

Prehľad molekulovej patológie lymfómov zo spektra difúzneho veľkobunkového B-lymfómu

Prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc.^{1,2}, MUDr. Tomáš Balhárek, PhD.^{1,2}, MUDr. Jozef Mičák¹

¹Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

²Martinské bioptické centrum, spol. s r. o., Martin

V práci sa uvádza stručný prehľad molekulovo-patologických charakteristík nádorov zo skupiny malígnych lymfómov, ktoré sa nazývajú „difúzne veľkobunkové lymfómy B-pôvodu“ (DLBCL). V skutočnosti predstavujú viacero skupín a podskupín rôznorodých nádorových jednotiek, takže kategória „DLBCL“ v súlade s princípmi lymfómovej klasifikácie podľa SZO zahŕňa: bližšie nešpecifikovaný DLBCL, samostatne definované podtypy DLBCL, ako aj iné veľkobunkové lymfómy imunokompetentného, respektíve imunokompromitovaného pacienta. Ide o spektrum agresívnych až vysokoagresívnych nádorov s rôznorodou morfológiou, biológiou a klinickými charakteristikami. Diskutované molekulovo-patologické charakteristiky prispievajú k pochopeniu etiopatogenézy uvedených lymfómov, k ich diagnostike a diferenciálnej diagnostike, umožňujú prognostickú stratifikáciu pacientov a čoraz viac sa uplatňuje ich prediktívna hodnota z hľadiska indikovania adekvátnej liečby pacientov s DLBCL.

Kľúčové slová: difúzny veľkobunkový B-lymfóm, iné veľkobunkové lymfómy, molekulová biológia, prognostické faktory, prediktívne faktory, FISH diagnostika, profily génovej expresie.

Molecular pathology of diffuse large B-cell lymphoma – a review

The presented work represents a brief overview of molecular-pathological characteristics of a group of malignant lymphomas, which are usually designated as „diffuse large B-cell lymphomas“ (DLBCL). In reality, they represent various groups and subgroups of heterogenous lymphoma entities – in accordance with WHO lymphoma classification the „DLBCL“ category includes: DLBCL, not otherwise specified, DLBCL subtypes defined separately as well as other lymphomas of large B-cells of an immunocompetent and immunocompromised patient resp. The category „DLBCL“ represents a spectrum of aggressive up to highly aggressive lymphomas with heterogenous morphology, biology and clinical characteristics. The discussed molecular-pathological characteristics contribute to the understanding of lymphoma etiopathogenesis, help in the diagnostic and differential-diagnostics processes, allow prognostic stratifications of the patients and with increasing importance show also predictive value for the indication of an adequate therapy of the DLBCL patients.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma, other large B-cell lymphomas, molecular biology, prognostic factors, predictive factors, FISH diagnostics, gene expression profiles.

Onkológia (Bratisl.), 2015; roč. 10(2): 96–100

Úvod

Difúzny veľkobunkový B-lymfóm (ďalej DLBCL) je jedným z najčastejších lymfómov našej populácie, ktorý biologicky patrí medzi agresívne lymfómy z periférnych B-buniek. V klasifikácii SZO je definovaný ako difúzne rastúci nádor z „veľkých“ B-lymfoidných buniek (1). Problematike DLBCL sme sa recentne venovali z hľadiska komplexnosti jeho biopatickej diagnostiky všeobecne a vo vybraných lokalizáciách (2 – 4). Tu predkladaný prehľad molekulovej patológie DLBCL nemá ambíciu nahradiť podrobnejšiu špecializovanú literatúru z genetiky a molekulovej biológie, predstavuje výsledok snahy sumarizovať nielen teoretické, ale aj praktické poznatky z molekulovej patológie všetkých nádorov, ktoré klinická prax zahŕňa do kategórie „DLBCL“.

Pojem „DLBCL“ totiž zahŕňa podľa SZO klasifikácie niekoľko etiopatogeneticky a klinicky značne rôznorodých lymfómov, respektíve skupín lymfómov, od agresívnych po vysokoagresívne, s rôznou efektívnosťou ich liečby (1) (tabuľka 1 – 3):

- prvú skupinu predstavuje „bližšie nešpecifikovaný DLBCL“ (ďalej DLBCL NOS – z angl. „not otherwise specified“), ktorý zahŕňa rôzne (morfológiou nádorových buniek definované) *varianty* a (fenotypovo alebo molekulárne-geneticky definované) *typy*, pričom označenie „bližšie nešpecifikovaný“ ho odlišuje od:
- „bližšie špecifikovaných DLBCL“, kam patria ďalšie tri skupiny – samostatne (klinicky či príslušnosťou k orgánu) definované podtypy DLBCL, iné veľkobunkové B-lymfómy imunokompetentného, ako aj iné veľkobunkové B-lymfómy imunokompromitovaného pacienta
- ďalšiu samostatnú problematiku predstavujú difúzne veľkobunkové B-lymfómy, tzv. sivej zóny – na hranici medzi DLBCL a Burkittovým lymfómom (BL), respektíve medzi DLBCL a klasickým Hodgkinovým lymfómom (cHL)

