

Metody cytogenetyki molekularnej w różnicowaniu agresywnych B-NHL

Methods of molecular cytogenetics in aggressive B-NHL differentiation

Article history:

Received: 16.07.2019

Accepted: 31.07.2019

Beata Grygalewicz*

Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii – Instytut im. Skłodowskiej-Curie, Warszawa, Polska

Streszczenie

B-komórkowe agresywne chłoniaki nieziarnicze (*B-cell non-Hodgkin lymphoma* – B-NHL) to heterogenna grupa nowotworów układu chłonnego, wywodząca się z obwodowych limfocytów B. Aberracje cytogenetyczne towarzyszące B-NHL to najczęściej translokacje onkogenów takich jak *MYC*, *BCL2*, *BCL6* w okolicie genowych *loci* dla łańcuchów ciężkich lub lekkich immunoglobulin. W niektórych przypadkach dochodzi do wystąpienia kilku wymienionych aberracji jednocześnie, tak jak w przypadkach przebiegających z równoczesną translokacją genów *MYC* i *BCL2* (*double hit*), niekiedy także z obecnością rearanżacji *BCL6* (*triple hit*). Takie chłoniaki cechuje szczególnie agresywny przebieg kliniczny.

Obecnie molekularna diagnostyka cytogenetyczna przy użyciu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz, w niektórych przypadkach, aCGH jest niezbędnym narzędziem rozpoznawania, klasyfikowania i oceny stopnia zaawansowania agresywnych, nieziarniczych chłoniaków B-komórkowych. Technika mikromacierzy CGH (aCGH) była kluczowym elementem wyróżnienia prowizorycznej grupy chłoniaków Burkitt-like z aberracją chromosomu 11q (*Burkitt-like lymphoma with 11q aberration* – BLL, 11q) w najnowszej klasyfikacji nowotworów układu chłonnego Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) z 2016 r. Omówione zostaną sposoby różnicowania na poziomie cytogenetycznym takich chłoniaków jak: chłoniak Burkitta (*Burkitt lymphoma* – BL), chłoniak rozlany z dużych komórek B (*diffuse large B-cell lymphoma* – DLBCL) oraz 2 nowych jednostek klasyfikacji WHO 2016, czyli chłoniaka z komórek B wysokiego stopnia złośliwości z obecnością translokacji *MYC* i *BCL2* i/lub *BCL6* (*high-grade B-cell lymphoma HGBL, with MYC and BCL2 and/or BCL6 translocations*) oraz chłoniaka BLL, 11q.

Abstract

B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL) is a heterogeneous group of lymphatic neoplasms derived from peripheral B cells. Among cytogenetic aberrations accompanying B-NHL the most common are translocations of 3 oncogenes *MYC*, *BCL2*, *BCL6* in the *loci* coding heavy or light chains of immunoglobulins. In some cases these aberrations occur simultaneously, as in cases with simultaneous *MYC* and *BCL2* gene translocation (*double hit*) or also with *BCL6* rearrangement (*triple hit*). These lymphomas are characterized by aggressive clinical course.

At present, molecular cytogenetic methods like fluorescence in situ hybridization (FISH) and, in some cases, microarray comparative genomic hybridization (aCGH) are essential tools for establishing correct diagnosis of aggressive, B-NHL. The aCGH was a key element in distinction of the provisional entity Burkitt-like lymphoma with 11q aberration (BLL, 11q) in the newest WHO 2016 classification of lymphoid neoplasms. Differentiation at the cytogenetic level of Burkitt lymphoma (BL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and 2 new entities in WHO 2016 classification, BLL, 11q and high-grade B-cell lymphoma HGBL, with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangement (double-hit or triple-hit lymphoma) will be discussed.

© 2019 Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Insitute of Hematology and Transfusion Medicine. Published by Sciendo. All rights reserved.

Słowa kluczowe:

B-NHL, cytogenetyka molekularna, FISH, aCGH

Keywords:

B-NHL, molecular cytogenetics, FISH, aCGH

Wstęp

Badania cytogenetyczne stanowią ważny element w procesie diagnostycznym wielu nowotworów, w tym białaczek i chłoniaków. Klasyczne badanie kariotypu, z czasem zostało uzupełnione, a w niektórych przypadkach zastąpione, metodami cytogenetyki molekularnej, takimi jak fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (*fluorescent in situ hybridization* – FISH) czy porównawcza hybrydyzacja genomowa na bazie mikromacierzy (*array comparative genomic hybridization* – aCGH). Metody te są mniej wymagające, jeśli chodzi o konieczność uzyskania podziałów komórkowych w hodowli *in vitro*, ponieważ badanie

może być przeprowadzone na jądrach interfazowych po utrwaleniu komórek nowotworowych lub na wyizolowanym DNA. Jednak każda z tych metod ma swoje ograniczenia. O ile w badaniu kariotypowym uzyskujemy dosyć niskorozdzielczy, ale całościowy, obraz aberracji chromosomowych zarówno liczbowych, jak i strukturalnych, to badanie FISH pozwala na stwierdzenie charakterystycznych zmian genowych, takich jak delecje, amplifikacje czy fuzje genowe powstałe w wyniku translokacji, inwersji lub innych zmian chromosomowych. Zaletą tej techniki jest jej duża specyficzność i wysoka rozdzielczość. Wadą metody FISH jest ograniczenie badania tylko do określonych genów lub *loci* chromosomowych. W związku z tym przed rozpoczęciem

