

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA” BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ**

**VARIABILITATEA MORFOLOGICĂ ȘI  
IMUNOFENOTIPICĂ  
A LIMFOAMELOR NON-HODGKIN CU CELULĂ B DE  
GRAD ÎNALT**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**CONF. UNIV. HABIL. DR. CEAUȘU MIHAIL CONSTANTIN**

**Student - doctorand:**

**HALCU GEORGIAN**



## Cuprinsul tezei de doctorat

<b>Partea generală .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Introducere .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Limfocitul B .....</b>	<b>13</b>
2.1. Limfocitul B - căi de semnalizare și micromediu.....	13
<b>3. Limfom non-Hodgkin cu celulă mare B – noutăți în clasificare .....</b>	<b>16</b>
3.1. Evoluția clasificării limfomului non-Hodgkin cu celulă mare B .....	16
3.2. Limfom difuz cu celulă mare B, NOS (DLBCL, NOS) .....	18
3.3. Limfom cu celulă mare B, bogat în histiocite/limfocite T (THR-LBCL) .....	19
3.4. Limfom difuz cu celulă mare B/ Limfom cu celulă B de grad înalt cu rearanjamente MYC și BCL2 (DLBCL/HGBL-MYC/BCL2).....	20
3.5. Limfom cu celulă mare B, ALK-pozitiv (ALK+ LBCL) .....	21
3.6. Limfom cu celulă mare B cu rearanjamente IRF4 (IRF4-LBCL) .....	21
3.7. Limfom cu celulă B de grad înalt cu aberații 11q (HGBL – 11q).....	22
3.8. Granulomatoză limfomatoidă (LYG) .....	22
3.9. Limfom difuz cu celulă mare B, EBV-pozitiv (EBV-DLBCL) .....	23
3.10. Limfom difuz cu celulă mare B, asociat inflamației cronice (CI-DLBCL).....	24
3.11. Limfom cu celulă mare B, asociat fibrinei (FA-LBCL).....	25
3.12. Limfom cu celulă mare B, asociat epanșamentelor lichidiene (FO-LBCL).....	26
3.13. Limfom plasmablastic (PBL) .....	27
3.14. Limfom cu celulă mare B, primar al situsurilor imunoprotejate .....	28
3.15. Limfom difuz cu celulă mare B, primar cutanat al gambei (PCLBCL-LT) .....	29
3.16. Limfom cu celulă mare B intravasculare (IV-LBCL) .....	29
3.17. Limfom cu celulă mare B primar mediastinal (PMBCL).....	30

3.18.	Limfom cu celulă B mediastinal de zonă gri (MGZL).....	31
3.19.	Limfom cu celulă B de grad înalt NOS (HGBL NOS).....	31
<b>4.</b>	<b>Elemente de biologie moleculară și citogenetică în limfomul non-Hodgkin cu celulă mare B.....</b>	<b>34</b>
4.1.	Subtipuri moleculare ale DLBCL.....	34
4.2.	Alterări genetice și citogenetice în DLBCL .....	34
4.3.	Translocații cromozomiale .....	35
4.4.	Mutații genetice .....	35
4.5.	Tehnici de investigare moleculară și citogenetică.....	35
4.6.	Implicații clinice și terapeutice.....	35
	<b>Partea originală.....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>Ipoteza de lucru și obiective generale.....</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>Metodologia generală a cercetării.....</b>	<b>40</b>
6.1.	Colectarea probelor și construirea blocurilor de tip tissue micro-array (TMA)..	41
6.2.	Examenul imunohistochimic .....	43
6.3.	Analiza statistică.....	44
<b>7.</b>	<b>De la biopsie la diagnostic: Limfomul cu celulă mare B în practică .....</b>	<b>46</b>
7.1.	Introducere.....	46
7.2.	Limfom, carcinom, melanom sau sarcom – care sunt diferențele? .....	46
7.3.	Limfom non-Hodgkin cu celulă B, cu celulă T sau Limfom Hodgkin.....	48
7.4.	Pattern de creștere și elemente histologice .....	49
7.5.	Evaluarea morfologică.....	50
7.6.	Proliferările cu celulă B de talie medie .....	53
7.7.	Fenotipul de centru germinativ.....	54
7.8.	Algoritmul Hans .....	55
7.9.	Limfoamele cu celulă B de tip dublu expresor.....	56
7.10.	Indice de proliferare Ki67.....	57

