

Proteinska ekspresija diferencijacijskih gena, translokacija t(14; 18)(q32; q21) i abnormalnosti regije 3q27 u primarnom difuznom B velikostaničnom i folikularnom limfomu stupnja 3

Borovečki, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2007

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:616876>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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





Središnja medicinska knjižnica

Borovečki , Ana (2007) *Proteinska ekspresija diferencijacijskih gena, translokacija t(14; 18)(q32; q21) i abnormalnosti regije 3q27 u primarnom difuznom B velikostaničnom i folikularnom limfomu stupnja 3. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.*

<http://medlib.mef.hr/269>

University of Zagreb Medical School Repository

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

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Borovečki

**PROTEINSKA EKSPRESIJA DIFERENCIJACIJSKIH GENA,
TRANSLOKACIJA t(14;18)(q32;q21) I ABNORMALNOSTI REGIJE 3q27 U
PRIMARNOM DIFUZNOM B VELIKOSTANIČNOM I FOLIKULARNOM
LIMFOMU STUPNJA 3**

DISERTACIJA

Zagreb, 2006.

**Disertacija je izrađena u Odjelu za patologiju i citologiju, Kliničke bolnice
“Merkur” u Zagrebu.**

Voditelj rada: prof. dr. sc. Mara Dominis

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mari Dominis, mentoru bez čijeg iznimnog zalaganja i podrške, usmjeravanja zajedničkog istraživanja i rasprava problema ne bi bilo ovog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Davoru Solteru, voditelju Max-Planck Institute of Immunobiology, Freiburg, Njemačka, na poklonjenim probama korištenim u FISH analizi.

Rad prof. dr. sc. Davora Ivankovića pretvorio je nepregledne tablice brojeva u smislene rezultate.

Zahvaljujem mr. sc. Sonji Džebro kao glavnom završnom revizoru i malim ispravkama velikog značaja.

Hvala Petri bez koje FISH ne bi bio FISH.

Hvala Tanji i Suzani bez kojih imuna ne bi bila imuna.

Na kraju rada, smatram da je uz zalaganje pojedinca ovakav rad ogledalo organiziranosti i stručnih vještina cijelog Odjela te zahvaljujem svim suradnicima.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1 Difuzni B velikostanični limfom (DLBCL).....	2
1.2 Folikularni limfom (FL).....	3
1.3 Terapijski pristup DLBCL i FL.....	5
1.4 DNA <i>microarray</i> analiza genske ekspresije DLBCL i FL.....	8
1.5 Proteinska ekspresija diferencijacijskih gena.....	11
1.5.1 <i>BCL6</i> gen i njegov proteinski produkt.....	12
1.5.2 CD10.....	13
1.5.3 <i>MUM1/IRF4</i> gen i njegov proteinski produkt.....	14
1.5.4 CD138.....	15
1.5.5 Proteinska ekspresija diferencijacijskih gena <i>DLBCL</i>	16
1.6 <i>BCL2</i> gen i njegov proteinski produkt.....	19
1.7 p53.....	21
1.8 CD30.....	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
3. BOLESNICI I METODE.....	25
3.1 Bolesnici.....	25
3.2 Tkivni <i>microarray</i>.....	28
3.3 Imunohistokemijsko bojenje.....	28

3.4	Interfazna fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH) na parafinskim rezovima tkiva.....	30
3.4.1	Priprema preparata.....	30
3.4.2	Probe.....	31
3.4.3	Analiza preparata.....	34
3.5	Statistička analiza.....	34
4.	REZULTATI.....	36
4.1.1	Fenotipske karakteristike diferencijacijskih biljega BCL6, CD10, MUM1/IRF4 i CD138, klasificiranje u GCB i ABC skupinu, te ekspresija biljega BCL2, p53 i CD30 u <i>DLBCL</i> i FL-3.....	36
4.1.2	t(14;18)(q32;q21) i abnormalnosti <i>BCL6</i> gena regije 3q27 u <i>DLBCL</i> i FL-3.....	39
4.2	Usporedba proteinske ekspresije i citogenetskih abnormalnosti <i>DLBCL</i> i FL-3, te GCB i ABC skupine.....	42
4.3	Usporedba utjecaja fenotipskih karakteristika, citogenetskih abnormalnosti i kliničkih prognostičkih pokazatelja na ishod bolesnika s <i>DLBCL</i> i FL-3, te GCB i ABC skupine.....	46
5.	RASPRAVA.....	51
6.	ZAKLJUČCI.....	59
7.	SAŽETAK.....	60
8.	SUMMARY.....	62
9.	LITERATURA.....	63
10.	ŽIVOTOPIS.....	81

Popis kratica

ABC	-	aktivirane B stanice (activated B-cell-like profile)
AIDS	-	sindrom stečene imunodeficijencije (acquired immunodeficiency syndrome)
BCL2	-	B stanični limfom 2 gen (B cell lymphoma 2 gene)
BCL6	-	B stanični limfom 6 gen (B cell lymphoma 6 gene)
CD	-	razlikovni antigen na površini stanice (cluster of differentiation)
cDNA	-	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
CHOP	-	cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisolon
COP	-	cyclophosphamide, vincristine, prednisolon
DAPI	-	4',6-diamidino-2-fenil-indol (4',6-diamidino-2-phenylindol)
DLBCL	-	difuzni B velikostanični limfom (diffuse large B-cell lymphoma)
DNA	-	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	-	etilen diamin tetraoctena kiselina (ethylene diamine tetracetic acid)
F	-	fuzijski žuti signal
FISH	-	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
FL	-	folikularni limfom (follicular lymphoma)
G	-	zeleni signal (green signal)
GCB	-	B stanice germinativnog centra (germinal center B-cell-like profile)

H&E	-	hemalaun & eozin
HIV	-	virus humane imunodeficijencije
<i>IgV_H</i>	-	geni varijabilne regije teškog lanca imunoglobulina
LSAB	-	vizualizacijski set streptavidin-biotin (labelled streptavidin-biotin system)
LSI	-	lokus specifična proba
MPI	-	Međunarodni prognostički indeks (International Prognostic Index)
mRNA	-	glasnička ribonukleinska kiselina
<i>MUM1/IRF4</i>	-	multipli mijelom-1/interferon regulatorni faktor-4 gen (multiple myeloma-1/interferon regulatory factor-4 gene)
NHL	-	ne-Hodgkinski limfomi
NK stanice	-	prirodnoubilačke stanice (natural killer cells)
O	-	narančasti signal (orange signal)
p	-	kratki krak kromosoma
q	-	dugi krak kromosoma
REAL	-	Revidirana europsko-američka klasifikacija limfoma (Revised European-American Lymphoma Classification)
RT-PCR	-	reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (reverse transcription and polymerase chain reaction)
SSC	-	natrijev citrat i klorid (sodium chloride salt and citrate)
SZO	-	Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organisation)
TMA	-	tkivni <i>microarray</i> (tissue microarray)

1. Uvod

Ne-Hodgkin limfomi (NHL) su heterogena skupina neoplazmi B, T i NK stanica imunološkog sustava. Mogu se pojaviti u bilo kojem organu, a neki oblici mogu razviti i sliku leukemije. Do danas je objavljeno gotovo 25 klasifikacija NHL čija povijest ocrta rastući broj spoznaja o prirodi različitih podtipova te postepeni prijelaz kriterija klasifikacije s morfologije prema kliničkim karakteristikama, imunofenotipu, definiranju stadija normalne stanične diferencijacije i genetičkoj pozadini tumorskih limfocita.

Današnji pristup klasifikacije limfoidnih neoplazmi Svjetske zdravstvene organizacije (SZO klasifikacija) nastoji definirati stvarne kliničke entitete bolesti temeljem morfoloških, imunofenotipskih i genetičkih karakteristika (1,2). Liječenje i prognoza bolesnika određeni su histološkim tipom limfoma, stadijem bolesti i kliničkim prognostičkim pokazateljima (3-6). Iako klinički prognostički pokazatelji predstavljaju široko prihvaćen prognostički model, uočena je znatna različitost ishoda bolesti u bolesnika istih prognostičkih skupina ukazujući na heterogenost bioloških karakteristika tumora (4-9).

Moderna genetička istraživanja upotrebom novih metoda – DNA *microarray*, RT-PCR, tkivni *microarray*, čine mogućim istovremeno istraživanje funkcije tisuće gena otkrivajući potpuno novi molekularni fenotip limfoidnih neoplazmi. Definiranje kliničkog značaja otkrivenih molekularnih karakteristika predstavlja osnovu nove molekularne

klasifikacije limfoidnih neoplazmi te osnovu za uvođenje nove generacije prognostičkih modela s kliničkim i terapijskim značenjem (10-13).

1.1 Difuzni B velikostanični limfom

Difuzni B velikostanični limfom (*DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma*) je najučestaliji tip limfoma odrasle dobi u zapadnim zemljama, s učestalosti 30-40% svih B NHL. Nezadovoljavajuća histopatološka reproducibilnost morfoloških tipova centroblastičnog i imunoblastičnog limfoma prepoznatih već u Kielskoj klasifikaciji 1974. godine, agresivan klinički tijek i sličan način liječenja doveli su do definiranja entiteta *DLBCL* te uvrštavanja u *Revised European American Lymphoma Classification* (*REAL* klasifikacija) 1994. godine (14).

DLBCL je difuzna proliferacija velikih neoplastičnih B limfoidnih stanica podrijetla B stanica germinativnog centra i postgerminativnih stanica. Iako je definiran kao zaseban entitet u SZO klasifikaciji, uočena je heterogenost bolesti – klinički, morfološki, imunofenotipski i genetički (15-17).

DLBCL se može pojaviti u obliku nodalne i ektranodalne bolesti. Ekstranodalna lokalizacija bolesti ima svoje osobitosti s obzirom na kliničke karakteristike i patogenetske mehanizme i razlikujemo medijastinalni, intravaskularni i primarni efuzijski *DLBCL* (2).

Tumorska stanica je B veliki transformirani limfocit, no morfološka slika *DLBCL* je šarolika i prema prevladavajućem morfološkom tipu stanica može se razlikovati šest podtipova *DLBCL*: centroblastični, imunoblastični, T limfocitima/histiocitima bogat,

anaplastični, plazmablastični i *DLBCL* sa stanicama sličnim Reed-Sternberg stanicama i ekspresijom ALK proteina (2). Danas ne postoji opće prihvaćeni stav o potrebi razlikovanja morfoloških podtipova *DLBCL*, iako neke studije ukazuju na njihov mogući klinički značaj (18-25).

Tumorske stanice su pozitivne, prema definiciji bolesti, na pan-B biljege CD19, CD20, CD22, CD79a, a pozitivitet intracitoplazmatskih odnosno površinskih imunoglobulinskih (Ig) biljega je različito izražen, kao i CD5, CD10, CD30 te CD45 biljega (2).

U *DLBCL* otkrivene su brojne kromosomske abnormalnosti, ali nisu izdvojene specifične dijagnostičke promjene. Najučestalije promjene su: lomovi regija 14q32, 3p21, 3q27, 22q12, 1q25 i 18q21; dodatni kromosomi 7,9,12 i X; gubitak kromosoma 1, 4, 6, 17 i Y, te delecije regija 6q21-25, 1p22-36, 1q32-44, 2p23-25, 4q31-35, 13p13-14 i 17p11-13 (26-30). U 11-23% slučajeva *DLBCL* s uznapredovalim kliničkim stadijem bolesti otkriveno je devet regija kromosomskih amplifikacija i izdvojeni su amplificirani geni s mogućom ulogom u nastanku limfoma (31). Klinički značaj svake pojedinačne promjene nije utvrđen, ali su pojedine promjene povezane s uznapredovalim kliničkim stadijem ili lošijim odgovorom na terapiju (32-34). Navedene kromosomske abnormalnosti uglavnom se ne nalaze kao pojedinačne promjene. Nakupljanje većeg broja abnormalnosti ukazuje na progresiju genetičkih promjena, što ima važnu ulogu u patogenezi *DLBCL* (28).

1.2 Folikularni limfom

Folikularni limfom (FL) - 25% svih B NHL - predstavlja drugi po učestalosti tip limfoma odraslih u zapadnim zemljama (2). FL su B stanični tumori u pravilu folikularne građe. Uz klonalne B stanice unutar neoplastičnih folikula nalaze se i folikularno specifični reaktivni T limfociti, folikularne dendritične antigen prezentirajuće stanice te makrofagi (1,2).

SZO klasifikacija razlikuje tri histološka stupnja FL i definira prevladavajući način rasta tumora ovisno o postotku nodularne i difuzne komponente rasta unutar tumora (2). Stupanj 1 i 2 (FL-1, -2) su tipični centrocitni odnosno centrocitno/centroblastni limfomi s <5 odnosno 5-10 centroblasta u velikom vidnom polju. Stupanj 3 (FL-3), s učestalosti 17.8-28.9% svih FL (35), prema SZO klasifikaciji može se podijeliti u podtip FL-3A – centrocitno/centroblastni limfom s >15 centroblasta u velikom vidnom polju i podtip FL-3B – centroblastni limfom s prisutnom difuznom komponentom rasta. FL karakterizira nodularan način rasta tumora, dok je u FL-3 često prisutan i difuzan rast.

Klinički značaj navedene morfološke podjele FL-3 nije jasan. Različiti autori ne nalaze klinički značaj navedenih histoloških podtipova FL-3 (35,36), dok Hans, CP i sur. izdvajaju prisutnost >50% difuzne komponente rasta kao nepovoljan pokazatelj (37).

Imunofenotipski većina FL pozitivna je na pan-B stanične biljege CD19, CD20, CD22 i CD79a, CD10, BCL6 i BCL2, a negativna na CD5 i CD23 (2).

t(14;18)(q32;q21) predstavlja učestalu citogenetsku abnormalnost FL, prisutna je u 85% slučajeva FL-1 i -2. Navedena translokacija smatra se ranim, kritičnim događajem u patogenezi FL, ali sama nije dovoljna za nastanak bolesti (3,12,38). Naime, niska učestalost t(14;18)(q32;q21) se može naći u cirkulirajućim B stanicama (jedna u 10⁵ stanica) kod većine zdravih pojedinaca (39). Rezistentnost stanice na signale

programirane stanične smrti kao posljedica navedene translokacije, predstavlja rizik za nakupljanje daljnjih molekularnih promjena odgovornih za nastanak malignog klona. Osim mehanizma povećane ekspresije *BCL2*, u nastanak limfoma mogu biti uključene druge molekule s učinkom smanjenja razine apoptoze stanica, ali i aktivacija *BCL6* kao alternativni mehanizam preživljenja stanice (40-42). Dodatne citogenetske abnormalnosti FL su izrazito heterogene i najčešće uključuju promjene broja kromosoma i balansirane translokacije +X, +7, +12, +12q13-14, +18 te delecije del6q, del13q, 1p36-, 17p13- i del10q22-24 (43,44). Heterogenost i nalaz rastućeg broja molekularnih promjena s porastom histološkog stupnja FL upućuje na postojanje različitih puteva klonalne evolucije (45,46).

Najnovije studije upućuju na kritičan biološki značaj netumorskih stanica limfnog čvora – T limfocita, stromalnih stanica i folikularnih dendritičnih antigen prezentirajućih stanica u klonalnoj evoluciji i određivanju prognostičkih karakteristika FL (47,48).

1.3 Terapijski pristup *DLBCL* i FL

Liječenje i prognoza bolesnika s *DLBCL* i FL određeni su histološkim karakteristikama, kliničkim stadijem bolesti (Ann Arbor klasifikacija) (5) i kliničkim prognostičkim pokazateljima obuhvaćenim Međunarodnim prognostičkim indeksom (MPI) (6,7). Određivanje kliničkog stadija bolesti prema kriterijima Ann Arbor klasifikacije obuhvaća četiri klinička stadija bolesti unutar kojih se razlikuje prisutnost ili odsutnost kliničkih B

simptoma. MPI obuhvaća dob bolesnika, opći status bolesnika, vrijednost laktat dehidrogenaze, klinički stadij bolesti i zahvaćenost ektranodalnih mjesta.

DLBCL je biološki agresivan limfom, ako se ne liječi medijan preživljenja je 1-2 godine (4). Standardna sistemna terapija bazira se na antraciklinskoj citostatskoj terapiji i dugotrajna remisija postiže se u 40-50% bolesnika (3,4). Iako SZO klasifikacija *DLBCL* definira kao zaseban kliničko-morfološki entitet, različit odgovor na terapiju ukazuje na biološku heterogenost tumora.

U vrijeme postavljanja dijagnoze većina bolesnika s FL je životne dobi iznad 50 godina i u uznapredovalom kliničkom stadiju bolesti. Međutim klinički tijek FL varira širokim rasponom biološkog ponašanja, od slučajeva spontane remisije (15-20%), slučajeva indolentnog kliničkog tijeka s prisutnim odgovorom na terapiju i relapsima bolesti te medijanom preživljenja 9-10 godina, do agresivnih kliničkih slučajeva (3,4,49). Smrtni ishod je najčešće posljedica rezistentnosti na terapiju, transformacije u *DLBCL* (20-70% slučajeva) ili toksičnog efekta terapije (4,7,50,51). Pristup liječenju FL obuhvaća različite mogućnosti, od praćenja bolesnika bez terapije do primjene agresivne kemoterapije s transplantacijom matičnih stanica (3,4,36). Odabir optimalnog liječenja uvjetovan je kliničkom agresivnošću i histološkim stupnjem FL (36).

Usporednom analizom morfoloških karakteristika histoloških stupnjeva FL, ekspresije biljega BCL2, BCL6, CD10 i najčešćih kromosomskih abnormalnosti t(14;18)(q32;q21) te preuredbe *BCL6* gena regije 3q27, uočena je značajna heterogenost (52-54).

