

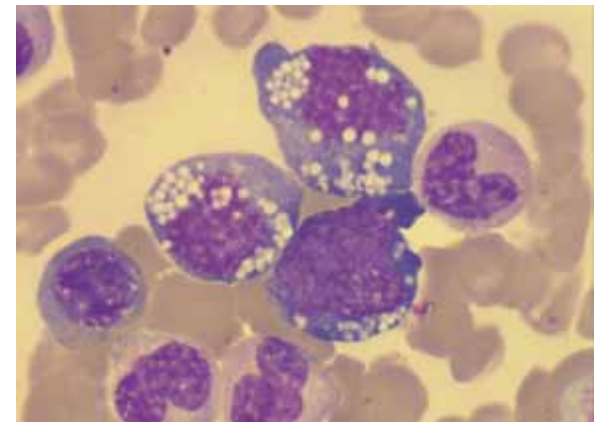
## Een lymfocyt met vacuolen is niet altijd een Burkitt cell.

### Twee casussen

Kees Otten & Liz van Weers

LUMC afdeling: Laboratorium voor Speciële  
Hematologie

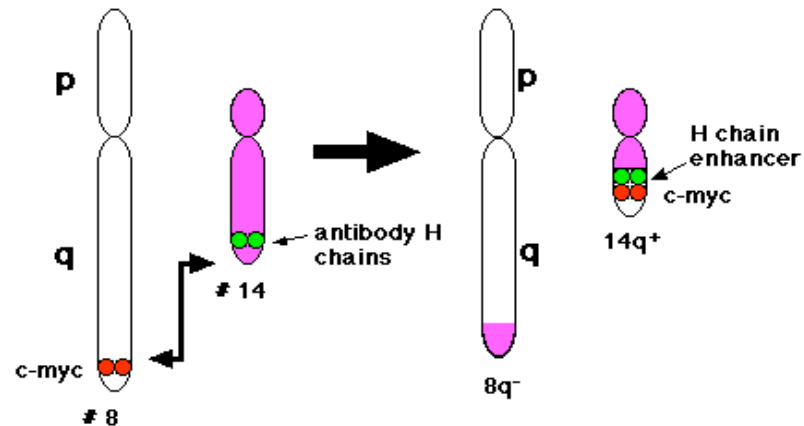
LEIDEN



- Het is altijd een uitdaging geweest om Burkitt lymfoom (BL) en diffuus large B-cel lymfoom (DLBCL) van elkaar te onderscheiden als morfologisch meerdere vacuolen tegen een achtergrond van blauw tot donkerblauw cytoplasma worden gezien.
- Burkitt lymfoom onderscheiden van andere lymfomen is belangrijk omdat er een ander management in de behandeling is.
- Diagnose is een samenspel van factoren waarbij niet alléén morfologie een uitgangspunt is.

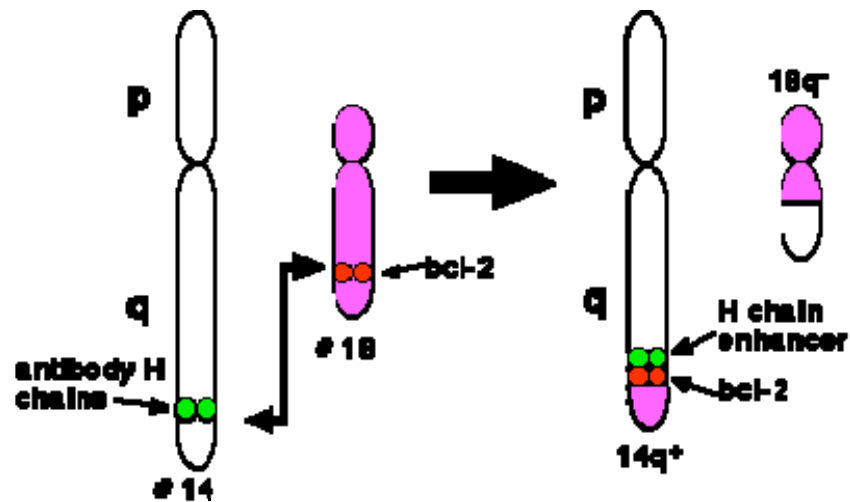
Diagnostisch belangrijke parameters worden verschaft door cytogenetisch onderzoek. Het betreft hier een aantal in de cel aanwezige proto-oncogenen die door tanslocatie tot expressie komen, met name MYC-rearrangement, BCL2 en BCL6.

## MYC-rearrangement



MYC is een specifiek B-cel gen gebied dat codeert voor de activatie van een essentiële transcriptie factor voor de mitose functie in de cel. Door translocatie t(8;14) verhuisd dit naar de IGH locus coderend voor de zware keten. Dit leidt tot overproductie en ongebreidelde mitose. Burkittlymfoom heeft karakteristiek een MYC rearrangement.

## BCL2

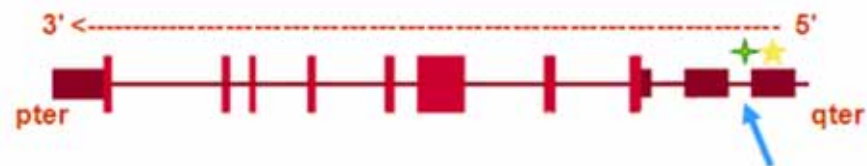


BCL2 is een proto-oncogen op chromosom 18 en is onderdeel van de familie van regulatoren van apoptose. Het codeert voor een eiwit (Bcl-2) wat apoptose remt. Translocatie t(14;18) brengt het gen materiaal wat codeert voor Bcl-2 eveneens naar het gebied op het gen waar een sterke activatie van de zware keten plaats vindt (IGH-locus). Hierdoor kunnen hoge levels van Bcl-2 ontstaan waardoor apoptose niet kan optreden.

