

**POJAVA B-KRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE
U HODGKINOVOJ BOLESTI: PRIKAZ BOLESNICE**

**THE ONSET OF B-CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA
IN HODGKIN'S DISEASE: A CASE REPORT**

NIKŠA TURK, RAJKO KUŠEC, MARIJA DOMINIS,
MARUŠKA MARUŠIĆ-VRSALOVIĆ, BRANIMIR JAKŠIĆ*

Deskriptori: B-kronična limfocitna leukemija – patologija, genetika; Hodgkinova bolest – patologija, genetika;
B limfociti – patologija; Preuredba gena za teški lanac B limfocita

Sažetak. Prikazujemo slučaj bolesnice (79 g.) s patohistološkom dijagnozom Hodgkinova limfoma (HL) (stadij IIIB, histološki tip MC) liječene kemoterapijom po protokolu LVPP (6 ciklusa) s dobrim terapijskim odgovorom. Neočekivano, 18 mjeseci nakon postavljanja dijagnoze HL-a javlja se leukocitoza ($19,4 \times 10^9/L$) sa 65% limfocita s limfoplazmocitnom diferencijacijom. Imunofenotip ovih stanica tipičan je za B-kroničnu limfocitnu leukemiju (B-KLL) (CD5/CD19+, CD23–, CD38±; uz slabi izražaj monoklonskih lakih lanaca λ). Molekularnom analizom preuredbe gena za teški lanac imunoglobulina (IgH) potvrđena je klonalnost limfocita periferne krvi. Postavljanjem dijagnoze B-KLL nametnulo se pitanje povezanosti dviju neoplazma limfocitnog podrijetla. Molekularnom analizom biopsata limfnog čvora iz vremena postavljanja dijagnoze limfoma nađena je klonska populacija B-limfocita. Time smo nedvojbeno dokazali koegzistenciju dviju bolesti uz klinički jasnu pojavu HL. Tek su naknadne molekularne analize arhivskih materijala, morfološki urednih razmaza periferne krvi potvrdile postojanje klonskih B-limfocita, bez dijagnostičkih kriterija limfoproliferativne bolesti tipa KLL. Ovakav nalaz etiološki isključuje sekundarnu leukemiju. Kao nepotvrđena hipoteza ostaje mogućnost netipičnog prezentiranja KLL-a u obliku Richterova sindroma s obilježjima HL-a bez limfocitoze od samog početka. Ovom hipotezom ostavljamo neodgovoreno pitanje radi li se možda u ovom slučaju o različitim kliničkim oblicima iste bolesti.

Descriptors: Leukemia, B-cell, chronic – pathology, genetics; Hodgkin disease – pathology, genetics;
B-lymphocytes – pathology; Gene rearrangement, B-lymphocyte, heavy chain

Summary. We present a case of a female patient (79 years) with pathohistologic diagnosis of Hodgkin's lymphoma (HL) (stage IIIB, histologic type MC) for which she was treated with chemotherapy according to LVPP protocol (6 cycles) with good therapeutic response. Unexpectedly, 18 months after HL diagnosis leukocytosis occurred ($19.4 \times 10^9/L$) with 65% of lymphocytes with lymphoplasmocytic differentiation. Immunophenotype of these cells is typical for B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) (CD5/CD19+, CD23–, CD38±; with weak expression of monoclonal light chains λ). Molecular analysis confirmed clonal immunoglobulin heavy chain gene (IgH) rearrangement of peripheral blood lymphocytes. The diagnosis of B-CLL imposed the question of the connection between two neoplasms of lymphocytic origin. Molecular analysis of lymph node biopsy taken at the time of lymphoma diagnosis revealed clonal population of B lymphocytes. That test undeniably proved coexistence of both diseases from the beginning. The latest PCR analysis of archive peripheral blood smears confirmed B lymphocyte clonality without diagnostic criteria for lymphoproliferative disease of CLL type. This finding etiologically excludes secondary leukemia. The possibility of atypical presentation of CLL in transformation to Richter's syndrome with morphologic characteristics of HL from the beginning stays unconfirmed. The hypothetical question that remains unanswered is: »Was it one disease in different clinical forms?«