FL-1 i -2, u 70% slučajeva ima tipičnu koekspresiju biljega BCL2 i CD10 i prisutnu t(14;18)(q32;q21). FL-3, karakteriziran je varijabilnom ekspresijom biljega BCL2 i CD10 i različitim kromosomskim abnormalnostima - preuredba *BCL6* gena regije 3q27, *BCL2*

amplifikacija i rjeđe t(14;18)(q32;q21). Također mali broj slučajeva FL-1 i -2 s odsutnom t(14;18)(q32;q21) karakteriziran je navedenom varijabilnom ekspresijom biljega i različitim kromosomskim abnormalnostima (52-54).

Kliničko ponašanje FL-3 u odnosu na klinički indolentne stupnjeve 1 i 2, sličnije je *DLBCL* (55-58), te je terapijski pristup FL-3 sličan ili jednak liječenju agresivnih limfoma (36). Radovi Ott, G i sur. (59,60) ukazuju na dva citogenetska i imunofenotipska profila FL-3, podtip s t(14;18)(q32;q21) i povećanom ekspresijom BCL2 morfoloških karakteristika FL-3A, te podtip s preuredbom *BCL6* gena regije 3q26 morfoloških karakteristika FL-3B. Bosga-Bouwer, AG i sur. (55) također opisuju dodatnu heterogenost citogenetskih karakteristika FL-3B. Navode tri podgrupe FL-3B međusobno isključivih citogenetskih karakteristika – grupa 1 s t(14;18)(q32;q21) bez preuredbe 3q27; grupa 2 bez t(14;18)(q32;q21) i bez preuredbe 3q27 ali s drugim kromosomskim abnormalnostima i grupa 3 bez t(14;18)(q32;q21) s preuredbom 3q27, te pretpostavljaju različitost uključenih onkogenetskih puteva (55). U novijem radu Bosga-Bouwer, AG i sur. (61) analizirali su ekspresiju biljega CD10, BCL6, BCL2 i p53 te preuredbu *myc* gena i mutacije *TP53* u navedene tri citogenetske grupe slučajeva FL-3B. Nisu utvrdili značajnu razliku između analizirane tri citogenetske grupe FL-3B. CD10 ekspresija bila je češće prisutna u grupi FL-3B s t(14;18)(q32;q21) ukazujući na sličnost te grupe s FL-1, -2 i -3A (61).

S obzirom na kliničke karakteristike i heterogenost citogenetskih i imunofenotipskih obilježja postavlja se pitanje da li je FL-3 pretežno folikularnog rasta, >75%, dio morfološkog, kliničkog i molekularno genetskog spektra *DLBCL*.

1.4 DNA *microarray* analiza genske ekspresije *DLBCL* i FL

DNA *microarray* tehnologija razvijena je kasnih 1990-tih kao jedna od brojnih novih tehnika funkcionalne genomike potaknutih rezultatima Projekta ljudskog genoma (*Human Genome Project*). Ova metoda predstavlja tip *in situ* hibridizacije; DNA *chipom* se istovremeno analizira nekoliko tisuća oligonukleotidnih ili komplementarnih DNA (cDNA) sekvenci izabranih gena (62-64). Iako mRNA nije krajnji produkt gena, transkripcija predstavlja prvu razinu informacije genske regulacije (63). Relativna količina hibridizirane RNA nekog uzorka, upućuje na relativnu razinu ekspresije gena dajući sliku dinamičke funkcije ekspresije gena (63). Specifične promjene u tumorskoj stanici mijenjaju uzorak mRNA ekspresije, karakterizirajući molekularni potpis i biološka obilježja tumora.

Jedan od važnih kriterija u klasifikaciji i dijagnozi limfoma je prisutnost citogenetskih i molekularnih abnormalnosti povezanih s različitim tipovima limfoma. Citogenetska analiza nije izdvojila pojedinačne promjene s dijagnostičkim i prognostičkim značenjem, a time niti klinički jasne uzroke biološke heterogenosti *DLBCL* (32-34). Analizom genske ekspresije *DLBCL* utvrđena je molekularna heterogenost tumora osobito gena uključenih u proliferaciju, aktivaciju i stupanj diferencijacije tumorskih stanica te odgovor netumorskih stanica limfnog čvora.

Alizadeh, AA i sur. (65) polazeći od koncepta bioloških karakteristika tumora određenih stupnjem B stanične diferencijacije, klasificirali su uzorke *DLBCL* prema uzorku genske ekspresije B stanica germinativnog centra. Definirali su dvije skupine *DLBCL*, GCB skupinu - s prisutnom ekspresijom gena B stanica germinativnog centra, i ABC skupinu - s niskom ekspresijom gena B stanica germinativnog centra i prisutnom ekspresijom gena normalno induciranih tijekom *in vitro* aktivacije B stanica periferne krvi. GCB i ABC skupina genske ekspresije *DLBCL* statistički se značajno razlikuju u petogodišnjem preživljenju, 76% u GCB odnosno 16% u ABC skupini (65). Ista skupina autora potvrdila je rezultat DNA *microarray* metode nalazom mutacija gena varijabilne regije teškog lanca imunoglobulina (IgV_H) u uzorcima *DLBCL* klasificiranih kao GCB, a odsutnost tih mutacija u ABC skupini (66). Početnu studiju Alizadeh, AA i sur. (65) potvrdili su Rosenwald, A i sur. (67) i Wright, G i sur. (68). Na osnovu analize ekspresije manjeg broja gena, uz GCB i ABC skupinu *DLBCL*, izdvojili su i treću skupinu karakteriziranu potpunim odsustvom ekspresije navedenih gena, što upućuje na dodatnu heterogenost skupina određenih stupnjem B stanične diferencijacije (67,68).

Shipp, MA i sur. (69) analizom genske ekspresije, neovisnom o stupnju B stanične diferencijacije, izdvojili su dvije skupine molekularne ekspresije *DLBCL* direktno povezane s povoljnim ishodom odnosno refraktornom bolešću. Nađeni geni, različito eksprimirani u navedene dvije skupine, uključeni su u signalne puteve B staničnih receptora, puteve serin/treonin fosforilacije i regulaciju apoptoze (69).

Nalaz različitog molekularnog fenotipa, razlika u kliničkom odgovoru bolesnika na standardnu antraciklinsku terapiju te moguće izdvajanje bolesnika lošijeg kliničkog ishoda unutar pojedine skupine rizika MPI upućuje nedvojbeno na postojanje

molekularno različitih bolesti unutar skupine *DLBCL* koje nastaju različitim mehanizmima maligne transformacije (70-76).

Analiza genske ekspresije FL, bez izdvojenih histoloških stupnjeva, u radu Alizadeh, AA i sur. (65), pokazala je grupiranje ekspresije FL uz molekularni profil ekspresije neaktiviranih B limfocita ukazujući na nisku razinu proliferacije tumora. Nalaz identičnog uzorka genske ekspresije FL i normalnih B stanica germinativnog centra potvrđuje GCB tip diferencijacije tumorskih stanica FL (65). Husson, H i sur. (77) su usporedbom genske ekspresije tumorskih stanica FL definirali pojačano eksprimirane gene u odnosu na normalne B stanice germinativnog centra. Pojačano eksprimirani geni uključeni su u regulaciju staničnog ciklusa, regulaciju transkripcije i međustaničnu interakciju te predstavljaju osnovu patogenetskih mehanizama u nastanku FL (77).

Glas, AM i sur. (13) su utvrdili da je genska ekspresija značajno bolji pokazatelj tijeka bolesti i prognoze FL od histoloških i kliničkih pokazatelja. Geni uključeni u kontrolu staničnog ciklusa, DNA sintezu i metabolizam stanice pojačano su eksprimirani u klinički agresivnim FL. Klinički indolentni FL obilježeni su pojačanom ekspresijom gena netumorskih T stanica i makrofaga limfnog čvora (13).

Shipp, MA i sur. (69) su pokazali analizom oligonukleotidnog *microarray* različitost uzoraka genske ekspresije FL i *DLBCL* s točnošću od 91%. Međutim, Robetorye, RS i sur. (75) su analizom genske ekspresije staničnih linija *DLBCL* s t(14;18)(q32;q21) utvrdili pojačanu ekspresiju *BCL2* i *myb* gena i smanjenu ekspresiju *Interleukin regulatory factor* (IRF-1). Identičan nalaz ekspresije navedenih gena nađen je u uzorcima FL u radu Alizadeh, AA i sur. (75) ukazujući na sličnost molekularnog profila FL i *DLBCL* s prisutnom t(14;18)(q32;q21).

Lossos, IS i sur. (78) su pokušali definirati uzorak genske ekspresije povezan s transformacijom FL u *DLBCL* kao i uzorak za razlikovanje *DLBCL* nastalog transformacijom FL i primarnog *DLBCL*. Transformacija FL u *DLBCL* praćena je pojavom različitih kromosomskih abnormalnosti koje nisu tipične i ponavljajuće (79,80). Međutim, mogu se izdvojiti dvije skupine genske ekspresije povezane s procesom transformacije definirane povišenom ili smanjenom ekspresijom *c-myc* gena. Uzorak genske ekspresije *DLBCL* nastalog transformacijom FL sličniji je primarnom FL nego *de novo* nastalom *DLBCL*, ukazujući na alternativni put patogeneze transformacije FL u *DLBCL* i *de novo* nastalog *DLBCL* (78).

1.5 Proteinska ekspresija diferencijacijskih gena

DNA *microarray* analiza genske ekspresije je zahtjevna i preskupa metoda za svakodnevnu kliničku upotrebu. Svaki gen uključen u proces neoplazije djeluje preko svog proteinskog produkta. Analizom mRNA indirektno se može zaključiti o posljedicama promjene ekspresije gena koja uzrokuje promjenu ekspresije proteina (81). Međutim, ekspresiju mRNA ne prati uvijek povišena ekspresija proteina (81). Rezultati DNA *microarray* analize predstavljaju ukupnu gensku ekspresiju stanične populacije tj. tumorskih i netumorskih stanica limfnog čvora (72). Izbor široko primjenjivane i dostupne imunohistokemijske metode kao potvrde rezultata DNA *microarray* omogućava proširenje rezultata na razinu proteinske ekspresije te analizu rasporeda proteinskog produkta unutar stanice (72).

Monoklonalna protutijela za pojedine produkte genske ekspresije već postoje te omogućavaju njihovo brzo određivanje na razini proteinske ekspresije i upotrebu u dijagnostici i terapiji limfoma. Kao biljezi genske ekspresije B stanica germinativnog centra izdvojeni su BCL6 i CD10, dok MUM1/IRF4 i CD138 predstavljaju mogući panel biljega aktiviranih B stanica (81-84).

1.5.1 *BCL6* gen i njegov proteinski produkt

B cell lymphoma 6 (BCL6) gen je kloniran iz translokacije koja zahvaća regiju 3q27 u *DLBCL* (85). BCL6 protein je *zinc-finger* protein s funkcijom sekvencijski specifičnog transkripcijskog represora gena uključenog u aktivaciju i diferencijaciju limfocita, kontrolu staničnog ciklusa i upalu. Funkcija *BCL6* gena je u formiranju germinativnog centra inhibiranjem diferencijacije B stanica germinativnog centra u plazma stanice, sazrijevanju antitijela i odgovoru T-helper 2 medijatora (86,87).

U normalnom limfatičnom tkivu BCL6 protein je selektivno eksprimiran u jezgrama stanica germinativnog centra, te rijetkim CD4 pozitivnim T stanicama i perifolikularnim CD30 pozitivnim limfatičnim stanicama (81,88).

U limfoidnim neoplazmama promjene regulacije *BCL6* gena nastaju kao posljedica kromosomskih translokacija, mikrolecija, točkastih mutacija i hipermutacija. Česte su kombinirane, bialelne promjene (89-91). Posljedična pojačana ekspresija *BCL6* gena dovodi do zastoja u sazrijevanju i proliferaciji B stanica. Isto tako pojačana ekspresija *BCL6* gena smanjuje p53 posredovan apoptotički odgovor na oštećenje DNA tijekom transformacije stanica germinativnog centra potičući nastale maligne klonove (92).

Mutacije regulatornog dijela *BCL6* gena nastaju najčešće u limfomima podrijetla germinativnih i postgerminativnih stanica – FL, *DLBCL* i Burkitt limfom. Prisutne su u 50-80% slučajeva *DLBCL* i 40% FL (89). Mutacije *BCL6* gena s posljedičnim prekidom autoregulacije dovode do promjene ekspresije BCL6 proteina (93-95).

Translokacije zahvaćaju 5' nekodirajuću domenu *BCL6* gena regije 3q27 dovodeći *BCL6* gen pod kontrolu različitih promotora, najčešće lokusa gena imunoglobulinskih lanaca (96). Translokacije *BCL6* gena predstavljaju najčešću kromosomsku abnormalnost *DLBCL* i prisutne su u 40% slučajeva i u 10-15% FL. Prognostički značaj preuredbe *BCL6* gena u *DLBCL* je različit, pojedine studije navode povoljan prognostički značaj, ali druge studije ne nalaze prognostički značaj ili navode nepovoljan ishod (96-104). Promotor gena uključen u translokaciju *BCL6* ima prognostički značaj; *Ig/BCL6* translokacije povezane su s povoljnim, *ne-Ig/BCL6* translokacije s nepovoljnim ishodom (105).

U uzorcima limfoma biološki značaj proteinske ekspresije BCL6 nije jedinstveno određen. BCL6 proteinska ekspresija označava stadij diferencijacije germinativnog centra. Promjene ekspresije BCL6 proteina su posljedica promjene regulacije *BCL6* gena, iako nisu uvijek povezane (106,107). U nekoliko radova analiziran je prognostički značaj BCL6 proteinske ekspresije *DLBCL*. Tri rada navode povoljniji ishod BCL6 pozitivnih bolesnika (108-110), dok Colomo, L i sur. (111) u velikoj studiji 128 bolesnika s *DLBCL*, nisu potvrdili navedeni značaj.

1.5.2 CD10

Common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CALLA, CD10) je membranska metaloproteinaza koja sudjeluje u postsekretornoj razgradnji neuropeptida, inaktivaciji upalnih i vazoaktivnih peptida. Nalazi se u različitim tkivima - mozgu, jetri, tankom crijevu, bubregu, kori nadbubrežne žlijezde, gonadama, placenti i leukocitima.

U normalnom limfatičnom tkivu CD10 protein je eksprimiran u ranim limfoidnim progenitornim stanicama i B stanicama germinativnog centra (112).

Ekspresija proteina CD10 prisutna je u većini slučajeva FL te 20-40% *DLBCL* (113-116). Rezultati analize prognostičkog značaja CD10 ekspresije u *DLBCL* se razlikuju u pojedinim radovima. Dva rada navode povezanost CD10 ekspresije i kraćeg ukupnog preživljenja (117,118). Ohshima, K i sur. (119) u studiji 138 slučajeva *DLBCL*, Go, J i sur. (120) i Biasoli, I i sur. (121) navode povoljan prognostički značaj ekspresije CD10, dok Fabiani, B i sur. (122) nisu pronašli prognostički značaj (119-122).

Zhang, X i sur. (123) izdvajaju *DLBCL* s ekspresijom CD10 kao podtip različitih genetičkih karakteristika od FL i *DLBCL*.

1.5.3 *MUM1/IRF4* gen i njegov proteinski produkt

Multiple myeloma - 1 / interferon regulatory factor – 4 (*MUM1/IRF4*) gen je limfocit specifičan član obitelji interferon regulatornih faktora transkripcije važan u proliferaciji i diferencijaciji B stanica (124,125). *MUM1/IRF4* onkogen otkriven je kloniranjem mjesta lomova t(6;14)(p25;q32) otkrivene u multiplom mijelomu, u kojoj *MUM1* gen regije 6p25 dolazi pod regulatornu kontrolu *IgH* lokusa regije 14q32 (126).

U reaktivnom limfatičnom tkivu MUM1/IRF4 ekspresija se razlikuje ovisno o fiziološkom stadiju B stanične diferencijacije (127,128). Uočena su tri fenotipska uzorka: centroblastni (BCL6+, MUM1-, CD138-), kasni germinativni / rani postgerminativni (BCL6-, MUM1+, CD138-) i postgerminativni (BCL6-, MUM1+, CD138+) (127,128).

U neneoplastičnom germinativnom centru većina stanica je MUM1 negativna, osim malog broja kasnih centrocita s prisutnom MUM1 ekspresijom. Postgerminativne stanice, imunoblasti, razvojni oblici prema plazma stanicama i plazma stanice, su također MUM1 pozitivne. CD138 su pozitivne samo diferencirane, zrele plazma stanice. To ukazuje da ekspresija MUM1/IRF4 prethodi ekspresiji CD138 u B staničnoj diferencijaciji (127,128).

U normalnom limfatičnom tkivu istovremena ekspresija MUM1/IRF4 i BCL6 u istoj stanici nije moguća (127,128). Različito od normalnih stanica germinativnog centra tumorske stanice *DLBCL* u 50% slučajeva pokazuju koekspresiju navedenih biljega sugerirajući poremećaj ekspresije tih gena (128).

1.5.4 CD138

Syndecan-1 (CD138) je transmembranski heparan sulfat proteoglikan. Ekspresija je prisutna na površini epitelnih stanica, normalnim B staničnim prekursorima u koštanoj srži, odsutna u stanicama germinativnog centra, te ponovno prisutna u postgerminativnim stanicama i zrelim plazma stanicama (129).

Interakcijom s različitim efektorskim molekulama regulira adheziju stanica, stanica i ekstracelularnog matriksa, migraciju stanica te potiče interakciju i aktivnost faktora rasta (130).

Ekspresija CD138 prisutna je u normalnim i neoplastičnim plazma stanicama, ne-Hodgkinskom limfomu malih stanica s plazmastičnom diferencijacijom te imunoblastičnom i plazmablastičnom *DLBCL* povezanim s AIDS-om (127,131).

