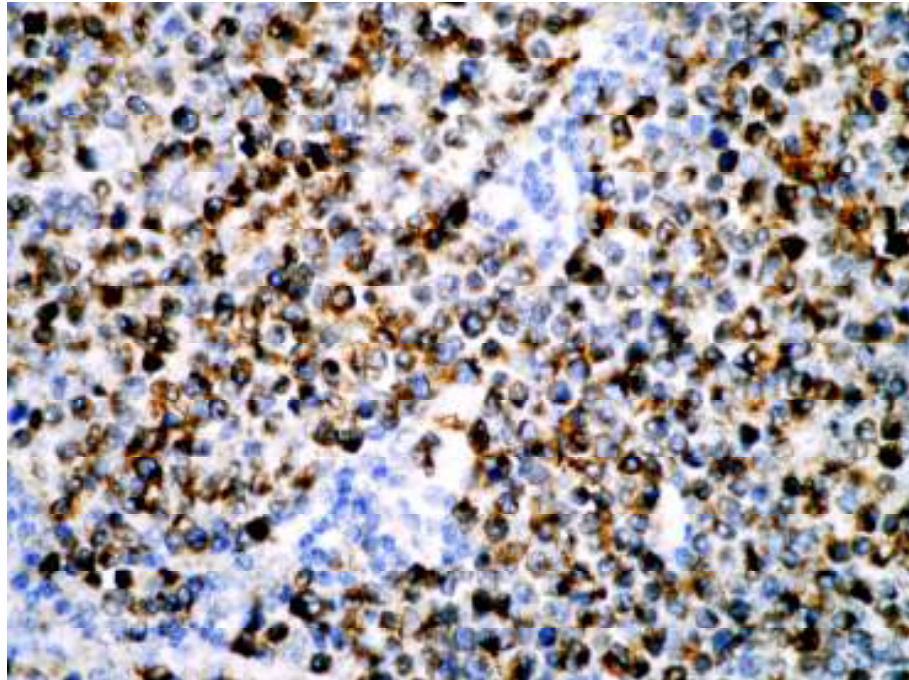


Slika 8. Prisutnost biljega MUM1 vidi se kao smeđe obojenje u jezgrama tumorskih stanica, povećanje 400x.

Prema izvornom radu, za algoritam prema Choiju i sur. pozitivnim rezultatom smatrana je ekspresija CD10 i BCL6 u više od 30% tumorskih stanica i ekspresija MUM1, FOXP1, GCET1 u više od 80% tumorskih stanica (52).

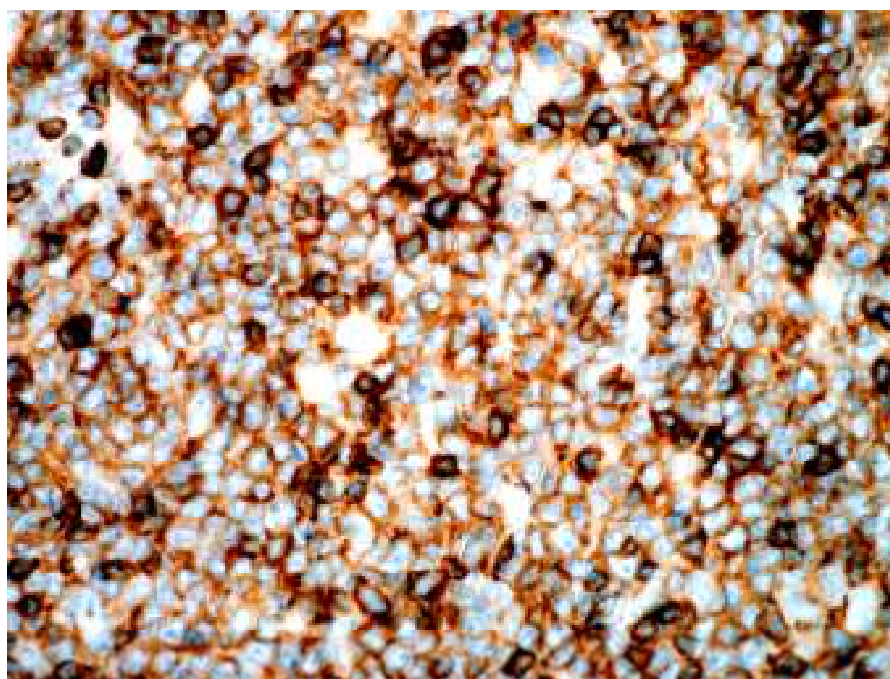


Slika 9. Nuklearni pozitivitet u tumorskim stanicama imunohistokemijskim bojenjem na FOXP1, povećanje 400x.

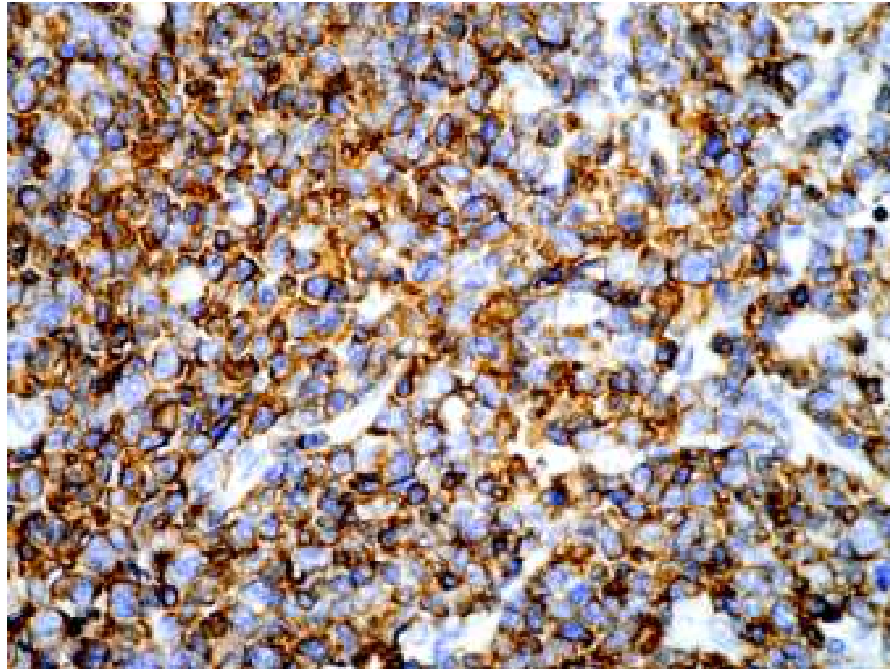


Slika 10. Tumorske stanice pokazuju membranski pozitivnu reakciju imunohistokemijskim bojenjem na GCET1, povećanje 400x.

Za CD43, CD5 i ciklin D1 pozitivnim nalazom smatrala se ekspresija u više od 30% tumorskih stanica, povećanje 400x.



Slika 11. Prisutnost biljega CD43 vidi se kao smeđe membransko obojenje tumorskih stanica, povećanje 400x.



Slika 12. Tumorske stanice pokazuju difuzno pozitivnu membransku reakciju na CD5, povećanje 400x.

Imunohistokemijskim bojenjem dokazano je da u uzorcima tumora s dokazanom ekspresijom biljega CD5 ne postoji koekspresija biljega ciklin D1, čime je isključena dijagnoza limfoma plaštene zone.

4.3. Rezultati podjele prema imunohistokemijskim algoritmima

Nakon imunohistokemijskog bojenja bolesnici su podijeljeni u GCB i non-GCB (ABC) skupinu prema originalnim algoritmima Hans i sur. (34), Choija i sur. (52), te Meyerovim modifikacijama ova dva algoritma (53). Prema algoritmu Hans i sur. 35% bolesnika svrstano je u GCB skupinu, a 65% bolesnika u GCB-skupinu. Prema Meyerovoj modifikaciji algoritma Hans i sur. u GCB skupini bilo je 47%, a u non-GCB skupini 53% bolesnika. Prema algoritmu Choija i sur. 32% bolesnika svrstano je u GCB skupinu, a 68% u ABC skupinu. Prema Meyerovoj modifikaciji algoritma Choija i sur. 50% bolesnika bilo je u GCB skupini, a 50% u ABC skupini. Raspodjela prema podrijetlu DLBCL prikazana je u tablici 6.

Tablica 6. Podjela DLBCL na GCB i non-GCB (ABC) skupine prema četiri algoritma.

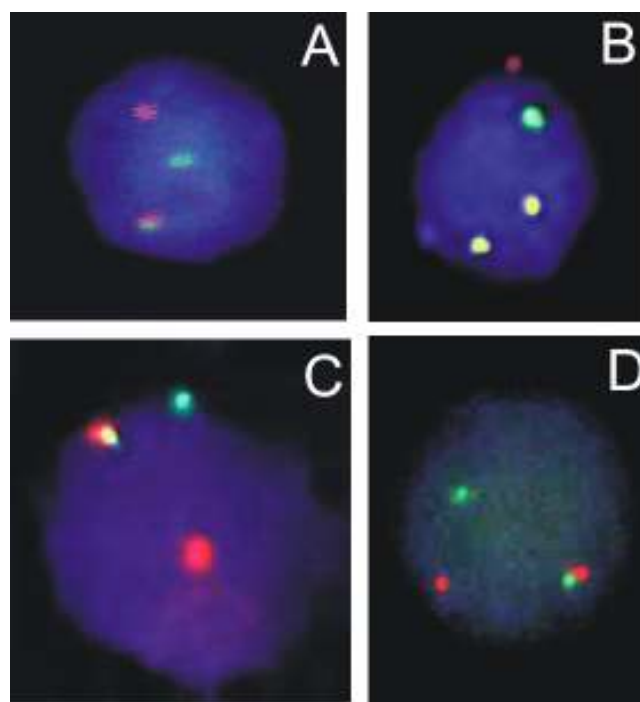
Algoritam	GCB N (%)	non-GCB (ABC) N (%)
Hans	37 (35)	70 (65)

Choi	34 (32)	73(68)
Hans*	50 (47)	57 (53)
Choi*	53 (50)	54 (50)

*modifikacije izvornih algoritama prema Meyeru i sur. (53)

4.4. Rezultati analize fluorescentnom *in situ* hibridizacijom (FISH)

Na svih 110 uzoraka DLBCL-NOS metodom FISH analizirano je postojanje translokacije *c-MYC*. Translokacija je dokazana na ukupno 5 uzoraka (4.5%). Od 5 uzoraka s potvrđenom translokacijom *c-MYC* samo u jednom DLBCL kao translokacijski partner dokazan je lokus *IGH*. Osim toga, u 2 uzorka uz translokaciju *c-MYC* nađena je translokacija *BCL2*, a u jednom uzorku translokacija *BCL6*. Niti u jednom od navedena tri uzorka s dvostrukim translokacijama partnerski lokus nije bio *IGH*. Bolesnici s DLBCL u kojima su potvrđene dvostruke translokacije isključeni su iz studije. Tako je konačnici u studiju uključeno 107 bolesnika od kojih je samo kod 2 potvrđena translokacija *c-MYC*.