Liječ Vjesn 2003;125:184–187

Hodgkinova je bolest maligna proliferacija tumorskih stanica limfoidnog podrijetla koja primarno zahvaća limfne čvorove. Opažena je povećana učestalost pojave sekundarnih malignih bolesti kod Hodgkinova limfoma (HL). Uvriježeno je mišljenje da je uzrok tomu primijenjena kemoterapija i zračenje tijekom liječenja. Opisani su slučajevi Hodgkinova limfoma koji se javlja istodobno s kroničnom limfocitnom leukemijom – KLL¹⁻⁴ ili u fazi njezine transformacije kao Richteroov sindrom s obilježjima Hodgkinove bolesti.^{3,5-7} Obrnuti su slučajevi s prvopostavljenom dijagnozom Hodgkinove bolesti izuzetno rijetki. Nedavno smo imali priliku pratiti takav slučaj u bolesnice s Hodgkinovim limfomom u remisiji koji se komplicirao pojavom B-kronične limfocitne leukemije (B-KLL) s limfoplazmocitoidnom diferencijacijom.

Prikaz bolesnice

Prva hospitalizacija 79-godišnje bolesnice bila je u kolovozu 2000. godine zbog generalizirane limfadenopatije do 5 cm u promjeru te splenomegalije (7 cm ispod LRL). Citološka punkcija dvaju povećanih limfnih čvorova na vratu govorila je u prilog Hodgkinove bolesti. Učinjena je ekstimpacija aksi-

* **Klinika za unutarnje bolesti, KB »Merkur«** (Nikša Turk, dr. med.; dr. sc. Rajko Kušec, dr. med.; prof. dr. sc. Branimir Jakšić, dr. med.), **Klinika za patologiju, KB »Merkur«** (prof. dr. sc. Marija Dominis, dr. med.), **Laboratorij za molekularnu dijagnostiku, KB »Merkur«** (mr. sc. Maruška Marušić-Vrsalović, dr. med.)

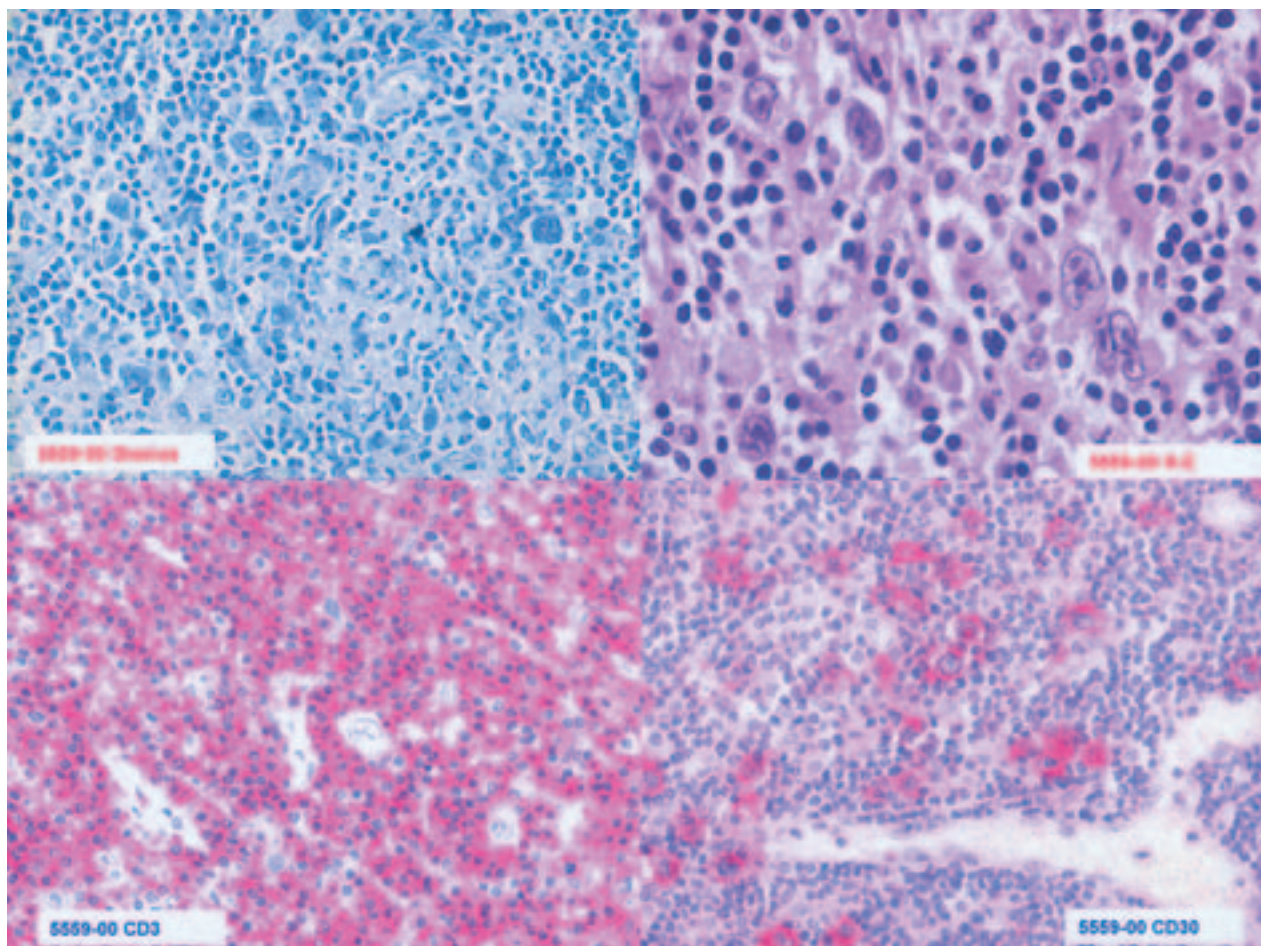
Adresa za dopisivanje: Dr. N. Turk, Klinika za unutarnje bolesti, Odjel hematologije KB »Merkur«, Zajčeva 19, 10000 Zagreb
Primljeno 4. listopada 2002., prihvaćeno 22. svibnja 2003.