CD138 je rijetko eksprimiran u neoplastičnim B stanicama *DLBCL* limfnog čvora. U nekoliko radova korišten je kao biljeg ABC fenotipa (111,132-136).

1.5.5 Proteinska ekspresija diferencijacijskih gena *DLBCL*

Definiranje podtipova *DLBCL* dokazivanjem proteinske ekspresije imunohistokemijskim metodama, daje mogućnost definiranja podtipova *DLBCL* različitih kliničkih karakteristika.

Analize proteinske ekspresije *DLBCL* sa ciljem izdvajanja GCB i ABC podtipova nisu jednoznačne (111,132-143). Pojedini radovi navode stupanj B stanične diferencijacije kao mogući pokazatelj ishoda *DLBCL* (133-136,140-143), dok drugi ne potvrđuju povoljan prognostički značaj GCB fenotipa (111,132, 137-139).

Slučajevi *DLBCL* se mogu podijeliti temeljem prisutne ekspresije ograničenog broja biljega, najčešće BCL6, CD10, MUM1/IRF4 i CD138. Ekspresija BCL6 i CD10 definirana je kao GCB fenotip (111,134- 143).

Hans, CP i sur. (142) su slučajeve *DLBCL* klasificirali u GCB skupinu ako je prisutna ekspresija samo CD10 ili CD10 i BCL6 biljega. Negativna ekspresija biljega CD10 i

BCL6 označavala je ABC skupinu. U slučajevima odsutne ekspresije CD10 i prisutne ekspresije BCL6, skupinu je određivala ekspresija MUM1/IRF4 biljega: ako je MUM1/IRF4 biljeg negativan, slučaj je klasificiran u GCB skupinu, odnosno ako je pozitivan u ABC skupinu. Na svim uzorcima analizirana je i genska ekspresija cDNA *microarray* metodom. Podjela *DLBCL* temeljem proteinske ekspresije biljega pokazala se točnija u predviđanju prognoze analiziranih slučajeva. Navedeni rezultat ukazuje da u slučajevima s povišenom genskom ekspresijom ne dolazi uvijek do translacije mRNA i stvaranja proteina (142). Također navode GCB fenotip kao povoljan prognostički pokazatelj unutar grupe niskog i visokog rizika MPI.

Koristeći kriterije za definiranje GCB i ABC fenotipa prema Hans, CP i sur. (142), u dva rada Colomo, L i sur. (111) i Moskowitz, CH i sur. (137) nije dokazan različit prognostički značaj navedenih fenotipskih skupina *DLBCL* (111,137).

Različito od prethodnih autora, Chang, CC i sur. (134), ne uzimajući ekspresiju biljega MUM1/IRF4 kao isključivo postgerminativni biljeg diferencijacije, definiraju tri fenotipske skupine *DLBCL*. Ekspresija CD10 i/ili BCL6 uz negativnu MUM1/IRF4 predstavlja GCB fenotip, ekspresija CD10 i/ili BCL6 uz pozitivnu MUM1/IRF4 ekspresiju je aktivirani GCB fenotip i negativna ekspresija CD10 i BCL6 uz pozitivnu ekspresiju MUM1/IRF4 i/ili CD138 predstavlja ABC fenotip. Izdvojeni GCB fenotip, često nazvan pravi GCB fenotip definiran isključivo ekspresijom CD10 i/ili BCL6, pokazao se kao nezavisan povoljan prognostički pokazatelj, dok nije nađena razlika u preživljenju fenotipskih skupina aktivirani GCB i ABC (134). Uz GCB fenotip utvrđen je kao nezavisan prognostički pokazatelj i vrijednost MPI. Nije pronađena korelacija

između fenotipskih skupina i vrijednosti MPI, te je prognostički značaj fenotipa neovisan o vrijednosti MPI (134).

Zinzani, PL i sur. (135) koristeći isti pristup određivanja fenotipskih skupina *DLBCL* kao Chang, CC i sur. (134), pronašli su različit prognostički značaj navedene tri fenotipske skupine.

Berglund, M i sur. (136) koristeći oba navedena pristupa u određivanju fenotipskih skupina *DLBCL* potvrđuje povoljan prognostički značaj ekspresija BCL6 ili CD10, dok je MUM1/IRF4 ekspresija povezana s lošijim preživljenjem .

Tzankov, A i sur. (141) potvrđuju GCB fenotip *DLBCL* kao nezavisan prognostički značajan pokazatelj. Također navode pozitivnu ekspresiju CD44v6 u ABC skupini *DLBCL* i povezanost s lošijim preživljenjem (141).

Simonitsch-Klupp, I i sur. (133) analiziraju stanične podtipove *DLBCL* i navode plazmablastično/plazmacitoidne morfološke karakteristike *DLBCL* i ABC fenotip kao loše prognostičke pokazatelje. Nije nađena razlika u preživljenju podtipova *DLBCL* centroblastične i imunoblastične morfologije, iako je ekspresija BCL6 češće prisutna u navedenim podtipovima nego u podtipu plazmacitoidne morfologije (133).

Linderroth, J i sur. (132) u određivanju podtipova *DLBCL* različitog histogenetskog podrijetla, koriste CD23 kao biljeg pregerminativnog i ranog germinativnog centra, kao biljege germinativnog centra BCL6, CD10 i CD40, i CD138 kao biljeg postgerminativnih stanica. Izdvajaju ekspresiju CD23 i CD40 kao prognostički povoljne, dok ekspresija CD10 i BCL6 nije pokazala značajnu povezanost s prognozom.

Saez, AI i sur. (144) pokušali su drugačijim pristupom od analize isključivo diferencijacijskih biljega definirati prognostički model *DLBCL*. Analizom proteinske

ekspresije 52 molekule (molekule kontrole staničnog ciklusa, apoptoze, B stanične diferencijacije, popravka DNA, degradacije ubiquitina, transkripcijski faktori) izdvojili su prognostički model od osam biljega sa 78% točnošću predviđanja lošeg ishoda. Iako navedeni model uključuje biljege BCL6 i MUM1/IRF4 potvrđujući njihov prognostički značaj u *DLBCL*, dobivene rezultate teško je povezati s tri prognostičke skupine *DLBCL* na osnovu genske ekspresije. Autori navode slučajno nakupljanje promjena s posljedicom povećane proliferacije i gubitka apoptoze tumorskih limfoidnih stanica, kao mogući patogenetski model *DLBCL* (144).

1.6 *BCL2* gen i njegov proteinski produkt

B cell lymphoma 2 (BCL2) protoonkogen smješten u regiji 18q21, otkriven je kloniranjem *t(14;18)(q32;q21)/IgH-BCL2* u FL (145-147).

BCL2 obitelj uključuje antiapoptotičke i proapoptotičke molekule. Slijedeći signale smrti stanice, proapoptotički homodimeri mijenjaju membranski potencijal mitohondrija, oslobađaju citokrom C i aktiviraju proteolitički enzim kaspaza 9 te potiču apoptozu. Povećana razina antiapoptotičkih proteina dovodi do stvaranja antiapoptotički/proapoptotičkih heterodimera ograničavajući utjecaj signala smrti stanice na membranski potencijal mitohondrija. *BCL2* protein je antiapoptotički protein, njegova povećana ekspresija štiti stanice od procesa programirane stanične smrti, a posljedično nakupljanje stanica čini osnovu nastanka limfoma. Povećana ekspresija *BCL2* je također odgovorna za kemoterapijsku rezistenciju (146,148-150).

BCL2 protein je eksprimiran u stanicama hematopoeze i drugim nehematopoetskim stanicama. BCL2 ekspresija odsutna je u neneoplastičnim B stanicama sekundarnih folikula i u kortikalnim timocitima (81).

Povećana ekspresija BCL2 proteina prisutna je u većini slučajeva FL i 30-60% *DLBCL*. Najčešće nastaje kao posljedica t(14;18)(q32;q21) koja je prisutna u 70-85% FL, odnosno 20-30% *DLBCL* i smatra se inicijalnim kritičnim događajem u patogenezi FL (2,3). t(14;18)(q32;q21) nije stalan nalaz u FL, učestalost se smanjuje s višim histološkim stupnjem FL (151). U navedenoj translokaciji *BCL2* gen dolazi pod konstitutivnu aktivaciju promotora *IgH* gena. Povećana ekspresija BCL2 proteina može biti prisutna u slučajevima odsutnosti t(14;18)(q32;q21) i nastaje kao posljedica amplifikacije i mutacije *BCL2* gena (152).

Amplifikacija *BCL2* gena i trisomija, ili rijetko veći broj kopija kromosoma 18, u slučajevima *DLBCL* opisana je u više radova (27,31,153). Navedene citogenetske promjene uzrokuju pojavu dodatnih signala u FISH analizi (154,155). U samo jednoj studiji nalaz dodatnih *BCL2* signala povezan je s ABC fenotipom *DLBCL*, međutim nije utvrđen klinički značaj navedenog nalaza (154).

t(14;18)(q32;q21) u primarnom *DLBCL* nije definirana kao pokazatelj preživljenja (90,91,148,149). Ekspresija BCL2 proteina u većem broju radova povezana je s bržim relapsom bolesti i kraćim ukupnim preživljenjem (152,153,156-159).

U novijim radovima t(14;18)(q32;q21) javlja se češće u GCB podtipu *DLBCL* (155,160-164). Poulsen, CB i sur. (143) navode da je t(14;18)(q32;q21) prisutna pretežno, ali ne i isključivo, u GCB podtipu *DLBCL*. U radu Barrans, SL i sur. (154) t(14;18)(q32;q21) vezana je češće uz GCB podtip *DLBCL* s lošijim preživljenjem u odnosu na GCB *DLBCL*

bez t(14;18)(q32;q21), dok Igbal, J i sur. (162) i Xu, Y i sur. (163) ne nalaze klinički značajnu razliku preživljenja t(14;18)(q32;q21) pozitivnih i negativnih slučajeva GCB podtipa *DLBCL*.

Povećana ekspresija BCL2 proteina osim u slučajevima *DLBCL* s t(14;18)(q32;q21) često je prisutna u slučajevima bez translokacije osobito u ABC podtipu *DLBCL* ukazujući na mogući različit mehanizam povećane ekspresije BCL2 u GCB i ABC podtipu *DLBCL* (154,155,162). U slučajevima bez t(14;18)(q32;q21) ekspresija BCL2 proteina nije pokazala utjecaj na preživljenje (154,155), osim u ABC podtipu *DLBCL* gdje je povezana s kraćim preživljenjem (142). Hirose, Y i sur. (138) nisu pronašli različitu učestalost, niti prognostički značaj t(14;18)(q32;q21) i proteinske ekspresije BCL2 u GCB i ABC podtipu *DLBCL*.

1.7 p53

p53 je tumor supresor gen, smješten na kromosomu 17p13.1. Jedan od najčešće mutiranih gena u ljudskim novotvorinama (>50% svih tumora). Genski produkt je nuklearni fosfoprotein s funkcijom transkripcijskog faktora koji inducira ekspresiju gena uključenih u zaustavljanje staničnog ciklusa u fazi G1 ili gena uključenih u apoptozu te predstavlja tzv. glavni čuvar genoma. p53 negativna regulacija progresije staničnog ciklusa posredovana je indukcijom p21 i posljedično neutralizacijom CDK2-ciklin E kompleksa (165).

p53 protein se imunohistokemijski ne može detektirati u normalnim stanicama zbog njegove brze razgradnje. Mutacija *p53* gena dovodi do stabilizacije i povišene razine proteina (166,167).

Mutacije *p53* gena dovode do funkcionalno neadekvatnog proteina i takav događaj nađen je u 17-25% *DLBCL* (167-170). U *DLBCL* mutirani *p53* gubi mogućnost aktivacije ciljnog gena *p21* rezultirajući p53+ p21- imunofenotipom, što je različito od p53- p21- imunofenotipa uočenog u odsutnosti mutacije *p53* gena (171).

Učestalost *p53* mutacija u *DLBCL* je relativno niska u usporedbi s drugim tumorima, ali je značajno viša od učestalosti kod većine niskoproliferativnih B staničnih limfoma, ukazujući da je *p53* inaktivacija povezana s značajnom proliferacijom tumora (165).

p53 ekspresija može se dokazati imunohistokemijski u 30-40% *DLBCL*, što ukazuje na ekspresiju u odsutnosti mutacije (167,170).

Ekspresija *p53* proteina u *DLBCL* povezana je s rezistencijom na terapiju (172), u nekim studijama s lošijim ishodom (173-175) ili utjecaj na preživljenje nije pronađen (176,177).

Paik, JH i sur. (178) analizirali su prognostički značaj proteinske ekspresije regulatornih molekula staničnog ciklusa u GCB i ABC tipu *DLBCL*. Pronašli su češće povećanu ekspresiju *p53* u GCB tipu *DLBCL* limfnog čvora, a negativnu ekspresiju *p16*, *p21* i *p14* u ABC tipu *DLBCL*. Također imunofenotip *p16* -, *p14* -, *p53* + definira prognostički nepovoljniju skupinu unutar GCB tipa *DLBCL* (178).

1.8 CD30

CD30 (Ki-1) molekula je dio *tumor-necrosis factor-receptor (TNFR)* obitelji i poznata je kao aktivacijski biljeg B i T limfocita (179,180).

U neneoplastičnom limfnom čvoru biljeg CD30 normalno je eksprimiran u interfolikularnim velikim B stanicama s dendritičnom morfologijom, u kojima je ekspresija biljega germinativnog centra i plazma stanica negativna (181).

Navedene stanice smatraju se ishodišnim stanicama dijela B velikostaničnih limfoma građenih od aktiviranih limfoidnih stanica kao i Hodgkinovog limfoma (182).

DLBCL s pozitivnom ekspresijom biljega CD30 karakteriziran je anaplastičnim staničnim podtipom i boljom prognozom sličnom ALK pozitivnom anaplastičnom limfomu velikih stanica (ALK+ *ALCL*) (20). Kliničke karakteristike CD30+ *DLBCL* ukazuju na daljnju heterogenost *DLBCL* i mogućnost izdvajanja zasebnog kliničko-patološkog entiteta (20,132).

Analizirajući značaj imunofenotipskih karakteristika *DLBCL*, Zinzani, PL i sur. (135) izdvojili su tri prognostičke skupine. Prognostički najnepovoljnija skupina sastavljena je od B postgerminativnih stanica s karakteristikama aktivacije i plazmablastične/plazmacitoidne diferencijacije, imunofenotipskih karakteristika CD30+ ili CD138+, BCL2+, CD10- i BCL6- (135).

Saez, AI i sur. (144) analizirajući prognostički model *DLBCL* na osnovu proteinske ekspresije, uočili su porast ekspresije biljega CD30 s nalazom EBV.

2. Ciljevi istraživanja

1. U primarnom *DLBCL* i FL-3 limfnog čvora utvrditi:
 - fenotipske karakteristike:
 - diferencijacijskih biljega BCL6, CD10, MUM 1/IRF4 i CD138
 - i klasificiranje u GCB i ABC skupinu;
 - BCL2, p53 te CD30;
 - prisutnost translokacije $t(14;18)(q32;q21)/IgH-BCL2$ i abnormalnosti regije 3q27 koje uključuju translokacije i numeričke aberacije *BCL6* gena.
2. Usporediti proteinsku ekspresiju i citogenetske abnormalnosti između *DLBCL* i FL-3, te GCB i ABC skupine.
3. Utvrditi utjecaj fenotipskih karakteristika, citogenetskih abnormalnosti i kliničkih prognostičkih pokazatelja – dob, spol, klinički stadij, Međunarodni prognostički indeks na ishod bolesnika *DLBCL* i FL-3, te GCB i ABC skupine.

3. Bolesnici i metode

3.1 Bolesnici

U istraživanje je uključeno 73 bolesnika s histološkom dijagnozom primarnog *DLBCL* i FL-3 limfnog čvora. Bolesnici su liječeni u KB Merkur, KB Dubrava i KBC Zagreb u razdoblju 2000 – 2004. godine.

Analizirana su 73 limfna čvora, dobivena u vrijeme dijagnostičkog postupka prije početka terapije.

Histološke dijagnoze postavljene su prema kriterijima SZO klasifikacije limfoidnih neoplazmi na histološkim rezovima obojenim hemalaun & eozinom (H&E), Giemsom, PAS i Gomori metodom (1,2).

U 53 uzorka dijagnoza je bila *DLBCL*, a u 20 uzoraka FL-3 pretežno folikularnog rasta, >75%.

U **tablici 1** prikazana su 73 bolesnika prema histološkoj dijagnozi, dobi, spolu, kliničkom stadiju bolesti i vrijednosti MPI u vrijeme postavljanja dijagnoze. Ispitivane skupine bolesnika statistički značajno se razlikuju s obzirom na dob (T test = 2.26; s.s. = 71; **P = 0.027**), dok je raspodjela bolesnika prema spolu podjednaka ($\chi^2 = 0.356$; s.s.= 1; P = 0.551). U svaki klinički stadij određen prema Ann Arbor klasifikaciji (5) uključeni su bolesnici sa i bez kliničkih B simptoma. Nije nađena statistički značajna razlika u zastupljenosti kliničkih stadija s obzirom na patohistološku dijagnozu *DLBCL* i FL-3 ($\chi^2 = 6.27$; s.s.= 3; P = 0.099). Vrijednosti MPI podijelili smo u dvije skupine. Skupina 1 uključuje - MPI score 0 i 1 - mali rizik i score 2- mali intermedijarni rizik; skupina 2

uključuje - MPI *score* 3 - veliki intermedijarni rizik i *score* 4 i 5 - veliki rizik. Statistički značajna većina bolesnika s FL-3 imala je MPI *score* nižeg rizika ($\chi^2 = 3.89$; s.s.= 1; **P = 0.048**).

Podaci o duljini praćenja bili su dostupni za 65 bolesnika sa srednjim vremenom praćenja od 19 mjeseci (1 – 1843 dana).

