

## Perbedaan Ekspresi BCL-2 pada Limfoma Sel B Jenis Sel Besar Difus sebagai Salah Satu Petanda Subtipe *Germinal Center B-Cell Like* dan *Non-Germinal Center B-Cell Like*

Dayanto Indro Utomo, Maria Francisca Ham, Kusmardi, Endang SR. Hardjolukito

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia  
 Jakarta

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Limfoma non-Hodgkin sel B jenis sel besar difus (DLBCL; *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*) adalah jenis limfoma non-Hodgkin yang paling banyak ditemukan dan merupakan suatu entitas yang sangat heterogen secara klinik maupun morfologik. Para ahli mengelompokkan DLBCL ke dalam dua subtipe yaitu subtipe *Germinal Center B Cell-Like* (GCB) dan *non-Germinal Center B-Cell Like* (non-GCB), di mana GCB memiliki prognosis yang lebih baik. Penjelasan tentang perbedaan dari kedua subtipe belum sepenuhnya diketahui. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perbedaan ekspresi Bcl-2 pada kedua subtipe DLBCL yang mungkin dapat menjelaskan perbedaan prognosisnya.

#### Metode

Studi potong lintang dilakukan pada 41 kasus DLBCL, terdiri atas 18 kasus subtipe GCB dan 23 kasus subtipe non-GCB. Dilakukan review diagnosis histopatologik dari sediaan H&E serta review imunofenotip dari sediaan imunohistokimia. Dilakukan pemeriksaan ekspresi Bcl-2 secara imunohistokimia dan penilaian positivitas dengan nilai *cut off* 31%. Selanjutnya dilakukan analisis statistik menggunakan uji Mann-Whitney.

#### Hasil

Seluruh kasus DLBCL, sejumlah 18 kasus subtipe GCB, 15 kasus ekspresi Bcl-2 dikategorikan tinggi. Sejumlah 23 kasus subtipe non-GCB ditemukan 22 kasus ekspresi Bcl-2 termasuk kategori tinggi. Ekspresi Bcl-2 pada DLBCL subtipe non-GCB (nilai rerata 78,70%) lebih tinggi secara bermakna dibandingkan ekspresi Bcl-2 subtipe GCB (nilai rerata 66,61%) ( $p < 0,05$ ).

#### Kesimpulan

Ekspresi Bcl-2 pada DLBCL subtipe non-GCB lebih tinggi dibandingkan ekspresi Bcl-2 subtipe GCB. Hal ini mungkin dapat menjadi salah satu penjelasan perbedaan prognosis diantara keduanya.

**Kata kunci:** Bcl-2, DLBCL, GCB, imunohistokimia, non-GCB.

### ABSTRACT

#### Background

Diffuse Large B-Cell Lymphoma is the most common type non-Hodgkin lymphoma found in the world, which very heterogenous entity clinically and morphologically. The experts categorized DLBCL into two subtypes, *Germinal Center B Cell-Like* (GCB) and *non-Germinal Center B-Cell Like* (non-GCB), in which GCB has a better prognosis. The mechanism behind the differences is not well understood. This research was conducted to analyze the differences of Bcl-2 expression in these two DLBCL subtypes and explained the prognosis differences of two subtypes.

#### Methods

A retrospective, cross-sectional study was conducted in 41 DLBCL cases consisted of 18 cases of GCB subtype and 23 cases of non-GCB subtype. Review of histopathological diagnosis from H&E and immunophenotypes from immunohistochemical stained was performed. Immunohistochemistry examination of Bcl-2 expression was done and the positivity was evaluated with 31% cut off. Furthermore, statistical analysis was performed by using Mann-Whitney test.

#### Results

All of 41 cases DLBCL, 18 cases including GCB subtype with 15 cases are high expressed of Bcl-2. And 23 cases including non-GCB subtype, with 22 cases are high expressed of Bcl-2. Bcl-2 expression in DLBCL, non-GCB subtype (median value of 78.70%) showed a statistically higher expression compared to the expression in GCB subtype (with median value of 66.61 %) ( $p < 0.05$ ).

#### Conclusion

BCL-2 expression in non-GCB subtype is higher than in GCB subtype of DLBCL. This finding might be explained the prognosis differences of two subtypes.