Hoog Bcl-2 wordt niet altijd verklaard door een translocatie, er zijn dus nog andere impulsen die dit genereren. Bcl-2 is ook positief bij andere B-cel lymfomen ( FCL).

## BCL6

Het BCL6 gen codeert voor een remmende transcriptiefactor (Bcl-6) op uitrijping en functie van de lymfatische cel. 'Pathways' zijn complex en divers zoals translocaties en storing in autoregulatie. Een hoog level Bcl-6 expressie verhindert o.a. differentiatie van B-cel tot plasmacel. Bcl-6 expressie komt in meerdere lymfoom typen voor (zoals FCl) maar wordt in wel 60-90% van de diffuus grootcellig B-cel casussen gezien.



- ★ mutations in the autoregulatory region
- + mutations in the IRF4 repression region
- chromosome translocations

### BCL6 rearrangements

Jean-Loup Huret 2012

- Aantonen van MYC rearrangement, BCL2 en BCL6 is diagnostisch en prognostisch van belang.
- Algemeen geldt bij cytogenetische afwijkingen een optelsom waarbij het gedrag van de maligniteit verergert.
- Een MYC translocatie met BCL-2 of BCL-6 geldt als een ‘double hit’ B-cel lymfoom en met beide als een ‘triple hit’ welke zeldzaam en uiterst zeldzaam zijn.

Diagnose burkittlymfoom of DLBCL (diffuus grootcellig B-cel lymfoom) is niet altijd makkelijk en de cel heeft soms karakteristieken van beiden. Zodoende is in de WHO-2008 een derde categorie ontstaan.

- **B-cell lymphoma, unclassifiable with features intermediate between large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma.** Deze bestaat grotendeels uit ‘double hit’ en ‘triple hit’ lymfomen. Verwachting voor nieuwe WHO versie is dat het een subgroep van Grootcellig B-cel gaat worden.

Voor het stellen van diagnose is van belang:

- Klinische info
- Morfologie bloed en beenmerg
- Immunofenotypering
- Moleculair diagnostiek
- Histologie
- Cytogenetica

## **Burkittlymfoom (BL)**

Burkittlymfoom (een B-cel lymfoom) is een zeer snel groeiende tumor met een zeer hoge proliferatie-index (Ki-67 kleuring) waarbij bijna 100% van de cellen positief zijn met een verdubbeling tijd van ongeveer 25 uur.

Presentatie is vaak met een hoge tumor-load (Bulky disease). Meestal bij kinderen en in jonge adolescentie, maar wordt ook gezien bij volwassenen



- **Burkittlymfoom** wordt onderverdeeld in 3 klinische varianten:
- **Endemische variant:** komt voor in equatoriaal Afrika en Papua Nieuw Guinea, vaak in de kaak en vaak bij kinderen. Mogelijk oorzaak is verminderde resistentie op EBV (uitputting van T-cel response) als gevolg van malaria infecties.
- **Sporadische type:** de variant die we kennen als een acuut probleem in de Nederlandse kliniek. Vaak lokalisatie in darmen.
- **Immunodeficiëntie geassocieerd burkittlymfoom:** Immuungecompromiteerde patiënten bv patiënten met HIV of patiënten behandeld met immunosuppressieve medicijnen na orgaantransplantaties.

- Leukemisch bij ‘bulky disease’, maar ook gevallen met uitgebreide lokalisatie in beenmerg en niet in bloed komen voor.
- Puur leukemisch is zeldzaam.
- Leukemische variant kan uitspreiden naar het CZS.
- Wordt behandeld als acute lymfatische leukemie.
- Reageert snel op chemotherapie (grote tumorafbraak), kan leiden tot een tumorlysis-syndroom met gevaar voor hart- en nierschade.

## MORFOLOGIE:

- middelgroot, ronde kern,
- samengeklonterd chromatine
- vaak meerdere nucleoli,
- diep basofiel cytoplasma
- enkele tot veel vacuolen gevuld met lipiden
- pleiomorfie is mogelijk

## CELMARKERS:

- Soms sterke IgM membraanexpressie
- Positief voor B-cel markers CD19, CD20, CD22, CD10, BCL6, CD38, CD77 en CD43
- Negatief of zwak positief voor BCL2
- TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) is altijd negatief bij burkitt-lymfoom. Positieve TdT pleit voor ALL

## **CYTOGENETICA:**

- Deregulatie MYC-gen.
- Translocatie aantoonbaar met FISH.
- In 10% van de gevallen is de FISH. negatief. MYC is wel positief met andere techniek.

## **De MYC translocatie:**

- MYC translocatie niet alléén bij burkittlymfoom.
- B-cell lymphoma, unclassifiable with features intermediate between large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma en DLBCL-NOS (zelden) kunnen ook positief zijn.
- Additionele cytogenetische afwijkingen zijn mogelijk.

## Grootcellig B-cel lymfoom (DLBCL-NOS)

- In de WHO 2008 worden diverse vormen van Grootcellig B-cel lymfoom geassocieerd met het orgaan waar zij in aanwezig zijn of anderszins een specifiek onderscheid maken. De vorm van Grootcellig B-cel lymfoom die differentiaal diagnostisch problemen kan geven met burkittlymfoom is het Diffuus Grootcellig B-cel lymfoom not otherwise specified (DLBCL-NOS).
- Presentatie: Grootcellig (meer dan 2x de grootte van een normale lymfocyt), diffuus groei patroon.
- Meer algemeen bij ouderen, komt ook voor bij kinderen en jonge volwassenen.
- Diverse groep.