Od 65 praćenih bolesnika, 2 nisu primili terapiju, a podaci o načinu liječenja bili su dostupni za 61 bolesnika: 39 bolesnika su liječena samo standardnom antraciklinskom terapijom (*CHOP*, *cyclophosphamide*, *doxorubicin*, *vincristine*, *prednisolon*) od kojih su tri bolesnika primila i dodatnu radioterapiju, 3 bolesnika uz standardnu antraciklinsku terapiju liječeni su i anti CD20 monoklonalnim protutijelom (*Rituximab*), 4 bolesnika su liječena neantraciklinskom terapijom (*COP*, *cyclophosphamide*, *vincristine*, *prednisolon*), 9 bolesnika liječeno je dodatnom polikemoterapijom, kod 6 bolesnika uz dodatnu polikemoterapiju učinjena je i transplantacija perifernih matičnih stanica.

Tablica 1. Prikaz bolesnika prema histološkoj dijagnozi, dobi, spolu, kliničkom stadiju bolesti i vrijednosti MPI u vrijeme postavljanja dijagnoze.

		DLBCL	FL-3
broj bolesnika		53	20
dob		P=0.027	
raspon/medijan/SD*		23-91/65.80/13.01	25-79/57.50/15.66
spol		P=0.551	
m/ž		28/25	9/11
klinički stadij**		P=0.099	
Σ64	I	10	5
	II	13	2
	III	10	8
	IV	14	2
MPI***		P=0.048	
Σ64	1	26	14
	2	21	3

* SD - standardna devijacija;

** I - stadij Ia i Ib; II – stadij IIa i IIb; III – stadij IIIa i IIIb; IV – stadij IVa i IVb;

*** 1 – MPI score 0 i 1 - mali rizik i score 2 - mali intermedijarni rizik;
2 – MPI score 3 - veliki intermedijarni rizik i score 4 i 5 - veliki rizik.

3.2 Tkivni *microarray*

Uzorci s dovoljnom količinom i kvalitetom tkiva korišteni su za izradu tkivnog *microarray* (TMA) (183-185). Iz reprezentativne regije tumora, iglom za biopsiju koštane srži promjera 11G/3.00mm (*Somatex, Germany*) uzeta su dva cilindra tkiva. Tkivni cilindar je uz pomoć mandrena pažljivo izvađen iz biopsijske igle i stavljen u označenu biopsijsku kazetu. Za izradu TMA svaki cilindar tkiva je prenesen pincetom na prethodno određeno mjesto u novom parafinskom bloku te uklopljen u tekući parafin. Pojedini TMA ukupno sadrži do dvanaest tkivnih cilindara. Svaki analizirani uzorak tumora, zastupljen je s dva cilindra tkiva reprezentativne regije promjera 2mm, uklopljenih u dva parafinska bloka TMA. TMA rezovi debljine 4µm preneseni su na silanizirana predmetna stakla (*DakoCytomation, Denmark*) i obojeni standardnom H&E metodom kako bi se provjerila kvaliteta dobivenih cilindara (186-191).

Rezovi TMA i standardni rezovi tkiva su jednako obrađeni imunohistokemijskom metodom (192,193) i interfaznom fluorescentnom *in situ* hibridizacijom.

3.3 Imunohistokemijsko bojenje

U imunohistokemijskoj analizi korištena su slijedeća protutijela: CD20 (*DakoCytomation, Denmark*, klon L26, razrijeđenje 1:200), CD3 (*DakoCytomation, Denmark*, poliklonalno, razrijeđenje 1:50), BCL6 (*Novocastra, Newcastle, UK*, klon P1F6, razrijeđenje 1:20), CD10 (*Novocastra, Newcastle, UK*, klon 56C6, razrijeđenje

1:20), MUM-1/IRF4 (*Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA*, poliklonalno, razrijeđenje 1:100), CD138 (*Novocastra, Newcastle, UK*, klon 5F7, razrijeđenje 1:50), BCL2 (*DakoCytomation, Denmark*, klon 124, razrijeđenje 1:10), p53 (*DakoCytomation, Denmark*, klon DO-7, razrijeđenje 1:25) te CD30 (*DakoCytomation, Denmark*, klon Ber-H2, razrijeđenje 1:20).

Postupci demaskiranja antigena su bili: BCL6, CD10, MUM1/IRF4, CD138 – lonac pod pritiskom *Pascal* (*DakoCytomation, Denmark*), +125°C, 30 sekundi, otopina etilen diamin tetraoctene kiseline (EDTA) pH8.0; BCL2, CD30 – mikrovalna pećnica, +95°C, 15 minuta, *Target Retrieval* otopina pH6.0 (*DakoCytomation, Denmark*); p53 – mikrovalna pećnica, +95°C, 15 minuta, *Target Retrieval* otopina pH9.0 (*DakoCytomation, Denmark*).

Za vizualizaciju ekspresije biljega korišten je streptavidin-biotin set (LSAB) (*DakoCytomation, Denmark*). Rezovi tkiva i tkivnog *microarray* debljine 4µm su deparafinirani, obrađeni standardnim, automatiziranim postupkom u *Autostainer* (*DakoCytomation, Denmark*) i kontrastirani hematoxylinom.

Pozitivnim rezultatom svih analiziranih biljega smatran je nalaz specifične ekspresije u >30% tumorskih stanica prema radu Hans, CP i sur. (142). U pozitivnim tumorskim stanicama BCL6, MUM1/IRF4 i p53 proteinska ekspresija je primarno nuklearna (81). Proteinska ekspresija CD10, CD138, CD30 i BCL2 biljega je primarno membranska i citoplazmatska.

Uzorci su klasificirani temeljem koekspresije pojedinih diferencijacijskih biljega u GCB i ABC skupinu prema kriterijima Hans, CP i sur. (142). Fenotipski uzorci CD10+, BCL6+, MUM1-; CD10+, BCL6-, MUM1+ i CD10+, BCL6+, MUM1+ smatrani su GCB

fenotipom, a fenotipski uzorci CD10-, BCL6+, MUM1+ i CD10-, BCL6-, MUM1+ ABC fenotipom.

3.4 Interfazna fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) na parafinskim rezovima tkiva

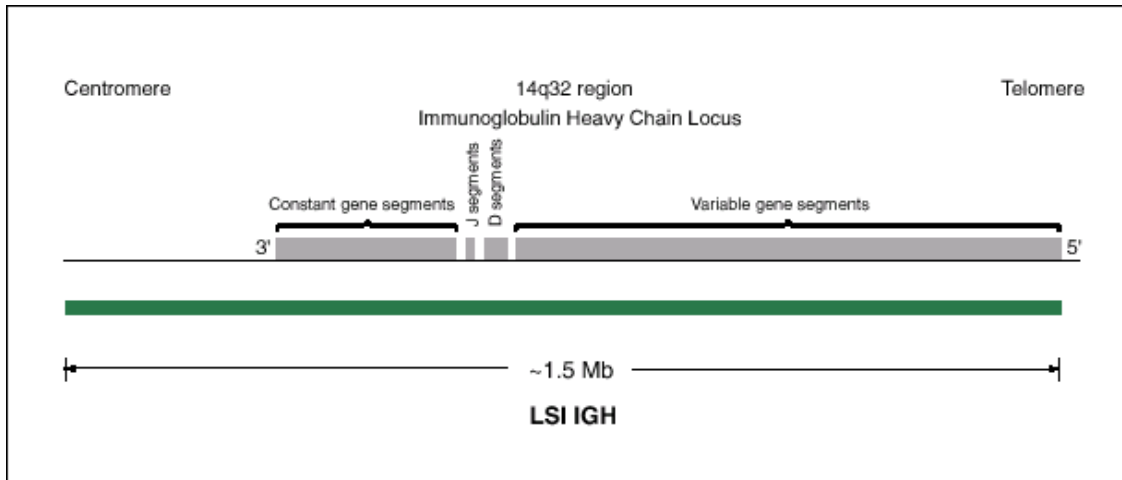
3.4.1 Priprema preparata

Rezovi tkiva debljine 4µm na silaniziranim predmetnim staklima (*DakoCytomation, Denmark*) deparafinirani su Histoclear otopinom (*National Diagnostics, England*) na sobnoj temperaturi tri puta kroz 5 minuta, te zatim isprani u 100% alkoholu na sobnoj temperaturi 2 minute. Rezovi su zatim rehidrirani u seriji alkohola 100%, 85% i 70%, 2 minute u svakom i isprani u destiliranoj vodi na sobnoj temperaturi. Nakon deparafinacije rezovi su kuhani u antigen *retrieval* puferskoj otopini *Target Retrieval* pH 9.0 (*DakoCytomation, Denmark*) na +95°C u mikrovalnoj pećnici 15 minuta, zatim tretirani s pepsinom 0.1g/mL (*Sigma, Germany*) na +37°C, 20 minuta, te dehidrirani u seriji alkohola 70%, 85% i 100%, 2 minute u svakom i osušeni na zraku. Prema uputama proizvođača pripremljene su direktno obilježene - dvobojna fuzijska proba LSI *IgH/BCL2 dual color, dual fusion translocation probe* (*Vysis Inc., USA*) i dvobojna razdvajajuća proba LSI *BCL6 dual color, break apart rearrangement probe* (*Vysis Inc., USA*). Na svaki rez stavljeno je 2µL probe i pokriveno pokrovnicom površine 100 mm² koja je učvršćena ljepilom. Predmetna stakla su stavljena u Hybridizer (*DakoCytomation,*

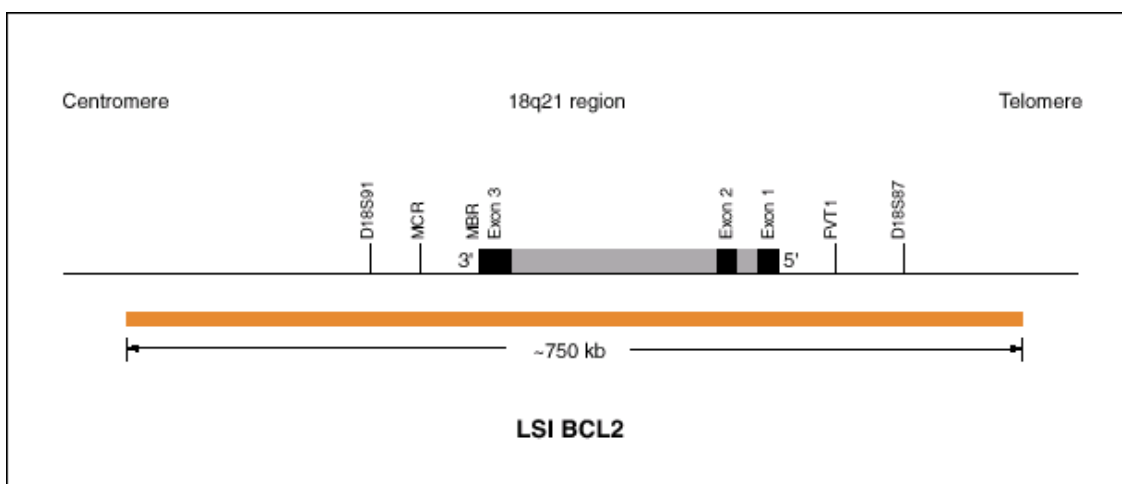
Denmark), gdje se odvija denaturacija na +82°C, 5 minuta, a zatim slijedi hibridizacija na +45°C, preko noći. Slijedeći dan rezovi se ispiru tri puta: u prethodno ugrijanom puferu 0.0003% Tween / 0.4xSSC na +72°C, 2 minute; u prethodno ugrijanom puferu 0.0001% Tween / 2xSSC na +72°C, 2 minute i na sobnoj temperaturi u 2xSSC, 2 minute. Završno, rezovi tkiva se prekrivaju s 10µl Vectashield sredstva za uklapanje (*Vector Laboratories Inc., USA*) koje sadrži 10⁻⁵g/L 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) fluorescirajuće boje (*Serva, Germany*) za kontrastiranje DNA.

3.4.2 Probe

LSI *IGH/BCL2 dual color, dual fusion translocation probe* je dizajnirana za detekciju jukstapozicije lokusa teškog lanca imunoglobulina (*IgH*) i sekvence *BCL2* gena uključene u t(14;18)(q32;q21) (194,195). Proba sadrži LSI *IgH* probu (**slika 1**) obilježenu sa SpectrumGreen, veličine otprilike 1.5 Mb, homologne sekvence s cijelim *IgH* lokusom i s dijelom sekvence veličine 300 kb uz 3' kraj *IgH* lokusa. LSI *BCL2* proba (**slika 2**) obilježena je sa SpectrumOrange i pokriva regiju veličine otprilike 750 kb, koja uključuje cijeli *BCL2* gen s dodatnim sekvencama ukupne veličine 250 kb distalno i proksimalno od *BCL2* gena. Rezultat hibridizacije u normalnoj jezgri s LSI *IgH/ BCL2* probom su dva narančasta i dva zelena signala (2O2G uzorak). U jezgri s t(14;18)(q32;q21) najčešći uzorak je jedan narančast, jedan zeleni signal, predstavljajući normalne homologe i dva narančasto/zelena (žuta) fuzijska signala, predstavljajući recipročnu translokaciju (1O1G2F uzorak) (194).



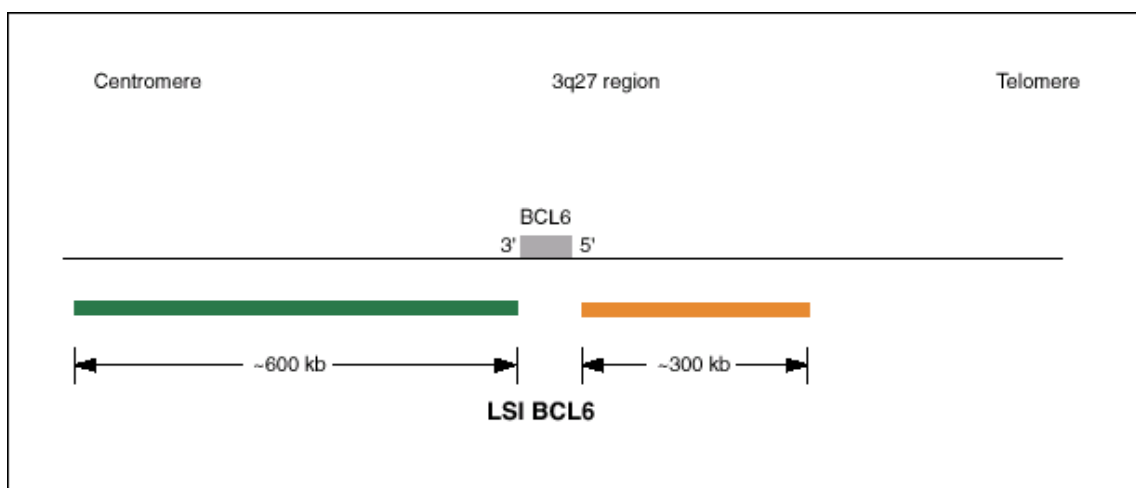
Slika 1. Shematski prikaz LSI *IgH* probe (www.vysis.com).



Slika 2. Shematski prikaz LSI *BCL2* probe (www.vysis.com).

LSI *BCL6* dual color, break apart rearrangement probe (**slika 3**) omogućava detekciju lomova kromosoma povezanih s različitim translokacijama koje uključuju *BCL6* gen u regiji 3q27. Proba sadrži 300 kb 5' LSI *BCL6* probu obilježenu sa SpectrumOrange i 600

kb 3' LSI *BCL6* probu obilježenu sa SpectrumGreen. Navedene probe su odvojene lokusom veličine 42 kb koji sadrži cijeli *BCL6* gen, uključujući i regiju loma *BCL6* gena. U normalnoj stanici hibridiziranoj s *BCL6* probom očekivani uzorak signala su dva narančasto/zelena fuzijska signala (2F). U stanici s translokacijom koja uključuje mjesto loma *BCL6* lokusa između 5' i 3' mjesta hibridizacije *BCL6* probe nalaze se jedan narančast, jedan zeleni i jedan fuzijski signal (1O1G1F). U nekim normalnim jezgrama može se vidjeti blaga odvojenost narančastog i zelenog signala zbog neobilježenog *BCL6* lokusa između mjesta hibridizacije dva dijela probe (196,197).



Slika 3. Shematski prikaz LSI *BCL6* probe (www.vysis.com).

3.4.3 Analiza preparata

Korišten je fluorescencijski mikroskop Olympus BX51, a slike su pohranjene uz pomoć *SoftImaging System analySIS GmbH*.

U svakom uzorku analizirano je 200 morfološki očuvanih jezgara. Nalaz karakterističnih promjena signala smatran je pozitivnim rezultatom ako je prisutan u >7% tumorskih stanica, što odgovara vrijednosti pozitivnog praga (151,196,198).

Vrijednost pozitivnog praga određuje se prema prisutnosti karakterističnih promjena signala u normalnom, reaktivnom limfatičnom tkivu. Pet uzoraka tkiva tonzila analizirano je kao kontrola. Vrijednost pozitivnog praga određena je kao srednja vrijednost +3SD frekvencija jezgara sa karakterističnim promjenama signala na 500 analiziranih stanica. U našim uzorcima fuzijski signal *IgH/BCL2* i razdvojeni *BCL6* signal nađeni su u manje od 1% analiziranih jezgara, dok dodatni signali u analiziranim uzorcima nisu nađeni.

3.5 Statistička analiza

Kvalitativni pokazatelji prikazani su kontingencijskim tablicama. Povezanost između kvalitativnih pokazatelja ispitana je χ^2 testom. Coxova multivarijatna regresijska analiza korištena je za procjenu prediktivne vrijednosti raspoloživih pokazatelja. Preživljenje je procijenjeno Kaplan-Meierovom analizom (199,200). Ukupno preživljenje je računato kao vrijeme praćenja od postavljanja patohistološke dijagnoze do dana smrti ili zadnje

kontrole. Bolesnici koji su bili živi u vrijeme zadnje kontrole uključeni su kao cenzorirano praćeni u analizu ukupnog preživljenja. Za statističku analizu podataka korišten je program STATISTICA (version 7.0 StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA).

