

Ekspresi EBNA-1 pada *diffuse large B cell lymphoma* serta *Small lymphocytic lymphoma* tipe nodal dan ektranodal

Indrawati, Irianiwati, Harijadi
Bagian Patologi Anatomi,
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

ABSTRACT

Indrawati, Irianiwati, Harijadi - *EBNA-1 expression in nodal and extranodal type of diffuse large B cell lymphoma and small lymphocytic lymphoma*

Background : Diffuse large B cell lymphoma is the most common type of non-Hodgkin lymphoma. Epstein-Barr Virus infection has been suggested to be involved in the pathogenesis of non-Hodgkin lymphoma.

Objective : To know the expression of EBNA-1 in diffuse large B cell lymphoma and small lymphocytic lymphoma and its association with nodal and extranodal location of B cell non-Hodgkin lymphoma

Methods : Thirty five cases of B cell non-Hodgkin lymphoma from embedding parafin tissue were constituted the basis of the study. Immunohistochemical examination using CD20 and EBNA-1 monoclonal antibody was done. The difference of EBNA-1 expression between diffuse large B cell lymphoma and small lymphocytic lymphoma and the difference of EBNA-1 expression between nodal and extranodal locations of B cell non-Hodgkin lymphoma were analyzed by chi square test

Result and Conclusion : Sixteen cases of B cell non-Hodgkin lymphoma showed positivity of EBNA-1 expression. There was significant difference between the number of cases with positivity of EBNA-1 expression in nodal and extranodal location of B cell non-Hodgkin lymphoma. There was not significant difference between the number of cases with positivity of EBNA-1 expression in diffuse large B cell lymphoma and small lymphocytic lymphoma. The result supported that latency EBV related lymphoma frequently occurs in extranodal location

Key words : EBNA-1, diffuse large B cell lymphoma, small lymphocytic lymphoma, nodal, extranodal

ABSTRAK

Indrawati, Irianiwati, Harijadi : *Ekspresi EBNA-1 pada diffuse large B cell lymphoma serta small lymphocytic lymphoma tipe nodal dan ektranodal*

Latar belakang : *Diffuse large B cell lymphoma* merupakan jenis limfoma non-Hodgkin yang paling sering dijumpai. Infeksi Epstein-Barr Virus diperkirakan berhubungan dengan patogenesis beberapa subtipe limfoma non-Hodgkin.

Tujuan Penelitian : mengetahui ekspresi EBNA-1 pada *diffuse large B cell lymphoma* dan *small lymphocytic lymphoma* serta perbedaan positivities ekspresi EBNA-1 pada lokasi nodal dan ektranodal

Bahan dan Cara : Tigapuluh lima kasus limfoma non-Hodgkin dari blok parafin jaringan dikelompokkan sebagai *diffuse large B cell lymphoma* dan *small lymphocytic lymphoma* tipe nodal dan ektranodal. Dilakukan pewarnaan imunohistokimia CD 20 dan EBNA-1. Perbedaan ekspresi EBNA-1 positif pada *diffuse large B cell lymphoma* dengan *small lymphocytic lymphoma* dan perbedaan ekspresi EBNA-1 positif pada limfoma non-Hodgkin tipe nodal dan ektranodal dianalisis dengan *chi square*.

Hasil dan simpulan : Enambelas kasus (46%) menunjukkan ekspresi EBNA-1 positif. Didapatkan perbedaan bermakna antara banyaknya jumlah kasus dengan ekspresi EBNA-1 positif pada limfoma non-Hodgkin sel B tipe ekstranodal dibanding jumlah kasus dengan ekspresi EBNA-1 positif pada limfoma non-Hodgkin tipe nodal. Tidak didapatkan perbedaan bermakna antara banyaknya jumlah kasus dengan ekspresi EBNA-1 positif pada *diffuse large B cell lymphoma* dan *small lymphocytic lymphoma*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa *diffuse non-Hodgkin lymphoma* yang berhubungan dengan virus EBV laten lebih banyak didapatkan pada lokasi ekstranodal.