Slika 13: A) Translokacija gena *c-MYC* – spojeni signal predstavlja normalni alel, a razdvojeni signali (crveni i zeleni) predstavljaju translokacije; B) *IGH/c-MYC* – fuzijski (žuti) signali predstavljaju translokaciju, a crveni i zeleni signal normalne alele *IGH* i *c-MYC*; C) Translokacija gena *BCL2*– spojeni signal predstavlja normalni alel, a razdvojeni signali (crveni i zeleni) predstavljaju translokacije; D) Translokacija gena *BCL6*– spojeni signal predstavlja normalni alel, a razdvojeni signali (crveni i zeleni) predstavljaju translokacije.

4.5 Rezultati statističke analize

Statistička analiza obuhvatila je ukupno 107 bolesnika koji su praćeni u rasponu od 1-112 mjeseci, s medijanom EFS 36 mjeseci i OS 43 mjeseca. Dvogodišnje ukupno preživljenje bilo je 72.9%.

4.5.1. CD5

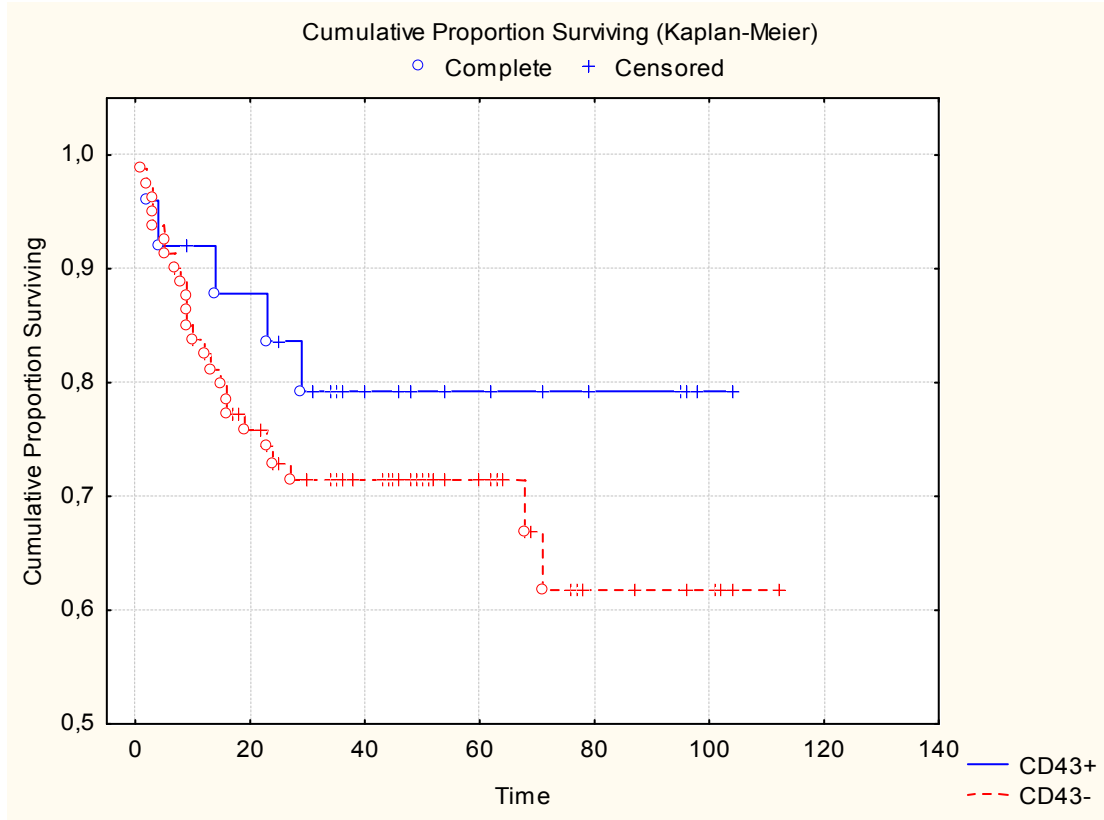
Imunohistokemijsko bojenje anti-CD5 protutijelom učinjeno je na uzorcima 107 bolesnika. Bilo je 8 pozitivnih uzoraka (7,5 %). Nije nađena statistički značajna povezanost ekspresije biljega CD5 s EFS ($p=0.712$) niti s OS ($p=0.461$). CD5-pozitivni tumori češće su svrstani u non-GCB (ABC) skupinu prema algoritmu Hans i Choijevom algoritmu (6 od 8 uzoraka, 75%), iako razlika nije bila statistički značajna.

4.5.2. CD43

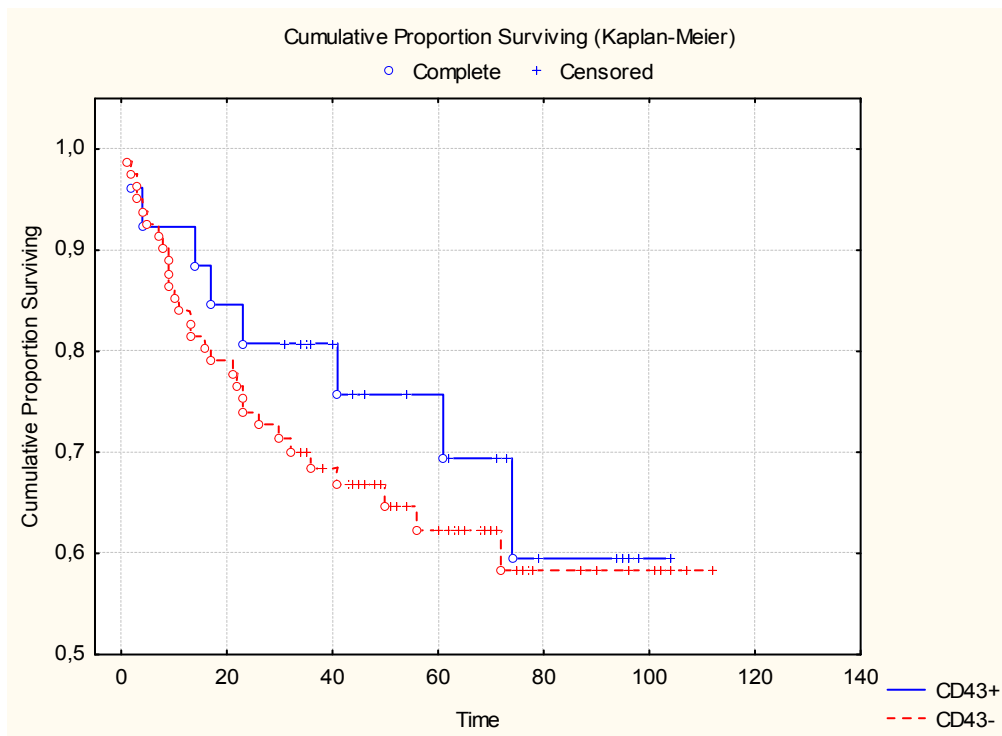
Od 107 analiziranih uzoraka DLBCL dokazana je ekspresija biljega CD43 u 26 uzoraka (24%). Nije nađena statistički značajna korelacija između ekspresije ostalih imunohistokemijski analiziranih biljega i CD43. Međutim, uočena je granično značajna veća učestalost ekspresije CD43 u BCL6-negativnim tumorima ($\chi^2= 3.776$, $df=1$, $p=0.052$) i u GCET1-negativnim uzorcima ($\chi^2= 3.769$, $df=1$, $p=0.052$).

Nakon podjele bolesnika u GCB i non-GCB (ABC) skupine prema algoritmu Hans i sur. i Choijevom algoritmu, nije nađena statistički značajna razlika u distribuciji tumora s ekspresijom CD43 između dvije skupine. Međutim, prema oba algoritma, veći broj uzoraka s dokazanom ekspresijom CD43 nalazio se u non-GC (ABC) skupini (73% prema algoritmu Hans i 81% prema Choijevom algoritmu).

U usporedbi s kliničkim pokazateljima, utvrđena je značajno veća učestalost ekspresije CD43 u muškaraca ($\chi^2= 4.837$, $df=1$, $p=0.028$), te povezanost ekspresije CD43 s normalnim serumskim vrijednostima LDH ($\chi^2= 4.619$, $df=1$, $p=0.032$). Na promatranih 107 bolesnika nije dokazana značajna povezanost ekspresije CD43 s EFS ($p=0.273$) niti s OS ($p=0.478$). Nije nađena povezanost s kliničkim stadijem, ektranodalnom lokalizacijom, dobi, niti općim stanjem bolesnika (ECOG), kao niti s odgovorom na terapiju, pojavom relapsa bolesti ili ishodom.



a)



b)

Slika 14. A) EFS ($p=0.273$) i B) OS ($p=0.478$) s obzirom na ekspresiju CD43.

4.5.3. Translokacija *c-MYC*

S obzirom da su nakon isključivanja uzoraka tumora s dvostrukim translokacijama u studiju uključena samo 2 bolesnika s translokacijom *c-MYC*, statistička analiza nije bila moguća.