V praxi sa často rozdiely medzi DLBCL NOS a jednotlivými skupinami „bližšie špecifikova-

ných DLBCL“ nesprávne strácajú. V zásade len tri parametre týchto nádorov – biologická agresivita, blastická morfológia (mono-) klonálny pôvod, sú rovnaké. Všetky ostatné morfológické, biologické (klinické) a molekulovo-patologické parametre lymfómov vnútri kategórie DLBCL NOS, a rovnako ani vnútri skupín DLBCL uvedených v b) rovnaké nie sú. Z hľadiska molekulovej patológie ich charakterizujú rozdielne cytogenetické a molekulové abnormality, a to jednak ich nádorových buniek, ako aj ich mikroprostredia („strómy“). To pomáha definovať ich charakteristické signatúry a účasť jednotlivých signálnych dráh v patogenéze všetkých „DLBCL“ a aj identifikovať dnes už reálne alebo potenciálne terapeutické ciele. Nižšie uvedené rozdiely nie sú len akademické, lebo molekulovo-patologické charakteristiky jednotlivých „DLBCL“ majú význam tak pre špecializovanú, ako aj rutinnú hematooonkologickú prax – v oblasti diagnostiky, prognostickej stratifikácie pacientov a v oblasti predikcie liečebnej odpovede (1 – 5).

Tabuľka 1. Varianty a typy DLBCL a iné veľkobunkové B-ML podľa klasifikácie SZO (1)

Morfologické varianty a špecificky definované typy DLBCL, NOS
Morfologické varianty
Centroblastový Imunoblastový Anaplastický
Typy podľa GEP, resp. fenotypové podľa IHC analýzy
GCB typ/GCB typ non-GCB typ/ABC typ CD5+ de novo DLBCL

Vysvetlivky: GEP – profil génovej expzie, IHC – imunohistochemická analýza, GCB – typ z buniek zárodočných centier (z angl. germinal center B-cell), ABC – typ z aktivovaných B-buniek (angl. activated B-cell)

Tabuľka 2. Samostatne (klinicky, resp. orgánovo definované podtypy DLBCL podľa klasifikácie SZO (1).

Samostatne definované podtypy DLBC
Veľkobunkový B-lymfóm bohatý na T-bunky Primárny DLBCL CNS (PCNSL) Primárny kožný DLBCL, „končatinový“ typ EBV pozitívny DLBCL starých ľudí
Vysvetlivky: CNS – centrálny nervový systém, EBV – Epsteinov-Barrovej vírus

Bližšie nešpecifikovaný DLBCL – „DLBCL NOS“

Kategória DLBCL NOS zahŕňa rôznorodé lymfómové jednotky, a preto narastá tlak klinickej praxe na zdokonalenie ich subklasifikácie, poznajúc molekulo-patologické „pozadie“ ich heterogenity – nádorových buniek aj mikroprostredia, v ktorom nádorové bunky proliferujú (1).

V oblasti genetických analýz nádorových buniek DLBCL pribúda množstvo poznatkov z konvenčnej cytogenetiky, o numerických a štruktúrnych chromozómových zmenách vrátane klonálnych karyotypových abnormalít, prestavieb a mutácií rôznych génov, z analýz profilov génovej expzie (ďalej GEP) a najnovšie aj analýz s použitím sekvenácie novej generácie (ďalej NGS). Získané poznatky sa uplatňujú v diagnostike a v diferenciálnej diagnostike a pri odhade prognózy individuálneho pacienta, niektoré majú „len“ prognostický a nie prediktívny význam (prípadne naopak), pričom prediktívna hodnota mnohých z nich narastá. Vedomí si zjednodušenia, tu upriamujeme pozornosť, s prihliadnutím na dnešnú aj našu diagnostickú a klinickú prax, na (5):

- a) niekoľko vybraných génov, na ich mutácie, najmä prestavby a vzájomné translokácie, prípadne amplifikácie, ako aj
- b) analýzy GEP umožňujúce „molekulovo definované“ rozdelenie lymfómov z kategórie

Tabuľka 3. Iné veľkobunkové lymfómy z B-buniek podľa klasifikácie SZO (1)

Iné veľkobunkové lymfómy z B-buniek	
Imunokompetentného pacienta	Imunokompromitovaného pacienta
DLBCL asociovaný s chronickým zápalom	Plazmablastový lymfóm
Primárny mediastinálny veľkobunkový B-ML	Primárny ML seróznych blán
Intravaskulárny veľkobunkový B-ML	Veľkobunkový B-ML pacienta s multientrickým Morbus Castleman, v spojení s infekciou HHV8
Lymfomatoidná granulomatóza	
ALK-pozitívny veľkobunkový B-ML	