PENGANTAR

Limfoma non-Hodgkin merupakan tumor ganas jaringan limfoid yang paling sering dijumpai. Penyakit ini memiliki sub kelompok yang sangat heterogen dengan klasifikasi yang selalu berkembang.¹ Pada tahun 1966 Rappaport mengajukan klasifikasi yang didasarkan sepenuhnya pada morfologi sel. Kemudian dikemukakan klasifikasi Luke-Collins yang mengelompokkan limfoma non-Hodgkin ke dalam kategori sel T, sel B histiosit, dan sel *null*, dengan memakai petanda sitokimia dan imunologi sebagai tambahan terhadap penelitian morfologi.² Pada tahun 1982, suatu panel pakar internasional menyarankan klasifikasi baru yang mengusahakan perakitan kategori morfologi limfoma non-Hodgkin ke dalam tiga kelompok prognosis utama. Klasifikasi terbaru dari WHO yang didasarkan pada klasifikasi REAL dikemukakan pada tahun 1999. Klasifikasi ini dikembangkan berdasarkan asumsi bahwa klasifikasi yang dipakai hendaknya dapat memberikan informasi mengenai biologi tumor, sifat alami, dan respon pengobatan.^{2,3}

Berdasarkan klasifikasi REAL, limfoma non-Hodgkin dapat dibedakan dalam kelompok limfoma sel B dan limfoma sel T/NK. Limfoma sel B matur merupakan kasus terbanyak, meliputi 90% dari seluruh kasus limfoma non-Hodgkin. Di seluruh dunia jenis limfoma tersebut diperkirakan menyumbang 4% kasus kanker baru setiap tahun.⁴ Jenis limfoma yang paling sering dijumpai dari kelompok ini adalah *diffuse large B cell lymphoma*, diikuti oleh *follicular lymphoma*, *MALT-lymphoma* dan *small lymphocytic lymphoma*. Meskipun di negara Barat limfoma merupakan kasus dengan frekuensi tinggi, *follicular lymphoma* merupakan kasus yang jarang dijumpai di Asia.^{3,4}

Etiologi limfoma non-Hodgkin belum diketahui dengan pasti. Infeksi virus Epstein-Bar diperkirakan berhubungan dengan patogenesis *diffuse large B cell lymphoma* pada penderita dengan imunokompromais

seperti sindrom imunodefisiensi primer dan gangguan imun primer yang lain, infeksi *human immunodeficiency virus (HIV)*, immunosupresi pada penderita pasca transplantasi organ dan sebagainya.⁵ Penyakit limfoproliferatif yang berhubungan dengan gangguan imun primer kebanyakan terjadi pada lokasi ekstranodal terutama traktus gastrointestinal dan sistem saraf pusat.^{4,6}

Virus Epstein Barr merupakan suatu *lymphotropic herpes virus* sebagai agen penyebab infeksi mononukleosis. Secara *in vivo* virus ini menginfeksi limfosit B dan sel epitel orofaring. Infeksi pada sel B diperantarai ikatan EBV pada glikoprotein selular 145 kDa CD 21 sebagai reseptor viral.^{5,7} Pada awalnya, virus ini hanya mengekspresikan *EB nuclear antigen-1* (EBNA-1) dan *EB encoded RNAs* (EBERs). Pola ekspresi gen ini dikenal sebagai tipe laten I, kemungkinan digunakan oleh virus untuk menghindarkan diri dari sistem imun seperti pada transplantasi organ dan AIDS. Sel yang terinfeksi EBV dapat mengadakan proliferasi secara tak terkendali dan mengekspresikan sejumlah protein laten virus. EBNA-2 dan LMP-1 mempunyai pengaruh besar pada proses transformasi sel. Akhirnya ini diketahui bahwa EBNA-1 berperan juga pada proses tersebut.^{8,9}

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi EBNA-1 pada limfoma non-Hodgkin pada berbagai variasi jenis serta lokasi nodal dan ekstranodal limfoma non-Hodgkin sel B.