4. Rezultati

4.1.1 Fenotipske karakteristike diferencijacijskih biljega BCL6, CD10, MUM1/IRF4 i CD138, klasificiranje u GCB i ABC skupinu, te ekspresija biljega BCL2, p53 i CD30 u *DLBCL* i FL-3

Imunohistokemijska analiza proteinske ekspresije pojedinih biljega učinjena je na uzorcima svih 73 bolesnika.

Značajno veća učestalost ekspresije BCL6 biljega nađena je u slučajevima FL-3 ($\chi^2 = 4.73$; s.s.= 1; **P = 0.030**) (tablica 2).

Tablica 2. Proteinska ekspresija biljega BCL6 u *DLBCL* i FL-3.

PHD	BCL6*		Σ
	+	-	
<i>DLBCL</i>	17	36	53
FL-3	12	8	20
Σ	29	44	73

$\chi^2 = 4.73$; s.s.= 1; **P = 0.030**

* + pozitivna ekspresija; - negativna ekspresija

Ekspresija ostalih diferencijacijskih biljega CD10, MUM1/IRF4 i CD138 nije se pokazala značajno različitom između bolesnika s *DLBCL* i FL-3. U analiziranim slučajevima *DLBCL* ekspresija biljega CD10 prisutna je u 10/53 (18.88%), te u 7/20 (35.0%) slučajeva FL-3. U većini slučajeva 50/53 (94.34%) *DLBCL* i u 18/20 (90.0%) FL-3 prisutan je pozitivitet MUM1/IRF4 biljega. Ekspresija biljega CD138 prisutna je u 1/53 (1.89%) *DLBCL* i niti u jednom slučaju FL-3.

Uzorci su klasificirani temeljem koekspresije pojedinih diferencijacijskih biljega u GCB i ABC skupinu (**tablica 3**).

Tablica 3. Podjela uzoraka u GCB i ABC skupinu.

Ekspresija biljega*	Bolesnici	Imunofenotipska skupina
CD10 +, BCL6 +, MUM1-	3 (4.11%)	GCB
CD10 +, BCL6 -, MUM1+	6 (8.22%)	GCB
CD10 +, BCL6 +, MUM1+	8 (10.96%)	GCB
CD10 -, BCL6 +, MUM1+	18 (24.66%)	ABC
CD10 -, BCL6 -, MUM1+	38 (52.05%)	ABC
Σ	73	

* + pozitivna ekspresija; - negativna ekspresija

Odnos imunofenotipskih skupina GCB i ABC i patohistološke dijagnoze *DLBCL* i FL-3 prikazan je u **tablici 4**. Analizirani slučajevi *DLBCL* (**slika 4**) i FL-3 (**slika 5**) statistički se ne razlikuju u ekspresiji biljega GCB i ABC skupine ($\chi^2 = 2.12$; s.s.= 1; P = 0.146).

Tablica 4. Odnos imunofenotipskih skupina GCB i ABC i patohistološke dijagnoze.

	GCB	ABC	
PHD			Σ
<i>DLBCL</i>	10	43	53
FL-3	7	13	20
Σ	17	56	73

$\chi^2 = 2.12$; s.s.= 1; P = 0.146

U analiziranim slučajevima *DLBCL* i FL-3 nije nađena značajna razlika u ekspresiji biljega BCL2 i p53. Ekspresija biljega CD30 nađena je u 11/53 (20.8%) *DLBCL*, dok je negativna u svih 20 slučajeva FL-3 ($\chi^2 = 4.89$; s.s.= 1; P = 0.027).

Imunofenotipske skupine GCB i ABC statistički se ne razlikuju u ekspresiji biljega BCL2 ($\chi^2 = 0.08$; s.s.= 1; P = 0.785), p53 ($\chi^2 = 0.33$; s.s.= 1; P = 0.568) i CD30 ($\chi^2 = 1.46$; s.s.= 1; P = 0.227).

4.1.2 t(14;18)(q32;q21) i abnormalnosti *BCL6* gena regije 3q27 u *DLBCL* i FL-3

U tri slučaja *DLBCL* nije bila moguća adekvatna analiza FISH signala t(14;18)(q32;q21).
Analizirani slučajevi *DLBCL* i FL-3 nisu se razlikovali niti u jednoj opisanoj skupini
citogenetskih promjena *BCL2* gena ($\chi^2 = 8.044$; s.s.= 4; P = 0.090) (**tablica 5**).

Tablica 5. Translokacija t(14;18)(q32;q21) u *DLBCL* i FL-3.

PHD	FISH t(14;18)(q32;q21)*					Σ
	1	2	3	4	5	
<i>DLBCL</i>	29	5	8	2	6	50
FL-3	8	7	2	2	1	20
Σ	37	12	10	4	7	70

$\chi^2 = 8.044$; s.s.= 4; P = 0.090

* 1 - bez promjene; 2 - prisutna translokacija (101G2F); 3- prisutni dodatni *BCL2* signali (3-4O2G, 5 $\geq$ O2G);
4 - prisutna translokacija i dodatni *BCL2* signali (3-4O1G2F, 5 $\geq$ O1G2F) 5 – prisutni samo dodatni *IgH* signali (2O3 $\geq$ G)

U slučajevima bez t(14;18)(q32;q21) (**slika 6**) nađena su 3–4 dodatna *BCL2* signala (3-4O2G) ili 5 i više dodatnih *BCL2* signala ($5 \geq O2G$), što upućuje na vjerojatnu amplifikaciju *BCL2* gena (**slika 7**). Uz prisutan fuzijski signal nađena su 3 – 4 dodatna *BCL2* signala (3-4O1G2F) što ukazuje na prisutnost translokacije uz dodatne *BCL2* signale ili su nađena 5 i više dodatnih *BCL2* signala ($5 \geq O1G2F$) što govori za prisutnost translokacije i vjerojatne amplifikacije *BCL2* gena (**slika 8**). U pojedinim uzorcima nađeni su samo dodatni *IgH* signali ($2O3 \geq G$).

U **tablici 6** su prikazane abnormalnosti *BCL6* gena regije 3q27 u *DLBCL* i FL-3. U dva slučaja *DLBCL* nije bilo moguće analizirati FISH signale. Analizirani slučajevi *DLBCL* i FL-3 nisu se razlikovali niti u jednoj opisanoj skupini citogenetskih promjena ($\chi^2 = 1.173$; s.s.= 3; P = 0.759).

Tablica 6. Abnormalnosti *BCL6* gena regije 3q27 u *DLBCL* i FL-3.

PHD	FISH 3q27*				Σ
	1	2	3	4	
<i>DLBCL</i>	25	7	14	5	51
FL-3	11	4	4	1	20
Σ	36	11	18	6	71

$\chi^2 = 1.173$; s.s.= 3; P = 0.759

* 1 – bez promjene; 2 – prisutna translokacija (1O1G1F); 3 – prisutni dodatni *BCL6* signali (3F, 5 $\geq$ F);
4 – prisutna translokacija i dodatni *BCL6* signali (1O1G2F, 1O1G4 $\geq$ F)

U analizi translokacije *BCL6* gena (**slika 9**) kao dodatni uzorak nađena su 3 fuzijska signala (3F) što upućuje na prisutan dodatni *BCL6* gen, dok 5 i više fuzijskih signala (5 $\geq$ F) označava vjerojatnu amplifikaciju *BCL6* gena. Dodatni uzorak predstavlja i prisutna translokacija *BCL6* gena uz dodatni *BCL6* gen ili vjerojatnu amplifikaciju (1O1G2F odnosno 1O1G4 $\geq$ F) (**slika 10**).

4.2 Usporedba proteinske ekspresije i citogenetskih abnormalnosti *DLBCL* i FL-3, te GCB i ABC skupine

Usporedba proteinske ekspresije BCL2 i opisanih citogenetskih promjena FISH analize t(14;18)(q32;q21) prikazana je u **tablici 7**. U tri slučaja *DLBCL* nije bila moguća adekvatna analiza FISH signala i usporedba proteinske ekspresije. U analiziranim slučajevima nije nađena statistički značajna razlika u proteinskoj ekspresiji BCL2 s obzirom na navedene citogenetske promjene ($\chi^2 = 7.51$; s.s.= 4; P = 0.111) (tablica 9).

Tablica 7. Translokacija t(14;18)(q32;q21) i proteinska ekspresija biljega BCL2.

BCL2* <i>imunohistokemija</i>	FISH t(14;18)(q32;q21)**					Σ
	1	2	3	4	5	
+	19	9	8	4	3	43
-	18	3	2	0	4	27
Σ	37	12	10	4	7	70

$\chi^2 = 7.51$; s.s.= 4; P = 0.111

*+ pozitivna ekspresija; - negativna ekspresija;

** 1 - bez promjene; 2 - prisutna translokacija (101G2F); 3- prisutni dodatni BCL2 signali (3-4O2G, 5 $\geq$ O2G);
4 - prisutna translokacija i dodatni BCL2 signali (3-4O1G2F, 5 $\geq$ O1G2F); 5 – prisutni samo dodatni IgH signali (2O3 $\geq$ G)

Odnos proteinske ekspresije BCL6 i analiziranih citogenetskih promjena *BCL6* gena prikazan je u **tablici 8**. U dva slučaja *DLBCL* nije bila moguća adekvatna analiza FISH signala i usporedba proteinske ekspresije. U analiziranim slučajevima nije nađena statistički značajna razlika u proteinskoj ekspresiji BCL6 s obzirom na navedene citogenetske promjene ($\chi^2 = 0.33$; s.s.= 3; P = 0.954).

Tablica 8. Abnormalnosti *BCL6* gena regije 3q27 i proteinska ekspresija biljega BCL6.

BCL6* <i>imunohistokemija</i>	FISH 3q27**				Σ
	1	2	3	4	
+	14	4	8	2	28
-	22	7	10	4	43
Σ	36	11	18	6	71

$\chi^2 = 0.33$; s.s.= 3; P = 0.954

* + pozitivna ekspresija; - negativna ekspresija;

** 1 – bez promjene; 2 – prisutna translokacija (101G1F); 3 – prisutni dodatni BCL6 signali (3F, 5 $\geq$ F)
4 – prisutna translokacija i dodatni BCL6 signali (101G2F, 101G4 $\geq$ F)

Usporedbom imunofenotipskih skupina GCB i ABC i t(14;18)(q32;q21) u analiziranim slučajevima uočena je značajno veća učestalost t(14;18)(q32;q21) u GCB skupini, te pojava t(14;18)(q32;q21) i dodatnih *BCL2* signala ili samo dodatni *BCL2* i *IgH* signali u ABC skupini ($\chi^2 = 15.66$; s.s.= 4; **P = 0.004**) (tablica 9). U tri slučaja *DLBCL* nije bila moguća adekvatna analiza FISH signala.

Tablica 9. Translokacija t(14;18)(q32;q21) u GCB i ABC skupini.

<i>Imunofenotipske skupine</i>	FISH t(14;18)(q32;q21)*					Σ
	1	2	3	4	5	
GCB	7	8	1	1	0	17
ABC	30	4	9	3	7	53
Σ	37	12	10	4	7	70

$\chi^2 = 15.66$; s.s.= 4; **P = 0.004**

* 1 - bez promjene; 2 - prisutna translokacija (101G2F); 3- prisutni dodatni *BCL2* signali (3-402G, 5 $\geq$ 02G);
4 - prisutna translokacija i dodatni *BCL2* signali (3-401G2F, 5 $\geq$ 01G2F); 5 – prisutni samo dodatni *IgH* signali (203 $\geq$ G)

GCB i ABC skupina nisu se razlikovale s obzirom na analizirane abnormalnosti *BCL6* gena ($\chi^2 = 2.28$; s.s.= 3; P = 0.517) (**tablica 10**). U dva slučaja *DLBCL* nije bila moguća adekvatna analiza FISH signala.

Tablica 10. Abnormalnosti *BCL6* gena regije 3q27 u GCB i ABC skupini.

<i>Imunofenotipske skupine</i>	FISH 3q27*				Σ
	1	2	3	4	
GCB	10	3	4	0	17
ABC	26	8	14	6	54
Σ	36	11	18	6	71

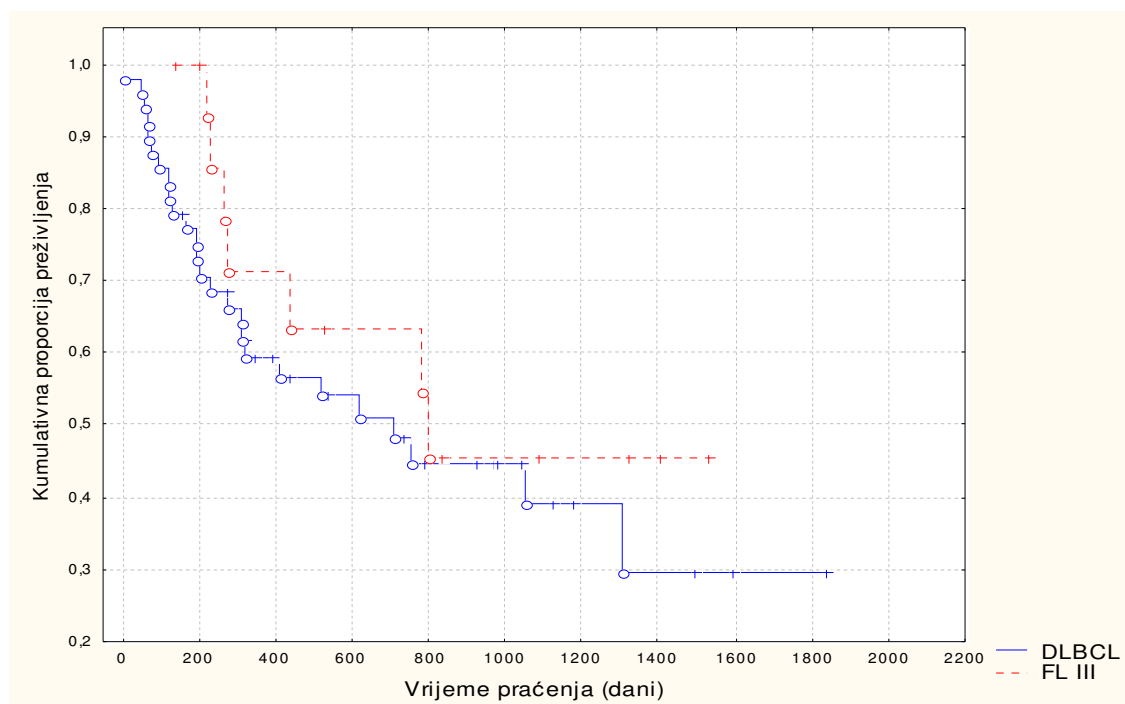
$\chi^2 = 2.28$; s.s.= 3; P = 0.517

* 1 – bez promjene; 2 – prisutna translokacija (101G1F); 3 – prisutni dodatni *BCL6* signali (3F, 5 $\geq$ F)
4 – prisutna translokacija i dodatni *BCL6* signali (101G2F, 101G4 $\geq$ F)

4.3 Usporedba utjecaja fenotipskih karakteristika, citogenetskih abnormalnosti i kliničkih prognostičkih pokazatelja na ishod bolesnika s *DLBCL* i FL-3, te GCB i ABC skupine

Analizom preživljenja skupina bolesnika s patohistološkom dijagnozom *DLBCL* i FL-3 nije nađena razlika (Cox-Mantel U-test = 2.463, P = 0.341) (slika 11).

Slika 11. Kumulativna proporcija preživljenja (Kaplan-Meier) za bolesnike oboljele od *DLBCL* i FL-3.

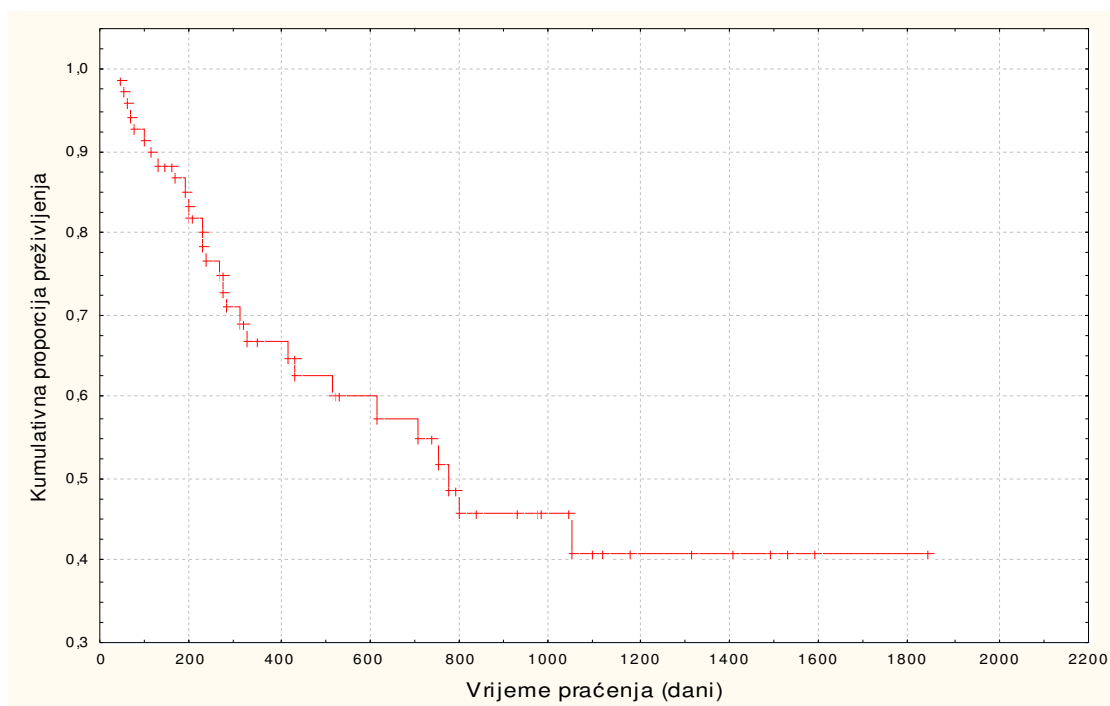


Cox-Mantel U-test = 2.463, P = 0.341

° kompletno praćenje; + cenzorirano praćenje

Mogući prognostički klinički značaj ekspresije pojedinih biljega BCL6, CD10 i BCL2, pronađenih skupina citogenetskih abnormalnosti prilikom analize t(14;18)(q32;q21) i *BCL6* gena i vrijednosti MPI analizirali smo Coxovom regresijskom analizom. Niti jedna varijabla nije se pokazala kao mogući nezavisni prognostički pokazatelj (Wald $\chi^2 = 8.26$; s.s.= 5; P = 0.143) (**slika 12**).