larnih limfnih čvorova. Patohistološki nalaz pokazao je brojne Reed-Sternbergove stanice (RS) uklopljene u pozadinu karakteriziranu infiltratima limfocita, plazma-stanica, eozinofilnih granulocita i histiocita (slika 1). U navedenoj su histološkoj slici nađene i Hodgkinove stanice. Opisani je nalaz potvrdio Hodgkinov limfom miješane celularnosti s imunofenotipom stanica CD30+, CD15+, EMA-, EBV+ (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms – R.E.A.L.). Daljnja je dijagnostička obrada imala za cilj utvrđivanje stupnja proširenosti bolesti. Hematološki nalazi bili su ovi: L $4,3 \times 10^9/L$; Er $3,82 \times 10^{12}/L$; Hb 99 g/L; Tr $100 \times 10^9/L$. U elektroforezi serumskih bjelancevina našli smo snižene vrijednosti albumina (34 g/L) i porast γ -globulina (22,3 g/L) bez izražene M-komponente. Vrijednosti imunoglobulina klase IgG i IgM bili su na gornjoj granici, dok je IgA bio povišen za 50% od gornje granice normalnih vrijednosti. Ostali laboratorijski parametri uključujući vrijednosti bakra bili su unutar referentnog intervala za dob i spol. Rendgenska snimka pluća pokazala je proširenje sjene gornjeg medijastinuma, a UZ abdomena izrazito povećanu slezenu (240×90 mm) te povećane limfne čvorove paraaortalno. Nalaz punkcije i biopsije koštane srži bio je suspektan u smislu limfoproliferativne bolesti s nodu-

lamnim infiltratima malih limfocita uz normalno očuvanu hematopoezu. Hodgkinove i RS-stanice nisu nađene.