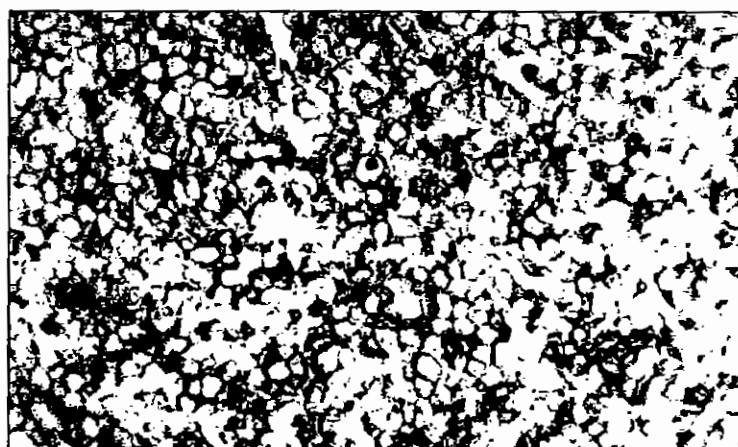
BAHAN DAN CARA

Penelitian dilakukan secara retrospektif dengan menggunakan sediaan kasus-kasus limfoma non-Hodgkin sel B jenis *diffuse large B cell* dan *small lymphocytic lymphoma* tipe nodal dan ekstranodal sebanyak 30 kasus di Bagian Patologi anatomi FK UGM. Setiap kasus yang didapat dievaluasi lagi,

dibuat sediaan baru dari blok parafin yang masih tersedia untuk pengecatan Hematoksin-eosin dan dilakukan penggolongan kasus terhadap limfoma sel B jenis *diffuse large B cell* dan *small lymphocytic lymphoma* tipe nodal dan ektranodal. Masing-masing sediaan dari blok parafin yang sama dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom, dideparafinisasi dengan xylol dan alkohol. Selanjutnya dilakukan pengecatan imunohistokimia CD 20 dan EBNA-1. Ekspresi positif CD 20 terlihat sebagai granula coklat pada membran sel, sedangkan ekspresi positif EBNA-1 terlihat sebagai granula coklat pada inti sel. Perbedaan ekspresi EBNA-1 positif pada *diffuse large B cell* dengan *small lymphocytic lymphoma* dan perbedaan ekspresi EBNA-1 positif pada limfoma sel B tipe nodal dan ektranodal dianalisis dengan *chi square*.

HASIL PENELITIAN

Dari 35 kasus yang didiagnosis secara histopatologi dengan pulasan rutin Hematoksin-eosin sebagai limfoma non-Hodgkin sel B diperiksa ulang dengan pulasan imunohistokimia CD 20. Ekspresi CD 20 dinyatakan positif bila dijumpai granula coklat pada membran sel-sel tumor (GAMBAR 1). Tigapuluh kasus ditetapkan sebagai *diffuse large B cell lymphoma* (DLBL) dan 5 sebagai *small lymphocytic lymphoma* (SLCC). Dari kasus-kasus *diffuse large B cell lymphoma*, 20 kasus merupakan tipe nodal, sedangkan 4 kasus *small lymphocytic lymphoma* terdapat pada lokasi ektranodal (TABEL 1).



GAMBAR 1. Ekspresi CD 20 terlihat sebagai granula coklat pada membran sitoplasma sel (400x)



GAMBAR 2. Ekspresi EBNA-1 positif terlihat sebagai granula coklat pada inti sel (400 X)

TABEL 1. Jumlah kasus berdasar tipe histologis dan status EBNA

		Status EBNA		Total
		negatif	positif	
tipe histologis	large cell	17	13	30
	small cell	2	3	5
Total		19	16	35

TABEL 2. Jumlah kasus berdasarkan lokasi dan status EBNA

		Status		Total
		Negatif	Positif	
Lokasi	Nodal	13	5	18
	Ekstranodal	6	11	17
Total		19	16	35

Ekspresi EBNA-1 positif didapatkan pada 16 kasus (46%). Ekspresi EBNA-1 dinyatakan positif bila dijumpai granula coklat pada inti sel (GAMBAR 2). Tigabelas kasus termasuk *diffuse large B cell lymphoma* dan 3 kasus merupakan *small lymphocytic lymphoma*. Pada tipe nodal, ekspresi EBNA-1 positif didapatkan pada 5 kasus, sedangkan tipe ekstranodal dengan EBNA-1 dijumpai pada 11 kasus (TABEL 2).

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, ekspresi EBNA positif dijumpai pada 16 kasus (46%). Hasil penelitian terdahulu terhadap ekspresi berbagai protein laten EBV maupun EBNA-1 menunjukkan frekuensi yang bervariasi. Dengan metoda PCR, Kim *et al*¹⁰ mendapatkan ekspresi EBNA-1 57% sedangkan ekspresi LMP-1 sebagai salah satu jenis protein laten EBV yang lain dijumpai pada 30% kasus *diffuse large B cell lymphoma* pada anak.¹¹ Peneliti lain mendapatkan EBER positif sebesar 19% dari 26 kasus limfoma sel B pada usus.⁶ Perbedaan hasil tersebut kemungkinan disebabkan perbedaan metoda maupun jenis antibodi yang dipakai.