4.5.4. Imunohistokemijski algoritmi

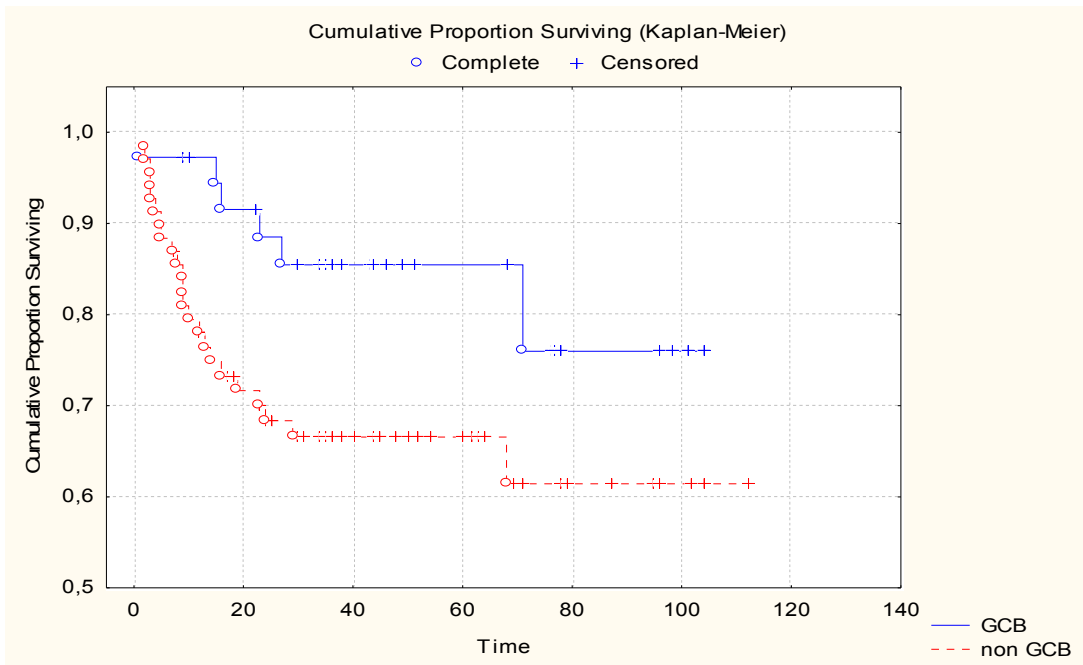
Analizirana je raspodjela 107 bolesnika na GCB i non-GCB (ABC) skupine prema četiri opisane algoritma. Samo je podjelom prema algoritmu Hans i sur. utvrđena statistički značajna razlika u preživljenju bez događaja (EFS) ($p=0.038$), te granično značajna razlika u ukupnom preživljenju ($p=0.053$) nakon podjele na GCB i non-GCB skupinu. U tablici 7 prikazani su rezultati podjele prema sva četiri algoritma u odnosu na EFS i OS.

Tablica 7. EFS i OS prema algoritmima prema Hans, Choiju i modifikacijama algoritama (log-rank test).

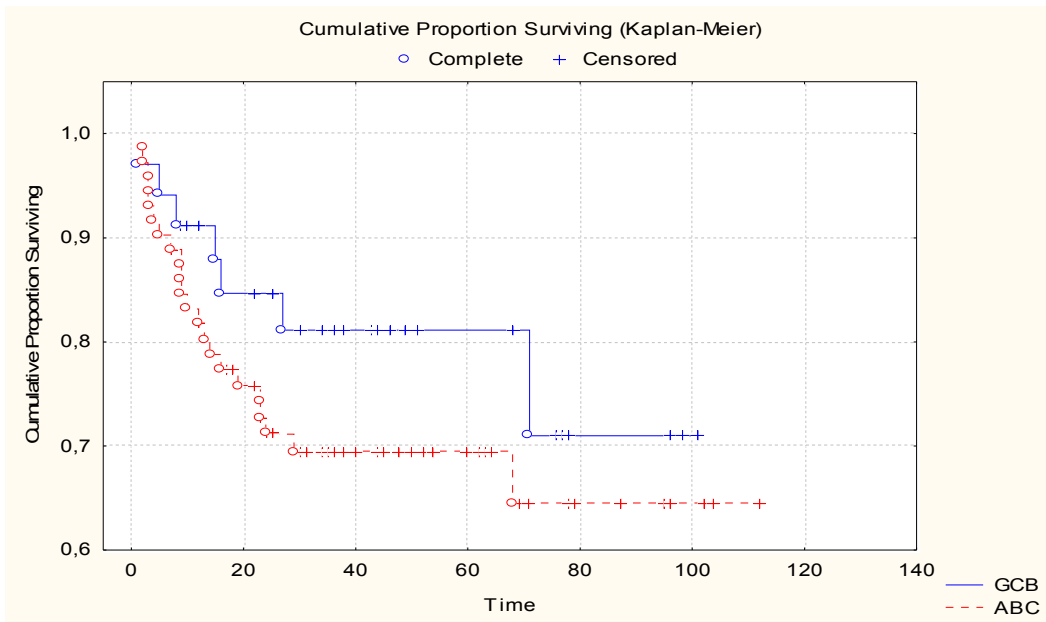
Algoritam	EFS	OS
Hans	$p=0.038$	$p=0.053$
Choi	$p=0.264$	$p=0.450$
Hans*	$p=0.296$	$p=0.152$
Choi*	$p=0.558$	$p=0.606$

*modifikacije izvornih algoritama prema Meyeru i sur. (53)

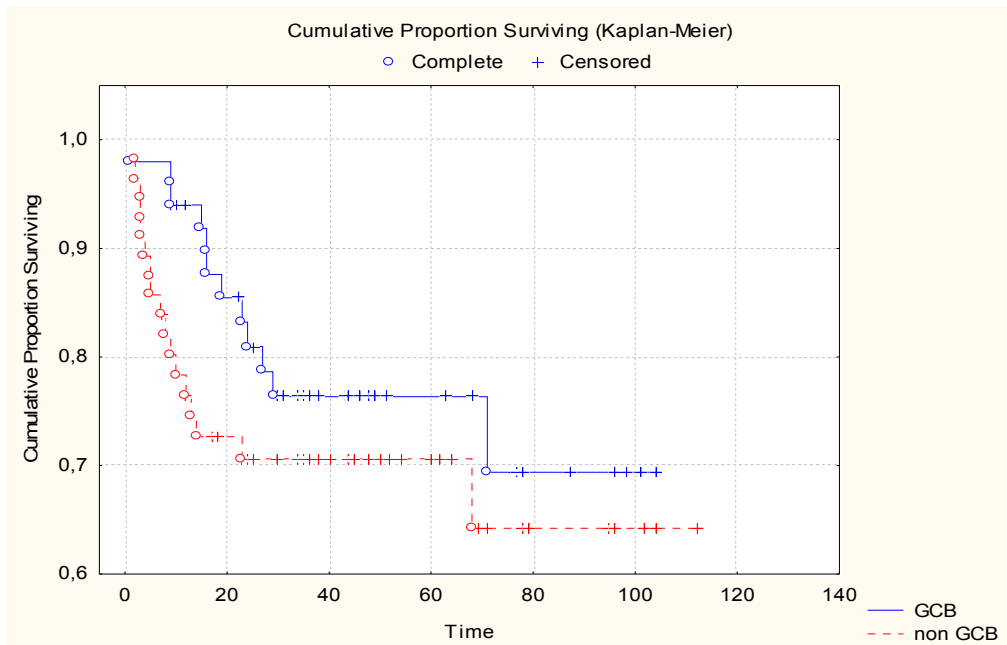
Na slikama 15. i 16. prikazane su krivulje EFS i OS nakon podjele na GCB i non-GCB (ABC) skupine prema sva 4 algoritma.



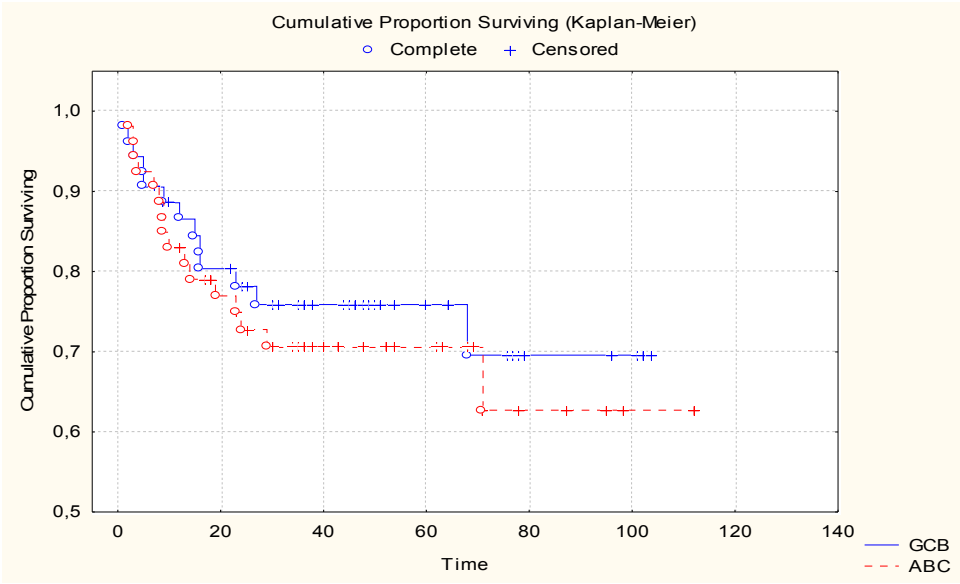
a)



b)

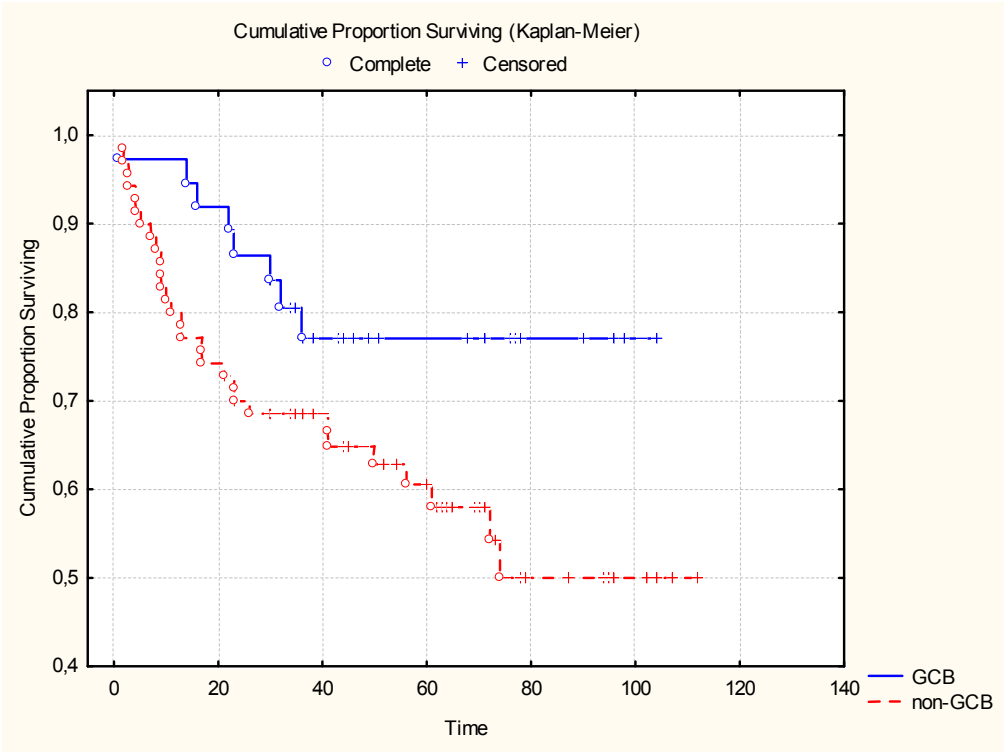


c)