## MORFOLOGIE DLBCL-NOS

- Centroblastair : meest algemeen middelgroot/ groot, ovale/ ronde kern, fijn chromatine, 2-4 tegen het membraan gelegen nucleoli, karig, basofiel cytoplasma. De kernen kunnen pleiomorf zijn. Vaak ook een klein percentage immunoblasten.
- Immunoblastair : vrijwel enkel immunoblasten, groot celtype, 1 nucleolus centraal in de kern en ruimer diepblauw cytoplasma.
- Anaplastisch: groot tot zeer groot celtype met ovale tot bizarre pleiomorfe kernen en basofiel cytoplasma (indruk kan zijn dat ze op Reed Sternberg cellen lijken).
- Daarnaast zijn zeldzame morfologische varianten en moleculaire / immunohistochemische subgroepen mogelijk.

## CELLMARKERS DLBCL-NOS

- PanB CD19, Cd20, CD22 en CD-79A, maar soms een van deze afwezig. Op de cel of cytoplasmatisch immuunglobuline (IgM>IgG>IgA)
  - Deels positief voor CD5, CD10, CD30 (membraan)
  - Bcl-2 eiwit in ongeveer 50% positief
  - Bcl-6 eiwit vaak positief ( 60-90% meest genoemd, verschilt per 'report')
- Proliferatieindex (ki-67) is hoog , meestal >40%, in sommige gevallen >90%

## CYTOGENETICA DLBCL-NOS

- Translocatie BCL-2 gen 20-30%.
- Translokatie BCL-6 gen 30%
- Myc rearrangement 10%
- Diverse andere translokaties/deleties zijn mogelijk

Bcell lymphoma's unclassified with features intermediate between diffuse large B cell lymphoma an Burkitt lymphoma. Myc-rearrangement en IGH-BCL-2 translocatie (Double hit) of BCL-6 of beide, Ki-67 >90%, zeldzaam, complex karyotype

Characteristic	Burkitt Lymphoma (BL)	Intermediate BL/DLBCL	DLBCL
<b>Morphology</b>			
Only small/medium-size cells	Yes	Common	No
Only large cells	No	No	Common
Mixture	No	Sometimes	Rare
<b>Poliferation (KI67/MIB1)</b>			
>90% and homogeneous	Yes	Common	Rare
<90% or heterogeneous	No	Sometimes	Common
<b>BCL2 expression</b>			
Negative/Weak	Yes	Sometimes	Sometimes
Strong	No	Sometimes	Sometimes
<b>Genetic features</b>			
MYC rearrangement	Yes (1)	Common	Rare
IG-MYC (2)	Yes	Sometimes	Rare
Non IG-MYC	No	Sometimes	Rare
BCL2 but no MYC rearrangement	No	Rare	Sometimes
BCL6 but no MYC rearrangement	No	Rare	Sometimes
Double hit (3)	No	Sometimes	Rare
MYC-Simple karyotype (4)	Yes	Rare	Rare
MYC-Complex karyotype (4)	Rare	Common	Rare

- (1) Approximately 5% of otherwise classical BL lack a detectable MYC rearrangement
- (2) IG-MYC: juxtaposition of MYC to one of the IG loci: IFG@ at 14q32, IGL@ at 22q11 or IGK@ at 2p12. Non IG-MYC tumours contain a MYC rearrangement but no juxtaposition to one of the IG loci.
- (3) Double hit lymphomas contain a MYC/8q24 breakpoint in combination with a BCL2/18q21 (by far most frequent) and/or BCL6/3q27 breakpoint. The partner of BCL2/18q21 breakpoint mostly is the IGH locus at 14q32. In some cases a t(8;15;18) is present.
- (4) Simple karyotype: no or only few cytogenetic or (array) CGH abnormalities other than rearrangement. For array CGH a lymphoma with 6 or more abnormalities has been assigned as 'MYC-complex'.

Source: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 2008.