* Corresponding author: Beata Grygalewicz, Samodzielna Pracownia Cytogenetyki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. W.K. Roentgena 5, 02-781 Warszawa, Polska, tel. +48 22 546 26 30, e-mail: beata.grygalewicz@coi.pl

badania wymagana jest znajomość zmian genowych, które chcemy potwierdzić lub wykluczyć. W przypadku aCGH, podobnie jak w badaniu kariotypowym, uzyskujemy całościowy obraz zmian, ale tylko niezrównoważonych, takich jak powielenia i utraty fragmentów chromosomów. Zrównoważone zmiany, jak na przykład translokacje, inwersje czy insercje są w tym badaniu niewidoczne. Niewątpliwymi zaletami metody aCGH są brak konieczności prowadzenia hodowli *in vitro*, jej duża rozdzielczość oraz możliwość określenia genów wchodzących w skład wykrytych aberracji.

B-komórkowe agresywne chłoniaki niezaiarncicze (*B-cell non-Hodgkin lymphoma* – B-NHL) to heterogenna grupa nowotworów układu chłonnego wywodząca się z dojrzałych, obwodowych limfocytów B. Najnowsza, uaktualniona klasyfikacja nowotworów limfoidalnych Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization* – WHO) z 2016 r. opisuje obowiązujący podział w tej grupie chorób [1]. Jest to bardziej aktualizacja poprzedniej, 4. edycji niż zupełnie nowa 5. edycja [2]. Wiele jednostek histoklinicznych zostało zachowanych. Niektóre „tymczasowe” jednostki przeszły do kategorii „zdefiniowane” oraz pojawiło się kilka nowych jednostek „tymczasowych”. W tabeli I przedstawiono najnowszy podział agresywnych chłoniaków B-komórkowych. Z tej grupy omówione zostaną sposoby różnicowania na poziomie cytogenetycznym takich chłoniaków jak: chłoniak Burkitta (*Burkitt lymphoma* – BL), chłoniak rozlany z dużych komórek B (*diffuse large B-cell lymphoma* – DLBCL) oraz 2 nowych jednostek klasyfikacji WHO z 2016 r., czyli chłoniaka z komórek B wysokiego stopnia złośliwości z obecnością translokacji *MYC* i *BCL2* i/lub *BCL6* (*high-grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements* - HGBL, *with MYC and BCL2 and/or BCL6 translocations*) oraz chłoniaka Burkitt-like z aberracją chromosomu 11q (*Burkitt-like lymphoma with 11q aberration* - BLL, 11q)

Chłoniak Burkitta (BL)

BL jest jednym z najbardziej agresywnych chłoniaków, charakteryzuje się blisko 100% frakcją wzrostową i najkrótszym wśród nowotworów czasem podwojenia masy, która wynosi około 26 godzin [3]. Wyróżnia się 3 warianty BL: endemiczny (występujący głównie w Afryce równikowej i Nowej Gwinei), sporadyczny i związany z niedoborem odporności. Prezentacja kliniczna jest często pozawęzłowa lub może przyjąć formę ostrej białaczki. Postać sporadyczna występuje głównie u dzieci i młodzieży, stanowiąc 50% wszystkich chłoniaków niezaiarnciczych, natomiast u dorosłych nowotwór ten występuje znacznie rzadziej, stanowiąc od 1% do 2% tej grupy nowotworów. Średni wiek zachorowania u dorosłych to 30 lat, chociaż notuje się również pik zachorowań u starszych pacjentów [4]. Mężczyźni chorują 2-3-krotnie częściej niż kobiety. BL rozwija się z transformowanej nowotworowo komórki B ośrodków rozmnażania.

Pod względem cytogenetycznym rearanżacja genu *MYC* (8q24) jest wysoce charakterystyczna dla chłoniaka Burkitta, ale nieswoista. W większości przypadków BL występuje jako translokacja t(8;14) przenosząca gen *MYC* do regionu łańcucha ciężkiego immunoglobulin (*IGH*) zlokalizowanego na chromosomie 14 (14q32). Rzadziej, czyli w około 5-10% przypadków, *MYC* przenoszony jest do *locus* łańcuchów lekkich: kappa (*IGK*, 2p11.2) na chromosomie

Tabela I. Klasyfikacja agresywnych chłoniaków z dojrzałych komórek B według uaktualnionej klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) 2016

