

# Imunohistokemijska obilježja difuznog B velikostaničnog limfoma dijagnosticiranog u Kliničkom bolničkom centru Osijek

---

Đurković, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:984439>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Petra Đurković**

**IMUNOHISTOKEMIJSKA OBILJEŽJA  
DIFUZNOG B VELIKOSTANIČNOG  
LIMFOMA DIJAGNOSTICIRANOG U  
KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU  
OSIJEK**

**Završni rad**

**Osijek, 2021.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Petra Đurković**

**IMUNOHISTOKEMIJSKA OBILJEŽJA  
DIFUZNOG B VELIKOSTANIČNOG  
LIMFOMA DIJAGNOSTICIRANOG U  
KLINIČKOM BOLNIČKOM CENTRU  
OSIJEK**

**Završni rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren na Zavodu za hematologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vlatka Periša, dr. med.

Komentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rajc, dr. med.

Rad ima 22 lista, 5 tablica i 2 slike.

## **PREDGOVOR**

*Najprije bih se htjela posebno zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Vlatki Periši, dr. med. na pruženoj prilici za suradnju, nesebično izdvojenom vremenu i uloženom trudu tijekom izrade ovog završnog rada.*

*Veliko hvala mojoj komentorici doc. dr. sc. Jasmina Rajc, dr. med. na pomoći i izdvojenom vremenu.*

*Neizmjereno hvala mojim roditeljima na njihovom odricanju, beskonačnoj podršci i ohrabrivanju u ostvarivanju mojih ciljeva. Vama dugujem sve što danas jesam.*

*Hvala mojoj sestri što je uvijek vjerovala u mene i oraspoložila me kada mi je bilo najteže.*

*Posebno hvala osobi uz koju sam naučila da mogu sve. Hvala na svakom savjetu, razgovoru i najvećoj podršci.*

## SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Limfomi.....	1
1.2. Ne-Hodgkinovi limfomi.....	1
1.3. Klasifikacija B-velikostaničnih limfoma.....	1
1.4. Difuzni B velikostanični limfom.....	2
1.4.1. Epidemiologija difuznog B-velikostaničnog limfoma.....	3
1.4.2. Etiologija difuznog B-velikostaničnog limfoma.....	3
1.4.3. Imunohistokemijska podjela difuznog B-velikostaničnog limfoma.....	3
1.4.4. CD10.....	4
1.4.5. BCL6.....	5
1.4.6. MUM1.....	5
1.4.7. Podklasifikacija DLBCL zasnovana na MYC statusu .....	5
2. CILJ.....	6
3. BOLESNICI I METODE.....	7
3.1. Etička načela.....	7
3.2. Ustroj studije.....	7
3.3. Bolesnici.....	7
3.4. Metode.....	7
3.5. Statističke metode.....	8
4. REZULTATI.....	9
4.1. Demografske i kliničke značajke bolesnika.....	9
4.2. Imunohistokemijska obilježja.....	10
4.3. c-MYC translokacija.....	12

5. RASPRAVA.....	13
6. ZAKLJUČAK.....	15
7. SAŽETAK.....	16
8. SUMMARY.....	17
9. LITERATURA.....	19
10. ŽIVOTOPIS.....	22

## POPIS KRATICA

ABC - DLBCL podtip koji ima izražene gene slične aktiviranim B stanicama (engl. *activated B-cell like*)

ALL - akutna limfoblastična leukemija (engl. *acute lymphoblastic leukemia*)

ALP - anaplastični limfom kinaza (engl. *anaplastic lymphoma kinase*)

BCL2 - antiapoptotička bjelančevina (engl. *B-cell lymphoma 2*)

BCL6 - protein koji se nalazi u limfocitima B i pomoćničkim (CD4+) limfocitima T (engl. *B-cell lymphoma 6*)

B-LCL - B velikostanični limfom (engl. *B large cell lymphoma*)

CD10 - neprilizin, transmembranski glikoprotein

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

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

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

GCB - DLBCL podtip koji ima izražene gene slične stanicama podrijetla germinativnog centra (engl. *germinal centre B cell like*)

HHV8 - humani herpes virus 8

HIV - virus humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus*)

IPI - međunarodni prognostički indeks (engl. *International prognostic index*)

IRF4 - regulatorni faktor 4 za interferon

KBC - Klinički bolnički centar

LDH - laktat dehidrogenaza (engl. *lactate dehydrogenase*)

MUM1 - nuklearni transkripcijski faktor poznat kao i regulatorni faktor 4 za interferon

MYC - obitelj gena regulatora i protoonkogeni koji kodiraju faktore transkripcije

NE-GCB - DLBCL koji nisu podrijetla germinativnog centra (engl. *non germinal centre B cell like*)

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



NK stanice - prirodno ubilačke stanice (engl. *Natural killer cells*)

R-CHOP - kemoterapijski protokol: rituksimab, ciklofosfamid, doksorubicin (hidroksidaunorubicin), vinkristin (Oncovin), prednison, od inicijala lijekova korištenih u kemoterapijskom protokolu

SAD - Sjedinjene Američke države (eng. *United States of America, USA*)