7.11. Discuții.....	60
<b>8. Evaluarea expresiei BCL2, c-MYC și Ki67 în limfomul non-Hodgkin cu celulă B de grad înalt .....</b>	<b>61</b>
8.1. Introducere.....	61
8.2. Materiale și metode .....	62
8.3. Pacienți .....	62
8.4. Examen microscopic și imunohistochimic .....	63
8.5. Analiza statistică.....	67
8.6. Rezultate .....	67
8.7. Caracteristicile pacienților .....	67
8.8. Supraviețuirea globală și corelațiile cu cu markerii biologici .....	71
8.9. Discuții.....	75
<b>9. Expresia PDL-1, PD-1 și micromediul în limfomul non-Hodgkin cu celulă B agresiv .....</b>	<b>79</b>
9.1. Introducere.....	79
9.2. Materiale și metode .....	80
9.3. Rezultate .....	87
9.4. Discuții.....	92
<b>10. Concluzii și contribuții personale.....</b>	<b>97</b>
10.1. Concluzii.....	97
10.2. Contribuții personale .....	17
<b>Bibliografie .....</b>	<b>101</b>

## I. Problema fundamentală

În ciuda progreselor semnificative din ultimele decenii în domeniul oncologiei și hemato-oncologiei, anumite tipuri de neoplazii hematologice, în special limfoamele non-Hodgkin agresive cu celulă B, rămân insuficient înțelese – mai ales pe plan național [1]. Această patologie, caracterizată prin agresivitate biologică și o evoluție rapidă, ridică probleme majore legate de diagnostic, tratament și prognostic, fiind o provocare reală de sănătate publică[1].

La nivel global, limfoamele non-Hodgkin reprezintă cele mai frecvente malignități hematologice ale adultului, iar tipul cu celulă B de grad înalt este cel mai răspândit, cu un impact disproporționat față de frecvența sa. Deși reprezintă doar 3–4% din totalul cancerelor, ele se regăsesc în topul primelor zece tipuri de neoplazii maligne și contribuie semnificativ la mortalitatea oncologică – de exemplu, ocupând locul 7 în SUA ca incidență și locul 9 ca mortalitate. În Europa, incidența variază între 3,8–5 cazuri la 100.000 locuitori anual, dar aceste date sunt influențate de factori demografici, genetici și de accesul inegal la servicii de sănătate.

În România, lipsa unui registru național funcțional pentru limfoamele non-Hodgkin generează un deficit critic de informații epidemiologice[2]. Cazurile raportate sunt incomplete, iar accesul la date centralizate lipsește. Conform Globocan 2020, România înregistra aproximativ 1900 de cazuri noi de limfoame non-Hodgkin anual, cu aproape 800 de decese, însă aceste cifre sunt probabil subestimate. În lipsa unor date solide, planificarea serviciilor medicale, cercetarea și strategiile de prevenție sunt grav afectate.

O problemă agravantă este diagnosticarea tardivă, majoritatea pacienților ajung în stadii avansate, în parte din cauza lipsei de instruire a medicilor din rețeaua primară și a accesului limitat la investigații specializate. În plus, limfoamele B de grad înalt prezintă o diversitate morfologică și imunofenotipică notabilă, care complică semnificativ diagnosticul histopatologic și clasificarea. Diferențele de expresie ale markerilor BCL2, MYC, Ki67, dar și ale celor din microambientul tumoral (PD-1, PDL-1, limfocite T CD4, limfocite T CD8 și macrofage CD68), influențează prognosticul și răspunsul la tratament[3].

În România, testele avansate de biologie moleculară și citogenetică sunt limitate ca disponibilitate, afectând atât activitatea diagnostică curentă din laboratoare, cât și capacitatea

de cercetare[4, 5]. Acest lucru se traduce într-un diagnostic uneori incomplet sau inexact și într-o imposibilitate de personalizare eficientă a tratamentului[6, 7].

Lucrarea de față pornește de la ipoteza că variabilitatea morfologică și mai ales imunofenotipică a limfomului non-Hodgkin cu celulă B are o valoare predictivă semnificativă asupra evoluției clinice și a răspunsului la tratament. Studiul se axează pe corelarea aspectelor histologice și imunohistochimice (BCL2, MYC, Ki67) cu datele clinico-evolutive, urmărind definirea de subgrupuri distincte cu semnificație prognostică[8].

O direcție complementară este explorarea relației dintre expresia markerilor de checkpoint imun (PDL-1, PD-1) și infiltratul de celule imune non-tumorale (limfocite T, macrofage) din microambientul tumoral, cu scopul de a înțelege mai bine mecanismele de evaziune imună și posibilele ținte terapeutice[9].

Obiectivul major al tezei este generarea de date relevante în contextul românesc, care să contribuie la rafinarea diagnosticului histopatologic, la identificarea de markeri cu valoare prognostică și, în final, la îmbunătățirea tratamentului personalizat pentru acești pacienți[10].

Această cercetare răspunde unei nevoi reale și acute ce vrea reducerea decalajului de cunoaștere din hemato-oncologia românească. Prin integrarea analizelor morfologice, imunohistochimice și clinice, lucrarea propune un model aplicabil în practica medicală curentă, cu potențial de a crește rata de diagnostic precoce, acuratețea clasificării și eficiența tratamentului. În plus, contribuie la înțelegerea diversității biologice a limfoamelor non-Hodgkin cu celulă B de grad înalt și susține eforturile de aliniere a sistemului medical românesc la standardele internaționale.