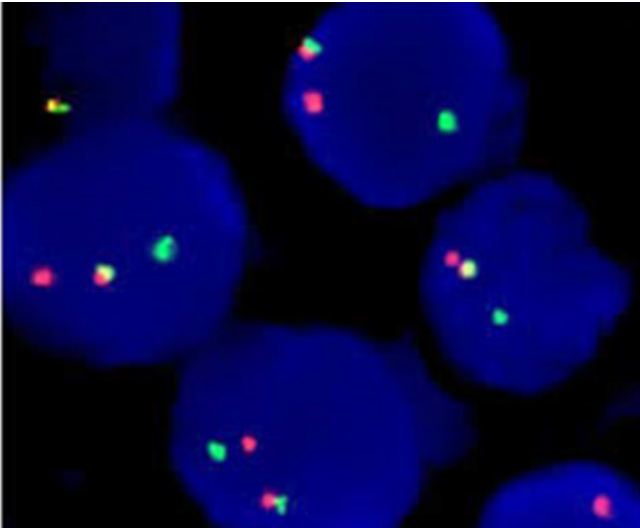
Table I. Aggressive B-cell lymphomas in the 2016 revised WHO classification

Jednostka histokliniczna
Chłoniak rozlany z dużych komórek B, bliżej nieokreślony (DLBCL, NOS) Warianty morfologiczne: - centroblastyczny - immunoblastyczny - anaplastyczny - inne rzadkie warianty morfologiczne Podtypy immunofenotypowe: - double-expressor DLBCL, NOS - CD30-pozytywny DLBCL, NOS - CD5-pozytywny DLBCL, NOS - cyklina D1-pozytywny DLBCL, NOS Podtypy molekularne: - z komórek ośrodków rozmnażania (GCB)* - z aktywowanych komórek B (ABC)*
Pierwotny DLBCL ośrodkowego układu nerwowego (CNS)
Pierwotny skórny DLBCL typu kończynowego (PCLBCL, <i>leg type</i>)
Pierwotny chłoniak śródpiersia (grasicy) z dużych komórek B (PMBL)
Pierwotny chłoniak wysiękowy (PEL)
Wewnątrznaczyniowy chłoniak z dużych komórek B (IVLBCL)
Chłoniak z dużych komórek B bogaty w komórki T/histiocyty (T/HRLBCL)
Chłoniak plazmablastyczny (PBL)
EBV-pozytywny DLBCL, NOS*
<i>HHV8-pozytywny DLBCL, NOS*</i>
DLBCL związany z przewlekłym zapaleniem
Ziarniniakowatość limfoidalna
Chłoniak z dużych komórek B, ALK+ (ALK+ LBCL)
Chłoniak z dużych komórek B z rearanżacją <i>IRF4</i> (LBCL with <i>IRF4-R</i>)*
Chłoniak Burkitta (BL)
Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q (BLL, 11q)*
Chłoniak o wysokim stopniu złośliwości z komórek B z rearanżacjami <i>MYC</i> i <i>BCL2</i> i/lub <i>BCL6</i> (HGBL, <i>MYC-R</i> and <i>BCL2-R</i> and/or <i>BCL6-R</i>)*
Chłoniak o wysokim stopniu złośliwości z komórek B, bliżej nieokreślony (HGBL, NOS)*
Chłoniak z komórek B, nieklasyfikowany, z cechami pośrednimi między chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B a klasycznym chłoniakiem Hodgkina (DLBCL/cHL)

* Zmiany w stosunku do klasyfikacji 2008; kursywa – nowe jednostki prowizoryczne; pogrubienie – omawiane podtypy będące przedmiotem różnicowania na poziomie cytogenetycznym.

2 lub lambda (*IGL*, 22q11.22) na chromosomie 22, odpowiednio jako translokacje t(2;8) i t(8;22). Efekt wszystkich 3 translokacji jest ten sam, czyli nadekspresja genu *MYC*. Jest to często jedyne zaburzenie cytogenetyczne w tym typie chłoniaka. W badaniu FISH z zastosowaniem sondy rozdzielczej dla genu *MYC* obserwujemy rozdzielenie sygnału, wskazujące na rearanżację genu *MYC* (Ryc. 1). Sondę tego typu stosuje się szczególnie, jeśli badany gen wchodzi w translokacje z więcej niż jednym genem partnerskim, tworząc tak zwane translokacje wariantowe. Kariotyp BL jest przeważnie prosty, czyli rearanżacji *MYC* towarzyszy co najwyżej 1 aberracja chromosomowa (Tab. II). Najczęstszymi zmianami dodatkowymi są: duplikacja 1q21-25, delecje 6q11-14, 13q32-34, 17p oraz trisomie 12, 7, 8 i 18 [5, 6]. Pacjenci z kariotypem z większą

liczbą aberracji gorzej odpowiadają na leczenie. Celem leczenia jest uzyskanie całkowitej remisji (*complete remission* – CR) choroby w pierwszym podejściu i wyleczenia, ponieważ nie ma skutecznego leczenia choroby nawrotowej i opornej. Leczeniem z wyboru jest intensywna immunochemioterapia z zastosowaniem dużych dawek leków alkilujących i antymetabolitów oraz leczenia dokanałowego. Najczęściej stosowanymi protokołami są: CODOX-M/IVAC, GMALL B-ALL/NHL 2002 [3]. BL najczęściej różnicujemy z DLBCL, NOS oraz z BLL, 11q.