# Case 1

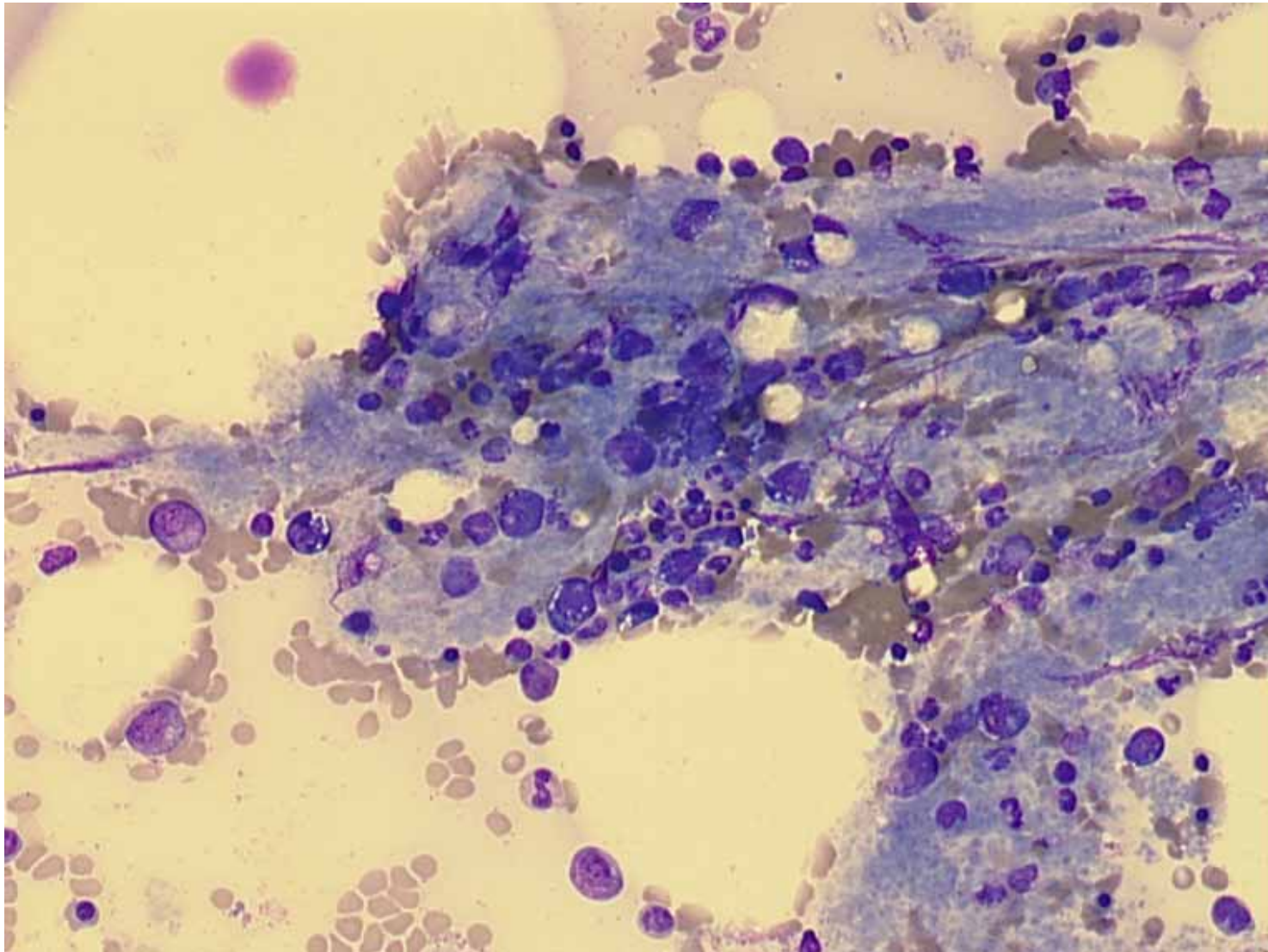
## Case 1

### Kliniek

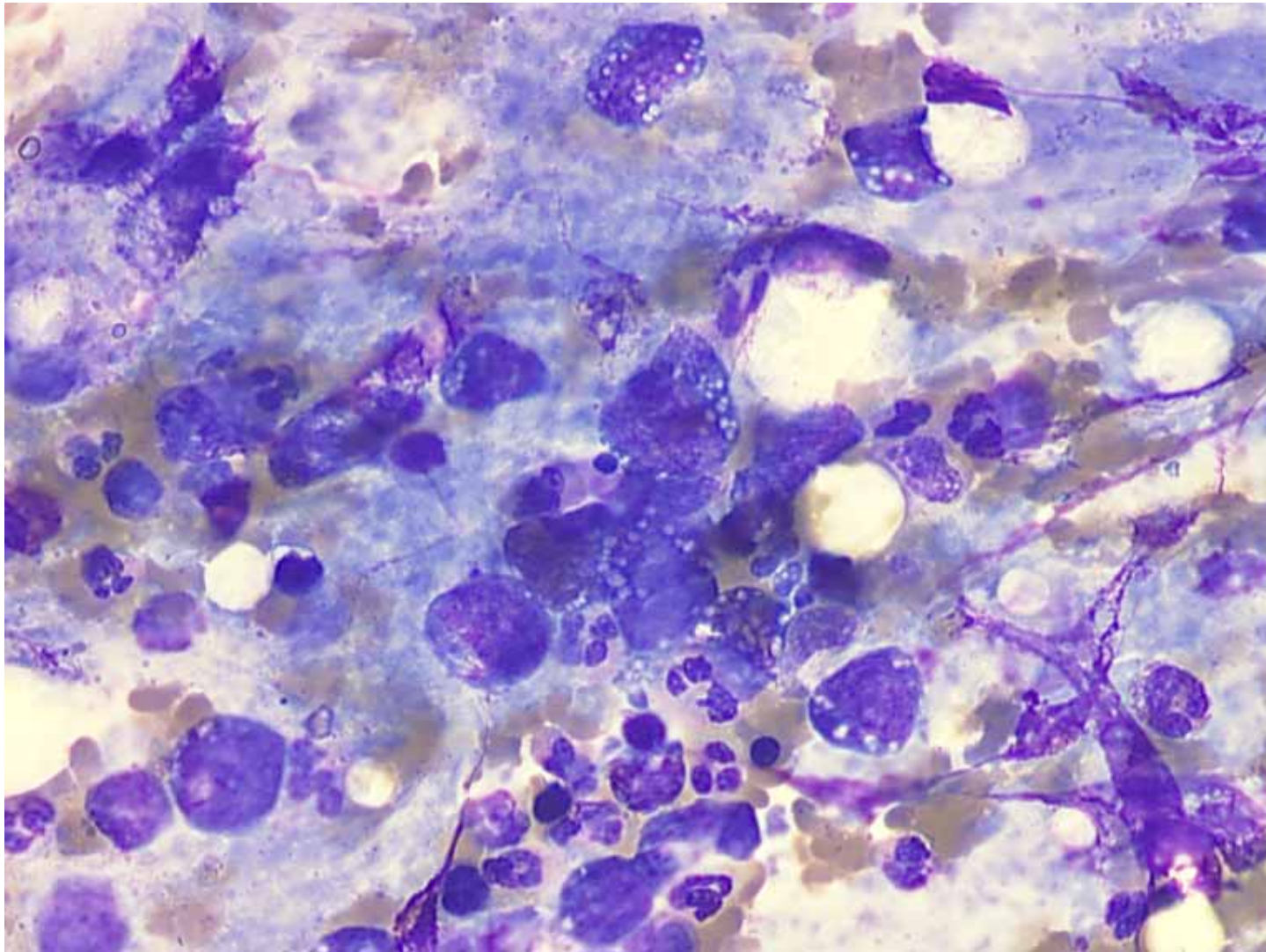
- 59 jarige vrouw meld zich op de spoedeisende hulp
- 2015 juni: sinds 2 weken algehele vermoeidheid, verminderde inspanningstolerantie, nachtzweeten, koorts.
- Geen voorgeschiedenis.
- Lichamelijk onderzoek: T 39 graden Celsius, geen lymfadenopathie, geen hepatosplenomegalie
- Laboratorium: bloed Hb 7.8, L 11.77 (diff: neutro. granulocyten: 93.55%) T 336, LDH 2008, kreatinine 82