## II. Ipoteza de lucru și obiectivele generale ale cercetării

Variabilitatea morfologică și imunohistochimică a limfoamelor non-Hodgkin cu celulă mare B reflectă heterogenitatea biologică a acestei entități și se corelează semnificativ cu profilul molecular, subtipul celular și comportamentul clinic al tumorii[11-16]. Caracterizarea detaliată a acestor aspecte poate contribui la o clasificare mai precisă, la stratificarea prognostică a pacienților și la alegerea unui tratament personalizat.

Prezenta teză își propune să investigheze variabilitatea morfologică și imunofenotipică a acestor neoplazii, îmbinând observațiile clinico-patologice cu analizele moderne pentru a obține o imagine de ansamblu cât mai completă asupra bolii. Abordând o temă până acum insuficient explorată pe plan autohton, am urmărit să obținem date valoroase care să contribuie la dezvoltarea unor metode de diagnostic mai precise și a unor strategii terapeutice mai eficiente.

Plecăm de la premisa că limfomul non-Hodgkin cu celulă B mare, cea mai frecventă formă de limfom non-Hodgkin cu celulă B agresiv, prezintă o heterogenitate morfologică, imunofenotipică și moleculară considerabilă, care influențează profund comportamentul biologic al tumorii, răspunsul la tratament și prognosticul pacientului. Această diversitate poate fi investigată și înțeleasă prin analiza integrativă a caracteristicilor histopatologice clasice, a profilului de expresie imunohistochimic și a subtipajului molecular. În sprijinul acestor elemente, vine primul studiu, care pune în context actual, conform clasificării recente a tumorilor hematopoietice și limfoide, din 2022 a Organizației Mondiale a Sănătății, pleiada de subtipuri de limfom non-Hodgkin cu celulă B agresive[17].

În contextul diagnosticului și evaluării factorilor de histoprognoză, principala ipoteză de lucru s-a concretizat în studiul al doilea de cercetare, centrat pe evaluarea expresiei markerilor imunohistochimici C-MYC, BCL2 și Ki67, coroborat cu analiza detaliată a arhitecturii tisulare și a trăsăturilor citologice ale celulelor tumorale. Astfel am urmărit să vedem cât de multe indicii valoroase pot furniza aceste elemente, pentru încadrarea precisă a tumorii într-o anumită categorie prognostică și pentru orientarea către o strategie terapeutică personalizată[18-21].

Un alt punct important l-a reprezentat analiza expresiei moleculelor imunoreglatoare PD-1 și PDL-1 în micromediul tumoral al limfomului non-Hodgkin cu celulă mare B. Pentru aceasta, în studiul al treilea, am vrut să vedem dacă expresie alterată a axei PD-1/PDL-1 se corelează cu prezența diferențiată a limfocitelor T helper (CD4<sup>+</sup>), T citotoxice (CD8<sup>+</sup>) și a



macrofagelor (CD68<sup>+</sup>) în microambientul tumoral, dar și dacă anumite subtipuri morfologice de limfom cu celulă mare B se asociază sau nu cu expresia acestor molecule de tip check - point. Ipoteză pleacă de la ideea că tumorile maligne hematologice pot utiliza mecanisme de evaziune imună prin inhibarea funcției limfocitare, iar expresia PD-1 pe limfocite T și a ligandului său PDL-1 pe celulele tumorale sau pe alte celule ale micromediului contribuie la menținerea unui status imun supresiv. Mai mult, distribuția și densitatea celulelor CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> și CD68<sup>+</sup> pot reflecta activitatea imună locală și gradul de inflamație tumorală, având potențial valoare prognostică[3, 10, 22-24].

Prin urmare, caracterizarea acestor markeri în cazul limfomului non-Hodgkin cu celulă mare B poate oferi informații importante privind mecanismele de progresie tumorală, corelații cu răspunsul la tratament și noi oportunități terapeutice, în special în ceea ce privește imunoterapia anti-PD-1/PDL-1.

De asemenea am urmărit să evaluăm semnificația prognostică a caracteristicilor histologice și imunohistochimice identificate, în raport cu parametrii clinici și evoluția bolii; ceea ce ar putea permite elaborarea unui model integrativ de evaluare diagnostică bazat pe morfologie și imunofenotip, care să sprijine practica medicală curentă în stratificarea riscului și în orientarea tratamentului personalizat pentru pacienții cu limfom.

### III. Metodologia generală a cercetării

Această cercetare este de tip retrospectiv și a inclus 66 de pacienți adulți diagnosticați cu limfom non-Hodgkin cu celulă mare B, tratați în perioada 2017–2024 în cadrul Spitalului Clinic Colțea București (secțiile de Anatomie Patologică și Hematologie). Studiul a fost realizat cu acordul Comitetului de Etică (nr. 8541/15.05.2020).