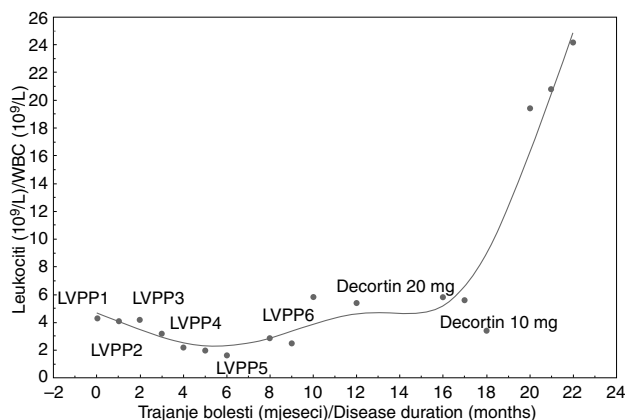
U rujnu 2000. godine započeta je kemoterapija po shemi LVPP (klorambucil 10 mg/dan, prokarbazin 150 mg/dan, prednison 60 mg/dan, svi tijekom 14 dana, te vinblastin 10 mg/dan 1. i 8. dana) koju je bolesnica primala do svibnja 2001. Ukupno je primila 6 ciklusa navedene terapije koja je rezultirala povlačenjem povećanih limfnih čvorova, ali ne i slezene.

U travnju 2002. godine, otprilike 18 mjeseci nakon početka kemoterapije, na kontrolnom je pregledu otkrivena leukocitoza (L $19,4 \times 10^9/L$) s 65% atipičnih limfocita u DKS-u, zbog čega je bolesnica hospitalizirana (slika 2). Klinički i UZ pretragom potvrđena je splenomegalija (4 cm ispod LRL-a), ali bez znakova povećanih limfnih čvorova. Punkcijom koštane srži nađeni su umnoženi limfociti uz limfoplazmocitoidne i atipične oblike (ukupno 63%), što govori u prilog KLL-u s limfoplazmocitoidnom diferencijacijom. Imunofenotipizacija periferne krvi i koštane srži pokazala je B-limfocite fenotipa: CD5+, CD19+, CD20+, CD79 α +, FMC7+, HLA D/DR+, ali CD10-, CD38 \pm , CD23- s monoklonskom ekspresijom lakih lanaca (lambda) srednjeg intenziteta. DNA PCR analizom mononuklearnih stanica periferne krvi utvrđena je klonska preuređenost gena za



Slika 1. Histološka slika aksilarnoga limfnog čvora. Limfni čvor pokazuje gubitak osnovne strukture te umjerenu fibrozu. Na histološkom preparatu uočavaju se Reed-Sternbergove stanice uklopljene u pozadinu karakteriziranu infiltratima limfocita, plazma-stanica, eozinofilnih i neutrofilnih granulocita te histiocita. U šarolikoj histološkoj slici prisutne su i mononuklearne Hodgkinove stanice. Navedeni nalaz govori u prilog Hodgkinova limfoma miješane celularnosti

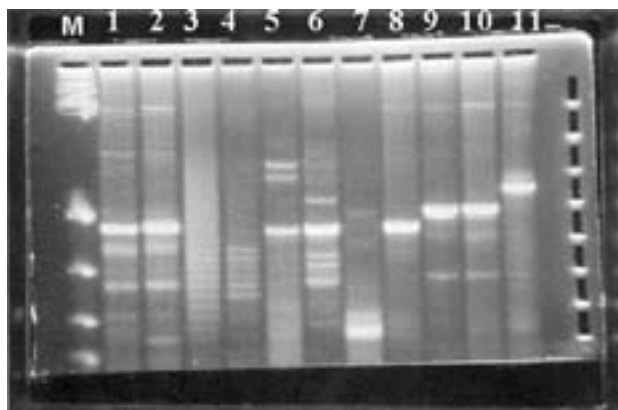
Figure 1. Histologic presentation of axillary lymph node. The lymph node shows the loss of basic structure and moderate fibrosis. Reed-Sternberg cells integrated into the background characterized by lymphocyte infiltrates, plasma cells, eosinophilic and neutrophilic granulocytes and histiocytes are observed in histologic preparation. The uneven histologic picture also reveals the presence of mononuclear Hodgkin's cells. This finding points to Hodgkin's lymphoma of mixed cellularity



Slika 2. Razina leukocita uz primijenjenu terapiju. Nepunih 12 mjeseci od posljednjeg, 6. ciklusa kemoterapije po protokolu LVPP, na kontrolnom pregledu bolesnice otkrivena je leukocitoza ($L=19,4 \times 10^9/L$) sa 65% atipičnih limfocita u DKS-u