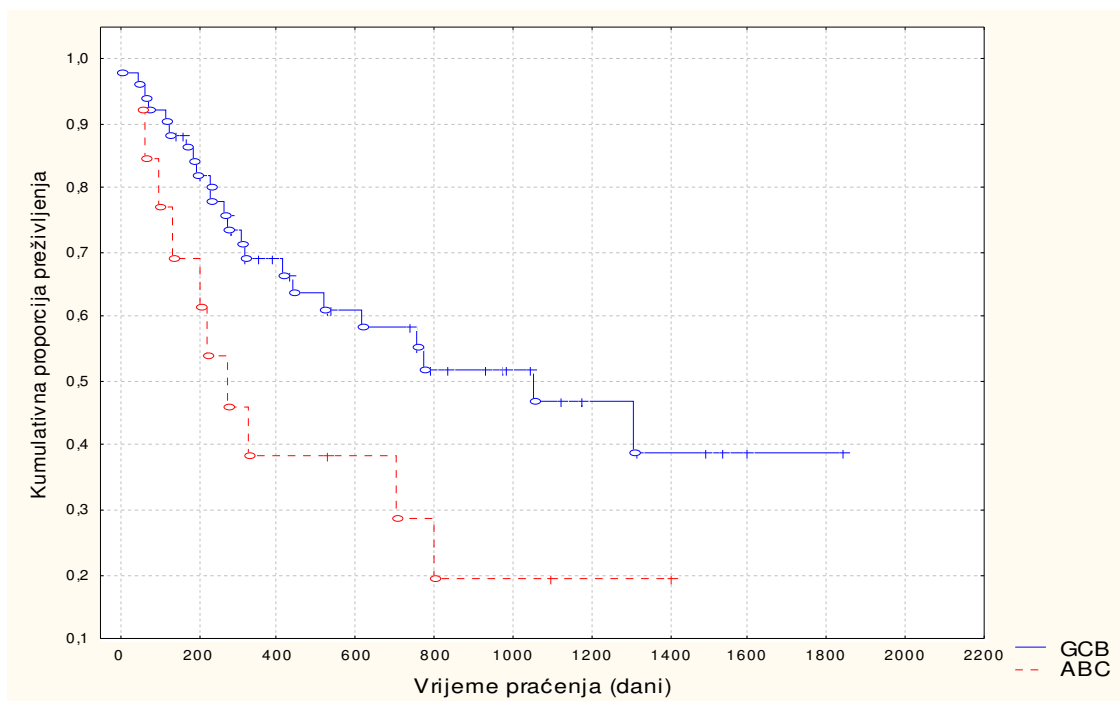
Slika 12. Funkcija preživljenja neovisnih varijabli ekspresije BCL6, CD10, BCL2, citogenetskih abnormalnosti t(14;18)(q32;q21) i *BCL6* gena i vrijednosti MPI u Coxovoj regresijskoj analizi.



Wald $\chi^2 = 8.26$; s.s.= 5; P = 0.143

Međutim, imunofenotipske skupine GCB i ABC predstavljaju neovisan, statistički značajan pokazatelj preživljenja (Cox-Mantel U-test = 4.309, **P = 0.047**) (slika 13).

Slika 13. Kumulativna proporcija preživljenja (Kaplan-Meier) za imunofenotipske skupine GCB i ABC.



Cox-Mantel U-test = 4.309, **P = 0.047**

° kompletno praćenje; + cenzorirano praćenje

Imunofenotipske skupine GCB i ABC ne razlikuju se prema zastupljenosti skupina rizika MPI (6) ($\chi^2 = 0.52$; s.s.= 1; P= 0.470) i time predstavljaju nezavisan, prognostički značajan pokazatelj (**tablica 11**).

Tablica 11. Razdioba imunofenotipskih skupina GCB i ABC prema MPI.

<i>Imunofenotipske skupine</i>	MPI*		Σ
	1	2	
GCB	7	6	13
ABC	33	18	51
Σ	40	24	64

$\chi^2 = 0.52$; s.s.= 1; P= 0.470

* 1 – MPI score 0 i 1 mali rizik i scor 2 mali intermedijarni rizik;
2 – MPI score 3 veliki intermedijarni rizik i score 4 i 5 veliki rizik.

Uočena je statistički značajna razlika zastupljenosti imunofenotipskih skupina prema kliničkom stadiju bolesti - Ann Arbor klasifikacija (5). ABC skupina češće je zastupljena višim kliničkim stadijem od GCB skupine ($\chi^2 = 9.33$; s.s.= 3; **P = 0.025**). Slučajevi ABC skupine podjednako su zastupljeni u nižim i višim kliničkim stadijima bolesti (**tablica 12**).

Tablica 12. Prikaz imunofenotipskih skupina GCB i ABC prema kliničkom stadiju (Ann Arbor klasifikacija).

<i>Imunofenotipske skupine</i>	Klinički stadij*				Σ
	I	II	III	IV	
GCB	2	2	8	1	13
ABC	13	13	10	15	51
Σ	15	15	18	16	64

$\chi^2 = 9.33$; s.s.= 3; **P = 0.025**

* I - stadij Ia i Ib; II – stadij IIa i IIb; III – stadij IIIa i IIIb; IV – stadij IVa i IVb.

Imunofenotipske skupine GCB i ABC ne razlikuju se u zastupljenosti bolesnika prema dobi (T test = 0.048; s.s.= 71 ; P = 0.962) i spolu ($\chi^2 = 0.045$; s.s.= 1; P = 0.832).

5. Rasprava

Morfološke karakteristike limfnih čvorova 73 bolesnika klasificirane su u skupinu *DLBCL* i skupinu FL-3 pretežno folikularnog rasta, >75%. Navedene skupine nisu se razlikovale prema spolu bolesnika i kliničkom stadiju bolesti. *DLBCL* bolesnici bili su nešto starije prosječne životne dobi, dok su bolesnici FL-3 češće imali niži MPI. Također nije nađena statistički značajna razlika u preživljenu analiziranih skupina bolesnika.

Analizirajući proteinsku ekspresiju biljega CD10, BCL6, MUM1/IRF4 i CD138, karakterističnih za germinativni odnosno postgerminativni stupanj diferencijacije B stanica, nađena je statistički značajno veća učestalost ekspresije biljega BCL6 u slučajevima FL-3 od slučajeva *DLBCL*, dok se ekspresija ostalih biljega nije statistički značajno razlikovala u navedenim morfološkim skupinama. Morfološki slučajevi FL-3 i *DLBCL* podjednako su zastupljeni u fenotipskim grupama GCB i ABC. Veći broj analiziranih slučajeva FL-3, 13/20, (65%) odnsono čak 43/53, (81%) slučajeva *DLBCL*, imaju ABC fenotip. Izdvojene fenotipske skupine GCB i ABC u analiziranim slučajevima statistički se značajno razlikuju s obzirom na preživljenje. Također u analiziranim slučajevima multivarijatnom regresijskom analizom nije utvrđen prognostički značaj ekspresije pojedinih biljega BCL6 i CD10. Analizirani slučajevi fenotipskih skupina GCB i ABC nisu se razlikovali u zastupljenosti skupina rizika MPI, niti je MPI izdvojen kao prognostički značajan pokazatelj multivarijatnom regresijskom analizom.

Analizirajući citogenetske abnormalnosti, analizirani slučajevi *DLBCL* i FL-3 nisu se razlikovali u promjenama *BCL2*, *BCL6* gena i ekspresiji BCL2 proteina. Nađena je veća

učestalost t(14;18)(q32;q21) u GCB fenotipu i veća učestalost istovremeno prisutne t(14;18)(q32;q21) i dodatnih *BCL2* signala ili samo dodatnih *BCL2* signala u slučajevima ABC fenotipa. U imunofenotipskim skupinama GCB i ABC nisu nađene razlike u promjenama *BCL6* gena. Također multivarijatnom regresijskom analizom nije utvrđen prognostički značaj niti jedne analizirane skupine citogenetskih promjena *BCL2* i *BCL6* gena.

Ekspresija CD10 smanjuje se s porastom histološkog stupnja FL (116). U analiziranih bolesnika s FL-3 CD10 pozitivne stanice nađene su u 7/20, (35%) slučajeva, a u bolesnika s DLBCL u 10/53, (19%) slučajeva.

MUM1/IRF4 ekspresija u neneoplastičnom limfnom čvoru prisutna je u malom broju kasnih centrocita germinativnog centra, ali je izrazito pozitivna u postgerminativnim stanicama (81,82,127,128). U analiziranim skupinama limfoma u našem radu biljeg MUM1/IRF4 je bio pozitivan u 18/20, (90%) slučajeva FL-3 i u 50/53, (94%) slučajeva *DLBCL*. MUM1/IRF4 ekspresija karakteristična za postgerminativne stanice, ne predstavlja isključivo biljeg terminalne diferencijacije B limfocita (127,128). U slučajevima morfološkog entiteta *DLBCL* može se raditi o bloku diferencijacije tumorskih B limfocita u stadiju prije terminalne diferencijacije. Veliki postotak MUM1/IRF4 pozitivnih slučajeva u morfološkoj skupini FL-3 ukazuje, bilo da tumorski B limfociti potječu od kasnih centrocita neneoplastičnog germinativnog centra, bilo da u ranijoj fazi B stanične diferencijacije dolazi do onkogenih promjena koje dopuštaju malignim B limfocitima da se dalje diferenciraju i “zamrznu” u kasnijoj fazi diferencijacije (16).

Negativna ekspresija CD138 u analiziranim slučajevima FL-3 i niska ekspresija 1/53, (2%) slučajeva *DLBCL* (pretežno centroblastne i imunoblastične morfologije), potvrđuje da je biljeg CD138 primarno pozitivan u terminalno diferenciranim stanicama tj. *DLBCL* plazmablastično / plazmacitoidne morfologije (133).

Iako u našem radu nije utvrđen prognostički značaj ekspresije pojedinih biljega BCL6 i CD10, u nekim radovima ekspresija navedenih biljega se pokazala kao prognostički značajan pokazatelj (108-110,117-121).

U radu Hans, CP i sur. (142) uspoređena je prvi puta klasifikacija uzoraka *DLBCL* imunohistokemijskom analizom proteinske ekspresije diferencijacijskih gena i klasifikacija istih uzoraka temeljem analize genske ekspresije. Imunofenotipska klasifikacija pokazala se točnijom u predviđanju ukupnog preživljenja od rezultata cDNA *microarray* klasifikacije. Time je potvrđeno da u slučajevima s povišenom razinom genske ekspresije ne dolazi uvijek do translacije mRNA i stvaranja funkcionalnog proteina.

Analizirane slučajeve, primjenjujući kriterije Hans, CP i sur. (142), podijelili smo na osnovu proteinske ekspresije u GCB i ABC skupinu. Nađena učestalost ABC fenotipa analiziranih slučajeva je nešto veća u odnosu na literaturne podatke prema kojima 30-65% slučajeva *DLBCL* predstavlja fenotipsku ABC skupinu (16,65,67,134).

GCB fenotip odgovara profilu genske ekspresije i stupnju diferencijacije normalnih B stanica germinativnog centra; ostaje otvoreno pitanje staničnog podrijetla ABC fenotipa. Mali broj B stanica neneoplastičnog germinativnog centra – kasni centroцити, eksprimiraju biljeg MUM1/IRF4, dok su BCL6 negativne. Tumorske B stanice koje odgovaraju navedenom stupnju diferencijacije kasnih centroцита ekspreimiraju istovremeno oba

biljega, MUM1/IRF4 i BCL6. Isto tako, nakon antigene stimulacije, moguća je diferencijacije B stanica u kratkoživuće plazmablaste izvan mikrookoliša germinativnog centra. Prema Shaffer, AL i sur. (16) navedena dva tipa B stanica predstavljaju moguće ishodište limfoma ABC fenotipa.

Iako je MPI u više radova multivarijantnom regresijskom analizom izdvojen kao nezavisan prognostički pokazatelj (67,134,136,138,140,142), u našem radu jedino su imunofenotipske skupine GCB i ABC definirane kao prognostički značajne.

Kromosomske translokacije, amplifikacije i delecije, kao i mutacije gena, koje se pojavljuju u B NHL remete normalnu B staničnu homeostazu, na tri načina: 1. poticanjem staničnog rasta i proliferacije, 2. blokiranjem programirane stanične smrti i 3. zaustavljanjem diferencijacije stanica (16).

Za folikularne neoplazme je karakteristična t(14;18)(q32;q21) pri čemu *BCL2* gen, odgovoran za regulaciju apoptoze, dolazi u regulatorno područje *IgH* gena, a posljedica je pojačana ekspresija *BCL2* onkogeno i deregulacija apoptoze. Međutim, u oko 20% *DLBCL* može se naći t(14;18)(q32;q21) ili amplifikacija *BCL2* gena (2,3).

Najčešća zajednička citogenetska abnormalnost FL i *DLBCL* je translokacija ili mutacija *BCL6* gena, transkripcijskog represora gena uključenih u regulaciju diferencijacije i proliferacije B stanica germinativnog centra (16). Ekspresija *BCL6* je najjača u stanicama neneoplastičnog germinativnog centra, a gubi se u tijeku terminalne diferencijacije B limfocita u plazma stanice. U slučajevima kada dođe do disregulacije *BCL6* gena, *BCL6* ekspresija javlja se u tumorskim stanicama izvan normalnog diferencijacijskog limita stanica germinativnog centra. *BCL6* gen postaje manje osjetljiv na fiziološke regulacijske utjecaje blokirajući time diferencijaciju u plazma stanice (16). S druge strane blokirajući

terminalnu diferencijaciju *BCL6* može utjecati na proliferaciju B limfocita germinativnog centra tj. omogućuje nekontroliranu diobu stanica u germinativnom centru (16).

Nalaz veće učestalosti t(14;18)(q32;q21) u GCB fenotipu i veća učestalost istovremeno prisutne t(14;18)(q32;q21) i dodatnih *BCL2* signala ili samo dodatnih *BCL2* signala u slučajevima ABC fenotipa ukazuje da t(14;18)(q32;q21) predstavlja primaran događaj u patogenezi GCB fenotipa, dok se mehanizmi amplifikacije *BCL2* gena, općenito povezani s progresijom tumora i lošijim kliničkim ishodom (27,28), pojavljuju češće u ABC skupini.

t(14;18)(q32;q21) s povećanom ekspresijom *BCL2* proteina češće je prisutna u GCB fenotipu *DLBCL* (143,155,160-164), dok je u dva rada nalaz dodatnih *BCL2* signala povezan s ABC fenotipom (34,154). Navedene citogenetske promjene smatraju se međusobno isključivim (31,67,152,154).

Klinički prognostički značaj preuredbe *BCL6* gena analiziran je u dva rada. Barrans, SL i sur. (102) navode povezanost preuredbe *BCL6*, proteinske ekspresije *BCL2* i ne-GCB imunofenotipa s lošijim kliničkim ishodom. De Paepe, P i sur. (139) iako nisu potvrdili prognostički značaj imunofenotipskih skupina GCB i ABC u slučajevima *DLBCL*, navode loš prognostički značaj proteinske ekspresije *BCL2* i preuredbe *BCL6* gena.

Bea, S i sur. (34) analizom citogenetskih promjena uočavaju prisutnost trisomije 3 i dodatnog 3q dijela kromosoma 3 isključivo u ABC skupini *DLBCL*, dok naši rezultati ukazuju na prisutnost dodatnih *BCL6* signala i u GCB skupini.

Povezanost subpopulacije normalnih B stanica i B staničnih limfoma moguće je dokazati kombinacijom histološke analize i imunofenotipa tumorskih stanica. Temeljem tih

kriterija, prema današnjim spoznajama većina perifernih B limfoma ima obilježja određenog normalnog stadija B stanične diferencijacije (16).

Folikularni limfomi staničnim sastavom tumorskih stanica (centrociti, centroblasti), netumorskim staničnim elementima (T limfociti, folikularne dendritične antigen prezentirajuće stanice, makrofagi), kao i načinom rasta podsjećaju na neneoplastični B germinativni centar. Tumorske stanice su CD10 pozitivne, a CD10 predstavlja osnovni biljeg B stanica neneoplastičnog germinativnog centra. U nekim slučajevima FL, tumorske stanice pokazuju morfološku heterogenost, od stanica tipičnih za germinativni centar (centrociti, centroblasti) do imunoblastične, pa čak i plazmocitoidne diferencijacije. Raznolikost morfološke slike FL ukazuje da se ne događa potpuni "stop" u diferencijaciji stanica.

Bolesnici s FL-3 prema tipu stanica i postotku centroblasta mogu se podijeliti u podtip 3A i 3B i za razliku od FL-1 i -2 pokazuju agresivan klinički tijek sličan *DLBCL* (2).