Datele au fost extrase din bazele de date informatice ale spitalului (InfoWorld și Hipocrat) și completate cu informații clinice din dosarele fizice și electronice. Criteriile de includere au presupus: diagnostic confirmat de DLBCL, investigații imunohistochimice complete și dosar medical complet. Au fost excluși pacienții cu alte tipuri de limfom B specific (ex. Burkitt, SNC, mediastinal), HIV/SIDA netratat corespunzător, transplant de organ, tumori solide sau comorbidități severe.

Inițial au fost identificate 125 de cazuri, dar după aplicarea criteriilor de excludere au fost păstrate 66. Pentru aceste cazuri s-a construit o bază de date cu parametri clinici, patologici și imunofenotipici, inclusiv scor Ann-Arbor, LDH, IPI și tratament.

Probele tumorale (blocuri de parafină) au fost recuperate din arhiva de anatomie patologică, secționate, colorate HE și revizuite pentru calitatea țesutului. Au fost selectate zone tumorale reprezentative, evitând necroza și artefactele.

Pentru standardizarea analizei, s-au construit 4 blocuri tissue micro-array, fiecare conținând câte două carote tisulare (2 mm) de la fiecare pacient. Extracția și montajul carotelor au fost realizate cu ajutorul echipei de la Institutul Național „Victor Babeș”, utilizând sistemul semiautomat TMA Master II (3D-HISTECH).

Carotele tisulare au fost fixate în blocurile receptoare și stabilizate prin încălzire ușoară a parafinei, apoi răcite pentru secționare. Din fiecare bloc TMA s-au realizat secțiuni seriate de 3–4 μm, utilizând un microtom. Secțiunile au fost montate pe lame adezive (SuperFrost Plus), marcate conform grilei de poziționare și utilizate pentru analiza imunohistochimică.

Pentru orientare și controlul calității, fiecare bloc TMA a inclus o carotă de control pozitiv și una de orientare (țesut amigdalian și o carotă goală). Blocurile au fost verificate pentru integritatea carotelor, poziționarea corectă și calitatea secțiunilor histologice.

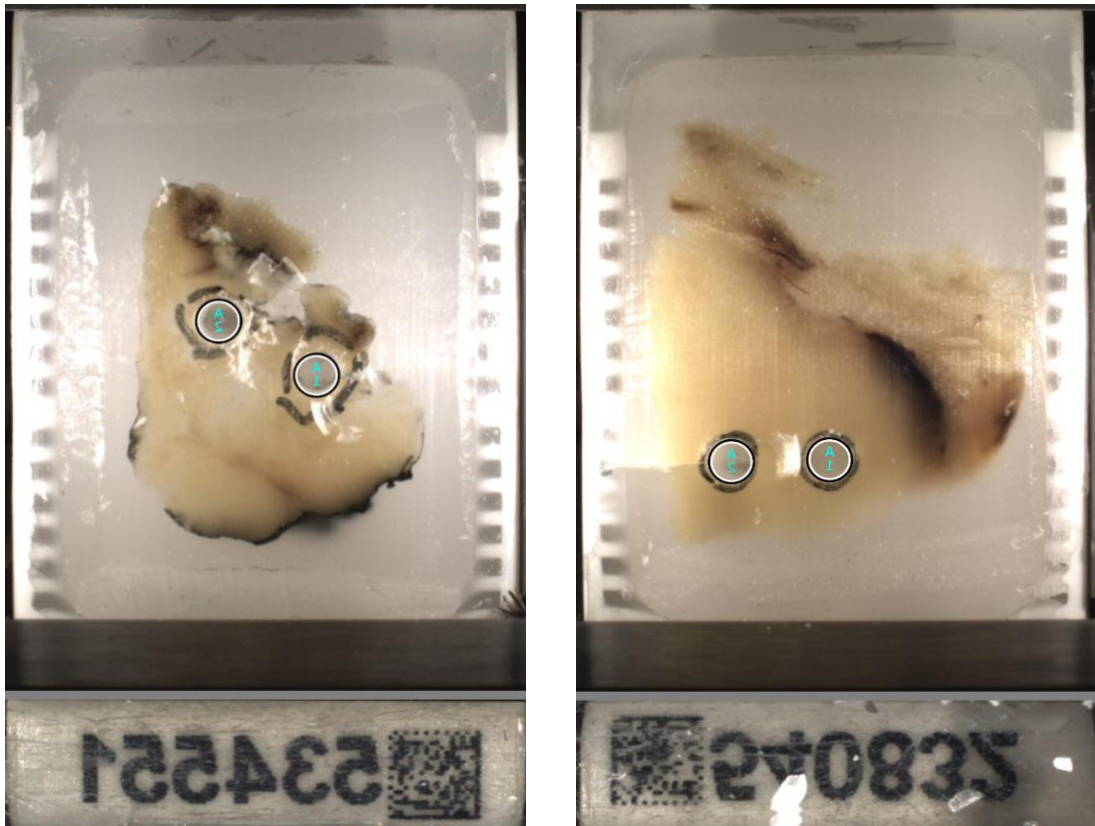


Fig. 3.1 Blocuri donor cu zonele selectate pentru extracția carotelor



Fig. 3.2 Blocuri TMA obținute

### **III.1 Examenul imunohistochimic**

Pentru analiza expresiei proteinelor țintă, s-a utilizat imunohistochimia automatizată pe platforma Ventana BenchMark ULTRA (Roche Diagnostics), care asigură standardizare și reproductibilitate ridicată. Secțiunile de 3–4 μm din blocurile TMA au fost montate pe lame SuperFrost Plus și incubate la 60°C timp de 1 oră.