Ryc. 1. Wynik badania FISH z sondą rozdzielczą MYC BAP (Vysis Abbott Molecular, Downers, Grove, IL). Sygnał fuzyjny wskazuje na prawidłową kopię MYC, sygnały czerwony i zielony wykazują rearanżację MYC przez rozdzielenie sygnału sondy, odpowiednio na 5' MYC i 3' MYC

Fig. 1. FISH test result with MYC Beak Apart (BAP) probe (Vysis Abbott Molecular, Downers, Grove, IL). The fusion signal indicates a normal copy of MYC, the red and green signals rearrangement of the MYC by separating the probe signal into 5' MYC and 3' MYC, respectively

Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q (BLL, 11q)

U około 10% klasycznych BL pod względem morfologicznym i w dużym stopniu immunofenotypowym nie stwierdza się w badaniu FISH rearanżacji genu *MYC* [7, 8]. Zjawisko to może być spowodowane różnymi mechanizmami, takimi jak odległe punkty pęknięć, które nie są pokryte przez sondy FISH czy insercje *MYC* w *IG* lub *IG* w *MYC*. Przynajmniej część przypadków BL bez rearanżacji *MYC* należy do

nowej, tymczasowej jednostki WHO z 2016 r. „Chłoniak Burkitt-like z aberracją 11q”. Według definicji grupę tę charakteryzuje morfologia komórek, immunofenotyp oraz profil ekspresji genów w dużej mierze zbliżone do BL, brak rearanżacji *MYC* i prawdopodobnie związane z tym niższy poziom ekspresji *MYC*, obecność specyficznej zmiany chromosomowej, czyli jednoczesnej duplikacji i delecji 11q, kariotypy bardziej kompleksowe niż w BL, częsta prezentacja węzłowa, przebieg kliniczny podobny do BL [9, 10]. Podobny obraz zmian opisano również w chłoniakach posttransplantacyjnych [11].

Detekcję, specyficzną dla BLL, 11q, jednoczesnej duplikacji i delecji 11q, można przeprowadzić metodami cytogenetyki molekularnej, takimi jak aCGH lub FISH. Badanie aCGH pozwala na dokładną analizę wielkości obu regionów. Wyróżnia się 2 główne typy duplikacji 11q, dużą – powyżej 50 Mpz, i mniejszą – poniżej 20 Mpz, która związana jest z dużym rozmiarem guza (powyżej 20 cm średnicy) i amplifikacją regionu 11q23.3 zawierającego gen *KMT2A* [12]. Oba typy zmian przedstawiono na rycinie 2. Aberracja 11q może być wykryta na jądrach interfazowych również w badaniu FISH. Podstawowy zestaw sond FISH do detekcji duplikacji i delecji 11q składa się z 2 sond: hybrydującej do minimalnego regionu duplikacji 11q23.3 (np. *KMT2A*) oraz do telomerowego regionu delecji (np. sonda telomerowa 11q). Obie sondy muszą być hybrydowane wraz z kontrolną sondą centromerową dla chromosomu 11 (Ryc. 2). Tylko jednoczesne powielenie sygnałów *KMT2A* i utrata sygnału telomerowe wskazuje na BLL, 11q. Szczególnie zaleca się przeprowadzanie analizy w kierunku aberracji 11q w przypadkach o morfologii BL, ale bez rearanżacji *MYC*. Badanie to może być przeprowadzone zarówno na świeżym materiale biopsji lub na skrawkach parafinowych.

Pacjenci z aberracjami 11q dobrze odpowiadają na agresywne leczenie schematem dla chłoniaka Burkitta GMALL/B-ALL/NHL/2002 lub dla agresywnych chłoniaków DLBCL, czyli DA-EPOCH-R.

Chłoniak rozlany z dużych komórek B, bliżej nieokreślony (DLBCL, NOS)