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

SŽS - središnji živčani sustav

## 1. UVOD

### 1.1. Limfomi

Limfomi su zloćudne novotvorine limfnog tkiva (1). Limfociti tijekom svoje diferencijacije mutiraju deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA), taj proces omogućuje veliku raznolikost u građi T staničnih receptora, odnosno imunoglobulina, što nam omogućuje učinkovitu obranu od raznih infekcija. No međutim, taj proces podložan je greškama koje mogu dovesti do gubitka odgovora na uobičajene kontrolne mehanizme i prvog koraka u nastanku limfoma (2). Nastanku limfoma u prilog ide i izloženost genotoksičnim tvarima i ionizirajućem zračenju, trajna izloženost antigenskoj stimulaciji, prirođene greške u mehanizmima popravka oštećenja DNA i imunodeficijence T staničnog sustava (3). Iako limfomi mogu nastati u bilo kojem organu koji sadrži limfno tkivo, najčešće ih pak nalazimo u limfnim čvorovima (4). Podjela limfoma prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) temelji se na histološkim obilježjima tumora zajedno sa imunološkim, kliničkim i genetskim obilježjima (3). SZO dijeli zloćudne tumore limfocita u tri osnovne skupine: tumore limfocita B, tumore limfocita T i prirodno ubilačkih (NK) stanica i Hodgkinovu bolest (2).

### 1.2. Ne-Hodgkinovi limfomi

Ne-Hodgkinovi limfomi (NHL) su heterogena skupina tumora koji se međusobno razlikuju po podrijetlu, staničnoj morfologiji, imunofenotipskim značajkama te genetskim i molekularnim promjenama tumorskih stanica (1). NHL-i se razlikuju od Hodgkinovih limfoma prema različitim kliničkim karakteristikama i odsutnošću Reed-Sternbergovih stanica (5). Podvrste NHL-a prema SZO su: B-stanični te T i NK-stanični. Većina NHL-a su B-stanični, gotovo 85 %, a ostali su T i NK stanični (6). NHL-i imaju 40 glavnih podtipova a najčešći tipovi uključuju: indolentni folikularni limfom koji čini oko 20 % - 30 % svih NHL-a i agresivni difuzni B velikostanični limfom (DLBCL) koji čini oko 1/3 svih NHL-a (5, 7). NHL očituje se brzim rastom tumorskih masa i/ili B simptomima. B simptomi uključuju vrućicu, noćno znojenje i gubitak tjelesne mase veći od 10 % (8). Širom svijeta NHL-i predstavljaju čak 5 % svih malignih bolesti (7).

### 1.3. Klasifikacija B-velikostaničnih limfoma

SZO 2016. godine napravila je novu klasifikaciju B-velikostaničnih limfoma (B-LCL). Prema toj klasifikaciji razlikujemo posebne podtipove B-LCL-a od koji je najčešći upravo DLBCL. Posebni tipovi B-LCL-a uključuju: B-velikostanični limfom bogat T stanicama i histiocitima,

primarni DLBCL središnjeg živčanog sustava (SŽS), nespecificirani na Epstein Barr virus (EBV) pozitivan DLBCL, DLBCL udružen s kroničnom upalom, limfomatoidna granulomatoza, primarni kožni DLBCL nožnog tipa, primarni limfom u izljevu, EBV pozitivan mukokutani ulkus, primarni medijastinalni B-LCL, intravaskularni B-LCL, anaplastični limfom kinaza (ALP) pozitivni B-LCL, plazmablastični limfom i nespecificirani DLBCL koji je povezan s Humanim herpes virusom 8 (HHV8) (9).

#### 1.4. Difuzni B velikostanični limfom

DLBCL, najčešći je tip NHL-a (10). DLBCL je tumor velikih stanica B-limfocitne loze čije su jezgre jednako velike ili veće od jezgara makrofaga, točnije dva puta su veće od malih limfocita (3). Ovaj tumor češći je u muškaraca, medijan pojave bolesti je oko 60. godine života, a pojavljuje se i u djece (2, 3).

Međunarodnim prognostičkim indeksom (IPI) definirano je 5 rizičnih čimbenika koji predviđaju ishod bolesti (11). IPI uzima u obzir: dob, razinu serumske laktat-dehidrogenaze (LDH), opće stanje bolesnika, klinički stadij bolesti i broj zahvaćenih ekстранodalnih mjesta (tablica 1.1.). Svaki pozitivan rizični čimbenik nosi 1 bod.

Tablica 1.1. Međunarodni prognostički indeks (IPI).

<i>Dob</i>	$\geq 60$ godina
<i>Nivo LDH*</i>	$> 240$ mmola/L
<i>Opće stanje bolesnika</i>	$> 2$
<i>Klinički stadij</i>	III i IV
<i>Broj zahvaćenih ekстранodalnih mjesta</i>	$\geq 2$

LDH\*-laktat dehidrogenaza

Prema zbroju bodova bolesnike svrstavamo u različite kategorije od najmanjeg tj. niskog rizika do najvećeg tj. visokog rizika (4).

Petogodišnje preživljenje s obzirom na 5 rizičnih čimbenika koji predviđaju ishod DLBCL iznosi: 73 % za 0 - 1 prisutan čimbenik, 51 % za 2 prisutna, 43 % za 3 prisutna čimbenika i 26 % za 4 - 5 prisutnih rizičnih čimbenika (11). IPI je najbolji pokazatelj koji predviđa ishod DLBCL-a, no međutim na ovaj limfom utječu i neki drugi klinički, patohistološki i biološki čimbenici (4). Danas se DLBCL liječi primjenom monoklonskog protutijela rituksimaba (R) uz kemoterapijski protokol (najčešće CHOP (ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizolon)). Dodatkom R, znatno se poboljšao ishod liječenja (11).