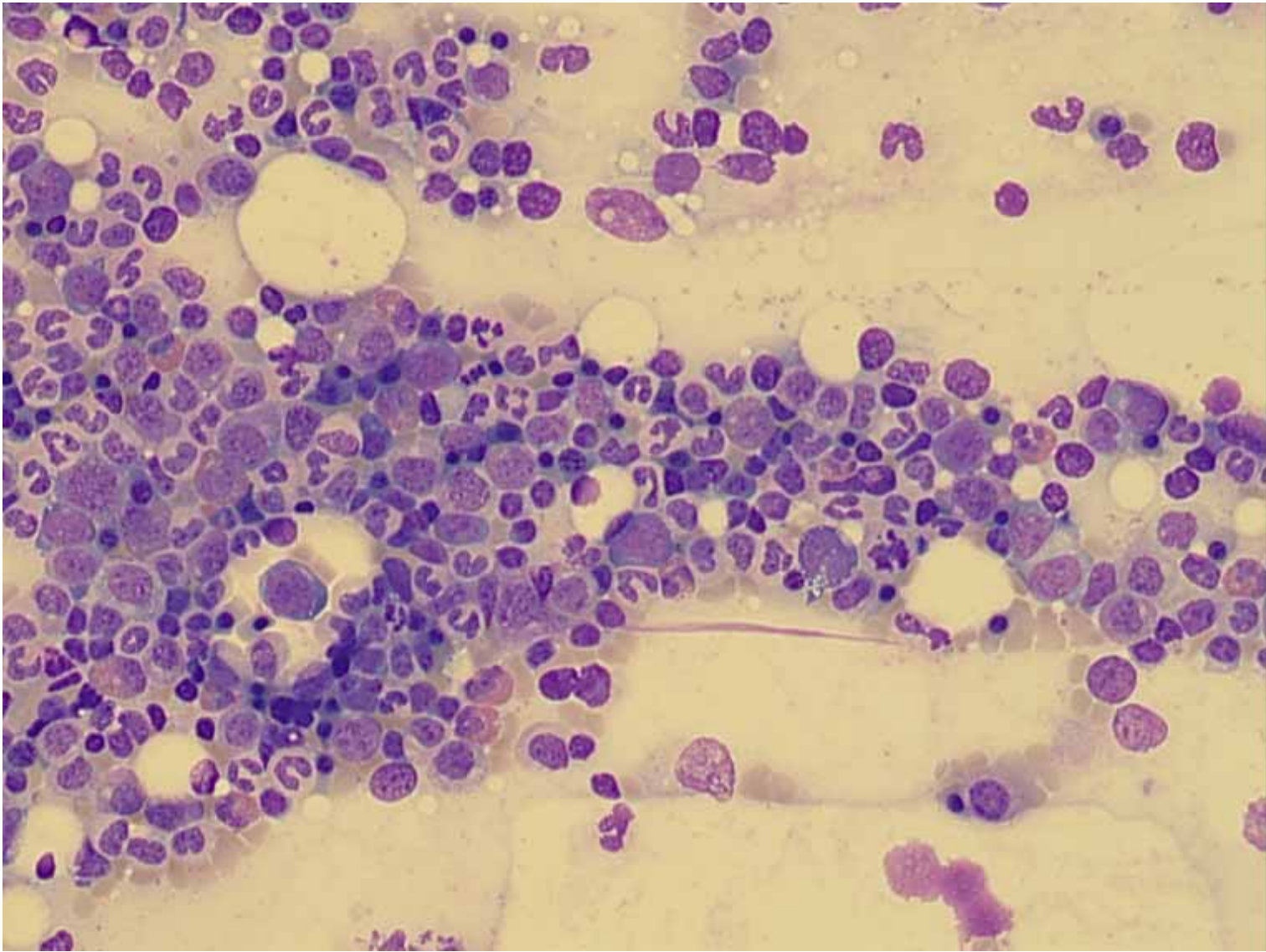
Overwegingen: verdenking hooggradig B-cell NHL / Burkitt lymfoom.