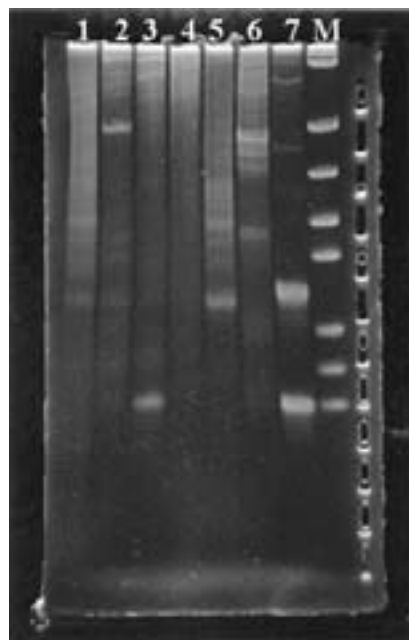
Figure 2. The level of leukocytes with applied therapy. Less than 12 months since the last, 6th cycle of chemotherapy according to LVPP protocol, leukocytosis ($L=19,4 \times 10^9/L$) with 65% of atypical lymphocytes in differential blood count was found in the patient at a control visit

teški lanac imunoglobulina (IgH).^{14,16} Gore navedeni nalazi potvrđuju dijagnozu B-KLL-a (R.E.A.L.). U laboratorijskim nalazima nađen je porast LDH (520 U/L) i serumskog bakra (31,8 $\mu\text{mol/L}$), dok je nalaz elektroforeze serumskih bjelančevina bio u granicama normalnih vrijednosti. Provedena je retrospektivna molekularna analiza klonalnosti B-limfocita iz uzoraka citoloških razmaza periferne krvi, bioptata kosti te limfnog čvora iz vremena postavljanja dijagnoze HL-a, kao i periferne krvi iz vremena leukocitoze. Prema veličini umnoženog odsječka gena IgH koji je jednak za sva četiri uzorka može se pretpostaviti da se radi o klonu B-stanica istovjetnog genotipa (slika 3, 4). U istoj je hospitalizaciji bolesnica primila 1. ciklus trodnevne terapije (klorambucil 20 mg/dan+



Slika 3. Retrospektivna molekularna analiza klonalnosti B-limfocita iz uzoraka bioptata kosti (linija 5) te limfnog čvora (linija 6) iz vremena postavljanja dijagnoze HL-a (2000. g.) i periferne krvi (linija 8) iz vremena leukocitoze (2002. g.). Prema veličini umnoženog odsječka gena za teški lanac imunoglobulina (IgH) koji je jednak za sva tri uzorka može se pretpostaviti da se radi o klonu B-stanica istovjetnoga genotipa

Figure 3. Retrospective molecular analysis of B lymphocyte clonality from bone (line 5) and lymph node (line 6) biopsy material taken at the time of HL diagnosis (yr. 2000) and peripheral blood (line 8) from the time of leukocytosis (yr. 2002). According to the size of duplicated gene segment for heavy immunoglobulin chain (IgH) which is equal for all three samples it may be presumed that this is a clone of B cells of the same genotype



Slika 4. Molekularnom analizom (DNA PCR) periferne krvi iz vremena leukocitoze (linija 2) te razmaza periferne krvi iz vremena postavljanja dijagnoze (linija 6) ustanovljeno je postojanje klonalne populacije B-limfocita, prisutne štoviše i u morfološki urednom razmazu periferne krvi bez limfocitoze iz 2000. g.

Figure 4. Molecular analysis (DNA PCR) showed clonal B-lymphocyte population both, in yr. 2000 in normal peripheral blood smear without lymphocytosis (line 6) and in yr. 2002 when leukocytosis occurred (line 2)

prednison 50 mg/dan) kojom je reduciran ukupan broj leukocita.