**Key words:** Bcl-2, DLBCL, GCB, immunohistochemistry, non-GCB.

**PENDAHULUAN**

Limfoma malignum merupakan keganasan primer jaringan limfoid. Limfoma malignum dibagi menjadi dua golongan utama, yaitu limfoma Hodgkin (LH) dan limfoma non-Hodgkin. Limfoma non-Hodgkin sel B jenis sel besar difus/*Diffuse Large B-Cell Lymphoma* (DLBCL) merupakan limfoma tersering dari seluruh jenis limfoma non-Hodgkin. Di negara-negara maju, limfoma jenis ini mencapai sekitar 30% dari semua limfoma non-Hodgkin sedangkan di negara berkembang termasuk di Indonesia persentasenya lebih tinggi. DLBCL paling sering ditemukan pada usia tua walau dapat juga ditemukan pada usia dewasa muda.<sup>1-3</sup>

DLBCL merupakan keganasan yang berasal dari sel limfosit B matur, yang dapat terjadi secara *de novo* atau merupakan transformasi dari limfoma sel B derajat rendah, misalnya limfoma folikuler. Menurut klasifikasi *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* WHO edisi 2 tahun 2008, DLBCL didefinisikan sebagai neoplasma sel B berukuran besar dengan inti sel berukuran sama atau lebih besar dari inti makrofag normal atau lebih dari dua kali ukuran limfosit normal, serta memiliki pola pertumbuhan difus. DLBCL mengekspresikan berbagai peptanda sel B, yaitu antara lain CD19, CD20 dan CD79a.<sup>1,2,4</sup>

Para ahli telah berusaha mengelompokkan DLBCL ke dalam kelompok-kelompok atau subtipe yang lebih homogen. Diharapkan dengan pembagian subtipe dapat diketahui karakteristik DLBCL yang lebih jelas terutama prognosis atau respon terapi dari pasien DLBCL. Alizadeh *et al*,<sup>5</sup> (2000) membedakan DLBCL berdasarkan pemeriksaan profil genetik menggunakan tehnik DNA *microarray*, di mana DLBCL dibagi menjadi tiga kelompok yang memiliki pola ekspresi gen yang berbeda tergantung pada tahapan diferensiasi sel B. Pada kelompok pertama, gen yang diekspresikan memiliki karakteristik menyerupai sel-sel B *germinal center*/sentrum germinativum sehingga disebut kelompok GCB (*Germinal Center B-Cell Like*), sedangkan pada kelompok kedua, pola ekspresi gennya menyerupai sel-sel B di darah tepi yang teraktivasi secara *in vitro* sehingga disebut sebagai kelompok ABC (*Activated B-Cell Like*). Kelompok ketiga merupakan kelompok yang tidak mengekspresikan salah satu dari kedua kelompok di atas dan disebut sebagai tipe 3. Selanjutnya kelompok ABC bersama-sama

dengan kelompok tipe 3 disebut sebagai subtipe non-GCB (*non-Germinal Center B-Cell Like*) yang memiliki kesintasan yang lebih buruk.<sup>5,6</sup>

Bcl-2 adalah gen spesifik yang mengatur proses apoptosis, dan peran Bcl-2 pernah dilakukan penelitian pada *caenorhabditis elegans* dan *B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2)*. Tempat aktivitas Bcl-2 adalah di membran mitokondria. Peran mitokondria dalam apoptosis adalah melepaskan molekul proapoptotik ke dalam sitosol, melepaskan sitokrom C, kemudian diikuti oleh proses yang menstimulasi kematian sel.<sup>7</sup>

Ekspresi Bcl-2 pada DLBCL subtipe GCB dan non-GCB memiliki mekanisme yang berbeda. Pada subtipe GCB, ekspresi Bcl-2 terjadi oleh karena adanya translokasi pada kromosom 14 dan kromosom 18, sedangkan pada DLBCL subtipe non-GCB ekspresi Bcl-2 berhubungan dengan aktivasi NfκB. Bcl-2 berperan dalam proses karsinogenesis melalui penghambatan sinyal-sinyal yang berhubungan dengan kematian sel melalui apoptosis, dan telah dilaporkan bahwa overekspresi gen Bcl-2 dapat menghambat apoptosis sel hematopoietik dan sel neuron.<sup>8</sup>

Dalam penelitian ini dilakukan pulasan Bcl-2 pada limfoma sel B jenis sel besar difus bertujuan untuk mengetahui perbedaan ekspresi Bcl-2 pada kedua subtipe, yaitu GCB dan non-GCB. Dari hasil pulasan ini diharapkan dapat diketahui informasi tentang profil dari kedua subtipe.