### 1.4.1. Epidemiologija difuznog B-velikostaničnog limfoma

DLBCL čini otprilike 31 % svih NHL-a u zapadnim zemljama i 37 % tumora B-stanica širom svijeta (12). Incidencija je općenito veća u razvijenim zemljama i u onima s velikom prevalencijom virusa humane imunodeficijencije (HIV) zbog imunokompromitiranosti takvih bolesnika (2). Hrvatsku kao i ostatak svijeta prati trend povećanja broja DLBCL-a (4). Stopa incidencije DLBCL-a u RH za 2007. godinu bila je 2,1 bolesnik na 100 000 stanovnika za žene i 2,9 bolesnika na 100 000 stanovnika za muškarce (7).

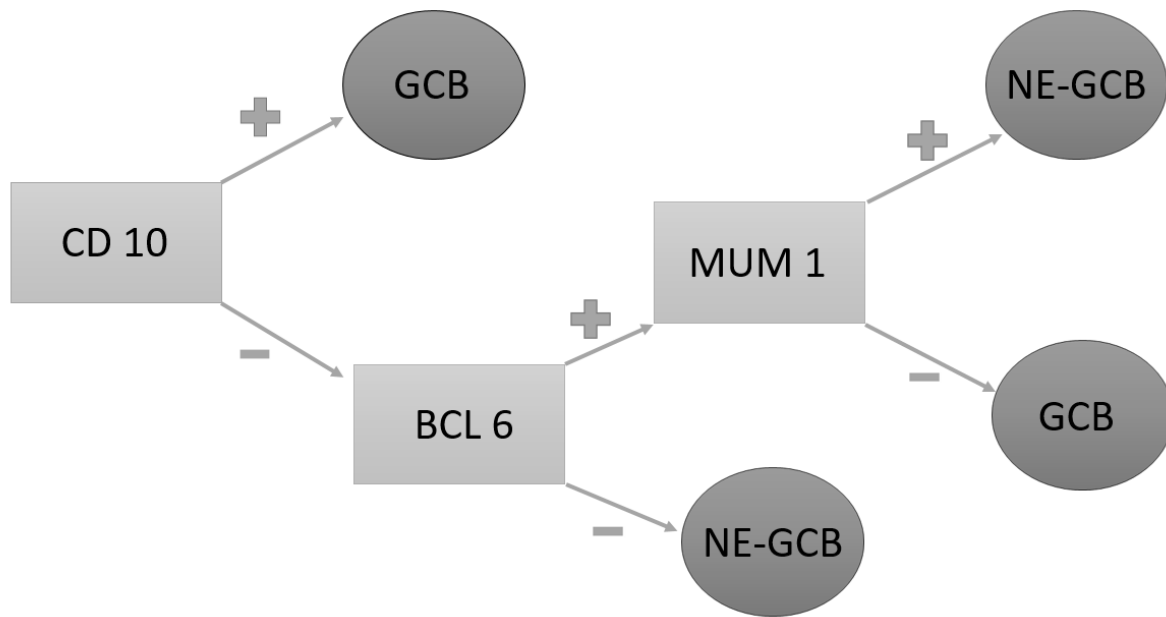
### 1.4.2. Etiologija difuznog B-velikostaničnog limfoma

Nastanak DLBCL-a to jest zloćudnu pretvorbu, kao i kod drugih limfoma, potiče mutacija gena koji kontroliraju životni ciklus limfocita (1). Među čimbenike rizika za nastanak DLBCL-a možemo uvrstiti: nasljedne bolesti s genetskim defektom, autoimunosne bolesti, stečene imunodeficijencije, infekcije (posebice virusne poput EBV) i druge okolišne čimbenike (1,4). Također, možemo reći i da obiteljska sklonost povećava mogućnost oboljenja, no međutim u većine oboljelih ne pronalazimo niti jedan čimbenik rizika za nastanak (1).

### 1.4.3. Imunohistokemijska podjela difuznog B-velikostaničnog limfoma

Molekularnom klasifikacijom na temelju ekspresije gena možemo identificirati različite podvrste tumora (13). Upotrebom tehnologije genskog čipa, DLBCL podijeljen je u tri podskupine: prva podskupina ima izražene gene slične stanicama germinativnog centra (GCB- engl. *Germinal centre B cell- like*), druga podskupina ima izražaj gena sličan aktiviranim B-stanicama (ABC- engl. *activated B-cell like*) i treća podskupina je klasificirana kao intermedijarna (3, 11). Dokazano je da bolesnici sa GCB DLBCL-om imaju bolje ukupno preživljenje u odnosu na bolesnike s ABC DLBCL-om (11).

S obzirom da je upotreba tehnike genskog čipa u kliničkoj praksi ograničena zbog tehničkih i financijskih razloga, 2008. godine SZO iznijela je novu DLBCL klasifikaciju koja se temeljila na Hansovom imunohistokemijskom algoritmu koji ima visoku podudarnost (80 % - 96 %) s tehnikom genskog čipa (11, 14). Ovaj algoritam podijelio je DLBCL imunohistokemijski pomoću 3 diferencijacijska biljega: CD10, BCL6 i MUM1 (11). DLBCL koji su podrijetla germinativnog centra (GCB) su: CD10 pozitivni ili CD10 negativni, BCL6 pozitivni i MUM1 negativni. DLBCL koji nisu podrijetla germinativnog centra (ne-GCB) su: CD10 negativni, BCL6 negativni ili CD10 negativni, BCL6 pozitivni i MUM1 pozitivni (slika 1.1.). GCB je prognostički povoljna, a ne-GCB je prognostički nepovoljna podskupina (14).