- Beenmergpunctie
- Immunofenotypering
- Botbiopt
- Cytogenetica



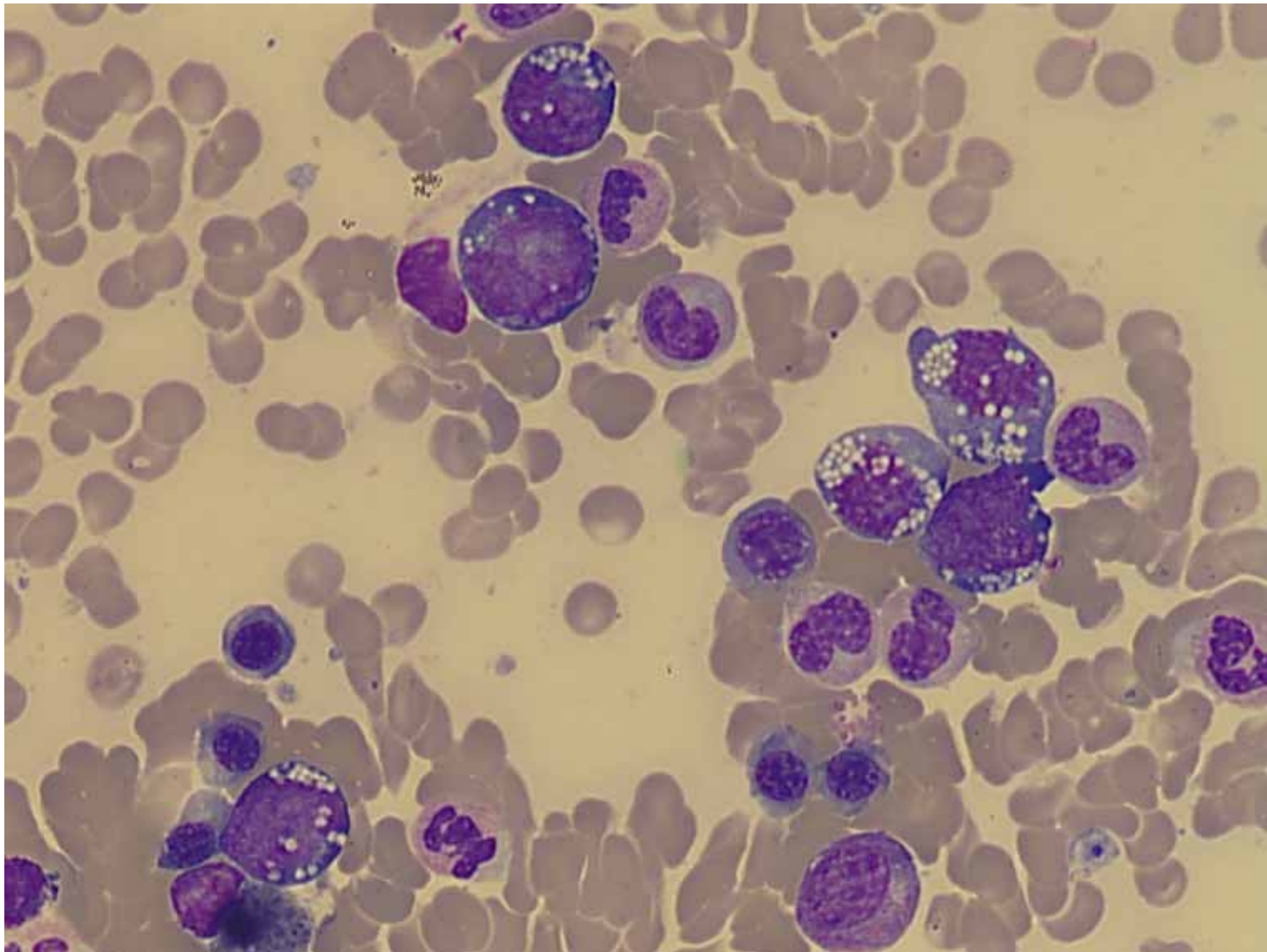


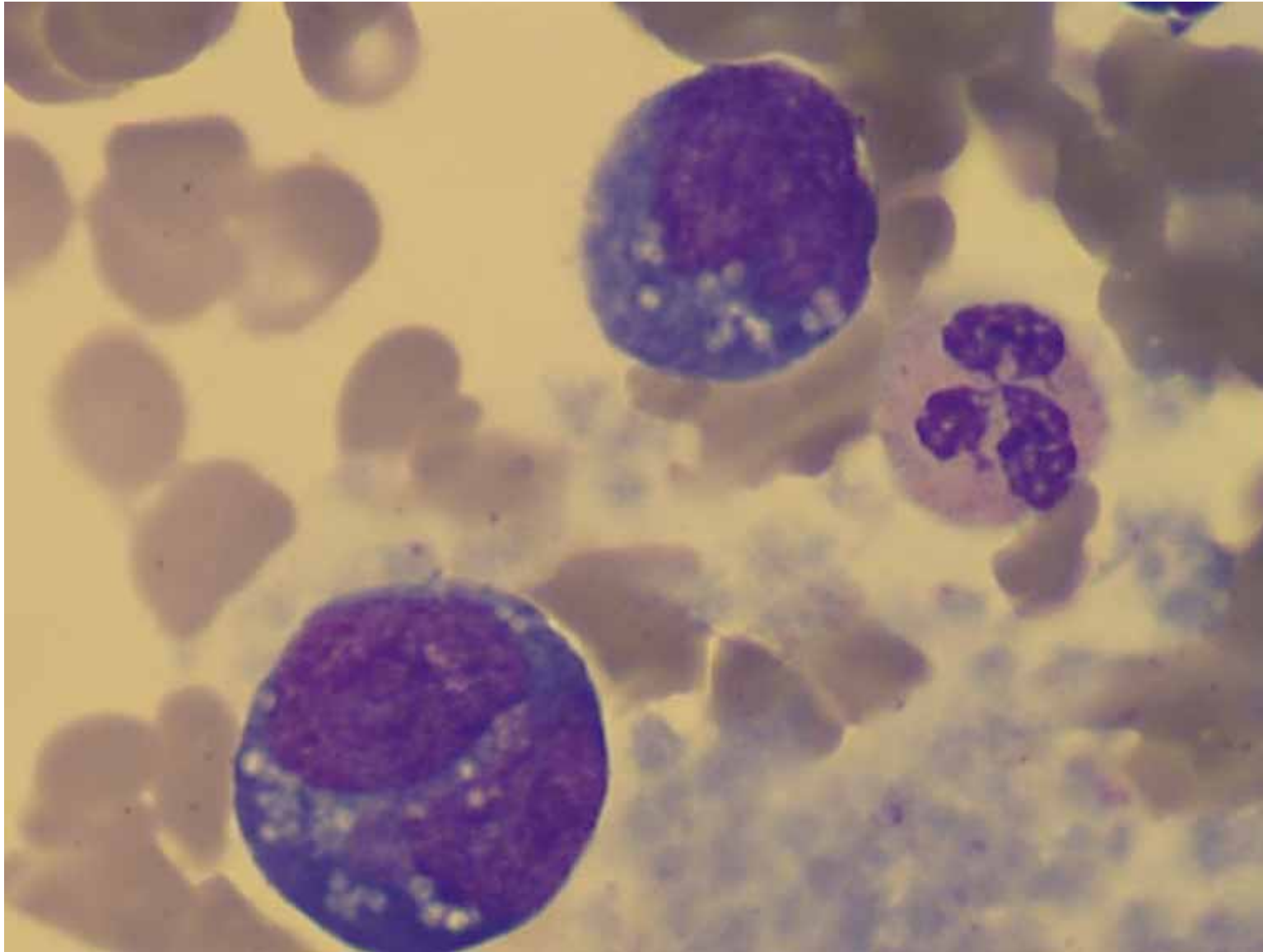




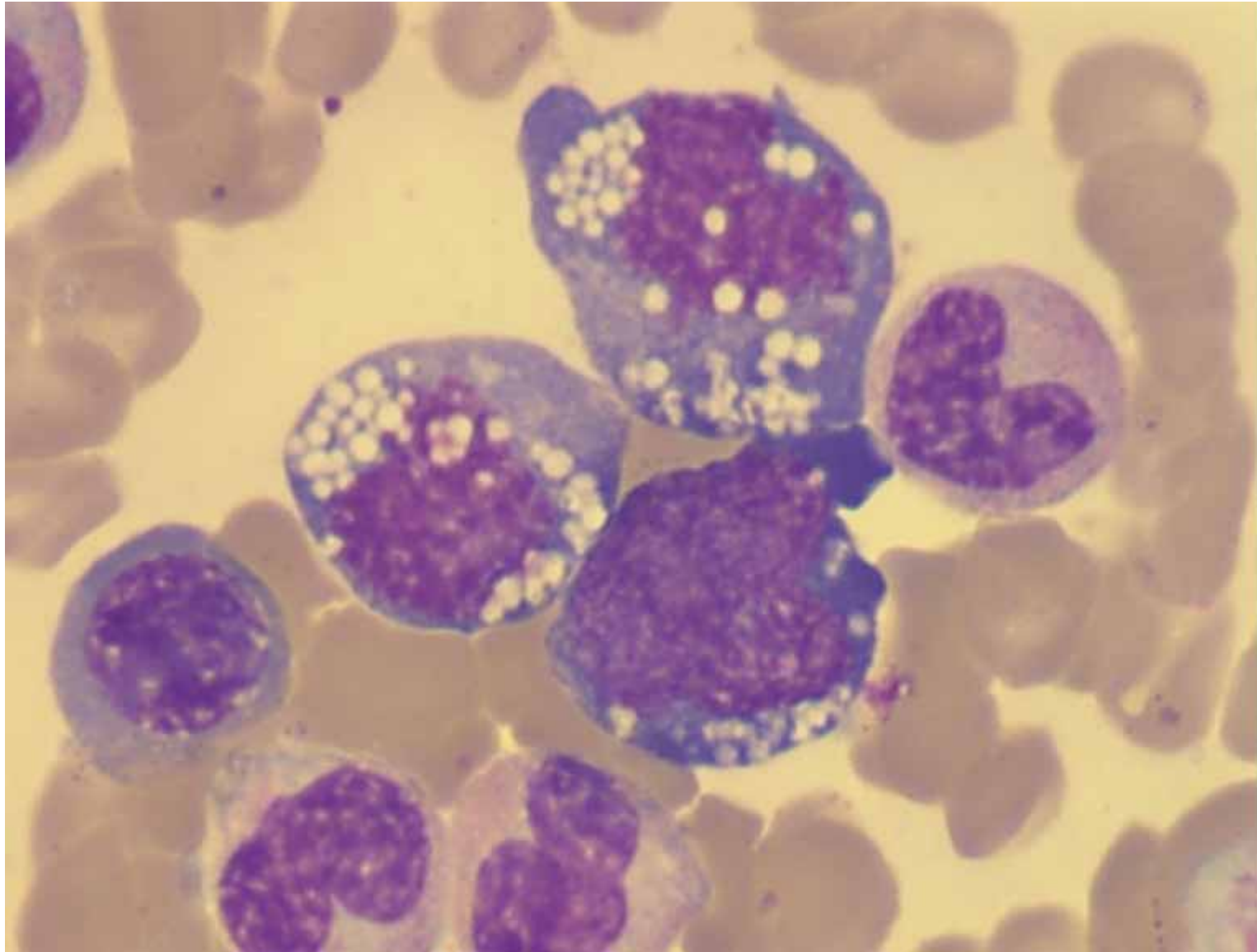












## Diagnostiek

- **Beenmergmorfologie:** celrijk ten dele gestold beenmerg waarin lokalisatie van een lymfatische maligniteit die morfologisch goed zou kunnen passen bij een **Burkitt lymfoom**.
- **Immunofenotypering:** beenmerg bevat 1% monoclonale B-lymfocyten deze zijn CD5-, CD10 +, CD19++, CD20++, CD22+, CD23 -
- **Botbiopt:** positief voor CD20, CD79a en enige aankleuringen in Bcl6, CD10. De **Ki-67 positief in >90%** en negatief voor BCL2 en MUM1 conclusie: **grootcellig B-cel non-hodgkin lymfoom**, meest waarschijnlijk **Burkitt lymfoom**.
- **Cytogenetica:** t(8;14) aanwezig, MYC rearrangement positief en bevestigt aanwezigheid van t(8,14) deze afwijking is specifiek voor **Burkitt lymfoom** en geassocieerd met een relatief ongunstig prognose.