**METODE PENELITIAN**

Desain penelitian adalah studi deskriptif analitik potong lintang. Penelitian diawali dengan pengumpulan rekam medik, pengumpulan formulir permintaan dan jawaban, serta mengumpulkan slide histopatologik. Selanjutnya mengumpulkan formulir jawaban imunohistokimia yang telah dilakukan sebelumnya, kemudian pencarian blok parafin dan pewarnaan imunohistokimia.

Penelitian dilakukan di Departemen Medik Patologi Anatomi FKUI/RSCM selama bulan September sampai dengan Oktober 2014. Populasi penelitian adalah kasus limfoma sel B jenis sel besar difus. Populasi terjangkau adalah sediaan dengan diagnosis DLBCL subtipe GCB dan non-GCB di Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM sejak tahun 2012 hingga 2014. Sampel dipilih secara *random sampling*, untuk mewakili tiap kelompok yang diteliti perhitungan

besar sampel menggunakan rumus besar sampel dua proporsi tidak berpasangan.<sup>9</sup>

Kriteria inklusi adalah kasus pasien yang telah ditentukan diagnosis sebelumnya, limfoma sel B jenis sel besar difus, dan sudah dilakukan pulasan IHK untuk CD10, Bcl-6 dan MUM1 untuk penentuan subtipe GCB dan non-GCB. Penilaian hasil penelitian dilakukan oleh dua pengamat dan data dinyatakan valid jika mencapai nilai kappa minimal 0,8.

Pulasan yang dilakukan adalah Bcl-2 (Biocare-100/D5) dengan pengenceran seratus kali menggunakan kontrol positif jaringan tonsil. Jaringan pada blok parafin dipotong setebal 3µ dan diletakkan pada kaca benda yang telah dilapisi *poly-L-lysine*. Setelah deparafinisasi dan pencucian slide dengan air mengalir, kemudian dipanaskan dalam *microwave* dalam suhu 96°C, selama 10 menit dan dibilas ulang. Inkubasi dengan antibodi primer Bcl-2 terlarut dalam PBS dilakukan *overnight* pada suhu 4°C. Langkah selanjutnya adalah inkubasi dengan antibodi sekunder dan pencucian ulang dengan PBS serta pewarnaan Hematoksilin.

Proporsi positivitas sel tumor yang positif terwarnai pada membran inti dan sitoplasma dinilai dari minimal sebanyak 500 sel dengan menggunakan aplikasi komputer ImageJ. Hasil dikategorikan tinggi jika nilai positif >31%, dan dikategorikan rendah jika ≤31% (nilai 31% merupakan *cut off* dari kurva ROC/Receiver Operating Characteristic). Data dianalisis dengan uji statistik Man-Whitney menggunakan program komputer SPSS versi 16. Nilai *cut off* positif dan negatif ditetapkan sebesar 31% berdasarkan perhitungan analisa statistik dari hasil yang ditemukan. Dalam penelitian ekspresi Bcl-2 untuk nilai *cut off* positif dan negatif belum ada standar yang baku dan seragam.

**HASIL**

Pada penelitian ini ditemukan 42 kasus DLBCL yang sudah diklasifikasikan ke dalam subtipe GCB dan non-GCB selama periode tahun 2012-2014. Sebanyak 28 kasus pasien merupakan pasien yang datang ke RSCM dan 14 pasien dari rumah sakit di luar RSCM. Dalam penilaian akhir ditemukan 41 kasus, sebanyak 18 kasus di antaranya tergolong subtipe GCB dengan rerata usia 45±24,4 tahun, sisanya sebanyak 23 kasus tergolong ke dalam subtipe non-GCB dengan rerata usia 75±15,3 tahun. Data hasil penelitian diamati oleh dua penilai dan didapatkan nilai

kappa sebesar 0,82 sehingga data dapat dinyatakan valid.