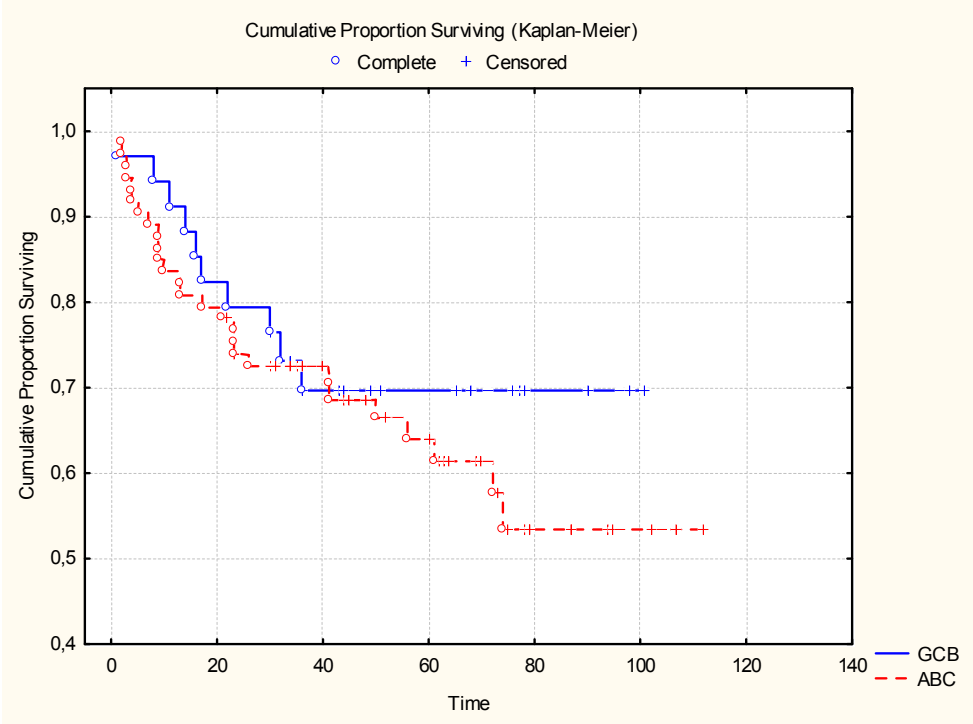


d)

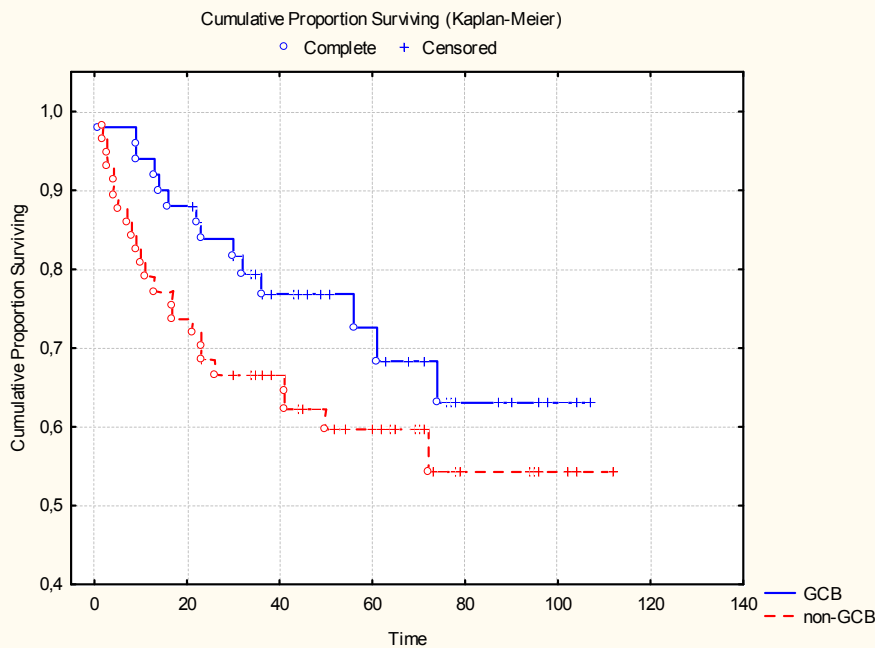
Slika 15. EFS prema algoritmima: A) Hans, B) Choi, C) Hans s modifikacijom, D) Choi s modifikacijom.



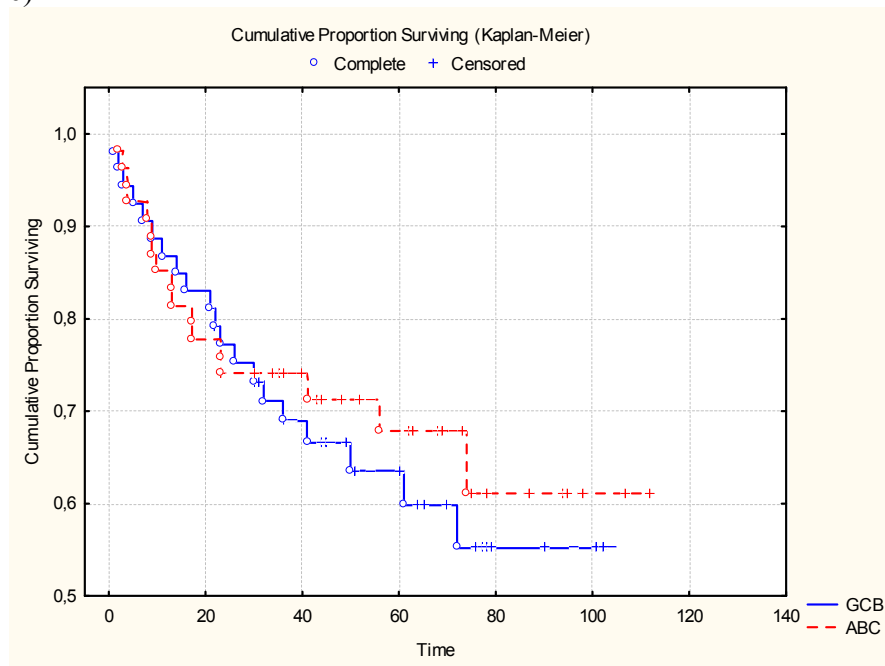
a)



b)



c)



d)

Slika 16. OS prema prema algoritmima: A) Hans, B) Choi, C) Hans s modifikacijom, D) Choi s modifikacijom.

Analizom preživljenja na skupini bolesnika liječenih po protokolu R-CHOP (ili sličnom protokolu baziranom na antraciklinima) nije utvrđena značajna razlika u EFS i OS nakon podjele na GCB i non-GCB (ABC) skupinu niti prema jednom algoritmu. Također, razlika nije dokazana niti u skupini bolesnika koji su liječeni CHOP ili sličnim antraciklinskim protokolom bez rituksimaba.

Prema modificiranom algoritmu Hans i sur. nađena je statistički značajna povezanost s odgovorom na terapiju: kod bolesnika u non-GCB skupini češće nije bilo odgovora na terapiju ili je nastupila progresija bolesti ($\chi^2= 6.568$, $df=2$, $p=0.037$). Nakon podjele prema ostalim algoritmima nije nađena povezanost s odgovorom na terapiju.

Nakon podjele prema Hans i sur. nađena je značajno veća učestalost relapsa u prognostički nepovoljnoj (non-GCB) skupini ($\chi^2= 6.973$, $df=1$, $p=0.008$), dok u drugim algoritmima nije bilo značajne razlike.

Također je utvrđena povezanost sa smrtnim ishodom kod bolesnika u non-GCB skupini prema algoritmu Hans i sur. ($\chi^2=4.198$, $df=1$, $p=0.040$), što nije nađeno nakon podjele prema ostalim algoritmima.

4.5.5. Ostali prognostički parametri

Na promatranoj skupini bolesnika utvrđena je povezanost preživljenja s dobi bolesnika; 54 bolesnika dijagnosticirana u dobi ≥ 60 godina imali su značajno kraće preživljenje EFS ($p=0.047$) i OS ($p=0.006$). Kao loši prognostički parametri u odnosu na EFS i OS potvrđeni su i lošije opće stanje bolesnika (ECOG > 1) (EFS $p=0.000$ i OS $p=0.000$), stadij bolesti III i IV (EFS $p=0.000$, OS $p=0.004$), IPI *score* 3 i više (EFS $p=0.000$, OS $p=0.000$), povišena serumska razina LDH (EFS $p=0.017$, OS $p=0.009$) te pojava relapsa bolesti (EFS $p=0.000$, OS $p=0.000$).

Također je utvrđena povezanost zahvaćenosti 2 ili više ekстранodalne lokalizacije osnovnom bolešću s lošijom prognozom; EFS ($\chi^2=9.263$, $df=2$, $p=0.009$) i OS ($\chi^2=7.047$, $df=2$, $p=0.029$).

Nije bilo značajne razlike u EFS i OS između bolesnika s primarnim nodalnim i ekстранodalnim DLBCL.

U odnosu na primljenu terapiju, najkraće preživljenje imala je skupina od 9 bolesnika s DLBCL liječenih terapijom koja nije uključivala R-CHOP, CHOP ili slične protokole bazirane na antraciklinima (kao što su CVP, COP ili R-CVP). Kod njih je nađena značajna razlika u odnosu na ostale dvije skupine bolesnika liječene R-CHOP ili CHOP protokolima; EFS ($\chi^2=9.820$, $df=2$, $p=0.007$) i OS ($\chi^2=7.482$, $df=2$, $p=0.023$).