Vysvetlivky: ALK – kináza anaplastického lymfómu, HHV – ľudský herpetický vírus

DLBCL NOS na podskupinu lymfómov s profilom GCB (z angl. germinal center B-cells) a na podskupinu s profilom ABC (z angl. activated B-cells) a

c) z toho vyplývajúce ponaučenia pre prax, respektíve na poznanie aktivácie rôznych signálnych dráh v patogenéze DLBCL NOS. Do skupiny génov DLBCL NOS, na ktoré sa dnes zameriava pozornosť, patria najmä (1, 5 – 7): rodina *Ig* génov, prípadne ďalšie gény B-bunkového receptora (*BCR*), gény regulujúce signálne dráhy proliferácie lymfoidných buniek a najnovšie aj gény regulujúce epigenetické, najmä metylačné zmeny. Patria sem „tradične“ gény *IGH* (lokus 14q32), *IGL* (22q11.2) a *IGK* (2p12), *BCL2* (18q21), *BCL6* (3q27), *MYC* (8q24) a *TP53* (17p13.1), najnovšie aj ďalšie, ako napríklad gény *REL* (2p16.1) *CDKN2A* (9p21.3), *EZH2* (7q36.1) a *PD1* (2q37.3).

V prevažnej časti DLBCL (až v 90 % prípadov) sa vyskytuje jedna z klonálnych abnormalít karyotypu (izolovane), ako je prestavba *IGH* s *BCL2* (translokácia t(14;18)(q32;q21)) alebo *IGH* s *BCL6* (t(3;14)(q27;q32)), prípadne *IGL* s *BCL6* (t(3;22)(q27;q11.2)), pričom ich incidencia sa udáva v rozpätí 18 – 40 % prípadov. Okrem toho sa približne v ďalších 5 – 20 % prípadov zisťujú (pri neprítomnosti zmien *BCL2* či *BCL6* génov) štruktúrne aberácie *MYC* génu – zlom a približne rovnako často jeho translokácia buď s *IGH*, alebo s non-*IGH* partnerom, t. j. t(8;14)(q24;q32), alebo t(8;22)(q24;q11.2), alebo zriedkavo dôjde k fúzii s partnerským *BCL6* génom (5, 8). Význam identifikácie týchto zmien je rôzny – napríklad prestavba tak *BCL2*, ako aj *BCL6* génu je považovaná za negatívny a inými za pozitívny prognostický faktor, ich dôkaz dnes nadobúda aj prediktívny význam (2, 5). Naproti tomu je už overený jednoznačne prognosticky negatívny vplyv prestavby *MYC* génu, rovnako aj vplyv mutácie *TP53* génu (1, 8). V našej bioptrickej praxi napríklad využívame FISH analýzy s použitím zlomových, respektíve fúzných sond na dôkaz prestavby génov *IGH*, *BCL2*, *BCL6* a *MYC* pre ich diagnostický a prognostický význam. Uplatňujú sa aj v diferenciálno-diagnostických procesoch

a umožňujú identifikovať tzv. „double-hit“ a „triple-hit“ lymfómy (patriace v zásade do sivej zóny medzi DLBCL a BL – tieto budú predmetom samostatného článku zo série o „DLBCL“).

Zásadný zlom pre prognostickú stratifikáciu pacientov s DLBCL NOS znamenali analýzy GEP, ktoré začali pribúdať od začiatku tohto storočia a na základe ktorých sa spresnil tzv. „COO koncept“ (z angl. cell of origin) DLBCL (9), vznikli tzv. molekulové definície ABC verus GCB podtypu DLBCL, pomocou ktorých sa dokázali klinicky relevantné prognostické rozdiely – signifikantne lepšie liečebné odpovede aj „v ére rituximabu“ a lepšie celkové prežívanie pacientov s GCB než s ABC profilom (9 – 11).

Súčasne pribúdajú správy o vplyve mikroprostredia v zmysle imúnnej protinádorovej odpovede, tvorby mimobunkovej hmoty, faktorov fibrotizácie a signalizácie nádor-stróma na proliferáciu DLBCL. Ukázalo sa, že GEP génov MHC („major histocompatibility complex“) triedy II koreluje s priaznivou prognózou a strata týchto génov (a ich proteínovej expzie) koreluje s redukciami počtu nádor infiltrujúcich CD8+ T-lymfocytov a zlou prognózou (11).

Analýzy GEP buniek nádoru aj mikroprostredia súčasne aj doplnili znalosti o prestavbe jednotlivých génov DLBCL a o ich význame pre molekulovú patogenézu DLBCL (5, 8, 12):

- napríklad v malej časti prípadov DLBCL s prestavbou *MYC* génu a až v 12 – 25 % prípadov s prestavbou *BCL2*, respektíve *BCL6* génu sú prítomné ich ďalšie zmeny, najmä zisky a zriedkavo aj zmoženie počtu kópií génov pri suspektnej polyzómmii, respektíve pravá amplifikácia génu (čo vysvetľuje aj niektoré nálezy imunohistochemicky (IHC) zisťovanej proteínovej expzie – viď ďalej),
- súčasne vynikajú aj rozdiely v incidencii jednotlivých chromozómových aberácií. V GCB podtype je častejšie vyznačená prestavba *BCL2* génu, delécia 17p (gén *TP53*), amplifikácia *REL* a *MDM2* génu a zisky 12q, zatiaľ čo v bunkách ABC podtyp je častejšia trizómmia 3. chromozómu, zisky v lokusoch