## Behandeling & Beloop

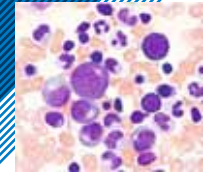
- Start behandeling in standaardarm Hovon 127 met R-CODOX (rituximab, cyclofosfamide, vincristine, doxorubicine, methotrexaat)/ R-IVAC.

complicaties:

1. Fusarium pneumonie wv Ambisome.
  2. Genitale infectie met HSV1.
  3. Cholestatische leverstoornissen, meest ws medicamenteus bij chemotherapie, anti virale en antischimmel-therapie. Leverchemie uiteindelijk weer verbeterend.
  4. Matige intake wv parenteraal Aminomix als bijvoeding.
- 2e kuur bestaande uit R-IVAC (rituximab, ifosfamide, etoposide, cytarabine) gecompliceerd door malaise en verminderde eetlust
  - Controle PET/CT scan: complete metabole respons
  - 3e kuur R-CODOX gecompliceerd door
    - E. faecalis bacteriëmie, waarvoor vancomycine en later amoxicilline inta v.
    - Forse mucositis waarvoor langdurig parenterale voeding.
    - Leverchemiestoornissen, geduid als medicamenteus, herstellende.
    - Tumoreuze laesie (>10 cm) op het perineum, geduid als hypertrofische herpes simplex type 1 reactivatie, vrijwel volledig verdwenen na aciclovir intra v. en beenmergrepopulatie.

- 2016 jan: inmiddels goede klinische conditie, wachten met laatste kuur (R-IVAC) totdat trombocyten  $>75$ ; nog steeds behandeld met liposomaal amfo.

## Case 2



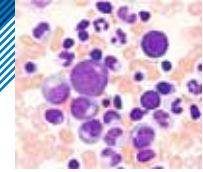
## Kliniek

- 67-jarige man
- 2015 mei: overname SEH lange land ziekenhuis ivm acute leukemie (vrijdagavond...)
- 2015 mei: sinds 1 week algehele achteruitgang, progressieve vermoeidheid, verminderde inspanningstolerantie, nachtzweeten, koorts. Normaal fit, veel fietsen etc, lukt nu niet meer.
- Voorgeschiedenis: diabetes mellitus, hypothyreoidie
- Lichamelijk onderzoek: T 39 graden Celsius, geen lymfadenopathie, geen hepatosplenomegalie
- Laboratorium: Hb 8.4, L 14.17 (diff: linksverschuiving, 7% maligne cellen), T 29, LDH 7000, kreatinine 120

Overwegingen: acute leukemie danwel aggresief leukemisch lymfoom

Beenmergbipt dag na opname:

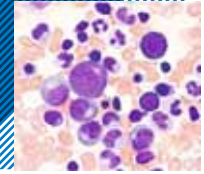
Werkdiagnose: Burkitt lymfoom, start Prednison + tumorlysisprofylaxe.



## Diagnostiek

- **Perifeer bloed**
  - **Morfologie:** plm. 7% maligne cellen
  
- **Beenmerg**
  - **Morfologie:** 55-75% maligne cellen, middelgroot tot groot celype, vrij grove chromatinestructuur, 1 of meerdere nucleoli, vaak onregelmatige kernomtrek met meerdere klievingen. Smalle tot ruimere donkerblauwe cytoplasmazoom, waarin veel vacuolen.
  - **Immunofenotypering:** CD10 +, CD19+, CD20+, CD22+, CD5-, CD23 -
  - **Cytogenetica:** t(14;18) positief, c-MYC rearrangement positief, extra chromosomen 1,5,7,9,17,20, 21 en 22.
  - **Histologie:** positief voor CD20, CD79a, **BCL2**, CD10, **MYC** JAP en **Ki-67** en negatief voor BCL6, TdT en CD30
  
- **Beeldvorming**
  - CT hals/thorax/abdomen: geen lymfadenopathie
  - PET-CT: geen lymfadenopathie, diffuus hoog miltmetabolisme, DD reactief danwel toch (resterend)lymfoomactiviteit, inhomogeen verhoogd beenmergmetabolisme, DD reactief danwel toch (resterend)lymfoomactiviteit.
  - MRI schedel: geen afwijkingen.
  
- **Liquor**
  - Immunofenotypering: Liquor bevat 5% cellen die we niet geheel vertrouwen gezien CD10 expressie, zeer zwak CD19+ en deze lijken monoclonaal kappa+. Positief.





## Behandeling & Beloop

- **Werkdiagnose:** Burkitt lymfoom, start Prednison + tumorlysisprofylaxe
- **Definitieve diagnose:** blijkt later **diffuus grootcellig B-cellymfoom** met **sterke MYC en BCL2** expressie compatibel met **dubbel hit lymfoom**.
- **Behandeling:**
  - Chemotherapie start 2015-mei: dose-adjusted EPOCH-R (etoposide, prednison, vincristine, cyclofosfamide, Rituximab en profylactische intrathecale chemotherapie), kuur van 5 dagen 1x per 3 weken
  - 1e kuur gecompliceerd door longbeeld mogelijk op basis van een (probable) pulmonale
  - Na 3 kuren: complete remissie. Plan 6 kuren gevolgd door consoliderende autologe SCT
- **Beloop:**
  - Echter in 2015-aug: dubbelzien obv uitval hersenzenuwen obv lymfoomlokalisatie cerebraal (ten tijde van 5e kuur DA-EPOCH-R).
  - Switch naar andere behandeling: RR-MTX-AraC (1x per 3 weken) gezien CZS lokalisatie
  - Tijdens behandeling met RR-MTX-AraC kuren klachten van progressieve spierzwakte en uitval van andere hersenzenuwen (niet meer in staat te lopen)
  - Evaluatie na 2 kuren RR-MTX-AraC kuren progressie zien met nu liquorlokalisatie van het lymfoom en tevens verdere uitbreiding in het CZS
  - Palliatieve setting/geen curatieve behandeling meer mogelijk.
  - Patiënt thuis 6 maanden na diagnose overleden