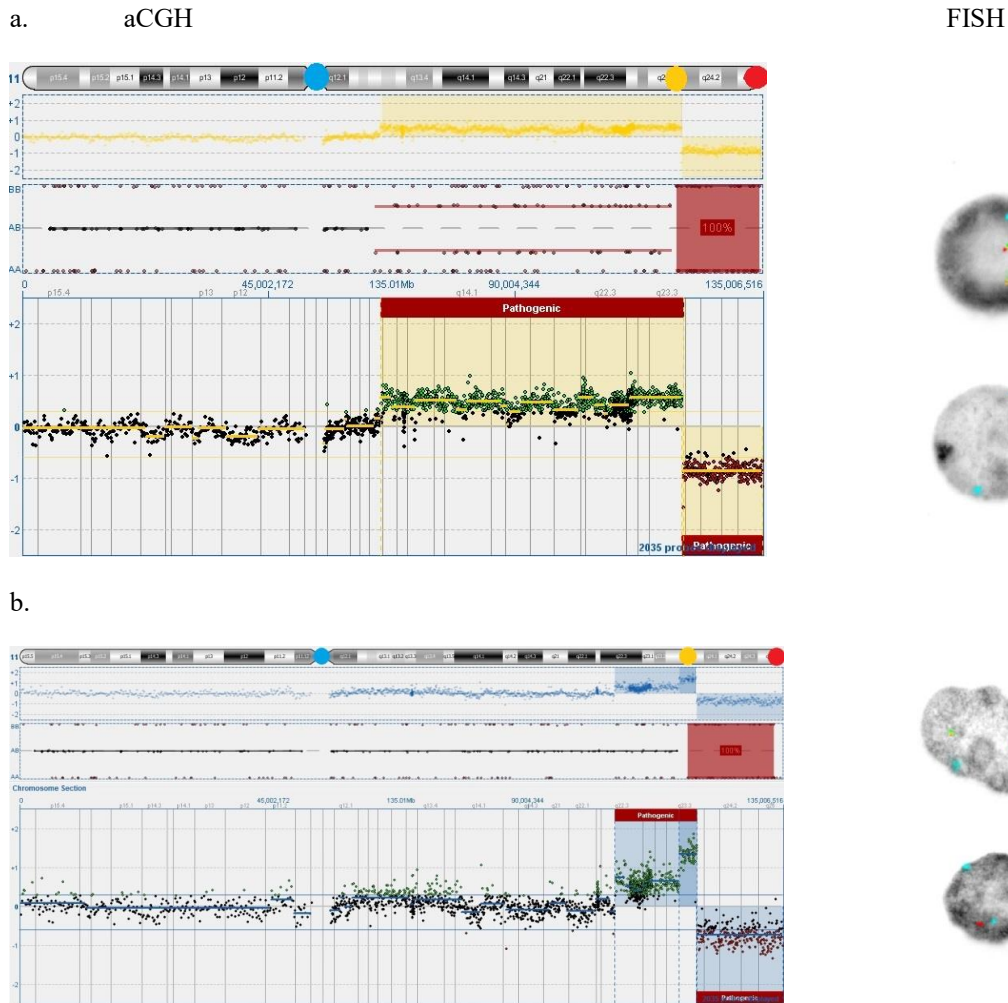
Chłoniak rozlany z dużych komórek B, bliżej nieokreślony, stanowi około 35% wszystkich chłoniaków nieziarniczych u dorosłych, w tym 80% chłoniaków agresywnych. Najczęściej występuje u osób starszych, ponad 50% pacjentów w momencie diagnozy ma powyżej 65 lat [13]. Pod względem morfologicznym wyróżniamy warianty: centroblastyczny, immunoblastyczny, anaplastyczny oraz inne rzadkie warianty. Najnowsza klasyfikacja WHO wprowadziła 2 molekularne

Tabela II. Cytogenetyczne różnicowanie agresywnych chłoniaków z dojrzałych komórek B według uaktualnionej klasyfikacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) 2016

Table II. Cytogenetic distinction of aggressive B-cell lymphomas according to the 2016 revised WHO classification

Jednostka histokliniczna	FISH				Kariotyp
	Rearanżacja <i>MYC</i>	Rearanżacja <i>BCL2</i>	Rearanżacja <i>BCL6</i>	Duplikacja/delecja 11q	
BL	+	-	-	-	Prosty
BLL, 11q	-	-	-	+	Bardziej złożony niż w BL
DLBCL, NOS	+*/-	+*/-	+*/-	-	Złożony
HGBL z rearanżacją <i>MYC</i> , <i>BCL2</i> i/lub <i>BCL6</i>	+	+	+/-	-	Złożony

* Jako pojedyncza zmiana



Ryc. 2. Wynik badania aCGH (CytoSure Haematological Cancer and SNP Array (8x60k), Oxford Gene Technology, Yarnton, UK) oraz FISH z zastosowaniem sond (Vysis Abbott Molecular, Downers, Grove, IL): centromerowej CEP-11-Aq widocznej w kolorze niebieskim, rozdzielczej MLL(KMT2A) w kolorze żółtym oraz telomerowej TelVysion 11q w kolorze czerwonym

a. Duża duplikacja $dup(11)(q13q23.3)$ z terminalną delecją $del(11)(q23.3q25)$, aCGH sondy w kolorze zielonym wykazują obszar duplikacji, sondy w kolorze czerwonym określają region delecji terminalnej. W badaniu FISH w tym samym przypadku dwóm sygnałom centromerowym towarzyszą trzy sygnały sondy MLL(KMT2A) i jeden sygnał sondy telomerowej.

b) Mała duplikacja $dup(11)(q22.3q23.3)$ z amplifikacją w regionie zawierającym gen KMT2A (11q23.3). W badaniu FISH widoczne powielenie sygnałów sondy MLL(KMT2A) i jeden sygnał sondy telomerowej.