Tabuľka 4. Najčastejšie používané algoritmy fenotypovej (imunohistochemickej) stratifikácie DLBCL

(feno-)typ DLBCL	Hans a spol., 2004	Choi a spol., 2009	Meyer a spol., 2011
GCB typ	CD10+/ bcl6+	GCET1+/MUM1-	CD10+/GCET1+ > MUM1+/FOXP1+
	CD10+/ bcl6 -	GCET1-/CD10+	CD10+/GCET1+ = MUM1+/FOXP1+, ale LMO2 +
	CD10-/ bcl6+ / MUM1-	GCET1-/CD10-/BCL6+/ FOXP1-	
non-GCB typ	CD10-/ bcl6-	GCET1+/MUM1+	CD10+/GCET1+ < MUM1+/FOXP1+
	CD10-/BCL6+/ MUM1+	GCET1-/CD10-/BCL6-/ GCET1-/CD10-/BCL6+/ FOXP1+	CD10+/GCET1+ = MUM1+/FOXP1+, ale LMO2 -

BCL2 a *BCL6* génov (18q21-q22, respektíve 3q) a straty chromozómov 6q a 9p (gén *CDKN2A*),

– objasnila sa tzv. molekulová patogenéza vzniku DLBCL vrátane významu detekcie aberantných somatických hypermutácií a rekombinačných zmien tried Ig receptora (napríklad narušenie rekombinačných procesov je pravdepodobne predispozíciou na chromozómové aberácie, najmä génov *BCL6* a *MYC*), ďalej boli identifikované spúšťače konštitatívnej aktivácie signálnej dráhy NFκB v ABC type (a jej chýbanie v GCB type) vrátane úlohy BCR, EBV a viacerých ďalších faktorov. Tieto poznatky už prekračujú rámec predloženého prehľadu molekulovej patológie DLBCL. Tu ostáva ešte dodať, že je žiaduce overiť, či všetky z nich platia „len“ pre primárny seu *de novo* DLBCL NOS, alebo aj pre zriedkavejší sekundárny DLBCL. Ten vzniká blastickou transformáciou primárneho malobunkového B-lymfómu (tzv. richterovský syndróm) a jeho molekulová patológia je komplexnejšia s prihliadnutím na molekulový profil primárneho procesu (13).

Fenotypová (imunohistochemická) stratifikácia DLBCL NOS bola pôvodne navrhnutá ako alternatíva ekonomicky náročnejších analýz GEP jednoduchšími a menej náročnými IHC analýzami fenotypu nádorových buniek, neskôr prispela aj k identifikácii vzťahu génovej expresie k IHC expresii daným génom kódovaného proteínu vrátane tzv. DLBCL s „dvojitou IHC expresiou“ (angl. „double-expressor“). Údaje o možnosti použiť fenotypovú charakteristiku (v rámci COO konceptu) DLBCL namiesto analýzy GEP na stratifikáciu pacientov a voľbu liečby sú rozporuplné. Niektorí poukazujú na to, že pri dodržaní všetkých metodických postupov a parametrov „cut-off“ hraníc sú takto získané údaje dobrým východiskom na indikáciu liečby (8, 14). Iní, naopak, tento postup nepodporujú a poukazujú na veľké rozdiely medzi jednotlivými centrami, respektíve ich hodnotiteľmi vnútri týchto centier

(1, 15). Podľa fenotypu možno rozdeľovať DLBCL NOS na skupinu GCB, non-GCB pôvodu a skupinu neklasifikovateľných DLBCL. Pri nej patológ používa IHC identifikáciu expresie rôznych nukleárných a cytoplazmatických antigénov v nádorových bunkách s použitím rôzne širokého panelu monoklonových protilátok. GCB pôvod nádorových buniek podporuje kombinácia pozitívnej expresie antigénov CD10, BCL6, GCET a LM02, naopak, non-GCB pôvod pozitívita antigénov MUM1/IRF4 a FOXP1. Na hodnotenie sa využívajú rôzne algoritmy pozitívnej verus negatívnej expresie (čiže chýbania pozitivity), pričom hodnotenie musí byť štandardizované v zmysle definície „cut-off“ hranice, t. j. stanovenia hranice percentuálneho podielu pozitívnych/negatívnych buniek z celkovej hodnotenej populácie nádorových buniek. Dnes sú k dispozícii tri najčastejšie používané algoritmy, ktoré sú uvedené v tabuľke 4 – sú to algoritmy podľa Hansovej et al. (16), Choa et al. (17) a tzv. algoritmus zhody („tally algorithm“ – 18). Sú aj ekonomicky rôzne náročné, keďže na jeden vyšetrený prípad vyžadujú aplikáciu troch, respektíve piatich protilátok, prvý z nich dosahuje zhodu s typizáciou podľa GEP približne 80 %, druhý približne 93 % a ešte vyššiu hodnotu súhlasu (5 – 6). Ostatné v literatúre sa vyskytujúce algoritmy iných autorov nezbudili väčší záujem odbornej verejnosti.