Slika 1.1. Imunohistokemijska podjela difuznih B velikostaničnih limfoma pomoću 3 diferencijacijska biljega. Izvor: izradila autorica rada u Microsoft PowerPoint programu. CD10- neprilizin; BCL6- protein koji se nalazi u limfocitima B i pomoćničkim limfocitima T; MUM1- nuklearni transkripcijski faktor; GCB- DLBCL koji su podrijetla germinativnog centra; NE-GCB- DLBCL koji nisu podrijetla germinativnog centra.

Usporedbom tehnike genskog profiliranja i imunohistokemijske tehnike za prognostičku podjelu DLBCL-a, neki radovi zaključuju da se imunohistokemijska tehnika dobro podudara sa tehnikom genskog profiliranja, dok drugi pak zaključuju suprotno (11).

#### 1.4.4. CD10

Ljudski CD10 antigen, neprilizin, transmembranski je glikoprotein koji pripada obitelji M13 peptidaza. U početku je identificirano da je prisutan u akutnim limfoblastičnim leukemijskim (ALL) stanicama pa je stoga nazvan uobičajenim antigenom ALL-e, ali kasnije je utvrđeno da je prisutan i u različitim stanicama, poput stanica prostate, bubrega, crijeva, endometrija, nadbubrežne žlijezde i pluća.

Naime, utvrđeno je da je ovaj protein prisutan u raznim zloćudnim bolestima i da igra značajnu ulogu u razvoju i napredovanju raka. Kod nekih karcinoma CD10 djeluje kao supresor tumora i inhibira napredovanje tumora, dok kod drugih ima ulogu u promicanju rasta tumora. Iako može inhibirati napredovanje tumora ipak većina zloćudnih bolesti pokazuje pojačanu ekspresiju CD10 i njegovu korelaciju sa višim stupnjem i težinom tumora (15).

### **1.4.5. BCL6**

BCL6 je protein koji se nalazi u limfocitima B i pomoćničkim (CD4+) limfocitima T (4). Ovaj protein je transkripcijski represor, igra važnu ulogu kao regulator germinativnog centra tj. mjesta na kojem se odabiru B stanice na temelju proizvodnje antitijela s velikim afinitetom za antigen. Tijekom razvoja germinativnog centra BCL6 igra ulogu u upravljanju brojnim staničnim funkcijama poput preživljavanja, odgovora na oštećenje DNA, zaustavljanje staničnog ciklusa i dr. . Među brojnim funkcijama, najbitnija je ona koja uključuje sprečavanje centroblasta da reagiraju na signale koji dovode do preranog izlaska iz germinativnog centra i doprinose limfomagenezi, dopuštajući uspostavljanje uvjeta povoljnih za malignu transformaciju (16).

### **1.4.6. MUM1**

MUM1, poznat kao i regulatorni faktor 4 za interferon (IRF4), nuklearni je transkripcijski faktor potreban za razvoj i aktivaciju B limfocita. MUM1 pripada IRF obitelji gena, koji su svi uključeni u regulaciju rasta stanica, transformaciju i indukciju apoptoze i razvoj imunološkog odgovora T stanica. Ekspresija ovog proteina vrlo je važna za diferencijaciju monocita, dendritičkih stanica i plazma stanica. Ekspresija proteina MUM1 pojavljuje se u kasnijim fazama diferencijacije B stanica nakon ekspresije CD10 i BCL6. MUM1 se nalazi uglavnom u B-staničnom limfomu i koristan je za podrazvrstavanje malignih limfoma. Prisutnost ekspresije MUM1 govori nam u prilog ne-GCB DLBCL-a s nepovoljnijom prognozom (17).

### **1.4.7. Podklasifikacija DLBCL zasnovana na MYC statusu**

S obzirom da pacijenti s DLBCL-om imaju vrlo različite kliničke ishode, otkrivanje prognostičkih biljega danas je postalo važno područje istrage. Ponavljajuće kromosomske translokacije MYC, BCL2, i BCL6 zabilježene su kod nekih DLBCL-ova (18). Srećom, samo 10 % DLBCL-a sadrže MYC translokaciju (19). Takvi slučajevi imaju lošiju prognozu s kemorezistencijom i skraćenim preživljavanjem, pa je podklasifikacija DLBCL zasnovana na MYC statusu postala presudna za odabir pacijenata koji su kandidati za intenzivnije liječenje (18, 19).

**2. CILJ**

Ispitati imunohistokemijska obilježja (GCB / ne-GCB) DLBCL dijagnosticiranih u Kliničkom bolničkom centru Osijek.

### **3. BOLESNICI I METODE**

#### **3.1. Etička načela**

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (Ur. broj 2158 - 61 - 07 - 21 - 163). Identitet bolesnika bio je zaštićen.

#### **3.2. Ustroj studije**

Istraživanje je ustrojeno kao presječna studija na povijesnim podacima. Prilikom izrade završnog rada korišteni su povijesni podatci iz Zavoda za hematologiju i Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra (KBC) Osijek.

#### **3.3. Bolesnici**

U istraživanje su bili uključeni pacijenti kojima je u razdoblju od 1. 1. 2016. godine do 31. 12. 2020. godine u KBC-u Osijek dijagnosticiran DLBCL. Pregledom arhiva Zavoda za Hematologiju KBC-a Osijek identificirani su pacijenti koji ispunjavaju kriterije za uključivanje u istraživanje. Obrada i dobiveni rezultati istraživanja neće utjecati na dijagnozu i liječenje bolesnika čiji će se materijal koristiti u istraživanju.