Fig. 2. aCGH test result (CytoSure Haematological Cancer and SNP Array (8x60k), Oxford Gene Technology, Yarnton, UK) and FISH using probes (Vysis Abbott Molecular, Downers, Grove, IL): Centromeric CEP-11-Aq visible in blue, Break Apart MLL (KMT2A) in yellow and TelVysion 11q telomeric probe on red color

a. Large duplication $dup(11)(q13q23.3)$ with a terminal deletion $del(11)(q23.3q25)$, aCGH green probes exhibit a duplication area, red probes determine the region of the terminal deletion. In FISH, in the same case, the two centromeric signals are accompanied by three MLL probes (KMT2A) and one telomeric probe signal.

b. Small duplication $dup(11)(q22.3q23.3)$ with amplification in the region containing KMT2A (11q23.3). In the FISH the multiplication of the MLL (KMT2A) probe signals and one telomeric probe signal are visible.

podtypy GCB i ABC, które zostały określone na podstawie analizy profilu ekspresji genów. Podział ten również odzwierciedla stadium komórki B, w którym doszło do transformacji nowotworowej. Chłoniaki typu GCB charakteryzuje sygnatura genowa i fenotypowa typowa dla prawidłowych limfocytów B ośrodków rozmnażania grudki chłonnej, w tym wysoka ekspresja BCL6 i CD10 [14]. Czynnikiem transkrypcyjnym BCL6 jest kluczowym regulatorem potencjału proliferacyjnego DLBCL podtypu GCB. Natomiast podtyp ABC charakteryzują zahamowanie ekspresji białek uczestniczących w formowaniu

ośrodków rozmnażania oraz zwiększona ekspresja genów i białek zaangażowanych w proces aktywacji limfocytów B przed ich ostatecznym zróżnicowaniem plazmatycznokomórkowym, takich jak kinaza PIM-1, IRF4/MUM1 czy BCL2 [15]. Kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za potencjał proliferacyjny w przypadkach ABC jest NF- κ B [16]. Oba podtypy różnią się profilem mutacyjnym, zmianami cytogenetycznymi oraz rokowaniem. Najczęstszą zmianą chromosomową w DLBCL, NOS jest translokacja angażująca gen BCL6, która występuje w około 30% przypadków,

z większą częstością w podtypie ABC (Tab. III) [17]. Translokacja t(14;18), przenosząca gen *BCL2* w pobliże silnego promotora genu *IGH*, występuje głównie w podtypie GCB [18]. Rearanżacja *MYC*, jako pojedyncza zmiana, występuje w 5-8% przypadków zarówno w podtypie ABC, jak i GCB. Cechą odróżniającą pod względem cytogenetycznym BL z rearanżacją *MYC* od DLBCL, NOS z tą samą aberracją jest kompleksowość kariotypu. DLBCL, NOS charakteryzuje się kariotypem kompleksowym. Wynik badania FISH z zastosowaniem sond rozdzielnyczych dla genów *BCL6*, *BCL2* i *MYC* może być pomocne w uściśleniu podtypu molekularnego DLBCL, NOS.

Standardowa terapia DLBCL, NOS opiera się na protokole R-CHOP. Obecność aberracji tych 3 onkogenów może mieć znaczenie prognostyczne. Niektóre badania dowodzą, że rearanżacja *BCL2* związana jest z pogorszeniem rokowania u pacjentów z podtypem GCB leczonych R-CHOP [19, 20]. Także powielenie kopii genu *BCL2* jest czynnikiem pogarszającym rokowanie w podtypie ABC [21]. Natomiast translokacje angażujące gen *BCL6*, w podtypie ABC, związane są z dłuższym czasem przeżycia [17, 22]. Rearanżacja *MYC* niezależnie od podtypu wskazuje na krótszy czas przeżycia [23, 24]. Badania dowodzą, że dodanie do protokołu R-CHOP nowych leków, takich jak bortezomib, lenalidomid czy ibrutinib jest korzystne dla pacjentów z podtypem ABC [25-28]. Z tego powodu rozróżnienie pomiędzy tymi 2 podtypami DLBCL, NOS powinno być ustalone w momencie diagnozy.

Chłoniak z komórek B wysokiego stopnia złośliwości z obecnością translokacji *MYC* i *BCL2* i/lub *BCL6* (HGBL, z translokacją *MYC* i *BCL2* i/lub *BCL6*)

Nowa kategoria w klasyfikacji WHO 2016 zawiera agresywne chłoniaki B-komórkowe z równoczesną obecnością rearanżacji *MYC*, *BCL2* i/lub *BCL6*. Inna nazwa tej grupy to chłoniaki *double-* lub *triple hit*, przy czym warunkiem włączenia do tej podjednostki jest zawsze obecność rearanżacji *MYC*, której towarzyszy aberracja *BCL2* i/lub *BCL6*. Przypadki z rearanżacją *BCL2* i *BCL6* bez translokacji angażującej gen *MYC* nie należą do tej kategorii.