Pri analýze fenotypu je potrebné pamätať na to, že korelácia medzi prestavbou individuálneho génu a medzi IHC expresiou tak kódovaného príslušného proteínu v nádorovej bunke je nedokonalá. V zásade pri prestavbe génu dokázané napríklad FISH vyšetrením je zvyčajne prítomná expresia príslušného proteínu, ale, naopak, to neplatí – napríklad IHC dôkaz pozitivity BCL2 proteínu, BCL6 proteínu alebo C-MYC proteínu sa vyskytuje, a to relatívne často aj pri absencii príslušnej prestavby. Preto nemožno prognostické závery vyplývajúce z nálezov génovej prestavby priamočiaro aplikovať na nálezy proteínovej expresie. Na druhej strane však pribúda poznatkov o tom, že v časti DLBCL aj bez prestavby príslušných génov bunky nádoru súčasne exprimujú dvojitú

alebo trojitú pozitivitu proteínov, napríklad c-myc, bcl2, resp. bcl6. Tieto prípady sa dnes analogicky k „double-hit“ a „triple-hit“ DLBCL začínajú označovať ako už spomenuté DLBCL s „dvojitou/trojitou IHC expresiou“ a objavujú sa prvé náznaky, že aj tento nález znamená horšiu prognózu pre pacienta s takto definovaným DLBCL.

Okrem uvedeného SZO klasifikácia uvádza samostatne imunohistochemicky definovaný CD5 pozitívny *de novo* DLBCL a v roku 2013 sa vyčlenil ďalší samostatný typ definovaný imunohistochemicky – CD30 pozitívny DLBCL (1, 19).

CD5 pozitívny *de novo* DLBCL

CD5+ *de novo* (seu primárny) DLBCL tvorí menej ako 10 % všetkých DLBCL a je geneticky odlišný od sekundárneho CD5+ DLBCL, ktorý vzniká zriedkavou transformáciou primárnej CLL/SLL. CD5+ *de novo* DLBCL je agresívnejším (než CD5-) lymfómom s horšou prognózou (vrátane častejšieho postihu CNS), pri ktorom na rozdiel od CD5- DLBCL nedošlo po aplikácii rituximabu do liečby DLBCL k zlepšeniu prežívania pacientov (5, 19). Nádorové bunky CD5+ DLBCL vykazujú klonálnu prestavbu *IGH*, zatiaľ čo prestavby *BCL2* alebo *MYC* génu absentujú (7).

CD30 pozitívny DLBCL

Pozitívna expresia CD30 antigénu v DLBCL je zrejme častejšia, ako sa očakávalo. Aj my od implementácie detekcie CD30 antigénu do IHC panelu diagnostiky DLBCL registrujeme vysoký počet pozitívnych prípadov. Výsledky sa môžu rôzniť podľa aplikácie hodnoty hraničnej „cut-off“ pozitivity. Pôvodne sa na zahrnutie lymfómu do skupiny CD30+ DLBCL navrhovala ako referenčná hodnota pozitívita vo viac ako 20 % buniek DLBCL (20). Tak sa zistilo, že približne 14 % prípadov DLBCL (v sérii viac ako 900 prípadov) patrí do kategórie CD30+ DLBCL, dnes niektoré úvahy smerujú k zníženiu referenčnej hodnoty na úroveň pozitivity vo viac ako 5 % buniek nádoru. U pacientov s CD30+ DLBCL sa zistilo lepšie celkové prežívanie a dlhší interval do progresie, a to tak v GCB, ako aj v ABC type. Molekulové analýzy CD30+ DLBCL dokazujú unikátny molekulový GEP definovaný:

- v bunkách nádoru zvýšenou reguláciou génov, ktoré regulujú NFκB aktiváciu a prežívanie lymfocytov, ďalej zníženou reguláciou génov BCR a B-bunkovej proliferácie,
- pri súčasnej nadmernej cytokínovej a stromálnej signatúre (20). Identifikácia CD30+ DLBCL je dobrým príkladom, ako faktor prognostického významu nadobúda aj potenciálny prediktívny význam.

Samostatne definované podtypy DLBCL

Veľkobunkový B-lymfóm bohatý na T-bunky a histiocyty (TCRBCL)

Molekulové a genetické analýzy sú sťažené malým podielom nádorových buniek v záplave reaktívnych buniek stromálnej reakcie. Predpokladaným protikladom nádorovej bunky sú B-bunky zárodočného centra folikulu (1). Nádorové (B-) bunky vykazujú monoklonálnu prestavbu niektorého z *Ig* génov, prestavby iných, v prípade DLBCL NOS sa vyskytujúcich génov, sú reportované ako zriedkavé až chýbajúce (najmä prestavba *MYC* génu), respektíve protirečivo – FISH analýzy niektorých súborov dokázali prestavbu *BCL2* génu približne v 1/4 a prestavbu *BCL6* v až 1/2 prípadov (5, 7). Ďalšie poznatky o molekulovej patológii TCRBCL sú limitované malým počtom štúdií. Analýzy GEP však identifikovali TCRBCL ako prognosticky nepriaznivý podtyp DLBCL s výraznou imunitnou protinádorovou reakciou hostiteľa (21), ktorej výrazom je morfológia aj názov nádoru. Napokon CGH analýzy poukázali na častý nález genetickej nerovnováhy, najčastejšie abnormality zahŕňajú zisky lokusu 4q13 (prípadne Xq, Xp21 a 18q21) a stratu 17p (6).