#### **3.4. Metode**

Iz medicinskih zapisa Zavoda za hematologiju KBC-a Osijek preuzet će se demografska i klinička obilježja, a iz arhivskog materijala (hemalaon eozinska i imunohistokemijska stakla te parafinski blokovi) pohranjenog na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek će se procijeniti imunohistokemijska obilježja svih dijagnosticiranih DLBCL u navedenom razdoblju.

Arhivski materijal dobiven je na način da se uzorak tumorskog tkiva najprije fiksirao u 10 % formalinu u svrhu očuvanja njegovog fizičkog ustroja i molekularnog sastava. Nakon fiksacije, provodio se postupak dehidracije uzorka i uklapanje uzorka u parafinske blokove. Tako dobiveni parafinski blokovi bili su rezani na mikrotomu u rezove debljine 4 - 5 mikrometara. Na kraju se svaki rez prenosio na stakalce i bojavao standardnim hemalaon eozinskim bojenjem i



imunohistokemijskim bojenjem. Stakalca sa tumorskim tkivom pregledavala su se svjetlosnim mikroskopom.

#### **3.5. Statističke metode**

Kategorijski podaci će biti predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podaci će biti opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona.

Podaci će biti statistički obrađeni računalnim programom SPSS Statistics Inc. (verzija 25.0., Chicago, IL, USA).

## 4. REZULTATI

## 4.1 Demografske i kliničke značajke bolesnika

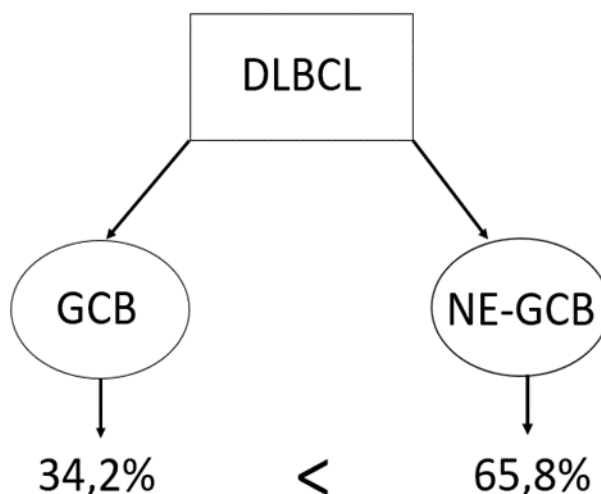
U istraživanje je uključen 38 bolesnik s veći udjelom muškaraca (55 %). Medijan dobi pacijenata sa DLBCL je 67 godina u rasponu od 20 do 81 godine. Najviše ispitanika je u dobi od 60 - 69 godina (36,8 %) i 70 - 79 godina (36,8 %) (tablica 4.1.).

Tablica 4.1. Raspodjela pacijenata s difuznim B velikostaničnim limfomom, obzirom na spol i dob.

<u>Dob pacijenata</u>	<u>Broj pacijenata prema spolu</u>		<u>Ukupno</u>
	<u>Muškarci</u>	<u>Žene</u>	
20 - 29	0	2	2 (5,3 %)
30 - 39	1	0	1 (2,6 %)
40 - 49	0	1	1 (2,6 %)
50 - 59	3	1	4(10,5 %)
60 - 69	10	4	<b>14 (36,8 %)</b>
70 - 79	5	9	<b>14 (36,8 %)</b>
80 - 89	2	0	2 (5,3 %)
<u>Ukupno</u>	<b>21 (55,3 %)</b>	<b>17 (44,7 %)</b>	<b>38</b>

#### 4.2. Imunohistokemijska obilježja

GCB podtip dijagnosticiran je kod 13 pacijenata (34,2 %), a ne-GCB podtip kod 25 pacijenata (65,8 %) (slika 4.1.) GCB je podjednako dijagnosticiran i kod muškaraca i žena, a ne-GCB je više dijagnosticiran kod muškaraca (tablica 4.2.).



Slika 4.1. Rezultati podjele imunofenotipskih podtipova difuznog B velikostaničnog limfoma. Izvor: izradila autorica rada u Microsoft PowerPoint programu. DLBCL - difuzni B velikostanični limfom; GCB - DLBCL koji su podrijetla germinativnog centra; NE-GCB - DLBCL koji nisu podrijetla germinativnog centra.

Tablica 4.2. Podjela pacijenata s obzirom na spol i tip difuznog B velikostaničnog limfoma.

<u>Spol pacijenata</u>	<u>Podtip DLBCL-a* prema imunohistokemijskim svojstvima</u>	
	<u>GCB†</u>	<u>ne-GCB‡</u>
<u>Muškarci</u>	6 (46,1 %)	15 (60 %)
<u>Žene</u>	7 (53,8 %)	10 (40 %)
<u>Ukupno</u>	<b>13</b>	<b>25</b>

\*DLBCL - difuzni B velikostanični limfom (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*); GCB† - DLBCL koji su podrijetla germinativnog centra (engl. *Germinal centre B cell-like*); ne-GCB‡ - DLBCL koji nisu podrijetla germinativnog centra (engl. *Non Germinal centre B cell-like*).

Potom smo pacijente podijelili s obzirom na dob i GCB i ne-GCB podtip DLBCL-a. Najviše pacijenata s GCB podtipom je u skupini od 60 - 69 godina. Najviše pacijenata sa ne-GCB podtipom je u skupini od 70 - 79 godina (tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Podjela pacijenata s obzirom na dob i tip difuznog B velikostaničnog limfoma.