Z tej grupy wyłączone są rzadkie przypadki chłoniaka grudkowego i białaczki/chłoniaka limfoblastycznego.

Pod względem morfologicznym chłoniaki tej grupy przypominają DLBCL, NOS lub mogą mieć cechy pośrednie pomiędzy BL i DLBCL. Kariotypy są kompleksowe. Rearanżacje genów *MYC*, *BCL2*, *BCL6* powinny być potwierdzone metodą FISH, ponieważ istnieją przypadki z podwójną lub potrójną nadekspresją białek kodowanych przez te onkogeny, które są spowodowane innym mechanizmem niż aberracje genów.

Do rearanżacji *MYC*, w około 65% przypadków, dochodzi na drodze translokacji przenoszących *MYC* w sąsiedztwo genów kodujących łańcuchy immunoglobulin, najczęściej *IGH*, ale również *IGK* i *IGL*. W pozostałych przypadkach *MYC* wchodzi w translokacje z innymi partnerami, takimi jak *BCL6*, *BCL11A*, *PAX5* czy *ICAROS49* [29, 30]. Istnieją obserwacje wskazujące, że translokacje *MYC* z genami immunoglobulin rokują gorzej niż z innymi genami [31, 32]. Translokacje *MYC* z *IGK* i *IGL* powinny być potwierdzane sondami dwufuzyjnymi, a nie rozdzielnymi, aby wyeliminować prawdopodobieństwo 2 niezależnych translokacji [33].

Współwystępowanie rearanżacji *MYC* i *BCL2* jest częstsze w podtypie GCB i wiąże się z krótszym czasem przeżycia [23, 32, 34]. Natomiast występujące razem rearanżacje *MYC* i *BCL6* są częściej opisywane w podtypie ABC, ale znaczenie prognostyczne tych zmian nie jest jednoznacznie określone.

Rokowanie w tej grupie pacjentów jest wysoce niekorzystne. W leczeniu klasycznym schematem R-CHOP odsetek całkowitych remisji jest relatywnie niski, a średnia całkowitego czasu przeżycia wynosi 4,5-18,5 miesięcy [23, 32, 35-37]. Obecnie prowadzone są badania nad nowymi schematami chemioterapii, które byłyby bardziej skuteczne w leczeniu tych pacjentów.

Amplifikacje onkogenów

Aktywacja onkogenów może odbywać się również na drodze amplifikacji prowadzących do ich nadekspresji. Pacjenci z DLBCL z amplifikacją *MYC* powyżej 4 kopii mają znacznie gorsze rokowanie niż chorzy, u których stwierdzono powielenie *MYC* od 3 do 4 kopii [38]. Powielenia lub amplifikacje *MYC*, *BCL2* i/lub *BCL6* współwystępujące

Tabela III. Częstość występowania zmian cytogenetycznych w podtypach ABC i GCB DLBCL, NOS
Table III. Incidence of cytogenetic changes in subtypes of ABC and GCB DLBCL, NOS

Wybrane zmiany cytogenetyczne	ABC DLBCL	GCB DLBCL
REARANŻACJA GENU		
<i>BCL2</i>	< 5%	40%
<i>BCL6</i>	25-30%	15%
<i>MYC, single hit</i>	5-8%	5-8%
ZMIANY LICZBY KOPII GENÓW		
1p36.32 (<i>TNFRSF14</i>) delecja	10%	30%
2p16 (<i>REL</i>) powielenie/amplifikacja	Rzadko	30%
3q27 powielenie/amplifikacja	45%	15-20%
6q21 (<i>PRDM1</i>) delecja	45%	25%
9p21 (<i>CDKN2A</i>) delecja	40%	20%
18q21.3 (<i>BCL2</i>) powielenie/amplifikacja	55%	15%

z 1 lub 2 translokacjami nie równoważą rearanżacji, mimo że istnieją doniesienia o podobnym efekcie biologicznym zwiększającym agresywność choroby, przypadki takie nie powinny być włączane do kategorii HGBL, z translokacją *MYC* i *BCL2* i/lub *BCL6* [38]. Pacjenci z amplifikacjami i/lub translokacjami *MYC* i *BCL2* są klasyfikowani jako HGBL, NOS [39, 40].

Wkład autorów/ Authors' contributions

BG – całość pracy.