Tabel 1. Karakteristik hasil penelitian.

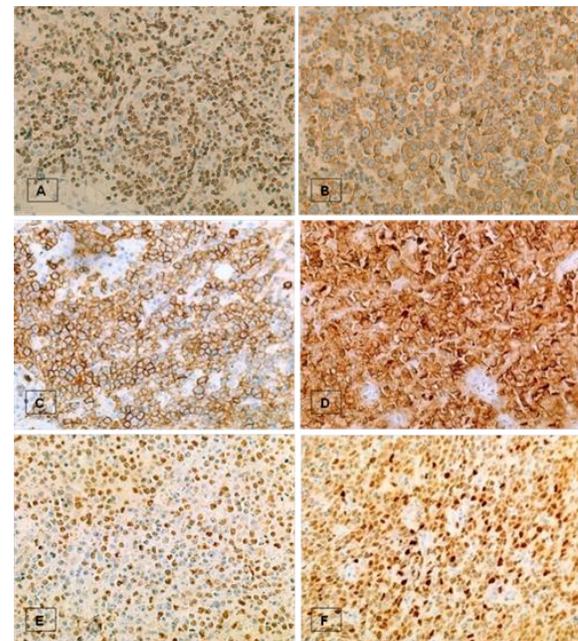
Variabel	GCB	non-GCB
Jenis kelamin		
Pria	14	16
Wanita	4	7
Usia (tahun)		
Kisaran	29-72	22-81
Rata-rata	45±24,4	75±15,3
Lokasi terbanyak		
Kepala dan leher	8	16

GCB : *Germinal center B-cell like*

Ekspresi Bcl-2 pada subtipe GCB didapatkan rerata 66,61% dan ekspresi Bcl-2 pada subtipe non-GCB didapatkan rerata 78,70%. Dari hasil uji statistik non parametrik dua sampel tidak berpasangan dengan Mann-Whitney didapatkan nilai p<0,05, dari hasil ini dapat disimpulkan hasil data penelitian ekspresi Bcl-2 pada subtipe GCB dan non-GCB secara statistik ditemukan perbedaan yang bermakna.

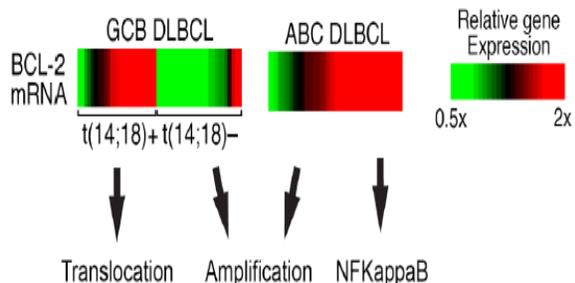
Tabel 2. Jumlah kasus dengan ekspresi Bcl-2 pada subtipe GCB dan non-GCB.

Subtipe	Ekspresi Bcl-2				Jumlah
	Tinggi	%	Rendah	%	
GCB	15	83	3	17	18
non-GCB	22	95	1	4	23
Jumlah	37		4		41



Gambar 1. Hasil pulasan imunohistokimia. Gambar menunjukkan ekspresi Bcl-2 pada (A) subtipe GCB

lebih rendah dari (B) subtype non-GCB. (C) Pulasan CD 20 positif pada membran sitoplasma. (D) Pulasan CD10 positif pada sitoplasma dan membran sitoplasma. (E) Pulasan Bcl-6 positif pada inti sel dan (F) pulasan MUM1 positif pada inti sel. Pembesaran 400x.



Gambar 2. Mekanisme ekspresi Bcl-2. Pada *diffuse large B-cell lymphoma* subtype GCB ekspresi Bcl-2 terjadi melalui translokasi dan amplifikasi gen, sedangkan pada subtype non-GCB (ABC) terjadi melalui amplifikasi gen dan aktivasi jalur NfκB. (dikutip dari Dunleavy *et al*<sup>6</sup>).