<u>Dob pacijenta</u>	<u>Podtip DLBCL-a* prema imunohistokemijskim svojstvima</u>	
	<u>GCB†</u>	<u>ne GCB‡</u>
20 - 29	1	1
30 - 39	0	1
40 - 49	0	1
50 - 59	3	1
60 - 69	<b>5</b>	9
70 - 79	4	<b>10</b>
80 - 89	0	2

\*DLBCL - difuzni B velikostanični limfom ( engl. *diffuse large B-cell lymphoma* ); GCB† - DLBCL koji su podrijetla germinativnog centra ( engl. *Germinal centre B cell- like*); ne-GCB‡ - DLBCL koji nisu podrijetla germinativnog centra (engl. *Non Germinal centre B cell- like* ).

### 4.3. c-MYC ekspresija

C-MYC ekspresija uočena je kod 7 pacijenata (18,4 %). U GCB podskupini 4 od 13 (30,8 %) pacijenata su imali c-MYC ekspresiju. S druge strane, kod ne-GCB podskupine samo 3 od 25 (12 %) pacijenata pokazalo je c-MYC ekspresiju (tablica 4.4.).

Tablica 4.4. Podjela pacijenata s obzirom na c-MYC ekspresiju i podtip difuznog B velikostaničnog limfoma.

<i>c-MYC*</i> <i>ekspresija</i>	<i>Podtip DLBCL-a† prema imunohistokemijskim svojstvima</i>		<i>Ukupno</i>
	<i>GCB‡</i>	<i>ne GCB§</i>	
<i>Ima</i>	<i>4</i>	<i>3</i>	<i>7</i>
<i>Nema</i>	<i>9</i>	<i>22</i>	<i>31</i>

\*c-MYC - obitelj gena regulatora i protoonkogeni koji kodiraju faktore transkripcije; DLBCL† - difuzni B velikostanični limfom ( engl. *diffuse large B-cell lymphoma* ); GCB‡ - DLBCL koji su podrijetla germinativnog centra ( engl. *Germinal centre B cell- like*); ne-GCB§ - DLBCL koji nisu podrijetla germinativnog centra (engl. *Non Germinal centre B cell- like* )

## 5. RASPRAVA

Širom svijeta, incidencija NHL-a je u porastu te je do danas dosegla postotak od čak 5 % svih malignih bolesti (7). Većina NHL-a su B stanični, a daleko najčešći je upravo DLBCL (6, 12). Pomoću imunohistokemijskih obilježja podijelili smo DLBCL-a na GCB podskupinu koja je prognostički povoljna i ne-GCB podskupinu koja je prognostički nepovoljna. Takva imunohistokemijska podjela provedena je u brojnim istraživanjima diljem svijeta (14).

U Republici Hrvatskoj objavljeno je vrlo malo na ovu temu, a do sada nije ispitivana imunohistokemijska podjela DLBCL dijagnosticiranih u KBC-u Osijek. U ovom istraživanju, koje je provedeno na Zavodu za hematologiju KBC-a Osijek, tijekom razdoblja od 4 godine (1. 1. 2016. - 31. 12. 2020.), ukupno je dijagnosticirano 38 DLBCL-a. Veći postotak su činili muškarci sa 55,3 %. Ovakvi rezultati sa većim postotkom DLBCL-a dijagnosticiranim kod muškaraca podudaraju se sa rezultatima dobivenim u Japanu (52 %) i rezultatima Lindsay i sur. (56,6 %) (20, 21). S druge strane, studija objavljena u Washingtonu dobila je rezultate suprotne našima sa većim postotkom DLBCL-a dijagnosticiranog kod žena (14).

Naši rezultati pokazuju da je ne-GCB češći imunofenotipski podtip DLBCL-a (65,8 % nasuprot 34,2 % GCB). Ovakvi rezultati podudaraju se sa rezultatima dobivenim u Zagrebu 2012. godine gdje je 35 % bolesnika imalo GCB fenotip, a 65 % ne-GCB fenotip (22). Također, diljem svijeta razne studije dobile su rezultate slične našima. Studija objavljena u Washingtonu dobila je rezultat od 51 % DLBCL-a svrstanih u ne-GCB podtip (14). Druga studija provedena u Švedskoj dobila je također rezultat sličan našem od 53 % slučajeva DLBCL-a svrstanih u ne-GCB podtip (23). Međunarodno multiinstitucionalno istraživanje „Potvrđivanje molekularne klasifikacije difuznog B velikostaničnog limfoma imunohistokemijom pomoću tkivnog mikroreza“ prikupilo je podatke od 152 pacijenta na različitim sveučilištima i centrima za rak, te su također dobili rezultate koji se podudaraju s našima od 58 % ne-GCB podtipa DLBCL-a (14).

S druge strane, veliki broj studija dobio je rezultate koji se ne podudaraju s našima. Studija provedena u Indiji izvijestila je da od ukupno 83 pacijenata, 44 od njih (53 %) svrstano je u GCB podskupinu (24). Sukladno tome Lindsay i sur. objavili su studiju koja je uključivala 214 pacijenata od koji su svrstali njih 112 (52 %) u GCB podskupinu (21). Također, studija provedena u Ekvadoru dobila je rezultat od 42,9 % pacijenata svrstanih u GCB podskupinu nasuprot 33,3 % svrstanih u ne-GCB podskupinu (14). Gupta i sur. u svojoj studiji dobili su ogroman rezultat od čak 73 % DLBCL-a GCB podskupine (25).