Konflikt interesu/ Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/ Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo

References

- [1] Swerdlow SH, Campo E, Piler SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127(20):2375–90.
- [2] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. In: Bosman FT, Jaffe ES, Lakhani SR, Ohgaki H (eds.). World Health Organization classification of tumours. Lyon: IARC; 2008.
- [3] Walewski J, Dąbrowska-Iwanicka A., Domańska-Czyż K, Rymkiewicz G. Chłoniaki o wysokiej agresywności klinicznej. *Acta Haematol Pol* 2009;40(2):125–44.
- [4] Mbulaiteye SM, Anderson WF, Ferlay, et al. Pediatric, elderly, and emerging adult-onset peaks in Burkitt's lymphoma incidence diagnosed in four continents, excluding Africa. *Am J Hematol* 2012;87(6):573–8.
- [5] Maria Murga Penas E, Schilling G, Behrmann P, et al. Comprehensive cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of 44 Burkitt lymphoma cell lines: secondary chromosomal changes characterization, karyotypic evolution, and comparison with primary samples. *Genes Chromosomes Cancer* 2014;53(6):497–515.
- [6] Scholtysik R, Kreuz M, Klapper W, et al. Detection of genomic aberrations in molecularly defined Burkitt's lymphoma by array-based, high resolution, single nucleotide polymorphism analysis. *Haematologica* 2010;95(12):2047–55.
- [7] Haralambieva E, Schuurin E, Rosati S, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization for detection of 8q24/*MYC* breakpoints on routine histologic sections: validation in Burkitt lymphomas from three geographic regions. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40(1):10–8.
- [8] Leucci E, Cocco M, Onnis A, et al. *MYC* translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol* 2008;216(4):440–50.
- [9] Pieńkowska-Grela B, Rymkiewicz G, Grygalewicz B, et al. Partial trisomy 11, dup(11)(q23q13), as a defect characterizing lymphomas with Burkitt pathomorphology without *MYC* gene rearrangement. *Med Oncol* 2011;28:1589–95.
- [10] Salaverria I, Martin-Guerrero I, Wagener R, et al. A recurrent 11q aberration pattern characterizes a subset of *MYC*-negative high-grade B-cell lymphomas resembling Burkitt lymphoma. *Blood* 2014;123(8):1187–98.
- [11] Ferreiro JF, Morscio J, Dierickx D, et al. Post-transplant molecularly defined Burkitt lymphomas are frequently *MYC*-negative and characterized by the 11q-gain/loss pattern. *Haematologica* 2015;100(7):275–79.
- [12] Grygalewicz B, Woroniecka R, Rymkiewicz G, et al. The 11q-Gain/Loss Aberration Occurs Recurrently in *MYC*-Negative Burkitt-like Lymphoma With 11q Aberration, as Well as *MYC*-Positive Burkitt Lymphoma and *MYC*-Positive High-Grade B-Cell Lymphoma, NOS. *Am J Clin Pathol* 2017;149(1):17–28.
- [13] Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene* 2004; 23(38):6524–34.
- [14] Lenz G, Wright GW, Emre NC, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(36):13520–5.
- [15] Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503–11.
- [16] Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009;459(7247):717–21.
- [17] Iqbal J, Greiner TC, Patel K, et al. Distinctive patterns of *BCL6* molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2007;21:2332–43.
- [18] 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(7):2285–90.
- [19] 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(6):2133–39.
- [20] Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with *BCL2* translocations have poor outcome, irrespective of *MYC* status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica* 2013;98(2):255–63.
- [21] Lu TX, Fan L, Wang L, et al. *MYC* or *BCL2* copy number aberration is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2015;(21):18374–88.

- [22] Shustik J, Han G, Farinha P, et al. Correlations between BCL6 rearrangement and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP. *Haematologica* 2010;95(1):96–101.
- [23] Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 2010;28(20):3360–5.
- [24] Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009;114(17):3533–7.
- [25] Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2009;113(24):6069–76.
- [26] Mathews Griner LA, Guha R, Shinn P, et al. High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(6):2349–54.
- [27] Nowakowski GS, LaPlant B, Habermann TM, et al. Lenalidomide can be safely combined with R-CHOP (R2CHOP) in the initial chemotherapy for aggressive B-cell lymphomas: phase I study. *Leukemia* 2011;25(12):1877–81.
- [28] Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-Cell lymphoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 2015;33(3):251–57.
- [29] Pedersen MØ, Gang AO, Poulsen TS, et al. MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC- or double-hit MYC/BCL2 translocations. *Eur J Haematol* 2014;92(1):42–48.
- [30] Bertrand P, Bastard C, Maingonnat C, et al. Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia* 2007;21(3):515–23.
- [31] Aukema SM, Kreuz M, Kohler CW, et al. Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica* 2014;99(4):726–35.
- [32] Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood* 2009;114(11):2273–9.
- [33] Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* 2015;126(22):2466–74.
- [34] Aukema SM, Siebert R, Schuurung E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319–31.
- [35] Dunleavy K Double-hit lymphomas: current paradigms and novel treatment approaches. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014(1):107–12.
- [36] Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C, et al. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica* 2007;92(10):1335–42.
- [37] Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, et al. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica* 2009;94(7):935–43.
- [38] Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* 2013;98(10):1554–62.
- [39] Li S, Seegmiller AC, Lin P, et al. B-cell lymphomas with concurrent MYC and BCL2 abnormalities other than translocations behave similarly to MYC/BCL2 double-hit lymphomas. *Mod Pathol* 2015;28(2):208–17.
- [40] Lin P, Dickason TJ, Fayad LE, et al. Prognostic value of MYC rearrangement in cases of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Cancer* 2012;118(6):1566–73.