Primárny difúzny veľkobunkový B-lymfóm centrálného nervového systému (PCNSL)

GEP profil buniek zodpovedá (aktivovaným) B-bunkám posledných vývojových štádií buniek zárodočného centra folikulu, bunky konštantne vykazujú monoklonálnu prestavbu *Ig* receptora a v 1/4 – 1/3 prípadov prestavbu *BCL6* génu (nie však *BCL2*) (5). Mutácie sa môžu vyskytnúť aj v génoch *MYC*, *PAX5* a *PIM1* (1, 7). Nádor nevykazuje žiadnu špecifickú molekulárno-genetickú abnormalitu využiteľnú v praxi ako marker. Aj v ňom podobne ako v predošlom type podľa výsledkov komparatívnej genomickej hybridizácie (CGH) prevládajú zisky nad stratami, pričom najčastejšie zisky (vyše 60 % prípadov) sú v lokuse 12q, 22q a 18q21 so zvýšeným počtom kópií alebo amplifikáciou génov *BCL2* a *MALT1* (čo vysvetľuje častú pozitivitu IHC dôkazu *bcl2* proteínu pri absencii prestavby *BCL2* génu). Najčastejšie deletovaným lokusom je 9p21.3 s postihom génu *CDKN2A/p16^{INK4a}* (až 2/3 prípadov) a 6q, najmä del 6q21-22 (v takmer 50 % prípadov) (6).

Primárny kožný difúzny veľkobunkový B-lymfóm, „končatinový“ („leg“) typ

Jeho nádorové bunky vykazujú podobnosť s DLBCL NOS – časté prestavby génov *IGH*, *BCL6*

(až v 80 %) a *MYC* (približne v 30 % prípadov), a súčasne aj s PCNSL – profil blízky ABC typu DLBCL NOS, pozitívna expresia *bcl2* proteínu pri chýbaní prestavby *BCL2* génu (z rovnakých príčin) a častá rekurentná abnormalita – delécia 9p21.3, postihujúca gény *CDKN2A* a *CDKN2B* (1, 6).

EBV pozitívny DLBCL starých ľudí

Nádorové bunky zodpovedajú zrelým B-bunkám v štádiu klonálnej transformácie indukovanej infekciou EBV, čiže bunkám ABC typu, ktoré vykazujú prestavbu *IGH* génu a prítomnosť genómu EBV. Prestavby génov *BCL2* a *MYC* sa zvyčajne nevyskytujú, rovnako ani mutácie génu *TP53*, niektoré údaje potvrdzujú translokácie 3q27, t. j. prestavbu *BCL6* génu (5 – 7, 22).

Iné veľkobunkové B-lymfómy

Väčšina ostatných „DLBCL“ – tu uvedených jednotiek patrí, s výnimkou primárneho mediastinálneho veľkobunkového B-lymfómu, medzi zriedkavé až raritné, preto ich tu uvádzame len v stručnom prehľade.

DLBCL asociovaný s chronickým zápalom

Nádorové bunky zodpovedajú EBV infekciou transformovaným B-bunkám v neskorom štádiu vývoja zárodočného centra, t. j. ide o GCB, respektíve post-GCB bunky s klonálnou prestavbou *Ig* génov a prítomnosťou genómu EBV (klonálnej genomovej EBV DNA), vo viac ako 2/3 prípadov aj mutáciu *TP53* génu (1). Nádor vykazuje pomerne špecifický profil génovej expresie (v súlade s asociáciou nádoru s chronickým zápalom – napríklad pleury) v zmysle nadmernej expresie génov pre apoptózu, prenos signálov a odpovede na interferón (zvýšená expresia *IFI27* – „interferon- α inducible protein 27“), čo môže mať význam predikcie príslušnej terapeuticko-odpovede (6, 22). Okrem toho sa vyskytujú mutácie epitopov cytotoxických lymfocytov (CTL) v oblasti génu *EBNA-3B*, čo spolu s poklesom expresie HLA triedy I (normálna expresia je nevyhnutná na navodenie účinku CTL) vysvetľuje, prečo nádorové bunky unikajú dozoru cytotoxických lymfocytov (1).

Primárny mediastinálny veľkobunkový B-lymfóm (PMBL)

Nádorové bunky vznikajú transformáciou tzv. asteroidných B-buniek drene týmusu s klonálnou prestavbou niektorého z *Ig* génov, napriek tomu vykazujú charakteristicky diskordantnú IHC expresiu B-bunkového receptora (CD79a+, ale s-Ig-), zrejme v dôsledku posttranskripčnej blokády (1).