Peranan EBV maupun EBNA-1 pada patogenesis limfoma non-Hodgkin sel B belum diketahui dengan pasti. Limfoma non-Hodgkin yang berhubungan dengan infeksi EBV terjadi pada penderita imunokompromais. Pada penderita tersebut, terjadi deregulasi sel T, yang pada keadaan

normal akan melakukan kontrol terhadap infeksi EBV laten.^{4,12}

EBNA-1 merupakan protein terikat DNA yang dibutuhkan untuk replikasi dan pemeliharaan episom genom EBV. Protein EBNA-1 mengandung suatu rangkaian *glycine-glycine-alanine (Gyl-Gyl-Ala)* dengan ukuran bervariasi.⁵ Domain tersebut merupakan suatu *cis-acting inhibitor* yang menghalangi presentasi MHC class I dengan menghambat prosesing antigen melalui jalur ubiquitin-proteosome. Kegagalan presentasi peptida EBNA-1 menyebabkan sel T CD8 + tidak dapat berperan secara efektif.¹³

EBNA-1 adalah satu-satunya gen penyandi protein laten yang secara konsisten terekspresi pada sel *Burkit Lymphoma* endemik.¹⁴ Meskipun EBNA-1 bukan merupakan onkogen utama EBV¹⁵, beberapa peneliti mengemukakan bahwa protein tersebut secara bermakna meningkatkan efisiensi proses imortalisasi sel B dan *tumorigenecity* dari EBV.¹⁶

Infeksi EBV pada manusia terjadi karena penularan secara oral. Virus EBV mengadakan replikasi pada sel orofaring. Meskipun penelitian terdahulu melaporkan bahwa replikasi virus terjadi pada sel epitel orofaring, peneliti lain mengemukakan bahwa sel B pada orofaring merupakan lokasi primer infeksi tersebut. Setelah infeksi primer, EBV menetap sebagai infeksi laten pada sel B.⁷

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan bermakna antara banyaknya jumlah kasus dengan

ekspresi EBNA-1 positif pada limfoma non-Hodgkin sel B tipe ekstranodal (65%) dibanding jumlah kasus dengan ekspresi EBNA-1 positif pada limfoma non-Hodgkin sel B tipe nodal (27 %) dengan $p < 0,05$. Limfoma non-Hodgkin yang berhubungan dengan virus EBV pada penderita gangguan primer imun lebih banyak terjadi pada lokasi ekstranodal.⁴

Kecenderungan lokasi ekstranodal tersebut di antaranya disebabkan oleh perbedaan reseptor *chemokine* pada sel B yang terinfeksi EBV.¹⁷ Dibandingkan sel B darah perifer yang lain, sel B yang terinfeksi EBV mengekspresikan CCR6 dan CLR 10 lebih tinggi serta CXCR4 dan CXCR5 lebih rendah.¹⁸ CCR6 merupakan reseptor untuk CARL/CCL20 yang diekspresikan oleh sel epitel mukosa dan keratinosit epidermal. CLR 10 merupakan reseptor untuk ILC/CTACK/CCL27 dan MEC/CCL28.^{19,20} ILC diekspresikan oleh keratinosit epidermal dan MEC diekspresikan oleh sel epitel mukosa tertentu seperti kelenjar ludah dan kolon.²¹ Oleh karena itu tingginya ekspresi CCR6 dan CLR10 pada sel B yang terinfeksi EBV akan meningkatkan kecenderungan migrasi sel tersebut pada lapisan mukosa jaringan.

Meskipun tidak disertai data yang jelas, beberapa ahli mengemukakan bahwa infeksi EBV banyak dijumpai pada *diffuse large B cell lymphoma* terutama tipe imunoblastik. Dari 3 kasus *diffuse large B cell lymphoma* imunoblastik pada penelitian ini, 2 kasus di antaranya menunjukkan ekspresi EBNA-1 positif. Walaupun demikian, pada penelitian ini tidak didapatkan perbedaan bermakna antara jumlah kasus dengan ekspresi EBNA-1 pada *diffuse large B cell lymphoma* dibanding jumlah kasus dengan ekspresi EBNA-1 pada *small lymphocytic lymphoma* ($p > 0,05$). Hal ini kemungkinan disebabkan karena sedikitnya jumlah kasus *small lymphocytic lymphoma*. Di samping itu, dari 5 kasus *small lymphocytic lymphoma* yang dijumpai, 4 kasus di antaranya terdapat pada lokasi ekstranodal.