Naše istraživanje utvrdilo je prekomjernu c-MYC ekspresiju kod 18,4 % pacijenata. To se ne podudara sa podacima da samo 10 % DLBCL-a sadrže c-MYC ekspresiju (19). Brojne druge studije izvjestile su o c-MYC ekspresiji kod manjeg postotka pacijenata. Istraživanje provedeno u Zagrebu izvjestilo je o c-MYC ekspresiji kod 4,5 % pacijenata (22). Sličan rezultat od 8 % c-MYC ekspresije dobila je studija objavljena u Washingtonu (14). Nešto veći postotak od 14 % c-MYC ekspresije koji se također ne podudara sa podatkom da samo 10 % DLBCL-a sadrže c-MYC ekspresiju dobila je studija provedena u Japanu (19, 20). Ogroman postotak od čak 40,7 % prekomjerne c-MYC ekspresije dobila je studija provedena u Ekvadoru (14).

C-MYC ekspresija u našem istraživanju bila je češća kod GCB podtipa DLBCL-a (30,8 % nasuprot 12 % ne-GCB). Ti rezultati analogni su rezultatima dobivenim u Ekvadoru gdje je također ekspresija c-MYC prevladavala kod GCB podtipa (42,9 %) (14). S druge strane, Gupta i sur. izvjestili su da je u njihovom istraživanju c-MYC ekspresija bila češća kod ne-GCB podtipa (25).

S obzirom da pacijenti sa c-MYC prekomjernom ekspresijom imaju lošiju prognozu, kemorezistenciju i skraćeno preživljenje, razmatra se da prekomjerna ekspresija c-MYC proteina bude prognostički čimbenik neovisan o IPI (14).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti:

1. Ne-GCB podtip DLBCL-a je češći u odnosu na GCB podtip DLBCL-a.
2. GCB podtip DLBCL je podjednako utvrđen i kod muškaraca i žena, a ne-GCB je češće utvrđen kod muškaraca.
3. GCB podtip DLBCL-a ima češće izraženu c-MYC ekspresiju.



## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ispitati imunohistokemijska obilježja (GCB / ne-GCB) difuznih B velikostaničnih limfoma (DLBCL) dijagnosticiranih u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Osijek.

**Nacrt studije:** DLBCL najčešći je podtip agresivnih ne-Hodgkinovih limfoma (NHL). Imunohistokemijskom analizom markera aktivacije i diferencijacije DLBCL-a, ovaj limfom možemo podijeliti na prognostički povoljnu (GCB) i nepovoljnu (ne-GCB) podskupinu.

**Bolesnici i metode:** Ova presječna studija provedena je uz pomoć medicinske dokumentacije na Odjelu za hematologiju KBC-a Osijek u kombinaciji s demografskim i kliničkim karakteristikama te početnim laboratorijskim nalazima odraslih pacijenata s novootkrivenom DLBCL. Izvedeno je u razdoblju od 1. siječnja 2016. do 31. prosinca 2020..

**Rezultati:** Ukupno je u ovu studiju bilo uključeno 38 pacijenata, 21 od 38 bili su muškarci (55,3 %), a 17 pacijenata (44,7 %) su bile žene. Medijan dobi pacijenata sa DLBCL-om je 67 godina u rasponu od 20 do 81 godine. 13 od 38 (34,2 %) bolesnika svrstano je u GCB podskupinu, dok je 25 bolesnika (65,8 %) klasificirano u ne-GCB podskupinu. c-MYC imunohistokemijsku ekspresiju imalo je ukupno 7 od 38 bolesnika (18,4 %). U GCB podskupini 4 od 13 (30,8 %) pacijenata su imali c-MYC ekspresiju, dok je u ne-GCB podskupini samo 3 od 25 (12 %) pacijenata pokazalo c-MYC ekspresiju.

**Zaključak:** Na temelju ovih rezultata možemo zaključiti da DLBCL približno podjednako zahvaća oba spola. Otprilike dvije trećine bolesnika klasificirano je kao podgrupa koja nije GCB, a u obje podskupine (GCB i ne-GCB) nije uočena prekomjerna c-MYC ekspresija.

**Ključne riječi:** c-MYC ekspresija; difuzni B velikostanični limfom; imunohistokemija; markeri; podskupina

## 8. SUMMARY

### **Immunohistochemical characteristics of diffuse large B-cell lymphoma diagnosed at the University Hospital Centre Osijek**

**Objectives:** Examine immunohistochemical characteristics (GCB / non-GCB) of DLBCL diagnosed at the Clinical Hospital Center Osijek.

**Study design:** Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common subtype of aggressive non-Hodgkin lymphomas (NHLs). Immunohistochemical analysis of DLBCL activation and differentiation markers can be divided into a prognostically favorable (GCB) and unfavorable (non-GCB) subgroups DLBCL.

**Participants and methods:** This cross-sectional study was performed using medical records at the Department of Hematology at the University Hospital Center Osijek combined with demographic and clinical characteristics and initial laboratory findings of adult patients with newly diagnosed DLBCL. It was performed in the period from the 1th of January 2016 to the 31th of December 2020.

**Results:** In total 38 patients were included in this study, 21 out of 38 were male patients (55,3 %) and 17 patients (44,7 %) were female. The median age value of the patients is 67 with range from 20 to 81 year of age. 13 out of 38 (34,2 %) patients were classified as germinal centre subgroup (GCB), while 25 patients (65,8 %) were classified as non-germinal centre subgroup (non-GCB). c-MYC immunohistochemical expression had 7 out of 38 patients (18,4 %). In the GCB subgroup, 4 of 13 (30.8 %) patients had c-MYC expression, while in the non-GCB subgroup, only 3 of 25 (12 %) patients showed c-MYC expression.