Takmer v 40 – 50 % prípadov je prítomný špecifický znak PMBL – prestavba *CIITA* génu (ktorý reguluje expresiu HLA-DR (MHC triedy II)). Fúznym partner tejto prestavby môže byť rôznych, ale približne v 1/2 prípadov je ním *PD-1* („programmed death“) gén (23). Ďalším charakteristickým molekulárno-genetickým znakom je nadmerná expresia *MAL* génu a zisky chromozómu 9p24, v ktorom sú obsiahnuté gény *JAK2*, *PD-L1* a *PDL2*. To isté platí pre amplifikácie chromozómu 2p postihujúce *c-REL* gén, čo vysvetľuje nielen nadmernú nukleárnu akumuláciu *REL* proteínu, ale aj aktiváciu signálnej dráhy NF κ B (s následnou aktiváciou dráhy *JAK-STAT* a inaktivujúcimi mutáciami *SOCS1* génu) a vyúsťuje do antiapoptotického efektu. Všetky tieto nálezy predstavujú *pro futuro* možný terapeutický cieľ. Výsledky analýz GEP približujú tento nádor skôr k spektru klasických Hodgkinových lymfómov než k DLBCL vrátane chýbania pre DLBCL častejšie prestavby niektorého z génov *BCL2*, *BCL6* a *MYC* (1, 5 – 6).

Intravaskulárny veľkobunkový B-lymfóm

Prítomná je prestavba niektorého z *Ig* génov. Prestavby iných génov (vrátane *BCL2* a *MYC*) sa nevyskytujú, rekurentné genetické abnormality nie sú (dosiaľ?) známe aj pre malý počet známych prípadov, ojedinele bola zistená prestavba *BCL6* génu (1, 6).

ALK pozitívny veľkobunkový B-lymfóm

Prítomná je prestavba *IgH* génu, genetickým markerom nádoru je prestavba *ALK* génu, čo dalo nádoru aj meno. Najčastejším typom prestavby v tomto lymfóme je fúzia *CLTC* génu („clathrin heavy chain gene“) na chromozóme 17q23 s *ALK* génom na chromozóme 2p23 (tzv. *CLTC-ALK* fúzia), výsledkom je zvláštna granulárna IHC expresia *ALK* proteínu. Pre ALK pozitívny veľkobunkový anaplastický lymfóm T-pôvodu typická prestavba (t(2;5)(p23;q35) a IHC expresia *ALK* proteínu v cytoplazme, jadre alebo jadierku buniek nádoru) sa vyskytuje len v malej časti prípadov. To isté ešte vo vyššej miere platí pre kryptickú inzerciu 3' *ALK* génovej sekvencie do chromozómu 4q22-24. Ďalšie menej časté a významovo doteraz nejasné translokácie postihujú gény *SEC31A* (3q27) a *SQSTM1* (chromozóm 5q35.1) (1, 6 – 7).

Lymfomatoidná granulomatóza

Predstavuje heterogénnu „skupinu“ lézií s rôznym podielom B- a T-buniek a s nízko- (G1-2) až vysokomaligným (G3) potenciálom, preto zaradenie tejto choroby do skupiny „DLBCL“ ná-

dorov je arbitrárne. T-bunkový receptor/gén nie je prestavaný. Dôkaz prestavby *Ig* génov môže byť negatívny (najmä v nízkomalignej skupine), ale EBV infikované B-bunky sú prinajmenej v časti prípadov klonálne (5 – 6).

Plazmablastový lymfóm

Nádorová bunka zodpovedá plazmablastu, t. j. blasticky proliferovanej B-bunke s „prepnutím“ B-bunkového programu na program expresie plazmocytových génov. Prítomná je prestavba niektorého z *Ig* génov, najčastejšie *IGH*, ktorý navyše vykazuje často somatické hypermutácie. Až v 70 % býva vyznačená expresia EBV genómu. Približne v 1/2 prípadov je prítomná prestavba *MYC* génu, pričom partnerom fúzie *MYC* génu je gén *IGH*, súčasťou prestavby *BCL2*, respektíve *BCL6* génu nebýva prítomná – nejde teda o spektrum „double“ alebo „triple hit“ lymfómov (1, 6 – 7).

Primárny ML serózných blán

Podľa profilu GEP nádorové bunky zodpovedajú post-GCB-bunkám, vykazujú klonálnu prestavbu niektorého z *Ig* génov a niekedy aj T-bunkového receptora (tzv. fenomén „genotypic infidelity“). Až v 20 % býva prítomný profil „double-hit“ DLBCL (s prestavbou *BCL2* a *MYC* génu). Vždy obsahujú genóm vírusu HHV8, v prípade nádorov u HIV pozitívnych pacientov s AIDS aj EBV genóm, prítomnosť EBV infekcie možno dokázať tak *in situ* hybridizačnými, ako aj PCR analýzami (1, 5).