Procedura IHC a inclus: deparafinare și rehidratare automată, recuperare antigenică (Ultra CC1, 95–100°C), blocarea peroxidazei endogene, incubarea cu anticorpi primari la 37°C și detecția cu truse OptiView sau ultraView DAB, urmată de contracolorare cu hematoxilină. La final, lamele au fost spălate, deshidratate și montate.

Pentru fiecare anticorp s-au utilizat controale externe pozitive și negative. Lamele au fost ulterior evaluate morfologic, scorificate și înregistrate în baza de date.

### **III.2 Analiza statistică**

Analiza statistică a fost realizată utilizând programul IBM SPSS Statistics versiunea 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, SUA). Valorile  $p < 0,05$  au fost considerate semnificative statistic.

Datele au fost clasificate în date categorice (nominale sau ordinale), exprimate prin frecvențe și procente, date continue (numerice), exprimate prin media  $\pm$  deviația standard (SD) pentru distribuții normale sau prin mediana și intervalul intercuartil (IQR) pentru distribuții non-normale.

Pentru asocierea între variabile categorice, s-a utilizat testul Fisher exact, în funcție de frecvențele așteptate.

Pentru evaluarea diferențelor în supraviețuirea globală (overall survival, OS) între grupuri, în funcție de factorii analizați, au fost utilizate analize Kaplan–Meier. Supraviețuirea globală a fost estimată sub formă de medie sau mediană, după caz, fiind însoțită de intervale de încredere de 95% și de rata de supraviețuire la 3 ani. Diferențele dintre grupuri au fost testate statistic prin testul Log-Rank.

Pentru analiza riscului de mortalitate, s-au aplicat modele de regresie Cox cu hazard proporțional, atât în analize univariate, cât și multivariate. Efectul fiecărei variabile a fost exprimat prin raportul de hazard (hazard ratio – HR), cu prezentarea intervalului de încredere de 95% și a valorii  $p$  corespunzătoare. Modelele au fost testate pentru adecvanța ajustării (goodness-of-fit) și semnificația statistică.

## **IV. Sinteza studiilor de cercetare științifică (partea specială)**

### **IV.1 De la biopsie la diagnostic: Limfomul cu celulă mare B în practică**

Diagnosticul limfomului non-Hodgkin cu celulă mare B de grad înalt implică o abordare complexă, întrucât aceste neoplazii pot imita alte tipuri de tumori solide sau hematologice. Pornind de la ghidurile OMS (HAEM5), am dezvoltat un algoritm diagnostic aplicabil în rutina curentă, cu accent pe diferențierea între limfoame, carcinoame, sarcoame și melanoame, în pasul inițial. Procesul începe cu evaluarea morfologică, completată de panouri imunohistochimice. Markerii esențiali precum CD45, CD20, CD3, CD79a și PAX5 sunt utilizați pentru a stabili linia celulară, mai ales în cazurile de limfoame B CD20-negative. Se acordă atenție deosebită și limfoamelor de tip plasmablastic sau ALK-pozitiv, care pot necesita markerii suplimentari precum CD138, ALK-1 și MUM1. Testele genetice (FISH) sunt cruciale pentru identificarea limfoamelor cu rearanjamente MYC, BCL2 și BCL6 (dublu sau triplu hit), însă știm că pentru contextul național, nu sunt încă suficient de ușor de accesat.

Evaluarea tiparului de creștere (nodular vs. difuz), a arhitecturii și a dimensiunii celulare contribuie la diagnosticul diferențial între DLBCL, limfomul Burkitt, cel limfoblastic B, limfomul cu celule de manta și formele agresive cu caracteristici intermediare. Indicele de proliferare Ki-67 este un parametru esențial, reflectând agresivitatea tumorii și ajutând la diferențierea de limfoamele indolente.

Clasificarea subtipurilor de limfom cu celulă B agresive este susținută de algoritmul Hans, care utilizează markerii CD10, BCL6 și MUM1 pentru a diferenția fenotipul de tip centru germinativ (GCB) de cel activat (ABC), fiecare cu implicații terapeutice distincte. De asemenea, markerii BCL2 și c-MYC permit identificarea limfoamelor cu expresie dublă, asociate cu prognostic rezervat.