U četvrtoj hospitalizaciji, krajem travnja i početkom svibnja ove godine, radi nastavka terapije (2. ciklus) perzistira splenomegalija (3 cm ispod LRL-a), ali bez povećanja limfnih čvorova. U laboratorijskim je nalazima i dalje bila prisutna leukocitoza s više od 60% atipičnih limfocita. Također je uočena albuminsko-globulinska disocijacija s porastom γ -globulina i malom M-komponentom široke osnovice koji zajedno iznose 25,1 g/L. Imunoelektroforeza serumskih i mokraćnih bjelančevina pokazala je monoklonske globuline klase IgG tipa lakog lanca kappa i Bence-Jonesove proteine tipa kappa. Serumski je bakar još porastao i iznosio je 37,2 $\mu\text{mol/L}$, a zabilježen je i porast LDH vrijednosti na 1020 U/L.

Bolesnica je ponovno hospitalizirana u lipnju ove godine zbog progresije bolesti i povećanja totalne tumorske mase (TTM). Leukociti su iznosili više od $55 \times 10^9/L$ uz povećanu slezenu do ispod umbilikusa te izraženu anemiju i trombocitopeniju. Tjedan dana nakon primljene terapije CNOP (ciklofosamid, mitoksantron, vinkristin, prednison) praćene pogoršanjem kliničke slike bolesnica je umrla.

Rasprava i zaključci

Prkazali smo pojavu dviju neoplastičkih bolesti za koje je uvriježeno mišljenje da nisu histogenetski srodne. Klinički tijekom govorio je u prilog prvo pojavi HL-a s dobrim odgovorom na kemoterapiju, a tek kasnije i pojavi KLL-a. Time je otvorena mogućnost etiološkoj ulozi provedene kemoterapije i posljednjoj, sekundarnoj pojavi druge neoplazme.

Ako pretpostavimo da se u remisiji nakon primijenjene terapije za HL pojavila druga zloćudna bolest koja se prezentirala kao KLL, nameće se pitanje kemoterapije kao mogućeg uzroč-

nog čimbenika njezine pojave. Učestalost pojave sekundarnih malignih bolesti kod Hodgkinova limfoma povećana je u odnosu na očekivanu incidenciju.⁸ Kemoterapija je poznati čimbenik rizika za razvoj sekundarnih malignosti, a potencirajući učinak ima kombinirana terapija zračenjem i citostatcima, od kojih su alkilirajući agensi posebice visokog rizika za razvoj sekundarnih leukemija.⁹⁻¹² Urba i sur.⁹ navode nizak rizik (manje od 2% nakon 10 godina) pojave sekundarnih leukemija nakon 6 provedenih ciklusa kemoterapije koji se tijekom vremena ne povećava. U opisanim studijama zabilježen je relativno dulji period do pojave maligne bolesti uzrokovane terapijom u bolesnika s Hodgkinovim limfomom, što nije bio slučaj u naše bolesnice.

U našem se slučaju na molekularnoj razini od samog početka prati istovjetni klon B-limfocita i u koštanoj srži, i u limfnom čvoru i perifernoj krvi (slika 3, 4). PCR nalaz govori u prilog koegzistencije obiju bolesti već od samog početka, ali s nemogućnošću dokazivanja KLL-a klinički ili hematološki. Navedeni nalaz na molekularnoj razini isključuje etiološki sekundarnu leukemiju i ostavlja otvorenim zanimljivu mogućnost histogenetske povezanosti obaju entiteta.

Posljednjih se godina učestalo raspravlja o zagonetnom podrijetlu Reed-Sternbergovih stanica, posebice u slučajevima KLL-a koji se komplicira pojavom Hodgkinova limfoma. Imunohistokemijske i molekularne analize upozorile su na mogućnost različitog podrijetla RS-stanica.^{3,5,14-16} U nekih bolesnika RS-stanice pokazuju B-stanične, a u drugih T-stanične biljege. Među najinteresantnijim radovima o ovoj temi su radovi Kuppersa i suradnika.¹⁴⁻¹⁶ Molekularnom »single-cell« analizom mutiranih imunoglobulinskih (Ig) V gena potvrđeno je da su Hodgkinove i RS-stanice klon tumorskih stanica koje potječu iz promijenjenog germinalnog centra B-stanica koji je izgubio sposobnost ekspresije antigenskih receptora. Iz opisanog proizlazi naša sljedeća hipoteza. Kako se od same pojave bolesti molekularno pratio istovjetni klon B-limfocita, postoji mogućnost da se KLL u početku prezentirala kao Richterov sindrom s obilježjima Hodgkinova limfoma, odnosno perifernom limfadenopatijom bez limfocitoze. Ova je hipoteza zanimljiva i s obzirom na nedovoljno razjašnjen nalaz biopsata koštane srži iz vremena dijagnoze koji pokazuje nodularne infiltrate malih limfocita, ali bez nalaza Hodgkinovih ili RS-stanica. Nakon primijenjene kemoterapije došlo je do remisije. Nakon više od godinu dana isti se klon B-limfocita javlja u perifernoj krvi (slika 3, 4) s progresijom limfocitoze, sada u tipičnom obliku za KLL. Za potvrdu navedene hipoteze potrebno bi bilo odrediti genotip RS i Hodgkinovih stanica. Istovjetna genska struk-