5. RASPRAVA

Ovom studijom dobiveni su neočekivani rezultati usporedbe učinkovitosti dva predložena imunohistokemijska algoritma s obzirom na prognozu bolesnika s DLBCL. Na promatranoj skupini bolesnika algoritam prema Hans i sur. pokazao je veću prognostičku vrijednost u podjeli na GCB i non-GCB podskupinu nego algoritam prema Choiju i sur. koji uključuje dva nova, specifična biljega stanica porijekla aktiviranih limfocita, odnosno germinativnog centra. Retrospektivna studija je u početku obuhvatila 110 bolesnika s dijagnozom DLBCL-NOS, od kojih su nakon dodatne analize izbačena 3 bolesnika kod kojih su utvrđene dvostruke kromosomske translokacije čime su svrstani u zasebnu još uvijek nejasnu kategoriju agresivnih limfoma. Završno je stoga u istraživanje uključeno 107 bolesnika. Značajna povezanost preživljenja bolesnika s do sada priznatim prognostičkim parametrima kao što su nepovoljni IPI, dob \geq 60 godina, 2 ili više ekстранodalnih lokalizacija, stadij bolesti III i IV upućivala je na reprezentativnost promatrane skupine bolesnika.

U analiziranoj skupini bolesnika s DLBCL nije dokazana povezanost biljega CD5 i CD43 niti translokacije *c-MYC* s prognostički nepovoljnom podskupinom non-GCB (ABC) nakon podjele prema imunohistokemijskim algoritmima Hans i sur. i Choija i sur. Razlog je vjerojatno mali uzorak bolesnika i niska učestalost biljega CD5 i translokacije *c-MYC* u ovim tumorima.

Od ukupno 110 bolesnika s DLBCL-NOS *c-MYC* translokacija potvrđena je kod njih 5 (4.5%), što je neznatno manje nego u većini objavljenih studija - postoci variraju od 4% u studiji Obermann i sur (100) do 14% u studiji Barrans i sur (94). Od 5 uzoraka s potvrđenom translokacijom *c-MYC* samo u jednom DLBCL kao translokacijski partner dokazan je lokus *IGH*. Postotak detektiranih translokacija možda bi bio i veći da su u istraživanju korištene probe za FISH specifično dizajnirane za različite translokacijske partnere. Komercijalno se dostupnim probama, naime, mogu dokazati najčešće točke loma, ali one ne pokrivaju različite neuobičajene točke loma koje su osobito česte kada su translokacijski partneri ostali geni, poput *IGK* ili *IGL*. Osim toga, dio bolesnika s potvrđenom translokacijom *c-MYC* naknadno je isključen je iz istraživanja zbog dodatnih translokacija *BCL2* i *BCL6*. Limfomi s navedenim dvostrukim ili trostrukim translokacijama danas se smatraju heterogenom skupinom tumora koji se prema klasifikaciji SZO provizorno svrstavaju dijelom u kategoriju DLBCL, a dijelom u intermedijarnu kategoriju neklasificiranih B-limfoma s osobinama između Burkittovog limfoma i DLBCL (2). Poznato je da ovi bolesnici, osobito podskupina s translokacijama *c-MYC* i *BCL2*, imaju izrazito nepovoljnu prognozu s vrlo lošim odgovorom na danas dostupne terapijske protokole (107, 108). Ova skupina limfoma razlikuje se po patogenezi i citogenetskim osobinama od klasičnih DLBCL, čak i u slučajevima kada se od njih morfološki ne razlikuju (96, 107), zbog čega se u budućim klasifikacijama može očekivati da budu izdvojeni u posebnu skupinu agresivnih B-limfoma. U ovom istraživanju oba bolesnika s dokazanim translokacijama *c-MYC* i *BCL2* imala su loš odgovor na terapiju (u oba slučaja R-CHOP protokol) i kratko preživljenje (11 i 22 mjeseca) sa smrtnim ishodom. Ti rezultati u

skladu su s podacima ostalih objavljenih istraživanja (97,98,108). Bolesnici s dvostrukim translokacijama (dijagnozom „*double hit*“ limfoma) isključeni su iz ove studije s ciljem da u konačnu analizu budu uključeni bolesnici s biološki precizno definiranom dijagnozom DLBCL-NOS. Završno, kod skupine od 107 bolesnika s jasnom dijagnozom DLBCL-NOS samo je u dva slučaja utvrđena translokacija *c-MYC* što je bilo nedovoljno za daljnju statističku obradu. Prema oba algoritma, jedan od bolesnika s *c-MYC* translokacijom bio je u non-GCB (ABC) skupini, a jedan u GCB skupini.

Međutim, čak i kada je statističkom analizom obrađena čitava skupina od 110 bolesnika s DLBCL koja uključuje i tumore s dvostrukim translokacijama (uključena su bila 3 bolesnika izdvojene kategorije agresivnog limfoma), nisu nađene značajne razlike u rezultatima s obzirom na analizirane ishode (odgovor na terapiju, EFS, OS, ishod).

U slučaju CD5 i CD43 nije dokazana statistički značajna povezanost s različitim prognostičkim skupinama, međutim uočen je trend grupiranja biljega CD5 i CD43 u non-GCB (ABC) skupini prema oba algoritma. Rezultati upućuju na moguću povezanost ovih biljega s prognostički nepovoljnim skupinama navedenim imunohistokemijskim algoritmima, za što je potrebno izraditi studije na većem uzorku bolesnika. Osim toga, rezultati granično značajne češće učestalosti ekspresije CD43 u BCL6-negativnim tumorima ($p=0.052$) i u GCET1-negativnim uzorcima ($p=0.052$) također govore u prilog povezanosti ekspresije biljega CD43 s non-GC imunohistokemijskim fenotipom DLBCL.

Ekspresija biljega CD43 nije povezana s lošijim preživljenjem, odgovorom na terapiju niti s ishodom bolesnika s DLBCL u ovoj studiji. Dokazana je u 24% DLBCL, što odgovara učestalosti ekspresije u ostalim objavljenim studijama (u rasponu od 16-28%) (39, 43). Iako je u jednoj studiji nađena povezanost ekspresije CD43 s preživljenjem (75), ovo istraživanje razlikovalo se od navedenog po upotrebi TMA u analizi tumorskog tkiva te po preciznije definiranim kriterijima dijagnoze DLBCL-NOS, što je moglo utjecati na razlike u dobivenim rezultatima.

U analiziranoj skupini bolesnika nađena je značajno učestalija ekspresija biljega CD43 kod muških bolesnika s DLBCL. U studiji Medine i sur. dokazano je da estrogen utječe na smanjenu ekspresiju CD43 kod miševa i da u koštanoj srži miša postoje hormonski ovisni mehanizmi koji sudjeluju u regulaciji normalne B-limfopoeze (109, 133). Iako ovi rezultati nisu potvrđeni na ljudima, mogli bi dijelom objasniti zašto je u promatranoj skupini značajno manji postotak žena s CD43-pozitivnim limfomima.

Zanimljiv je i rezultat o povezanosti ekspresije CD43 s normalnim vrijednostima LDH u krvi. U danas dostupnoj literaturi ne postoje podaci koji bi objasnili povezanost ekspresije CD43 na tumorskim stanicama s normalnim vrijednostima LDH, međutim moglo bi se pretpostaviti da posrednim mehanizmima CD43 preko kontrole aktivacije ekspresije drugih receptora utječe na koncentraciju LDH.

U ovom istraživanju ekspresija CD5 dokazana je u 7,5% DLBCL. Slični rezultati nađeni su u drugim istraživanjima provedenim na bolesnicima iz zapadnih zemalja (od 5,5% u studiji Ott i sur (46), do samo 2% u studiji Coloma i sur (36), dok je nešto veća učestalost dokazana u studijama na azijskoj populaciji (10% u studiji Yamaguchi i sur. (84) i 12% u studiji Hyo i

sur. (85)). Prema nekim istraživanjima ekspresija CD5 u DLBCL povezana je s uznapređovalim stadijem bolesti, učestalijim zahvaćanjem CNS-a i lošijim preživljenjem, a značajno prognostičko značenje zadržala je i u eri imunokemoterapije (28,44,45). U ovoj studiji nije nađena značajna povezanost CD5 s preživljenjem, niti s ostalim promatranim parametrima, što je u skladu s dijelom objavljenih istraživanja (36, 55). Međutim, na rezultat je mogao utjecati i relativno mali ukupan broj bolesnika s ekspresijom CD5.

Postoci ekspresije biljega CD10 (22%), BCL6 (69%) i MUM1 (60%) u skladu su s očekivanim postocima prema većini objavljenih studija. Međutim velike razlike u ekspresiji svih navedenih biljega među različitim studijama (20-60% za CD10, 60-90% za BCL6 i 35-65% za MUM1) (52,64,69,110) upućuju na problem uporabe različitih protutijela, reproducibilnosti imunohistokemijskih bojenja i njihove interpretacije. Studija Lunenburškog Limfomskog Biomarkerskog Konzorcija potvrdila je velike razlike u osjetljivosti i reproducibilnosti imunohistokemijske analize različitih biljega kod DLBCL, među kojima se izrazito nepouzdanim pokazao biljeg BCL6 (64).

Rezultati imunohistokemijske analize ekspresije biljega korištenih u oba algoritma (CD10, BCL6, MUM1, FOXP1 i GCET1) nisu pokazali povezanost niti jednog pojedinačnog biljega s preživljenjem ili ishodom bolesti. Iako postoje studije u kojima je dokazana povezanost ekspresije FOXP1 s nepovoljnom prognozom kod DLBCL (63, 98), ti rezultati nisu potvrđeni na ispitivanoj skupini bolesnika.

Prema algoritmu Hans i sur. 35% bolesnika u ovoj studiji imalo je GCB fenotip, a 65% non-GCB fenotip, dok je prema Choijevom algoritmu bio je nešto manji postotak bolesnika u GCB skupini (32%). S obzirom na razliku u redosljedju analiziranja biljega, biljeg BCL6 u Choijevom algoritmu postao je manje značajan za konačnu podjelu, što je nadomješteno uvođenjem novih protutijela GCET1 i FOXP1. U izvornoj studiji ovakva podjela bolje je korelirala s rezultatima analize genske ekspresije. Međutim, oba protutijela pokazala su se zahtjevnima za dobivanje adekvatne imunohistokemijske reakcije u tkivu kao i za interpretaciju rezultata. U ovoj studiji korišten je isti klon kao u izvornoj Choijevoj studiji, a ekspresija FOXP1 nađena je u čak 72% uzoraka (točan postotak ekspresije nije naveden u izvornoj studiji). Visoki postotak u ovoj skupini bolesnika upućuje na mogući problem s nedovoljnom specifičnošću protutijela.