În concluzie, diagnosticul limfoamelor B de grad înalt necesită integrarea riguroasă a datelor morfologice, imunofenotipice și genetice. Algoritmii moderni și panelurile extinse de markerii cresc semnificativ acuratețea diagnosticului și permit individualizarea tratamentului, contribuind astfel la îmbunătățirea prognosticului pacienților.

## **IV.2 Evaluarea expresiei BCL2, c-MYC și Ki67 în limfomul non-Hodgkin cu celulă B agresiv**

Studiul al doilea de cercetare a inclus 66 de pacienți diagnosticați cu limfom difuz cu celulă mare B, cu o vârstă mediană de 61,8 ani și o predominanță masculină (59,1%). Aplicarea algoritmului Hans a evidențiat o predominanță a subtipului ABC (65,2%). Expresia markerilor biologici a arătat o pozitivitate pentru BCL-2 în 57,6% dintre cazuri, pentru BCL-6 în 65,2%, și pentru C-MYC în 7,6%. De asemenea, 65,2% dintre pacienți au prezentat un indice de proliferare Ki-67  $\geq 75\%$ .

Expresiile multiple (dublă sau triplă) ale markerilor C-MYC, BCL-2 și BCL-6 au fost prezente în doar 7,6% din cazuri. Subtipul GCB a fost semnificativ asociat cu expresia C-MYC, în timp ce subtipul ABC a fost predominant în cazurile negative pentru acest marker. Nu s-au identificat corelații semnificative între expresia markerilor C-MYC, BCL-2 sau Ki-67 și alte caracteristici clinice precum vârsta, sexul, stadiul bolii sau scorul IPI.

Supraviețuirea globală mediană (OS) a fost de 48 luni, cu o rată de supraviețuire la 3 ani de 54,5%. Expresia C-MYC și a scorului IPI nu au influențat semnificativ supraviețuirea. În schimb, expresia BCL-2 a sugerat o tendință de supraviețuire redusă, iar un Ki-67  $\geq 75\%$  s-a corelat semnificativ cu o supraviețuire mai scăzută ( $p < 0,001$ ). Pacienții cu Ki-67 crescut au avut o medie de supraviețuire de 39 luni comparativ cu 76 luni pentru cei cu expresie sub 75%.

De asemenea, vârsta  $\geq 60$  ani s-a asociat cu o supraviețuire semnificativ mai mică (41 vs. 68 luni,  $p = 0,010$ ). Singurul caz cu expresie dublă C-MYC/BCL-2 a avut o supraviețuire de 1 lună, ceea ce, deși statistic semnificativ ( $p < 0,001$ ), are relevanță limitată din cauza numărului mic de cazuri.

Analiza predictivă a mortalității a arătat că doar vârsta  $> 60$  ani și expresia ridicată a Ki-67 au fost predictori independenți semnificativi ( $p < 0,05$ ), cu riscuri de deces crescute de 2,36, respectiv 3,89 ori.

### **IV.3 Expresia PDL-1, PD-1 și micromediul în limfomul non-Hodgkin cu celulă B agresiv**

Cel de-al treilea studiu s-a desfășurat pe baza aceluiași eșantion de pacienți, dar cu ajutorul blocurilor multi-tisulare am lucrat markerii imunohistochimici PD-L1, PD-1, CD68, CD4 și CD8.

Expresia PD-L1 a fost observată în celulele tumorale în 6 cazuri (9,1%) – cu un singur caz peste 50% și cinci peste 1%. La nivelul celulelor imune stromale, 39 de cazuri (59%) au prezentat expresie pozitivă. Pentru PD-1, 7,6% dintre pacienți au avut expresie în celulele tumorale, iar 40,9% în celulele stromale. Markerii CD68, CD4 și CD8 au fost pozitivi în 23, 34, respectiv 14 cazuri.

Analiza statistică nu a evidențiat corelații semnificative între expresia PD-1 și majoritatea parametrilor clinici (vârstă, stadiu, scor IPI), cu excepția sexului: femeile au avut o expresie PD-1 semnificativ mai mare la nivelul celulelor imune (55,6% față de 30,8%,  $p=0,044$ ). În cazul PD-L1, expresia în celulele tumorale s-a asociat semnificativ cu morfologia ( $p=0,015$ ): limfoamele anaplazice au fost mai frecvent pozitive, iar cele centroblastice, negative.

Expresia markerilor CD68, CD4 și CD8 nu a arătat corelații statistice semnificative cu parametrii clinici, cu două excepții notabile. CD68 s-a asociat semnificativ cu stadiul Ann Arbor ( $p=0,040$ ), fiind mai frecvent exprimat în stadiile I–II. De asemenea, expresia CD68 a fost mai scăzută în limfoamele centroblastice și mai ridicată în cele de grad înalt ( $p=0,010$ ).

Aceste date sugerează o potențială valoare prognostică a expresiei PD-1, PD-L1 și CD68 în subtipurile morfologice și stadializarea DLBCL, necesitând însă validare în studii cu loturi extinse.