**Conclusion:** Based on these results we can conclude that DLBCL affects both sexes approximately equally. About two-thirds of the patients are classified as non-GCB subgroup and in both subgroups (GCB and non-GCB) c-MYC is not overexpressed.

**Key words:** c-MYC expression; diffuse B large cell lymphoma; immunohistochemistry; markers; subgroup

**9. LITERATURA**

1. Načinović - Duletić A, Valković T, Dvornik Š. Hematologija za prvostupnike medicinsko - laboratorijske dijagnostike. 1. izd. Rijeka: Sveučilište u Rijeci; 2011.
2. Bešlija S, Vrbanec D. Medicinska - internistička onkologija. 1. izd. Sarajevo: Medicinski fakultet, Udruženje onkologa Bosne i Hercegovine; 2014.
3. Labar B, Hauptmann E. Hematologija. 4. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2017.
4. Ilić I. Pojavnost i značenje tumorskog biljega CD43 na velikostaničnom limfomu B- imunofenotipa. Doktorska dizertacija. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek; 2008.
5. Thandra K, Barsouk A, Saginala K, Anand Padala S, Barsouk A, Rawla P. Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. Med Sci. 2021; 9: 5 - 14.
6. Ivančević Ž, Rumboldt Z, Bergovec M, Silobrčić V. MSD - priručnik dijagnostike i terapije. Dostupno na adresi: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/hematologija-i-onkologija/limfomi/ne-hodgkinovi-limfomi>. Datum pristupa: 5. 7. 2021.
7. Koalicija udruga u zdravstvu. Onkologija.hr. Dostupno na adresi: <https://www.onkologija.hr/>. Datum pristupa: 6. 7. 2021.
8. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A. Klinička onkologija. 3. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
9. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R i sur. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016; 127 (20): 2375 - 90.
10. Perfecto-Avalos Y, Gonzalez AG, Hernandez-Reynoso A, Sánchez-Ante G, Ortiz-Hidalgo C, Scott SP, i sur. Discriminant analysis and machine learning approach for evaluating and improving the performance of immunohistochemical algorithms for COO classification of DLBCL. Transl Med. 2019; 17: 198 - 210.
11. Hanna L, Crosby T, Macbeth F. Praktična klinička onkologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2021.

12. Umukoro C, Khan S. Epidemiology, pathology, and clinical features of DLBCL. Dostupno na adresi: <https://lymphomahub.com/medical-information/epidemiology-pathology-and-clinical-features-of-dlbcl>. Datum pristupa: 8. 7. 2021.
13. Alizadeh A, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, i sur. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403: 503 - 511.
14. Cevallos J, Montalvo N. Immunophenotypic characteristics of diffuse large b-cell lymphoma and expression of C-MYC protein: single Ecuadorian center experience. *Rev Colomb Cancerol*. 2019; 23(2): 41 - 44.
15. Mishra D, Singh S, Narayan G. Role of B Cell Development Marker CD10 in Cancer Progression and Prognosis. *Mol Biol Int*. 2016; 432: 86 - 97.
16. Basso K, Dalla FR. BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol*. 2010; 105: 193 - 210.
17. Nordic immunohistochemical Quality Control (NordiQC). NordiQC, MUM1. Dostupno na adresi: <https://www.nordiqc.org/epitope.php?id=55>. Datum pristupa: 21. 7. 2021.
18. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic Significance of MYC, BCL2, and BCL6 Rearrangements in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Plus Rituximab. *Cancer*. 2012; 118(17): 73 - 83.
19. Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, Roy A, Cin PD, Neuberger DS, i sur. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS One*. 2012; 7(4): e33813.
20. Tsuyama N, Sakata S, Baba S, Mishima Y, Nishimura N, Ueda K, i sur. BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. *Blood*. 2017; 130: 489 - 500.
21. Morton LM, Cerhan JR, Hartge P, Vasef MA, Neppalli VT, Natkunam Y, i sur. Immunostaining to identify molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma in a population-based epidemiologic study in the pre-rituximab era. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2011; 2(3): 245 - 252.
22. Dotlić S. Imunohistokemijski algoritmi subklasifikacije difuznog B velikostaničnog limfoma. Doktorska dizertacija. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2012.

23. Thunberg U, Enblad G, Berglund M. Classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry demonstrates that elderly patients are more common in the non-GC subgroup and younger patients in the GC subgroup. *Haematol.* 2012; 97 (2): e3.
24. Dwivedi A, Mehta A, Solanki P. Evaluation of immunohistochemical subtypes in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on survival. *Indian J Pathol Microbiol.* 2015; 58: 453 - 8.
25. Gupta M, Maurer MJ, Wellik LE, Law ME, Han JJ, Ozsan N, i sur. Expression of Myc, but not pSTAT3, is an adverse prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma treated with epratuzumab/R-CHOP. *Blood.* 2012; 120: 4400 - 4406.

## **10. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODATCI**

Ime i Prezime: Petra Đurković

Datum i mjesto rođenja: 7. 1. 2000., Osijek

Adresa stanovanja: Vijenac Dinare 8, Osijek

Kontakt: +385 91 918 7155

E-mail: petraaa071@gmail.com

### **OBRAZOVANJE**

2006. – 2014. Osnovna škola Ivana Filipovića u Osijeku

2014. – 2018. II. gimnazija Osijek

2018. – 2021. Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko  
laboratorijska dijagnostika