U vrijeme kad je objavljena Choijeva studija, protutijelo za GCET1 nije bilo komercijalno dostupno i autori su koristili eksperimentalno protutijelo proizvedeno u laboratoriju Dr. M. Pirisa (Španjolska). Isti klon korišten je u kasnije objavljene dvije studije od kojih je jedna potvrdila prognostičku značajnost Choijevog algoritma (53), a druga nije dobila povezanost s prognozom (63). U ovom radu korišteno je komercijalno protutijelo za GCET1 (klon RAM341, Abcam, Cambridge, MA, USA). Ekspresija biljega GCET1 nađena je u 39% bolesnika. U dvije dosadašnje studije iste skupine autora u kojima je primijenjen Choijev algoritam nađena je značajna povezanost imunohistokemijski definirane ABC-podskupine s nepovoljnom prognozom (52,53), dok ovdje prikazani rezultati ne potvrđuju tu povezanost. Razlike se mogu objasniti nedovoljnom osjetljivošću korištenog protutijela za GCET1 i izrazito problematičnom interpretacijom imunohistokemijske reakcije na rezovima iz

parafinskih kocaka. S obzirom da je ekspresija biljega GCET1 u ovom algoritmu jedan od najvažnijih parametara za podjelu na GCB i ABC podskupinu, opisani problemi mogu značajno utjecati na reproducibilnost rezultata.

U multicentričnoj studiji Britanske i Švicarske grupe autora ispitivana je varijabilnost u imunohistokemijskim reakcijama i interpretacijama rezultata imunohistokemije na primjeru DLBCL (106). Utvrđena je niska razina reproducibilnosti rezultata za biljege GCET1, FOXP1 i BCL6, što je u skladu s iskustvima laboratorija u kojemu je ovaj rad izrađen.

S obzirom da su protutijela za FOXP1 i GCET1 relativno nova i ne koriste se rutinski u većini laboratorija, u budućnosti bi se standardizacijom interpretacije ovih imunohistokemijskih bojenja (prema uzoru na preporuke Lundenburškog Limfomskog Biomarkerskog Konzorcija za ostale biljege) te poboljšavanjem senzitivnosti i specifičnosti klonova mogla značajno poboljšati reproducibilnost postojećih ili novih imunohistokemijskih algoritama. Nedavno je objavljena studija Gualco i sur. koji su analizirali algoritme prema Hans i Choiju na skupini od 424 DLBCL uz uvođenje novog protutijela HGAL/GCET2. (135). Prema njihovim rezultatima HGAL/GCET2 je pouzdan i specifičan biljeg stanica germinativnog centra s većom osjetljivošću od do sada korištenih biljega. Uključivanjem ovoga biljega postojeći algoritmi mogli bi učinkovitije stratificirati bolesnike u prognostički različite skupine, iako bi za potvrdu takvih zaključaka bila potrebna korelacija s analizom GEP.

Primjenom algoritma prema Hans i sur. utvrđena je statistički značajna razlika u preživljenju bez događaja (EFS) ($p=0.038$), te granično značajna razlika u ukupnom preživljenju ($p=0.053$) nakon podjele na GCB i non-GCB skupinu. Nađena je i značajno veća učestalost relapsa u prognostički nepovoljnoj (non-GCB) skupini ($p=0.008$) te povezanost sa smrtnim ishodom kod bolesnika u non-GCB skupini ($p=0.040$). Takvi rezultati nisu dobiveni nakon podjele bolesnika prema ostalim opisanim algoritmima. Ovi rezultati u skladu su s dijelom objavljenih studija (45, 47, 48), iako su brojna istraživanja pokazala da je algoritam Hans i sur. izgubio prognostičku vrijednost u eri imunokemoterapije koja uključuje rituksimab (50-55).

Za razliku od studije Meyera i sur (53), modifikacijama izvornih algoritama prema Hans i Choiju u našoj skupini bolesnika nije postignuta učinkovitija stratifikacija na prognostički povoljnu i nepovoljnu skupinu. Jedino je prema modificiranom algoritmu Hans i sur. nađena značajna povezanost s odgovorom na terapiju.

Gutierrez-Garcia i sur (63) usporedili su 5 različitih imunohistokemijskih algoritama, među kojima su i algoritmi prema Hans i Choiju, na 157 bolesnika s DLBCL s obzirom na povezanost s preživljenjem i korelaciju s rezultatima GEP analize. Niti jedan od algoritama nije pokazao prognostičku vrijednost s obzirom na preživljenje. Nađena je statistički značajna korelacija između rezultata GEP analize i podskupina određenim prema algoritmu Hans i sur, za razliku od algoritma prema Choiju. Ovi rezultati u suprotnosti su sa studijom Meyera i sur. koji su osim prognostičke vrijednosti oba algoritma potvrdili i visoku podudarnost s rezultatima GEP. Obje skupine autora promatrale su homogenu populaciju bolesnika s DLBCL liječene imunokemoterapijom. Rezultati ovih studija i prikazane studije hrvatske

populacije bolesnika upućuju na utjecaj razlika u tehničkim mogućnostima laboratorija i manjak standardizacije u interpretaciji imunohistokemijskih bojenja.

Jedan od najvažnijih ciljeva današnjih znanstvenih istraživanja u hematopatologiji ostaje unaprijediti standardne prognostičke pokazatelje za bolesnike s DLBCL kao što je IPI, koje se temelje na kliničkim parametrima, ne uzimajući u obzir važne biološke razlike i porijeklo tumorskih stanica ove heterogene skupine tumora. Analizom GEP konzistentno je definirana podskupina bolesnika s lošijim odgovorom na terapiju i nepovoljnim ishodom, koja bi značajno profitirala primjenom specifičnijih terapijskih protokola. Danas dostupna protutijela i imunohistokemijski algoritmi nemaju osjetljivost i reproducibilnost da pouzdano, u različitim ustanovama, stratificiraju bolesnike u različite prognostičke skupine koje bi reflektirale kompleksne profile genske ekspresije GCB i ABC podskupine DLBCL. Sve dok tehnologija genskog čipa ne postane široko dostupna i rutinski primjenjiva metoda na temelju koje će se modificirati liječenje, postojat će potreba za usavršavanjem imunohistokemijskih algoritama.

U analiziranoj skupini bolesnika iz dvije velike institucije imunohistokemijski algoritam prema Hans i sur. ima veću vrijednost u subklasifikaciji bolesnika s DLBCL na prognostički povoljnu i nepovoljnu skupinu. Iako imunohistokemijski algoritmi s danas dostupnim protutijelima ne mogu pouzdano nadomjestiti molekularnu analizu ekspresije gena, primjena algoritma prema Hans i sur. pruža vrijednu informaciju na temelju koje se može pretpostaviti nepovoljnija prognoza kod bolesnika u non-GCB podskupini.

6. ZAKLJUČCI

- Biljezi CD5 i CD43 nisu povezani s prognostički nepovoljnom podskupinom non-GCB (ABC) određenoj prema imunohistokemijskim algoritmima Hans i sur. i Choi i sur., ali uočen je trend grupiranja biljega CD5 i CD43 u non-GCB (ABC) skupini prema oba algoritma
- Translokacija gena *c-MYC* potvrđena je kod manjeg broja bolesnika nego što je očekivano, zbog čega nije bilo moguće analizirati eventualnu povezanost s imunohistokemijski definiranim GCB i non-GCB/ABC podskupinama niti prognostičko značenje. Učestalost translokacije gena *c-MYC* kod ove je populacije bolesnika u skladu s najnižim učestalostima u do sada objavljenim studijama.
- Imunohistokemijski algoritam prema Hans i sur. ima veću vrijednost u subklasifikaciji bolesnika s DLBCL na prognostički povoljnu i nepovoljnu skupinu nego algoritam prema Choiju i sur.
- Ekspresije biljega CD43 i CD5 nisu povezane s lošijim preživljenjem, odgovorom na terapiju niti s ishodom bolesnika s DLBCL.

Navedeni rezultati upućuju na važnost isprobavanja različitih imunohistokemijskih algoritama u pojedinačnim ustanovama prije implementacije bilo kojega algoritma u svakodnevnoj rutinskoj praksi. S obzirom na različite rezultate u studijama provedenim u velikim istraživačkim centrima, konačna vrijednost algoritama velikim dijelom ovisi o tehničkim specifičnostima svakoga laboratorija i vrstama protutijela. S obzirom na današnji standardni terapijski protokol koji uključuje imunokemoterapiju, imunohistokemijska subklasifikacija bolesnika na prognostički povoljnu i nepovoljnu skupinu nije adekvatna zamjena genskoj analizi tumorskog tkiva i ima ograničenu vrijednost u pružanju prognostičke informacije kod bolesnika s DLBCL.

7. SAŽETAK

Difuzni B-velikostanični limfom, bez osobitosti (DLBCL-NOS) je heterogena skupina agresivnih non-Hodgkinovih limfoma kod kojih postoji potreba za novim prognostičkim parametrima temeljenim na molekularnim osobinama i ekspresiji biljega koji se mogu analizirati imunohistokemijskim metodama. Studija je obuhvatila 107 bolesnika s DLBCL-NOS koji su podijeljeni u GCB i non-GCB/ABC podskupinu prema imunohistokemijskim algoritmima Hans i sur. i Choija i sur. kako bi se ispitala njihova prognostička vrijednost i eventualna povezanost s ostalim prognostičkim parametrima. U podskupini bolesnika s non-GCB imunofenotipom prema algoritmu Hans i sur. nađena je značajna povezanost s lošijim preživljenjem, pojavom relapsa i nepovoljnim ishodom bolesti. Nakon podjele prema Choijevom algoritmu nije utvrđena povezanost GCB i ABC podskupina s preživljenjem, pojavom relapsa niti ishodom. Rezultati pokazuju da u promatranoj skupini bolesnika primjena algoritma prema Hans i sur. pruža korisniju prognostičku informaciju nego algoritam prema Choiju i sur.