## V. Concluzii și contribuții personale

### Concluzii

În contextul actual al patologiei, ritmul rapid al progreselor științifice face ca diagnosticul limfomului difuz cu celule B mari să se bazeze în principal pe identificarea celulelor limfoide mari și confirmarea originii B prin imunocolorare. În ultimele două decenii, au fost realizate progrese semnificative în înțelegerea caracteristicilor genetice ale limfoamelor cu celule mari, ceea ce a permis o clasificare mai precisă a acestora. Ca urmare, este mai important ca niciodată ca patologii să mențină standarde moderne de acuratețe diagnostică în evaluarea acestor cazuri.

Diagnosticul și clasificarea limfoamelor cu celule B mari, rămâne un proces complex, dar esențiale în hematopatologia modernă. Clasificarea OMS din 2022 a adus revizuirii nuanțate care sporesc precizia diagnostică, ghidează deciziile terapeutice și reflectă progresele în înțelegerea heterogenității genetice și fenotipice a acestor neoplasme. Deși DLBCL este cel mai frecvent subtip, acesta ridică frecvent provocări de diagnostic din cauza suprapunerilor morfologice cu alte limfoame agresive sau malignități non-hematopoietice.

Subclasificarea precisă a DLBCL se bazează pe o abordare multidisciplinară, care integrează morfologia, imunohistochimia, citogenetica și diagnosticul molecular. Distincțiile cheie între subtipurile GCB, ABC și limfoamele B de grad înalt – inclusiv variantele cu dublă sau triplă rearanjare (dublu-hit și triplu-hit) – sunt esențiale pentru determinarea prognosticului și personalizarea tratamentului. Incorporarea algoritmilor de diagnostic, precum clasificatorul Hans, împreună cu utilizarea atentă a tehnicilor complementare precum FISH și evaluarea indicelui de proliferare Ki-67, reprezintă instrumente indispensabile în arsenalul diagnosticului histopatologic.

Pe măsură ce diagnosticul limfoamelor continuă să evolueze, menținerea unui standard înalt de acuratețe și actualizarea cunoștințelor în acord cu noile criterii de clasificare sunt imperative pentru îmbunătățirea rezultatelor clinice ale pacienților.

Analiza imunohistochimică a markerilor C-MYC, BCL2 și Ki-67 în cadrul cohorței studiate a evidențiat valoarea acestor parametri ca instrumente utile în evaluarea prognostică a pacienților cu DLBCL. Totuși, absența testelor genetice și moleculare avansate, precum hibridizarea in situ fluorescentă (FISH) sau secvențierea genomică, a reprezentat o limitare semnificativă a studiului, restricționând posibilitatea unei caracterizări moleculare complete



a cazurilor analizate. În acest context, imunohistochimia se conturează drept o soluție practică și accesibilă, cu aplicabilitate clinică, în identificarea unor factori predictivi relevanți, mai ales în centrele în care infrastructura pentru teste moleculare este limitată sau inexistentă.

Subtipul GCB a prezentat o asocieră semnificativă cu expresia pozitivă a C-MYC, iar un indice de proliferare Ki-67  $\geq 75\%$  s-a corelat cu o supraviețuire globală semnificativ redusă. Aceste constatări susțin importanța acestor biomarkeri în stratificarea riscului și în fundamentarea deciziilor terapeutice personalizate.

Deși expresia BCL2 nu a atins pragul semnificației statistice în corelație cu supraviețuirea globală la trei ani, tendința observată indică un potențial rol prognostic, mai ales în contextul evaluării combinate cu alți markeri. Această ipoteză necesită validare prin studii suplimentare pe loturi extinse.

Studiul legat de expresia PD-L1 și PD-1 în limfomul non-Hodgkin cu celulă mare B a evidențiat o asocieră semnificativă între expresia tumorală a PD-L1 și tipul morfologic al DLBCL, limfoamele anaplazice fiind corelate cu expresie crescută a PD-L1. Această constatare susține ipoteza unui răspuns favorabil potențial la imunoterapia anti-PD-1/PD-L1 în acest subtip morfologic, subliniind valoarea PD-L1 ca posibil biomarker predictiv.

Expresia PD-1 în celulele imune stromale a fost mai frecventă la pacientele de sex feminin, sugerând posibile diferențe imunologice legate de sex în cadrul DLBCL, care ar putea influența răspunsul imun și necesită investigații suplimentare.

Infiltrarea macrofagică marcată prin CD68 s-a asociat cu subtipurile morfologice de grad înalt și cu stadiile avansate Ann Arbor, indicând un posibil rol al macrofagelor asociate tumorii în progresia bolii și imunosupresia tumorală. Acest aspect susține integrarea markerilor din micromediul tumoral în evaluările prognostice și strategii terapeutice viitoare.