**DISKUSI**

Berdasarkan kelompok umur yang paling banyak ditemukan pada usia 41-50 tahun dan 51-60 tahun, yaitu sebanyak 13 orang (31,7%). Menurut Stein *et al.* dalam WHO, limfoma sel B terbanyak dijumpai pada umur tua dan dewasa muda. Pada penelitian yang dilakukan pulasan Bcl-2 dengan pengenceran seratus kali, dan penilaian oleh dua orang pengamat didapatkan nilai kappa 0,82 dan data dapat dinyatakan valid.

Berdasarkan penilaian secara statistik dengan uji non-parametrik Mann-Whitney diketahui bahwa ekspresi Bcl-2 pada DLBCL subtype GCB dan non-GCB berbeda bermakna dengan nilai  $p < 0,05$ . Serta penetapan nilai *cut off* sebesar 31% masih dalam kisaran nilai *cut off* yang biasa dipergunakan dalam penelitian menurut kepustakaan, yaitu berkisar antara 10%-70%.<sup>10,11</sup>

Ekspresi Bcl-2 pada DLBCL subtype GCB dan non-GCB sangat bervariasi hasilnya. Pada hasil penelitian yang ditemukan diketahui bahwa ekspresi Bcl-2 pada subtype non-GCB lebih tinggi secara bermakna dibandingkan dengan subtype GCB. Menurut patogenesisnya ekspresi Bcl-2 pada subtype GCB terjadi melalui translokasi dan amplifikasi, sedangkan pada subtype non-GCB terjadi melalui amplifikasi dan aktivasi NfκB. Pada tahapan aktivasi NfκB terjadi

proliferasi sel, sehingga ekspresi Bcl-2 sebagai anti apoptotik menjadi tinggi. Hal tersebut menjadi penjelasan mengapa ekspresi Bcl-2 pada subtype non-GCB lebih tinggi secara bermakna pada penelitian ini dibandingkan dengan ekspresi Bcl-2 pada subtype GCB.<sup>8,10</sup>

Dalam beberapa penelitian dikatakan bahwa ekspresi Bcl-2 yang tinggi berhubungan dengan respon terapi yang lebih buruk. Dengan penelitian yang dilakukan tentang ekspresi Bcl-2 pada DLBCL, secara klinik dapat diketahui prognosis pada pasien yang dilakukan terapi berdasarkan hasil yang ditemukan. Ekspresi Bcl-2 yang lebih tinggi terjadi pada subtype non-GCB dengan prognosis yang lebih buruk daripada subtype GCB.<sup>10,11</sup>

Sehingga dalam menilai prognosis DLBCL pada pasien dengan terapi standar yang sudah dilakukan, Bcl-2 dapat dikatakan sangat signifikan selain pemeriksaan faktor lainnya. Pemeriksaan dalam hal jenis morfologik, imunofenotip dan profil genetik juga dapat menilai respon terapi pada pasien DLBCL.<sup>12</sup>

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, ekspresi Bcl-2 pada subtype GCB lebih banyak yang termasuk dalam kategori tinggi dibandingkan kategori rendah. Berdasarkan patogenesis Bcl-2 pada subtype GCB yaitu translokasi dan amplifikasi, pada suatu penelitian dikatakan bahwa perubahan ekspresi Bcl-2 dapat diakibatkan oleh mutasi poin yang spesifik selain dua mekanisme tersebut. Hal tersebut mungkin dapat menjadi penjelasan kenapa pada seluruh sampel DLBCL subtype GCB lebih banyak yang mengekspresikan Bcl-2 dengan kategori tinggi, yaitu lebih dari 31%.<sup>10</sup>

Dalam beberapa studi dikatakan bahwa ekspresi Bcl-2 yang tinggi berhubungan dengan respon terapi yang lebih buruk. Pada penelitian lain yang menggunakan metode pemeriksaan *Southern blotting* ditemukan bahwa translokasi kromosom dan amplifikasi gen Bcl-2 tidak berhubungan dengan ketahanan hidup pasien DLBCL.<sup>12,13</sup>

Dalam penelitian ini tidak dilakukan penilaian faktor prognosis, yang dapat diketahui dari pemeriksaan secara klinis pada pasien sebelum dan setelah dilakukan terapi standar. Dari data yang dikumpulkan berdasarkan arsip rekam medis pusat di RSCM, sebagian besar pasien telah mendapat terapi standar berupa R-CHOP. Sebagian pasien yang lain belum mendapat terapi standar, disebabkan kondisi

pasien yang kurang stabil dan perlu pemulihan kondisi secara umum. Jumlah pasien yang belum dilakukan terapi di RSCM lebih sedikit dari total jumlah pasien pada penelitian ini.