Analizirano je i prognostičko značenje biljega CD5 i CD43 te translokacije *c-MYC* kod bolesnika s DLBCL, te njihova korelacija s podjelom na GCB i non-GCB/ABC podskupine prema oba algoritma. Nije utvrđena značajna povezanost s preživljenjem, odgovorom na terapiju ili ishodom bolesti za biljege CD5 i CD43, a analiza prognostičkog značenja translokacije *c-MYC* nije bila moguća zbog malog broja uzoraka s dokazanom translokacijom. Povezanost ekspresije CD5 i CD43 s non-GCB/ABC podskupinom prema oba algoritma nije bila statistički značajna, iako je uočeno da se oba biljega češće pojavljuju u toj podskupini (75% tumora s dokazanom ekspresijom CD5 bilo je u non-GCB/ABC skupini prema oba algoritma, a 73% i 81% uzoraka s ekspresijom CD43 svrstano je u non-GCB/ABC skupinu prema algoritmu Hans i sur. odnosno Choija i sur.). Aberantna ekspresija ovih biljega u tumorskim stanicama, te češća ekspresija CD43 u BCL6-negativnim i GCET1-negativnim slučajevima DLBCL govori u prilog povezanosti ekspresije CD5 i CD43 s prognostički nepovoljnom skupinom DLBCL i sugerira ulogu ovih proteina u putovima onkogeneze odgovornim za nastanak agresivnijeg oblika bolesti. Ovo istraživanje daje uvid u patogenezu DLBCL-a te dokazuje probleme u primjeni imunohistokemijskih algoritama.

8. SUMMARY

Immunohistochemical algorithms for diffuse large B cell lymphoma subclassification

Snježana Dotlić, 2012.

Diffuse large B cell lymphoma, not otherwise specified (DLBCL-NOS) is a heterogenous group of aggressive non-Hodgkin lymphomas for which new molecular and immunohistochemical prognostic parameters are needed. This study included 107 patients with DLBCL-NOS stratified into GCB and non-GCB/ABC subgroup according to the immunohistochemical algorithms proposed by Hans et al. and Choi et al. with a purpose to analyse their prognostic value and correlation to other prognostic parameters. Patients in the non-GCB group according to the Hans' algorithm had significantly shorter event free survival, higher frequency of relapse and unfavorable outcome. No prognostic significance was observed after subclassification according to the Choi's algorithm. These results imply that in the observed patient group immunohistochemical subclassification according to the Hans' algorithm offers better prognostic information than Choi's algorithm.

This study was also undertaken to test the prognostic significance of CD5 and CD43 markers, as well as *c-MYC* translocation in DLBCL. Also, the distribution of CD5 and CD43 expression in the GCB and non-GCB/ABC groups was analyzed according to both algorithms. There was no significant correlation between CD5 and CD43 expression and survival, response to therapy or outcome. Prognostic significance of *c-MYC* translocation could not be analyzed because the incidence of *c-MYC* translocation in this group of patients was lower than expected.

Although the correlation between CD5 and CD43 expression and non-GCB/ABC subgroup did not reach statistical significance, both markers were more frequently distributed in the non-GCB/ABC subgroup. Abberant expression of these markers in tumor cells, as well as correlation between CD43 expression and lack of BCL6 and GCET1 in tumor cells implicates a role these proteins might have in the oncogenesis of the more aggressive form of disease. The study gives a new insight into DLBCL pathogenesis and demonstrates the practical problems in the application of immunohistochemical algorithms in the routine clinical practice.

9. LITERATURA

1. Willett EV, Roman E. Lymphoma overview. U: Marcus R, Sweetenham JW, Williams ME (ur). Lymphoma Pathology, Diagnosis and Treatment. London (UK), Cambridge University Press; 2005; 3-11.
2. Swerdlow SH, Elias C, Harris NL i sur. (ur). WHO classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed.: Lyon (FR): IARC Press; 2008.
3. Incidencija raka u Hrvatskoj 2009, Bilten br. 34. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2010.
4. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 1998; 9:717-720.
5. The non Hodgkin lymphoma pathologic classification project. National Cancer Institute. Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer* 1982;49:2212-2235.
6. Ioachim HL, Dorsett B, Cronin W i sur. Acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas: clinical, pathologic, immunologic, and viral characteristics of 111 cases. *Hum Pathol* 1991;22:659-673.
7. Filipovich AH, Heinitz KJ, Robison LL i sur. The immunodeficiency cancer registry. A research resource. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1987;9:183-184.
8. Matas AJ, Hertel B, Rosai J i sur. Post-transplant malignant lymphoma. *Am J Med* 1976;61:716-720.
9. Ioachim HL. Neoplasms associated with immune deficiencies. *Pathol Annu* 1987;22:177-222.
10. Ioachim HL. Immune deficiency: opportunistic tumors. U: Encyclopedia of cancer, vol II. San Diego, CA: Academic Press, 2002;469-485.
11. Harris NL, Jaffe ES, Stein H i sur. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal for the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
12. Bautista-Quach MA, Ake CD, Chen M, Wang J. Gastrointestinal lymphomas: Morphology, immunophenotype and molecular features. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3:209-225.
13. Campbell J, Seymour JF, Matthews J i sur. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur J Haematol* 2006;76:473-480.

14. Chung R, Lai R, Wei P i sur. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood* 2007;110:1278-1282.
15. Coiffier B. Treatment of non-Hodgkin's lymphoma: a look over the past decade. *Clin Lymphoma Myeloma* 2006;1:7-13.
16. The International Non Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329:987-994.
17. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 89:3909-3918.
18. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M i sur. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007 Mar 1;109:1857-1861.
19. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE i sur. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-511.
20. Rosenwald A, Wright G, Chan WC i sur. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-1947.
21. Rosenwald A, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003;443:S41-7.
22. Fu K, Weisenburger DD, Choi WWL i sur. Addition of Rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008;26:4587-94.
23. Lenz G, Wright G, Dave SS i sur. Stromal gene signatures in large B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008;359:2313-2323.
24. Wright G, Tan B, Rosenwald A i sur. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9991-9996.
25. Koivula S, Valo E, Raunio A, Hautaniemi S, Leppä S. Rituximab regulates signaling pathways and alters gene expression associated with cell death and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Rep* 2011;25:1183-1190
26. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA i sur. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 2004; 350:1828-1837.
27. Malumbres R, Chen J, Tibshirani R i sur. Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Blood* 2008; 111:5509-5514.

28. Lossos IS, Alizadeh AA, Rajapaksa R i sur. HGAL is a novel interleukin-4-inducible gene that strongly predicts survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101:433-440.
29. Bea S, Zettl A, Wright G i sur. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005; 106:3183-3190.
30. Chan WC, Armitage JO. Genomic analysis of lymphoma: potential for clinical application. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010 Mar;8(3):353-60.
31. Green MR, Aya-Bonilla C, Gandhi MK i sur. Integrative genomic profiling reveals conserved genetic mechanisms for tumorigenesis in common entities of non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:313-326.
32. Bentink S, Wessendorf S, Schwaenen C i sur. Pathway activation patterns in diffuse large B-cell lymphomas. *Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project*. *Leukemia* 2008;22:1746-1754.
33. Booman M, Szuhai K, Rosenwald A i sur. Genomic alterations and gene expression in primary diffuse large B-cell lymphomas of immune-privileged sites: the importance of apoptosis and immunomodulatory pathways. *J Pathol* 2008;216:209-217.
34. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC i sur. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103:275-282.
35. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP i sur. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:464-470.
36. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M i sur. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101:78-84.
37. Haarer CF, Roberts RA, Frutiger YM, Grogan TM, Rimsza LM. Immunohistochemical classification of de novo, transformed, and relapsed diffuse large B-cell lymphoma into germinal center B-cell and non germinal center B-cell subtypes correlates with gene expression profile and patient survival. *Arch Pathol Lab Med*. 2006; 130:1819-1824.
38. Moskowitz CH, Zelenetz AD, Kewalramani T i sur. 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;106:3383-3385.
39. Jablonska J, Jesionek-Kupnicka D, Potemski P i sur. Comparison of two different immunohistochemical algorithms identifying prognostic subgroups of DLBCL. *Pol J Pathol*. 2010;3:124-132.

40. Veelken H, Vik Dannheim S, Schulte Moenting J, Martens UM, Finke J, Schmitt-Graeff A. Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy. *Ann Oncol.* 2007;18:931-939.
41. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML. i sur. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod Pathol.* 2009;22:1094-1101.
42. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W i sur. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol.* 2006;208:714-723.
43. Molina TJ, Gaulard P, Jais J-P. i sur. Germinal center phenotype determined by immunohistochemistry on tissue microarray does not correlate with outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy in the randomized trial LNH98-5. A GELA study. *Blood.* 2007;110:24a.
44. Ilic I, Mitrovic Z, Aurer I i sur. Lack of prognostic significance of the germinal center phenotype in diffuse large B cell lymphoma patients treated with CHOP-like chemotherapy with and without rituximab. *Int J Hematol.* 2009;90:74-80.
45. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML i sur. Prognostic impact of immunohistochemistry defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood* 2007;109:4930-4935.
46. Ott G, Ziepert M, Klapper W i sur. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/non GCB classifier predicts outcome in diffuse large B cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood* 2010;116:4916-4925.
47. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC i sur. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996; 88:1046-1051.
48. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP i sur. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:464-470.
49. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T i sur. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001; 412:341-346.
50. Haarer CF, Roberts RA, Frutiger YM i sur. Immunohistochemical classification of de novo, transformed, and relapsed diffuse large B cell lymphoma into germinal center B-cell and nongerminal center B-cell subtypes correlates with gene expression profile and patient survival. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1819-1824.

51. Barrans SL, Carter I, Owen RG i sur. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2002;99:1136-1143.
52. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC i sur. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5494-5502.
53. Meyer PN, Fu K, Greiner i sur. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 10;29:200-207.
54. Montes-Moreno S, Roncador G, Maestre L i sur. GCET1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas. *Blood*. 2008;111:351-358.
55. Fanoni D, Tavecchio S, Recalcati S i sur. New monoclonal antibodies against B-cell antigens: possible new strategies for diagnosis of primary cutaneous B-cell lymphomas. *Immunol Lett* 201130;134:157-160.
56. Wang B, Lin D, Li C, Tucker P. Multiple domains define the expression and regulatory properties of Foxp1 Forkhead transcriptional repressors. *J Biol Chem* 2003;27:24259-24268.
57. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2002;2:920-932.
58. Banham AH, Beasley N, Campo E i sur. The FOXP1 winged transcription factor is a novel candidate tumour suppressor gene on chromosome 3p. *Cancer Res* 2001;15:8820-8829.
59. Banham AH, Connors JM, Brown PJ i sur. Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1065-1072.
60. Barrans SL, Fenton JA, Banham A, Owen RG, Jack AS. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood*. 2004;104:2933-2935.
61. Hu CR, Wang JH, Wang R, Sun Q, Chen LB. Both FOXP1 and p65 expression are adverse risk factors in diffuse large B-cell lymphoma: A retrospective study in China. *Acta Histochem*. 2012;16.
62. Gu K, Weisenburger DD, Fu K i sur. Cell of origin fails to predict survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol*. 2011 Oct 18. doi: 10.1002/hon.1017
63. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F i sur. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011 May 5;117:4836-4843.

64. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M i sur. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol.* 2007 Mar 1;25:805-812
65. Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2000;24:846-852.
66. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q i sur. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 1997;16:161-170.
67. Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. Control of inflammation, cytokine expression and germinal center formation by BCL-6. *Science* 1997;276:589-592.
68. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L i sur. Distribution and pattern of Bcl-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood* 2000;95:651-659.
69. Kawasaki C, Ohshim K, Suzumiya J i sur. Rearrangements of Bcl-1, Bcl-2, Bcl-6 and c-myc in diffuse large B cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2001;42:1099-1106.
70. Tsuboi K, Iida S, Inagaki H i sur. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 2000;14:449-456.
71. Natkunam Y, Warnke RA, Montgomery K i sur. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2001;14:686-694.
72. Mittrucker HW, Matsuyama T, Grossman A i sur. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 1997;275:1075-1083.
73. Slymen DJ, Miller TP, Lippman SM i sur: Immunobiologic factors predictive of clinical outcome in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1990; 8:986-993.
74. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1989;1:27-35.
75. Mitrovic Z, Ilic I, Nola M i sur. CD43 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009;9:133-137.
76. Nola M, Lukenda A, Bollmann M, Kalauz M, Petrovecki M, Bollmann R. Outcome and prognostic factors in ocular adnexal lymphoma. *Croat Med J.* 2004;45:328-332.
77. Knowles DM. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms. U: Knowles DM (ur). *Neoplastic Hematopathology.* 2nd ed. Philadelphia, PA:Lipincott, Williams and Wilkins; 2001:93-226.

78. Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 1999;111:488-494.
79. Sikut R, Nilsson O, Baeckström D, Hansson GC. Colon adenoma and cancer cells aberrantly express the leukocyte-associated sialoglycoprotein CD43. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Sep 18;238(2):612-6.
80. Misawa Y, Nagaoka H, Kimoto H i sur. CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion. *Eur J Immunol*. 1996;26:2573-81.
81. Manazza AD, Bonello L, Pagano M i sur. Follicular origin of a subset of CD5+ diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2005;124:182-190.
82. Yamaguchi M, Ohno T, Oka K i sur. De novo CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma: clinical characteristics and therapeutic outcome. *Br J Haematol*. 1999;105:1133-1139.
83. Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G i sur. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood*. 2002; 100:4537-4543.
84. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M i sur. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood*. 2002;99:815-821.
85. Hyo R, Tomita N, Takeuchi K. i sur. The therapeutic effect of rituximab on CD5 positive and CD5 negative diffuse large B cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2010;28:27-32.
86. Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ i sur. Building an outcome predictor model for diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 2004;164:613-622.
87. Linderöth J, Jerkeman M, Cavallin-Stahl E, Kvaloy S, Torlakovic E. Immunohistochemical expression of CD23 and CD40 may identify prognostically favorable subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: A Nordic Lymphoma Group Study. *Clin Cancer Res*. 2003;9:722-728.
88. Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M i sur. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol*. 2008;19:1921-1926.
89. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S i sur. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2005;106:1770-1777.
90. Kume M, Suzuki R, Yatabe Y i sur. Somatic hypermutations in the VH segment of immunoglobulin genes of CD5 positive diffuse large B-cell lymphomas. *Jpn J Cancer Res*. 1997;88:1087-1093.
91. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt nad non-Burkitt's lymphomas. *Int J Cancer*. 1976;17:47-56.

92. Niitsu N, Okamoto M, Miura I i sur. Clinical Significance of 8q24/c-MYC translocations in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Sci* 2009;100:233-237.
93. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S i sur. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009;114:3533-3537.
94. 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;28:3360-3365.
95. Kramer MHH, Hermans J, Wijburg E i sur. Clinical Relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998;92:3152-3162.
96. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S i sur. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. *Leukemia*. 2008;22:2226-2229.
97. Offit K, Wong G, Filippa DA, Tao Y, Chaganti RS. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood*. 1991;77:1508-1515.
98. Gualco G, Weiss LM, Harrington WJ, Bacchi CE. Nodal diffuse large B-cell lymphomas in children and adolescents: immunohistochemical expression patterns and c-MYC translocation in relation to clinical outcome. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:1815-1822.
99. Tibiletti MG, Martin V, Bernasconi B i sur. BCL2, BCL6, MYC, MALT1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Hum Pathol*. 2009;40:645-652.
100. Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S, Tzankov A. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *J Clin Pathol*. 2009;62:754-756.
101. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C. i sur. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 1990;348: 334-336.
102. Fesus L, Davies PJ, Piacentini M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol*. 1991;56: 170-177.
103. Gotow T, Shibata M, Kanamori S. i sur. Selective localization of Bcl-2 to the inner mitochondrial and smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells. *Cell Death Differ*. 2000;7: 666-674.
104. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*. 2009;122: 437-441.
105. Petros AM, Medek A, Nettesheim DG. i sur. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98: 3012-3017.

106. Hill ME, Maclennan KA, Cunningham DC. i sur. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood*. 1996;88: 1046-1051.
107. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S. i sur. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90: 244-251.
108. De Paepe P, De Wolf-Peeters C. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogenous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia*. 2007;21:37-43.
109. Uccella S, Placidi C, Marchet S i sur. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1321-1328.
110. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD. i sur. BCL2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2012;26: 1383-1390.
111. Baseggio L, Geay MO, Gazzo S i sur. In non-follicular lymphoproliferative disorders, IGH/BCL2-fusion is not restricted to chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012;158: 489-498.
112. Summers KE, Goff LK, Wilson AG. i sur. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2001;19: 420-424.
113. Jager U, Bocskor S, Le T. i sur. Follicular lymphomas' BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood*. 2000;95: 3520-9.
114. Wilson KS, Sehn LH, Berry B. i sur. CHOP-R therapy overcomes the adverse prognostic influence of BCL-2 expression in diffuse large B cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2007;48: 1102-1109.
115. Deweindt C, Albagli O, Bernardin F. i sur. The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: a novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain. *Cell Growth Differ*. 1995;6:1495-1503.
116. Chang CC, Ye BH, Changanti RS, Dalla-Favera R. BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 6947-6952.

117. Pero R, Palmieri D, Abgriso T. i sur. POZ-, AT-hook-, and zinc finger-containing protein (PATZ) interacts with human oncogene B cell lymphoma 6 (BCL6) and is required for its negative autoregulation. *J Biol Chem.* 2012;287: 18308-18317.
118. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K. i sur. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood.* 1995;86: 45-53.
119. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature.* 2004;432: 635-639.
120. Basso K, Dalla-Favera R. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol.* 2010;105: 193-210.
121. Basso K, Saito M, Sumazin P. i sur. Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood.* 2010;115: 975-984.
122. Migliazza A, Martinotti S, Chen W. i sur. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92: 12520-12524.
123. Ueda C, Akasaka T, Ohno H. 2002 Non-immunoglobulin/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma: prognostic implications. *Leuk Lymphoma.* 2002;43: 1375-1381.
124. Ehinger M, Linderth J, Christensson B i sur. A subset of CD5- diffuse large B-cell lymphomas expresses nuclear cyclin D1 with aberrations at the CCND1 locus. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:630-638.
125. Natkunam Y, Lossos IS, Taidi B i sur. Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein, a new marker of germinal center B-cell derivation. *Blood* 2005; 105:3979-3986.
126. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P i sur. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8:68-74.
127. Rimsza LM, Leblanc ML, Unger JM i sur. Gene expression predicts overall survival in paraffin-embedded tissues of diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2008; 112:3425-3433.
128. Pescarmona E, De Sanctis V, Pistilli A i sur. Pathogenetic and clinical implications of Bcl-6 and Bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B-cell lymphomas. *J Pathol* 1997; 183:281-286.
129. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE i sur. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2004; 165:159-166.

130. Lawrie CH, Ballabio E, Soilleux E i sur. Inter- and intra-observational variability in immunohistochemistry: a multicentre analysis of diffuse large B cell lymphoma staining. *Histopathology* 2012;61:18-25.
131. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ i sur. 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;30:1-12.
132. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E i sur. Double hit lymphomas. *Blood* 2011;117:2319-2331.
133. Medina KL, Strasser A, Kincaid PW. Estrogen influences the differentiation, proliferation and survival of early B-lineage precursors. *Blood* 2000;95:2059-2067.
134. Berglund M, Thunberg U, Amini RM i sur. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol* 2005; 18:1113-1120.
135. Gualco G, Bacchi LM, Domeny-Duarte P i sur. The contribution of HGAL/GCET2 in immunohistochemical algorithms: a comparative study in 424 cases of nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2012; doi: 10.1038/modpathol.2012.119

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. prosinca 1974. u Osijeku. Diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1999. Nakon pripravničkog staža u Kliničkoj bolnici Merkur položila sam državni ispit 2000. Provela sam 9 mjeseci na Kansas University Medical School, Kansas City, KS, USA i 2001. položila ispit USMLE (United States Medical Licensing Exam). Nakon povratka u Republiku Hrvatsku završila sam specijalizaciju iz patološke anatomije na Kliničkom bolničkom centru Zagreb (2002-2006). U akademskoj godini 2005/06 završila sam Stručni poslijediplomski studij iz patologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. 2006. godine završila sam Znanstveni poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2006. sam zaposlena kao specijalist patolog na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. 2009. sam provela tri mjeseca na stručnom usavršavanju iz područja hematopatologije na Zavodu za patologiju i mikrobiologiju, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA pod mentorstvom Prof.dr. D.D.Weisenburgera.

Član sam European Association for Haematopathology (EAHP) i Hematopatološke sekcije Hrvatskog društva patologa i sudskih medicinara pri Hrvatskom liječničkom zboru. Jedan sam od autora 16 znanstvenih radova objavljenih u časopisima koji su indeksirani u bazi Current Contents.