Na osnovu morfoloških i kliničkih kriterija, *DLBCL* je prema klasifikaciji SZO zaseban tip limfoma. Kako je već spomenuto, na liječenje standardnom sistemnom polikemoterapijom bolesnici različito reagiraju na terapiju što ukazuje na biološku heterogenost entiteta (3,4).

Iako se radi o dva morfološki različito definirana entiteta, kliničke karakteristike i preživljenje ukazuju na njihove sličnosti.

Klinički značaj morfoloških podtipova FL-3 analiziran je u radovima Hsi, ED i sur. (35) i Hans, CP i sur (37). Rezultati nisu pokazali razliku u preživljenju slučajeva FL-3A i -3B (35,37). SZO klasifikacija preporučuje, bez obzira na prevladavajući tip tumorskih stanica FL, određivanje postotka difuzne komponente rasta tumora. Difuzni rast velikih

transformiranih limfocita – centroblasta, prisutan u >50% pojedinog tumora povezan je s nepovoljnijim kliničkim tijekom bolesti i kraćim preživljenjem (37). U dosadašnjim radovima analiza citogenetskih karakteristika FL-3 (55,59,60,61) ukazuje također na heterogenost navedenog histološkog stupnja FL. U navedenim radovima analizirane slučajeve FL-3 citogenetskih karakteristika sličnih *DLBCL* karakterizira difuzna komponenta rasta tumora (60,61).

Željeći utvrditi da li je biološka sličnost FL-3 i *DLBCL* povezana s morfološkom karakteristikom difuznog rasta, stupnjem diferencijacije neoplastičnih B limfocita ili citogenetskim abnormalnostima u rad su uključeni slučajevi FL-3 pretežno folikularnog rasta, >75% te slučajevi primarnog *DLBCL*.

Analiza genske ekspresije *DLBCL*, definiranog kao zasebni morfološko klinički entitet u SZO klasifikaciji, pokazala je da se radi o heterogenoj bolesti različitog molekularnog profila i različitog kliničkog tijeka. Polazeći od koncepta bioloških karakteristika tumora određenih stupnjem B stanične diferencijacije, analize genske ekspresije slučajeva *DLBCL* jednoznačno su izdvojile skupine GCB, ABC i tip 3 heterogenih karakteristika genske ekspresije (65-68,142,143). Ovi podtipovi *DLBCL* su važni jer su ne samo genetički različiti, već su različito osjetljivi na standardnu sistemnu antraciklinsku citostatsku terapiju. GCB skupinu bolesnika karakterizira petogodišnje preživljenje 60%, a ABC skupinu, odnosno tip 3 genske ekspresije petogodišnje preživljenje 36% odnosno 39% (65,67).

Fenotipske karakteristike tumora odraz su genske ekspresije tumorskih stanica. Iako mRNA nije krajnji produkt gena, transkripcija predstavlja prvu razinu informacije genske regulacije (63). Analizom mRNA indirektno se može zaključiti o posljedicama promjene

ekspresije gena koja bi imala za posljedicu abnormalnu ekspresiju proteina (81).

Međutim, ekspresija mRNA i proteina se uvijek ne podudaraju (81).

U radu nije nađen klinički značaj podjele analiziranih slučajeva u skupinu FL-3, >75% folikularnog rasta i *DLBCL*. Navedeni morfološki slučajevi bili su podjednako zastupljeni u izdvojenim fenotipskim skupinama GCB i ABC sa utvrđenom statistički značajnom razlikom preživljenja. Navedeni rezultati ukazuju na dominantan značaj proteinske ekspresije određene stupnjem B stanične diferencijacije u odnosu na nalaz difuzne komponente rasta, analiziranih skupina citogenetskih abnormalnosti i kliničkih prognostičkih pokazatelja.

6. Zaključci

1. *DLBCL* i FL-3 pretežno folikularnog rasta, >75%, su dva morfološki različito definirana entiteta, ali vrlo sličnih kliničkih, imunofenotipskih i citogenetskih karakteristika.
2. Morfološki entiteti *DLBCL* i FL-3 nisu prepoznatljivi u imunofenotipskim skupinama GCB i ABC.
3. t(14;18)(q32;q21) predstavlja primaran događaj u patogenezi GCB fenotipa, dok se mehanizmi amplifikacije gena pojavljuju češće u ABC skupini.
4. GCB i ABC fenotip predstavlja nezavisan, prognostički značajan pokazatelj.
5. Biološko ponašanje i prognoza tumora određena je karakterističnom proteinskom ekspresijom B limfoidnih stanica zamrznutih u određenom stupnju diferencijacije, a ne morfološkim karakteristikama rasta i kliničkim prognostičkim pokazateljima.

7. Sažetak

73 bolesnika s povećanim limfnim čvorovima klasificirani su prema kriterijima SZO klasifikacije u *DLBCL* (53 bolesnika) i FL-3 pretežno folikularnog rasta, >75% (20 bolesnika). Ekspresija biljega je određena imunohistokemijskom metodom, a citogenetske abnormalnosti FISH metodom na parafinskim rezovima tkiva.

Rezultati su pokazali da *DLBCL* i FL-3 pretežno folikularnog rasta, >75%, iako dva morfološki različita entiteta prema kriterijima SZO klasifikacije, ne pokazuju statistički značajne razlike u preživljenju, ali postoji značajna razlika u dobi bolesnika i vrijednosti MPI. Slučajevi *DLBCL* i FL-3 nisu se razlikovali u promjenama *BCL2*, *BCL6* gena i ekspresije *BCL2* proteina, dok je prisutnost ekspresije proteina *BCL6* statistički značajno veća u slučajevima FL-3. Važno je istaknuti da morfološki entiteti *DLBCL* i FL-3 nisu prepoznatljivi u imunofenotipskim skupinama GCB i ABC, klasificiranim temeljem ekspresije četiri diferencijacijska biljega CD10, *BCL6*, MUM1/IRF4 i CD138. $t(14;18)(q32;q21)$ nađena je značajno češće u GCB skupini, a $t(14;18)(q32;q21)$ i dodatni *BCL2* signali ili samo dodatni *BCL2* i *IgH* signali u ABC skupini. $t(14;18)(q32;q21)$ predstavlja primarni događaj u patogenezi GCB skupine. Mehanizmi amplifikacije *BCL2* gena, povezani s progresijom tumora i lošijim kliničkim ishodom, češći su u ABC skupini. Nisu nađene razlike u promjenama *BCL6* gena u GCB i ABC skupini.

Multivarijatnom regresijskom analizom nije utvrđen prognostički značaj ekspresije pojedinih biljega *BCL6* i CD10, analiziranih promjena *BCL2* i *BCL6* gena, niti MPI. Nije nađena razlika u zastupljenosti skupina rizika MPI između bolesnika s GCB odnosno

ABC imunofenotipom. Imunofenotipski karakterizirane skupine GCB i ABC su prognostički značajan pokazatelj.

8. Summary

73 patients with lymph nodes enlargement were classified, according WHO lymphoma classification into DLBCL (53 cases) and FL-3 predominantly follicular architecture, >75% (20 cases). Expression of markers was detected by immunohistochemical method and cytogenetic abnormalities were analysed by FISH.

The results have shown no differences in survival of DLBCL and FL-3 predominantly follicular architecture, >75%, which are two different morphological entities according WHO classification, but differences in patients age and IPI were detected. In cases of DLBCL and FL-3 were not found differences in *BCL2*, *BCL6* genes abnormalities and *BCL2* protein expression. The *BCL6* protein expression was more frequently found in FL-3. Morphological entities DLBCL and FL-3 were equal represent in GCB and ABC groups, which were defined according CD10, *BCL6*, MUM1/IRF4 and CD138 expression. The t(14;18)(q32;q21) was more frequently found in the GCB group, and t(14;18)(q32;q21) with additional *BCL2* signals or only additional *BCL2* and *IgH* signals in the ABC group. t(14;18)(q32;q21) represent an initial mechanism in the pathogenesis of GCB group. Amplification of *BCL2* gene is frequently present in ABC group. In the GCB and ABC groups were not detected differences in *BCL6* gene abnormalities.

Multivariate regression analysis was shown no prognostic significance of the expression of each *BCL6* and CD10 protein expression, the *BCL2* and *BCL6* genes abnormalities and the IPI. Also in GCB and ABC groups were not detected differences in the IPI. GCB and ABC immunophenotype groups were defined as independent prognostic predictors.

9. Literatura

1. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology* 2000;36:69-87.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, ur. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2001, str.351.
3. Broudy VC, Berliner N, Larson RA, Leung LL, ur. *Hematology 2004: American Society of Hematology Education Program Book*. 1. izd. Washington: American Society of Hematology; 2004, str.518.
4. Mason DY, Harris NL, ur. *Human Lymphoma: Clinical Implications of the REAL Classification*. London: Springer – Verlag; 2001.
5. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Costwolds meeting. *J Clin Oncol* 1989;7:1630-6.
6. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993;329:987-94.
7. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood* 2004;104:1258-65.
8. Anonymous. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 1997;89:3909-18.
9. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying Non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1998;16:2780-95.
10. Abramson JS, Shipp MA. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood* 2005;106:1164-74.

11. Morgensztern D, Lossos IS. Molecular prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Treat Options Oncol* 2005;6:269-77.
12. Gandhi MK, Marcus RE. Follicular lymphoma: time for a re-think? *Blood Rev* 2005;19:165-78.
13. Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, et al. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and guide the choice of treatment. *Blood* 2005;105:301-7.
14. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-92.
15. Pileri SA, Dirnhofer S, Went PH, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. Review. *Histopathology* 2002;41:482-509.
16. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2002;2:920-32.
17. Lossos IS. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:6351-7.
18. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood* 1997;89:2291-7.
19. Baars JW, de Jong D, Willemse EM, et al. Diffuse large B-cell non Hodgkin lymphomas: the clinical relevance of histological subclassification. *Br J Cancer* 1999;79:1770-6.
20. Maes B, Anastasopoulos A, Kluin – Nelemans JC, et al. Among diffuse large B-cell lymphomas, T-cell-rich/histiocyte-rich BCL and CD30+ anaplastic B-cell subtypes exhibit distinct clinical features. *Ann Oncol* 2001;12:835-8.
21. Xu Y, Kroft SH, McKenna RW, Aquino DB. Prognostic significance of tumour-infiltrating T lymphocytes and T-cell subsets in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a multiparameter flow cytometry study. *Br J Haematol* 2001;112:945-9.

22. Tsirigotis P, Economopoulos T, Rontogianni D, et al. T-cell-rich B-cell lymphoma. Analysis of clinical features, response to treatment, survival and comparison with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology* 2001;61:257-64.
23. Diebold J, Anderson JR, Armitage JO, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic analysis of 444 cases classified according to the updated Kiel classification. *Leuk Lymphoma* 2002;43:97-104.
24. Muris JJ, Meijer CJ, Cillessen SA, et al. Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia* 2004;18:589-96.
25. Colomo L, Loong F, Rives S, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol* 2004;28:736-47.
26. Dave BJ, Nelson M, Pickering DL, et al. Cytogenetic characterization of diffuse large cell lymphoma using multi-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;132:125-32.
27. Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 2004;22:3498-506.
28. Berglund M, Enblad G, Flordal E, et al. Chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Mod Pathol* 2002;15:807-16.
29. Cigudosa JC, Parsa NZ, Louie DC, et al. Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:123-33.
30. Dave BJ, Weisenburger DD, Higgins CM, et al. Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization studies of diffuse large B-cell lymphoma in children and young adults. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;153:115-21.
31. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:234-40.
32. Jerkeman M, Johansson B, Akerman M, Cavallin-Stahl E, Kristoffersson U, Mitelman F. Prognostic implications of cytogenetic aberrations in diffuse large B-cell lymphomas. *Eur J Haematol* 1999;62:184-90.

33. Nanjangud G, Rao PH, Hegde A, et al. Spectral karyotyping identifies new rearrangements, translocations, and clinical associations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002;99:2554-61.
34. Bea S, Zettl A, Wright G, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005;106:3183-90.
35. Hsi ED, Mirza I, Lozanski G, et al. A clinicopathologic evaluation of follicular lymphoma grade 3A versus grade 3B reveals no survival differences. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:863-8.
36. Chau I, Jones R, Cunningham D, et al. Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy? *Br J Cancer* 2003;89:36-42.
37. Hans CP, Weisenburger DD, Vose JM, et al. A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. *Blood* 2003;101:2363-7.
38. de Jong D. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J Clin Oncol* 2005;23:6358-63.
39. Limpens J, Stad R, Vos C, et al. Lymphoma – associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 1995;9:2528-36.
40. Zha H, Raffeld M, Charboneau L, et al. Similarities of prosurvival signals in bcl-2 positive and bcl-2 negative follicular lymphomas identified by reverse phase protein microarray. *Lab Invest* 2004;84:235-44.
41. Akasaka T, Lossos IS, Levy R. Bcl-6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* 2003;102:1443-8.
42. Jardin F, Gaulard P, Buchonnet G, et al. Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL-6 rearrangement: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics. *Leukemia* 2002;16:2309-17.
43. Lestou VS, Gascoyne RD, Sehn L, et al. Multicolour fluorescence in situ hybridization analysis of t(14;18) – positive follicular lymphoma and correlation with gene expression data and clinical outcome. *Br J Haematol* 2003;122:745-59.

44. Viardot A, Moller P, Hogel J, et al. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2002;20:4523-30.
45. Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14,18). *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:375-82.
46. Hoglund M, Shen L, Connors JM, et al. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:195-204.
47. Küppers R. Prognosis in follicular lymphoma – it's in the microenvironment. *New J Med* 2004;351:2152-3.
48. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004;351:2159-69.
49. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1984;311:1471-5.
50. Rohatiner AZS, Lister TA. The clinical course of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18:1-10.
51. Plancarte F, Lopez-Guillermo A, Arenillas L, et al. Follicular lymphoma in early stages: high risk of relapse and usefulness of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index to predict the outcome of patients. *Eur J Haematol* 2006;76:58-63.
52. Guo Y, Karube K, Kawano R, et al. Low-grade follicular lymphoma with t(14;18) presents a homogeneous disease entity otherwise the rest comprises minor groups of heterogeneous disease entities with Bcl2 amplification, Bcl6 translocation or other gene aberrances. *Leukemia* 2005;19:1058-63.
53. Schraders M, de Jong D, Kluin P, Groenen P, van Krieken H. Lack of bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the bcl2 gene or by absence of the t(14;18) translocation. *J Pathol* 2005;205:329-35.
54. Horsman DE, Okamoto I, Ludkovski O, et al. Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br J Haematol* 2003;120:424-33.

55. Bosga-Bouwer AG, van Imhoff GW, Boonstra R, et al. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood* 2003;101:1149-54.
56. Bartlett NL, Rizeq M, Dorfman RF, Halpern J, Horning SJ. Follicular large-cell lymphoma: intermediate or low grade? *J Clin Oncol* 1994;12:1349-57.
57. Wendum D, Sebban C, Gaulard P. Follicular large-cell lymphoma treated with intensive chemotherapy: an analysis of 89 cases included in the LNH87 trial and comparison with the outcome of diffuse large B-cell lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1997;15:1654-63.
58. Rodriguez J, McLaughlin P, Hagemeister FB, et al. Follicular large cell lymphoma: an aggressive lymphoma that often presents with favorable prognostic features. *Blood* 1999;93:2202-7.
59. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002;99:3806-12.
60. Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Müller-Hermelink HK, Ott MM. Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol* 2004;165:481-90.
61. Bosga-Bouwer AG, van den Berg A, Haralambieva E, et al. Molecular, cytogenetic, and immunophenotypic characterization of follicular lymphoma grade 3B; a separate entity or part of the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma or follicular lymphoma? *Hum Pathology* 2006;37:528-33.
62. Celis JE, Kruhoffer M, Gromova I, et al. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett* 2000;480:2-16.
63. Brazma A, Vilo J. Gene expression data analysis. Minireview. *FEBS Lett* 2000;480:17-24.
64. Staudt LM. Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N Engl J Med* 2003;348:1777-85.
65. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.

66. Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB, et al. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10209-13.
67. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-47.
68. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroup of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9991-6.
69. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002;8:68-74.
70. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 2005;105:1851-61.
71. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 2004;350:1828-37.
72. Kobayashi T, Yamaguchi M, Kim S, et al. Microarray reveals differences in both tumors and vascular specific gene expression in de novo CD5+ and CD5- diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Res* 2003;63:60-6.
73. Rosenwald A, Staudt LM. Clinical translation of gene expression profiling in lymphomas and leukemias. *Semin Oncol* 2002;29:258-63.
74. Van't Veer LJ, De Jong D. The microarray way to tailored cancer treatment. *Nat Med* 2002;8:13-14.
75. Robetorye RS, Bohling SD, Morgan JW, Fillmore GC, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. Microarray analysis of B-cell lymphoma cell lines with the t(14;18). *J Mol Diag* 2002;4:123-36.
76. Dybkaer K, Iqbal J, Zhou G, Chan WC. Molecular diagnosis and outcome prediction in diffuse large B-cell lymphoma and other subtypes of lymphoma. *Clin Lymphoma* 2004;5:19-28.
77. Husson H, Carideo EG, Neuberg D, et al. Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood* 2002;99:282-9.

78. Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8886-91.
79. Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Segraves R, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 2003;101:3109-17.
80. Sigal S, Ninette A, Rechavi G. Microarray studies of prognostic stratification and transformation of follicular lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18:143-56.
81. Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 2002;99:409-26.
82. deLeval L, Harris NL. Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology* 2003;43:509-28.
83. Gascoyne R. Emerging prognostic factors in diffuse large B cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2004;16:436-41.
84. Bai M, Skyras A, Agnantis NJ, et al. B-cell differentiation, apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. *Anticancer Res* 2005;25:347-62.
85. Dalla-Favera R, Ye BH, Lo Coco F, et al. Identification of genetic lesions associated with diffuse large-cell lymphoma. *Ann Oncol* 1994;5:55-60.
86. Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, et al. The Bcl-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet* 1997;16:161-70.
87. Reljic R, Wagner SD, Peakman LJ, Fearon DT. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J Exp Med* 2000;192:1841-8.
88. Falini B, Fizzotti M, Pileri S, Liso A, Pasqualucci L, Flenghi L. BCL-6 protein expression in normal and neoplastic lymphoid tissues. *Ann Oncol* 1997;8:101-4.

89. Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu H, et al. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk Lymphoma* 2003;44:5-12.
90. Cattoretti G, Pasqualucci L, Ballon G, et al. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* 2005;7:445-55.
91. Wang X, Li Z, Naganuma A, Ye BH. Negative autoregulation of BCL-6 is baypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15018-23.
92. Phan RT, Dalla-Favera R. The bcl6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinalcentre B cells. *Nature* 2004;432:635-9.
93. Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, et al. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood* 2000;95:651-9.
94. Artiga M, Saez A, Romero C, et al. A short mutational hot spot in the first intron of BCL-6 is associated with increased BCL-6 expression and with longer overall survival in large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* 2002;160:1371-80.
95. Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, Houldsworth J, Changati R, Dalla-Favera R. Mutations of the Bcl6 protooncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2003;101:2914-23.
96. Xu WS, Liang RH, Srivastava G. Identification and characterization of BCL6 translocation partner genes in primary gastric high-grade B-cell lymphoma: heat shock protein 89 alpha is a novel fusion partner of BCL6. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:69-75.
97. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:3152-62.
98. Kawasaki C, Ohshim K, Suzumiya J, et al. Rearrangements of bcl-1, bcl-2, bcl-6 and c-myc in diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2001;42:1099-106.
99. Vitolo U, Gaidano G, Botto B, et al. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q delation in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol* 1998;9:55-61.

100. Pescarmona E, De Sanctis V, Pistilli A, et al. Pathogenetic and clinical implications of Bcl-6 and Bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B-cell lymphomas. *J Pathol* 1997;183:281-6.
101. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, et al. LAZ3 rearrangements in Non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, karyotype and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 1994;83:2423-7.
102. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2002;117:322-32.
103. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Eng J Med* 1994;331:74-80.
104. Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Stahl E, et al. Prognostic implications of BCL6 rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B cell lymphoma – a Nordic Lymphoma Group study. *Int J Oncol* 2002;20:161-5.
105. Ueda C, Akasaka T, Ohno H. Non-immunoglobulin/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma: prognostic implications. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1375-81.
106. Skinnider BF, Horsman DE, Dupuis B, Gascoyne RD. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Hum Pathol* 1999;30:803-8.
107. Jardin F, Buchonnet G, Parmentier F, et al. Follicle center lymphoma is associated with significantly elevated levels of BCL-6 expression among lymphoma subtypes, independent of chromosome 3q27 rearrangements. *Leukemia* 2002;16:2318-25.
108. Lossos IS, Jones CD, Warnke R, et al. Expression of single gene, Bcl 6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2001;98:945-51.
109. Braaten K, Betensky R, de Leval L et al. Bcl-6 expression predicts improved survival in patients with primary central nervous system lymphoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1063-9.
110. Bai M, Agnantis NJ, Skyras A, et al. Increased expression of the bcl6 and CD10 proteins is associated with increased apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 2003;16:471-80.

- 111.Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;101:78-84.
- 112.Kaufmann O, Flath B, Spath-Schwalbe E, Possinger K, Dietel M. Immunohistochemical detection of CD10 with monoclonal antibody 56C6 on paraffin sections. *Am J Clin Pathol* 1999;111:117-22.
- 113.Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson P. CD10 and bcl6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2000;24:846-52.
- 114.Almasri NM, Iturraspe JA, Braylan RC. CD10 expression in follicular lymphoma and large cell lymphoma is different from that of reactive lymph node follicles. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:539-44.
- 115.King B, Chen C, Locker J et al. Immunophenotypic and genotypic markers of follicular center cell neoplasia in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2000;13:1219-31.
- 116.Eshoa C, Perkins S, Kampalath B, Shidham V, Juckett M, Chang CC. Decreased CD10 expression in grade III and in interfollicular infiltrates of follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol* 2001;115:862-7.
- 117.Uherova P, Ross CW, Schnitzer B, Singleton TP, Finn WG. The clinical significance of CD10 antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2001;115:582-8.
- 118.Xu Y, McKenna RW, Molberg KH, Kroft SH. Clinicopathologic analysis of CD10+ and CD10- diffuse large B-cell lymphoma. Identification of high-risk subset with coexpression of CD10 and bcl-2. *Am J Clin Pathol* 2001;116:183-90.
- 119.Ohshima K, Kawasaki C, Muta H, et al. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology* 2001;39:156-62.
- 120.Go J, Yang W, Ree H. CD10 expression in primary intestinal large B-cell lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:956-60.
- 121.Biasoli I, Morais JC, Scheliga A, et al. CD10 and bcl2 expression combined with the International Prognostic Index can identify subgroups of patients with diffuse large-cell lymphoma with very good or very poor prognoses. *Histopathology* 2005;46:328-33.

- 122.Fabiani B, Delmer A, Lepage E, et al. CD10 expression in diffuse large B-cell lymphomas does not influence survival. *Virchow Arch* 2004;445:545-51.
- 123.Zhang X, Karnan S, Tagawa H, et al. Comparison of genetic aberrations in CD10+ diffused large B-cell lymphoma and follicular lamphoma by comparative genomic hybridization and tissue-fluorescence in situ hybrdization. *Cancer Sci* 2004;95:809-14.
- 124.Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:293-312.
- 125.Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, et al. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 2000;14:449-56.
- 126.Iida S, Rao PH, Butler M, et al. Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet* 1997;17:226-30.
- 127.Carbone A, Gloghini A, Larocca LM, et al. Expression profile of MUM1/IRF4, BCL-6, and CD138/syndecan-1 defines novel histogenetic subset of human immunodeficiency virus-related lymphomas. *Blood* 2001;97:744-51.
- 128.Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 2000;95:2084-92.
- 129.Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1989;1:27-35.
- 130.Yang Y, Yaccoby S, Liu W, et al. Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood* 2002;100:610-7.
- 131.Sanderson RD, Borset M. Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Ann Hematol* 2002;81:125-35.
- 132.Linderoth 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 Resch* 2003;9:722-8.

- 133.Simonitsch-Klupp I, Huser I, Ott G, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic/plasmacytoid features are associated with TP53 delations and poor clinical outcome. *Leukemia* 2004;18:146-55.
- 134.Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, et al. 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;28:464-70.
- 135.Zinzani PL, Dirnhofer S, Sabattini E, et al. Identification of outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. Immunohistochemical profiling of homogeneously treated *de novo* tumors with nodal presentation on tissue micro-arrays. *Haematologica* 2005;90:341-7.
- 136.Berglund M, Thunberg U, Amini RM, et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol* 2005;18:1113-20.
- 137.Moskowitz CH, Zelenetz AD, Kewalramani T, et al. Cell 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;106:3383-5.
- 138.Hirose Y, Masaki Y, Karasawa H, et al. Incidence of diffuse large B-cell lymphoma of germinal center B-cell origin in whole diffuse large B-cell lymphoma: tissue fluorescence in situ hybridization using t(14;18) compared with immunohistochemistry. *Int J Hematol* 2005;81:48-57.
- 139.De Paepe P, Achten R, Verhoef G, et al. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 2005;23:7060-8.
- 140.Barrans SL, Carter I, Owen RG, et al. 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;99:1136-43.
- 141.Tzankov A, Pehrs AC, Zimpfer A, et al. Prognostic significance of CD44 expression in diffuse large B cell lymphoma of activated and germinal center B cell-like types: a tissue microarray analysis of 90 cases. *J Clin Pathol* 2003;56:747-52.
- 142.Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-82.

143. Poulsen CB, Borup R, Nielsen FC, et al. Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2005;74:453-65.
144. Saez AI, Saez AJ, Artiga MJ, et al. Building an outcome predictor model for diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2004;164:613-22.
145. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440-3.
146. Wei MC. Bcl-2 related genes in lymphoid neoplasia. *Int J Hematol* 2004;80:205-9.
147. Shen Y, Iqbal J, Huang JZ, Zhou G, Chan WC. BCL2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells. *Blood* 2004;104:2936-9.
148. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-6.
149. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukaemia cell line. *Blood* 1993;81:151-7.
150. Ranger AM, Zha J, Harada H, et al. Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9324-9.
151. Sekiguchi N, Kobayashi Y, Yokota Y, et al. Follicular lymphoma subgrouping by fluorescence in situ hybridization analysis. *Cancer Sci* 2005;96:77-82.
152. Rantanen S, Monni O, Joensuu H, Franssila K, Knuutila S. Causes and consequences of bcl2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001;42:1089-98.
153. Kusumoto S, Kobayashi Y, Sekiguchi N, et al. Diffuse large B-cell lymphoma with extra bcl-2 gene signals detected by FISH analysis is associated with a non-germinal center phenotype. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1067-73.
154. Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, et al. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res.* 2003;9:2133-9.

155. Monni O, Fransilla K, Joensuu H, Knuutila S. BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1999;34:45-52.
156. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:244-51.
157. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, et al. 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;88:1046-51.
158. Hermine O, Haioun C, Lepage E, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996;87:265-72.
159. Jerkeman M, Anderson H, Dictor M, et al. Assessment of biological prognostic factors provides clinically relevant information in patients with diffuse large B-cell lymphoma – a Nordic Lymphoma Group study. *Ann Hematol* 2004;83:414-9.
160. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002;99:2285-90.
161. McCluggage WG, Catherwood M, Alexander HD, McBride HA, Smith MEF, Morris TCM. Immunohistochemical expression of CD10 and t(14;18) chromosomal translocation may be indicators of follicle centre cell origin in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* 2002;41:414-20.
162. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 2004;165:159-66.
163. Xu Y, McKenna RW, Doolittle JE, Hladik CL, Kroft SH. The t(14;18) in diffuse large B-cell lymphoma: correlation with germinal center-associated markers and clinical features. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005;13:116-23.
164. Fang JM, Finn WG, Hussong JW, Goolsby CL, Cubbon AR, Variakojis D. CD10 antigen expression correlates with the t(14;18)(q32;q21) major breakpoint region in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 1999;12:295-300.
165. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* 2003;101:1220-35.

- 166.Pinyol M, Hernandez L, Martinez A, et al. INK4a/ARF locus alterations in human non-Hodgkin's lymphomas mainly occur in tumors with wild-type p53 gene. *Am J Pathol* 2000;156:1987-96.
- 167.Koduru PR, Raju K, Vadmal V, et al. Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:4078-91.
- 168.Sanchez-Beato M, Saez AI, Navas IC, et al. Overall survival in aggressive B-cell lymphomas is dependent on the accumulation of alterations in p53, p16 and p27. *Am J Pathol* 2001;159:205-13.
- 169.Moller MB, Ino Y, Gerdes AM, Skjodt K, Louis DN, Pedersen NT. Aberrations of the p53 pathway components p53, MDM2 and CDKN2A appear independent in diffuse large B cell lymphoma. *Leukemia* 1999;13:453-9.
- 170.Villuendas R, Piris MA, Algara P, et al. The expression of p53 protein in non-Hodgkin's lymphomas is not always dependent on p53 gene mutations. *Blood* 1993;82:3151-6.
- 171.Villuendas R, Pezzella F, Gatter K, et al. p21WAF1/CIP1 and MDM2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, MDM2-, p21- immunophenotype associated with missense p53 mutations. *J Pathol* 1997;181:51-61.
- 172.Wilson W, Teruya-Feldstein J, Fest T. Relationship of p53, bcl2 and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1997;89:601-9.
- 173.Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *New Engl J Med* 1997;337:529-34.
- 174.Leroy K, Haioun C, Lepage E, et al. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol* 2002;13:1108-15.
- 175.Kerbauf FR, Colleoni GW, Saad ST, et al. Detection and possible prognostic relevance of p53 gene mutations in diffuse large B-cell lymphoma. An analysis of 51 cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma* 2004;45:2071-8.
- 176.Llanos M, Alvarez-Arguelles H, Aleman R, Oramas J, Diaz-Flores L, Batista N. Prognostic significance of Ki-67 nuclear proliferative antigen, bcl-2 protein and p53 expression in follicular and diffuse large b-cell lymphoma. *Med Oncol* 2001;18:15-22.

- 177.Kramer M, Hermans J, Parker J, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* 1996;14:2131-8.
- 178.Paik JH, Jeon YK, Park SS, et al. Expression and prognostic implications of cell cycle regulatory molecules, p16, p21, p27, p14 and p53 in germinal centre and non-germinal centre B-like diffuse large B-cell lymphomas. *Histopathology* 2005;47:281-91.
- 179.Falini B, Pileri S, Pizzolo G, et al. CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood* 1995;85:1-14.
- 180.Stein H, Foss HD, Dirkop H, et al. CD30-positive anaplastic large cell lymphoma: a review of its pathological, genetic and clinical features. *Blood* 2000;96:3681-95.
- 181.Marafioti T, Jones M, Facchetti F, et al. Phenotype and genotype of interfollicular large B cells, a subpopulation of lymphocytes often with dendritic morphology. *Blood* 2003;102:2868-76.
- 182.Garcia JF, Mollejo M, Fraga M, et al. Large B-cell lymphoma with Hodgkin's features. *Histopathology* 2005;47:101-10.
- 183.Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-7.
- 184.Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 2001;195:72-9.
- 185.Gillet CE, Springall RJ, Barnes DM, Hanby AM. Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J Pathol* 2000;192:549-53.
- 186.Rosen DG, Huang X, Deavers MT, Malpica A, Silva EG, Liu J. Validation of tissue microarray technology in ovarian carcinoma. *Mod Pathol* 2004;17:790-7.
- 187.Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000;80:1943-9.
- 188.Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A, Leader M. Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. *Histopathology* 2003;42:70-6.

189. Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol* 2002;26:312-9.
190. Rassidakis GZ, Jones D, Thomaides A, et al. Apoptotic rate in peripheral T-cell lymphomas. A study using a tissue microarray with validation on full tissue sections. *Am J Clin Pathol* 2002;118:328-34.
191. Hedvat CV, Hegde A, Chaganti RS, et al. Application of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkins and Hodgkins lymphoma. *Hum Pathol* 2002;33:968-74.
192. Zettl A, Meister S, Katzenberger T, et al. Immunohistochemical analysis of B-cell lymphoma using tissue microarrays identifies particular phenotypic profiles of B-cell lymphomas. *Histopathology* 2003;43:209-19.
193. Zu Y, Steinberg SM, Campo E, et al. Validation of tissue microarray immunohistochemistry staining and interpretation in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2005;46:693-701.
194. Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, Philippon K, Kleiverda K, Kluin P. Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:85-94.
195. Barrans SL, Evans PAS, O'Connor SJM, Owen RG, Morgan GJ, Jack AS. The detection of t(14;18) in archival lymph nodes. *J Mol Diagn* 2003;5:168-75.
196. Sanchez-Izquierdo D, Siebert R, Harder L, et al. Detection of translocations affecting the BCL6 locus in B cell non-Hodgkin's lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization. *Leukemia* 2001;15:1475-84.
197. Roumier C, Galiege-Zouitina S, Bastard C, et al. FISH analysis with a YAC probe improves detection of LAZ3/BCL6 rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol J* 2000;1:117-25.
198. Godon A, Moreau A, Talmant P, et al. Is t(14;18)(q32;q21) a constant finding in follicular lymphoma? An interphase FISH study on 63 patients. *Leukemia* 2003;17:255-9.
199. Ivanković D, ur. Osnove statističke analize za medicinare. Samobor: A.G. Matoš; 1988, str.370.
200. Petz B, ur. Statističke metode za nematematičare. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2004, str.384.

10. Životopis

Rođena sam 24. travnja 1974. godine u Zagrebu, gdje sam završila osnovnu i srednju školu.

1998. godine diplomirala sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s prosječnom ocjenom 4.3. Tijekom studija izradila sam studentski znanstveni rad «Morfometrijski parametri limfatičnih stanica u bolesnika s kroničnim limfoproliferativnim bolestima u odnosu na normalne limfocite» pod mentorstvom prof. dr. sc. Branimir Jakšića. Od 01.08. do 01.09.1998. godine u sklopu studentske razmjene Medicinskog fakulteta u Heidelbergu i Zagrebu, boravila sam u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i terapiju Kirurške klinike Ruprecht–Karls–Universität Heidelberg, Njemačka, i upoznala osnove molekularne dijagnostike.

Pripravnički staž obavila sam u KB Merkur, Zagreb, i 1999. godine položila državni ispit. Od 2000. do 2004. godine radila sam u Laboratoriju za citologiju i hematologiju, Klinike za unutarnje bolesti, KB Merkur, Zagreb, gdje sam pod mentorstvom mr. sc. Ike Kadum-Skelin završila specijalizaciju iz Kliničke citologije.

U akademskoj godini 2001/2002 završila sam Stručni poslijediplomski studij iz Kliničke citologije, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2002. do 2004. godine završila sam Znanstveni poslijediplomski studij Doktorski studij Biomedicina i zdravlje, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Od 23.03.2004. godine radim na Odjelu za patologiju i citologiju KB Merkur, Zagreb, gdje sam 22. travnja 2005. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Mare Dominis započela specijalizaciju iz Patološke anatomije.

Aktivno sam sudjelovala na 3 međunarodna i 7 domaćih znanstvenih skupova na kojima sam izlagala kao prvi autor 7, te kao koautor 24 kongresna rada.

Objavila sam tri znanstvena rada citirana u CC.