Dalam penelitian ini digunakan *cut off* penilaian Bcl-2 yaitu 31%, hal tersebut diketahui berdasarkan hasil analisa statistik dengan kurva ROC dari data yang ditemukan. Pada beberapa studi penilaian ekspresi Bcl-2 memakai *cut off* yang bervariasi yaitu berkisar antara 10% sampai 70%, misalnya dalam penelitian yang dilakukan oleh Johnson NA *et al.* untuk menilai ekspresi Bcl-2 pada kasus DLBCL, dipakai nilai *cut off* sebesar 50%.<sup>13-15</sup>

Kelemahan penelitian yang dilakukan pada kesempatan ini adalah kurangnya keterangan klinik yang ditemukan. Berdasarkan data yang lebih lengkap diharapkan dapat mengkaitkan temuan ekspresi Bcl-2 dengan respon terapi pada pasien DLBCL dari kedua sub tipe yang telah dilakukan terapi. Metode penelitian restrospektif kurang memadai untuk dilakukannya evaluasi terapi lanjutan pada pasien DLBCL, diperlukan metode prospektif untuk kepentingan evaluasi lanjutan.

**KESIMPULAN**

Ekspresi Bcl-2 pada DLBCL sub tipe non-GCB lebih tinggi daripada ekspresi Bcl-2 pada DLBCL sub tipe GCB. Bcl-2 dapat digunakan sebagai salah satu petanda sub tipe GCB dan non-GCB pada DLBCL dengan menggunakan nilai *cut off* sebesar 31%. Semua kasus GCB pada penelitian ini memberikan hasil positif untuk pulasan antibodi CD10.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Stein H, Warnke RA, Chan W, Jaffe E, Gatter K, Campo E, *et al.*In: Stein H, ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008. p.233-7.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasm: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008; 112: 4384-94.
3. Reksodiputro AH, Irawan C, Hardjolukito E, Suzanna E, Rinaldi I, Mulansari N, *et al.* Non-Hodgkin lymphoma in Jakarta. *Indon J Cancer*. 2011; 5: 129-33.
4. Dennis P, Malley O, Auerbach A, Weiss LM. Practical applications in immunohistochemistry: Evaluation of diffuse large B-cell

- lymphoma and related large B-cell lymphomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 14: 1-10.
5. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, *et al.* Distinct types of diffuse large B-Cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403: 503-10.
6. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, *et al.* The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-Cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002; 346: 193-6.
7. Willis S, Day CL, Hinds MG, Korsmeyer SJ. BCL-2 regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci*. 2003; 116: 4053-6.
8. Dunleavy K, Wilson H. The differential role of Bcl-2 within molecular subtypes of DLBCL. *Clin Cancer Res*. 2011; 15: 7505-7.
9. Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro A, Budiman I, Purwanto SH. Perkiraan besar sampel. Dalam: Sastroasmoro S, Ismael S, eds. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis, edisi ke-3 Jakarta: Sagung Seto; 2010; h.314-7.
10. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, Scott DW, Tan K, Nierah SB, *et al.* BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2012; 26: 1383-90.
11. C Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, *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. *Haematol*. 2013; 98: 255-63.
12. Coutinho R, Gribben J. Biomarkers of diffuse large B-cell lymphoma: impact on diagnosis, treatment, and prognosis. *Curr Biomark Find*. 2013; 3: 17-24.
13. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, *et al.* Concurrent expression of MYC and BCL-2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 3452-9.
14. Suri C. The immunohistochemical evaluation of the expression of BCL2 in different histological grades of squamous cell. *J Clin Diagn Res*. 2009; 3: 1891-9.
15. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Takeuchi H, Nishizaki T, Higashi H, *et al.* Bcl-2 protein

expression is associated with p27 and p53  
protein expression and MIB-1 counts in

breast cancer. Cancer. 2006; 6: 1-7.