tura navedenih stanica i B-limfocita potvrdila bi teoriju o različitim kliničkim oblicima jedne te iste bolesti.

LITERATURA

1. *Reinares GA, Morera JMD, Baraibar PR, Bernal LP.* Discordant lymphoma: report of two cases and review of the literature. *Revista Clin Espanola* 1998;198:749-751.
2. *Acaba L, Hallman D, Rodriguez-Morales E, Velez R, Velez-Garcia E.* Simultaneous occurrence of Hodgkin's disease and chronic lymphocytic leukemia: a unique presentation. *Boletin-Asociacion Medica de Puerto Rico* 2000;92:12-24.
3. *Williams J, Schned A, Cotelingam JD, Jaffe ES.* Chronic lymphocytic leukemia with coexistent Hodgkin's disease. Implications for the origin of the Reed-Sternberg cells. *Am J Surg Pathol* 1991;15:33-42.
4. *Ojeda E, Gonzalez M, SanMiguel JF, Ramos F, Flores T, Borrascas AL.* Immunological markers in a coexisting chronic lymphocytic leukemia and Hodgkin's disease. *Haematologia* 1988;21:163-167.
5. *Ohno T, Smir BN, Weisenburger DD, Gascoyne RD, Hinrichs SD, Chan WC.* Origin of the Hodgkin/Reed-Sternberg cells in chronic lymphocytic leukemia with Hodgkin's transformation. *Blood* 1998;91:1757-1761.
6. *O'Sullivan MJ, Kaleem Z, Bolger MJ, Swanson PE, Zutter MM.* Composite prolymphocytoid and Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:907-9.
7. *Pescarmona E, Pignoloni P, Mauro FR, Cerretti R, Anselmo AP, Mandelli F, Baroni CD.* Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: an immunohistological, molecular and clinical study of four cases suggesting a heterogeneous pathogenetic background. *Virchows Arch-Inter J Pathol* 2000;437:129-132.
8. *Kaldor JM, Day WE, Clarke EA et al.* Leukemia following Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1990;322:7-13.
9. *Urba WJ, Longo DL.* Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1992;326:678-87.
10. *Mauch PM, Canellos GP, Rosenthal DS, Hellman S.* Reduction of fatal complications from combined modality therapy in Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1985;3:501-505.
11. *Andrieu JM, Ifrah N, Payen C, Fermanian J, Coscas Y, Flandrin G.* Increased risk of secondary acute nonlymphocytic leukemia after extended-field radiation therapy combined with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1990;8:1148-1154.
12. *Devereaux S, Selassie TG, Vaughan-Hudson G, Vaughan-Hudson B, Linch DC.* Leukaemia complicating treatment for Hodgkin's disease: the experience of the British National Lymphoma Investigation *BMJ* 1990;301:1077-1080.
13. *Gallo JH, Phadke KP.* Chronic lymphocytic leukemia and Hodgkin's disease in the same patient: case report and review of the literature. *Pathology* 1981;13:365-370.
14. *Kuppers R, Sousa AB, Baur AS, Strickler JG, Rajewsky K, Hansmann ML.* Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. *Mol Med* 2001;7:285-292.
15. *Kuppers R.* Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res* 2002;84:277-312.
16. *Kuppers R.* Identifying the precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease: role of the germinal center in B-cell lymphomagenesis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;21(suppl 1):S74-79.