SIMPULAN

Didapatkan perbedaan bermakna antara jumlah kasus dengan ekspresi EBNA-1 positif pada limfoma non-Hodgkin sel B tipe nodal dibanding jumlah kasus dengan ekspresi EBNA-1 positif pada limfoma non-Hodgkin sel B ekstranodal

SARAN

Perlu dilakukan pelacakan lebih lanjut terhadap gangguan sistem imun pada kasus-kasus limfoma non-Hodgkin dengan ekspresi EBNA-1 positif

KEPUSTAKAAN

1. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic Pathology : 6th ed. W.B. Saunders Company, 1997
2. Armitage JO. The changing classification of non-Hodgkin lymphoma. CA Cancer J Clin 1997; 47 : 323-25
3. Mason DY, Harris NL. Human Lymphoma : Clinical Implications of The REAL Classification. Springer, 1999
4. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues in WHO Classification of Tumours. IARC Press, 2001
5. Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication in Field BN, Knipe DM, Howley PM, Editors. Fields Virology. 3th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996
6. Quintanilla L, Maldonado CL, Ott G, Gschwendtner A. Primary non-Hodgkin lymphoma of the intestine : High prevalence of Epstein-Barr virus in Mexican Lymphomas as compared with European cases. Blood 1997 ; 89(2) : 644-51
7. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med 2000 ; 348 : 481-92
8. Murray PG, Young LS. Themed issue : the biology and pathology of the Epstein-Barr virus. J Clin Pathol 2000; 53 : 219-21
9. Young L, Alfieri C, Henessy K, Evans H, O'Hara C, Anderson KC, et al. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. N Engl J Med 1989 ; 321 : 1080-85
10. Kim I, Park ER, Park SH, Lin Z, Kim YS. Characteristics of Epstein-Barr virus isolated from the malignant lymphomas in Korea. J Med Virol 2002 ; 67 (1) : 59-66
11. Chabay PA, De Matteo EN, Aversa L, Maglio S, Grinstein S, Preciado MV. Assessment of Epstein-Barr virus association with pediatric non-Hodgkin lymphoma in immunocompetent and in immunocompromised patients in Argentina. Arch Pathol Lab Med 2002 ; 126 : 331-35
12. van baarle D, Kostense S, van Oers MHJ, Hamann D, Miedema F. Failing immune control as a result of impaired CD8+ T-cell maturation : CD27 might provide a clue. Trends in immunology 2002 ; 23 (12) : 586-91
13. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G. et al. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. Nature 375 : 685-88, PubMed
14. Wilson JB, Bell JL, Levine AJ. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. EMBO J 1996; 15 (12) : 3117-26
15. Kang Ms, Hung SC, Kieff E. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 activates transcription from episomal but not

- integrated DNA and does not alter lymphocyte growth. PNAS 2001 ; 989 (26) : 15233-15238
16. Humme S, Reisbach G, Feederle R, Delecluse HJ, Bousset K, Hammerschmidt W, Schepers A. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. PNAS 2003; 100 (19) : 10989-10994
 17. Bowman EP, Campbell JJ, Soler D, Dong Z, Manlongat N, Picarella D, *et al.* Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. J Exp Med 2000; 191 : 1303-18
 18. Nakayama T, Fujisawa R, Izawa D, Hieshima K, Takada K, Yoshie O. Human B cells immortalized with Epstein-Barr virus upregulate CCR6 and CCR10 and downregulate CXCR4 and CXCR5. J Virol 2002; 76 (6): 3072-77
 19. Nakayama T, Fujisawa R, Yamada H, Horikawa T, Kawasaki H, *et al.* Inducible expression of a CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3./CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. Int Immunol 2001; 13 : 95-103
 20. Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiya H, *et al.* Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and human. Eur J Immunol 1999; 29: 33-642
 21. Pan J, Kunkel EJ, Gossler U, Lazarus N, Langdon P, Broadwell K, *et al.* A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. J Immunol 2000; 165 : 2943-49