Veľkobunkový B-ML pacienta s multicentrickým M. Castleman s pridruženou infekciou HHV8

Predpokladaným protikladom nádorovej bunky je tzv. naivná B-bunka. Nádorové bunky vykazujú aktiváciu signálnej dráhy IL-6 receptora, informácie o cytogenetických abnormalitách nádorových buniek nie sú známe – zväčša sa zisťuje normálny karyotyp, respektíve len ojedinelé vzácne a nešpecifické aberácie, ako napríklad del7 a del 8 (1, 5 – 7).

B-bunkový lymfóm, neklasifikovateľný s intermediárnymi črtami medzi DLBCL a klasickým Hodgkinovým lymfómom

Molekulová charakteristika tohto vysoko-agresívneho lymfómu typicky prítomného

v mediastíne mladých ľudí je predmetom intenzívneho skúmania a zatiaľ je k dispozícii len málo výsledkov. Viaceré výstupy analýz GEP podporujú vzťah tohto nádoru s PMBL a cHL, pričom sa diskutuje, či rozdiely medzi týmito nádormi aj pre ich častú reverzibilitu nie sú skôr zapríčinené epigenetickými než genetickými faktormi (1, 11, 23). Rozbor poslednej do úvahy tu prichádzajúcej jednotky – B-bunkového lymfómu, neklasifikovateľného s intermediárnymi črtami medzi DLBCL a Burkittovým lymfómom, ponechávame pre prekrývanie jeho problematiky s molekulovou patológiou „double“ a „triple-hit“ veľkobunkových lymfómov (ako sú časté prestavby *MYC* génu, komplexné karyotypové zmeny a súčasné prestavby s *BCL2*, respektíve *BCL6* genóm) na autorov tejto kapitoly DLBCL.

Použitie výsledky sú súčasťou riešenia projektu *BioMed na JLF UK (ITMS kód 26220220187)*, ktorý je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ.

Literatúra

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press, 2008. 439.
2. Plank L, Balhárek T, Mičák J, et al. Biologicky, prognosticky a prediktívne relevantná biotická typizácia bližšie nešpecifikovaného difúzneho veľkobunkového lymfómu B-pôvodu – príklad komplexnosti modernej biotickéj patológie nádorových ochorení. *Acta chemotherapeutica*. 2013;22(1):66–76.
3. Plank L, Balhárek T. Biológia maligných lymfómov. *Onkologia (Bratisl.)*. 2014;9(2):68–72.
4. Mičák J, Balhárek T, Szépe P, et al. Difúzny veľkobunkový B-lymfóm ako najčastejší B-bunkový non-Hodgkinov lymfóm oblasti hlavy a krku. *Otorinolaryng. a Foniat. (Praha)*. 2015;64(1).
5. Naiem F, Rao PN, Son SX, et al. Diffuse large B-cell lymphoma. Diffuse large B-cell lymphoma subtypes. Other Lymphomas of Large B cells. In: Naiem F, Rao PN, Son SX, Grody WW, eds. *Atlas of hematopathology. Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier; 2013: 427–464.
6. Slack GW, Hsi ED, Gascoyne RD. Diffuse aggressive B-cell lymphomas. In: Hsi ED, Goldblum JR, eds. *Hematopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier. Saunders, 2012. 261–292.
7. Young KH, Medeiros LJ, Chan WC. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. In: Orazi A, Knowles DM, Foucar K, Weiss LM, eds. *Knowles' neoplastic hematopathology*. 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins, 2014. 502–565.
8. Tzankov A, Zijun Y, Xu-Monette ZY, Gerhard M, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Modern Pathol.* 2014;27:958–971.
9. Scott DW, Wright GW, Williams PM, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue

Blood. 2014;123:1214–1217. Published ahead of print January 7, 2014, doi:10.1182/blood-2013-11-536433.

10. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503–511.

11. 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(25):1937–1947.

12. Schneider C, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 2011;28(2):167–177.

13. Said JW. Aggressive B-cell lymphomas: how many categories do we need? *Modern Pathol.* 2013;26:42–56.

14. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313–2323.

15. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: Validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications – A study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):805–812.

16. Hans CH, 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(1):275–282.

17. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5494–5502.

18. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200–207.

19. Hyo R, Tomita M, Takeuchi K, et al. The therapeutic effect of rituximab on CD5-positive and CD5-negative diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2010;28:27–32.

20. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, et al. CD30 expression defines a novel subset of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. Prepublished online January 23, 2013; doi:10.1182/blood-2012-10-461848.

21. 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;105:1851–1861.

22. Vockeroth M, Yap L-F, Shannon-Lowe C, et al. The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *J Pathol*. 2015;235:312–322.

23. Steidl C, Shah SP, Woolcock, BW, et al. MHC class II transactivator CITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature*. 2011;471(7338):377–381.

Prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc.

ÚPA JLF UK a UNM,
Kollárova 2, 036 59 Martin
plank@jfm.uniba.sk