Deși expresia markerilor CD4 și CD8 nu a prezentat corelații statistice semnificative cu parametrii clinici, profilul general de infiltrare T evidențiază un dezechilibru imun cu potențial impact funcțional, dominat de celulele T CD8 pozitive. Expresia punctelor de control imun, inclusiv PD-1, pe aceste celule sugerează un fenotip epuizat, ce ar putea limita eficiența răspunsului imun antitumoral.

### **Contribuții personale (originalitatea tezei)**

Una dintre principalele contribuții ale acestei teze constă în elaborarea unui algoritm practic de diagnostic pentru limfomul difuz cu celulă B de grad înalt, bazat pe actualizarea

din ediția a 5-a a clasificării OMS a tumorilor hematopoietice. Acest algoritm integrează criteriile morfologice, imunohistochimice și clinice, cu scopul de a ghida în mod eficient medicii anatomico-patologi și clinicieni în stabilirea unui diagnostic precis, reproductibil și orientat spre prognostic, contribuind astfel la standardizarea evaluării acestor cazuri în practica medicală curentă.

În cadrul studiului am implementat tehnica TMA, prin selecția și prelucrarea a 66 de cazuri de DLBCL, cu scopul de a realiza o analiză imunohistochimică uniformă și comparabilă. Această abordare permite evaluarea simultană a mai multor markeri pe aceleași condiții tehnice și reduce variabilitatea preanalitică. Prin utilizarea TMA, am asigurat o bază solidă pentru corelațiile statistice și biologice ulterioare și am demonstrat fezabilitatea metodei în laboratoarele cu resurse limitate.

O contribuție importantă a acestei lucrări a fost evidențierea unor corelații semnificative între expresia markerilor BCL2, c-MYC, Ki-67 și aspectele morfologice, respectiv prognosticul pacienților. Am arătat că expresia concomitentă a BCL2 și c-MYC definește cazurile cu fenotip „dublu expresor”, asociate cu un prognostic negativ. De asemenea, un indice proliferativ Ki-67 crescut a fost asociat cu forme agresive ale bolii, ceea ce sprijină utilizarea acestor markeri în stratificarea riscului.

Am evaluat pentru prima dată într-un lot național expresia markerilor PD-1 și PD-L1 atât în celulele tumorale, cât și în cele stromale, în cadrul limfomului DLBCL. Analiza a relevat un model de expresie heterogen, cu diferențe semnificative între subtipurile histologice, contribuind la înțelegerea complexității microambientului imun. Rezultatele au implicații în selecția pacienților eligibili pentru imunoterapie și sugerează un rol activ al căii PD-1/PD-L1 în patogeneza unor subgrupuri de DLBCL.

Un alt aport personal important a constat în caracterizarea cantitativă și calitativă a celulelor imune din micromediul tumoral, limfocite T helper (CD4), limfocite citotoxice (CD8) și macrofage (CD68). Am realizat o evaluare comparativă între cazurile cu morfologie tipică și cele cu aspecte anaplastice, demonstrând influența infiltratului imun asupra evoluției clinice. Aceste date contribuie la o mai bună înțelegere a interacțiunilor tumoră-micromediu și pot fundamenta direcții viitoare de cercetare imuno-oncologică.

Un element distinctiv al acestei teze este aplicarea și adaptarea algoritmului Hans pentru clasificarea moleculară a DLBCL în subtipurile GCB și ABC, utilizând exclusiv markerii imunohistochimici CD10, BCL6 și MUM1. Am adaptat pragurile de pozitivitate conform literaturii de specialitate și am demonstrat utilitatea acestui algoritm în absența

testării genetice (FISH), oferind astfel o metodă accesibilă și eficientă în contextul practicii medicale românești.

Analiza statistică multivariată (model Cox) a permis identificarea unor factori independenți de prognostic, dintre care vârsta  $\geq 60$  ani și un indice Ki-67  $\geq 75\%$  s-au dovedit a fi predictorii semnificativi pentru supraviețuirea globală. Această descoperire susține includerea acestor parametri în evaluarea standard a cazurilor de DLBCL și are potențialul de a ghida deciziile terapeutice, în special în lipsa unor teste genetice avansate.

Am realizat o bază de date completă care integrează parametri clinici (vârstă, sex, localizare), morfologici, imunohistochimici și de supraviețuire pentru fiecare dintre cele 66 de cazuri. Această bază de date a fost utilizată pentru analize statistice descriptive și inferențiale, oferind un instrument valoros pentru validarea ipotezelor formulate și pentru utilizări viitoare în cercetare clinicopatologică.

În lipsa disponibilității testelor FISH în multe centre medicale, am demonstrat utilitatea expresiei imunohistochimice a markerilor BCL2 și c-MYC ca metodă de screening pentru identificarea cazurilor cu potențial dublu-hit. Această strategie permite orientarea pacienților către investigații genetice suplimentare doar atunci când expresia este concomitentă, contribuind la optimizarea costurilor și la prioritizarea cazurilor cu risc crescut.

Am evidențiat o expresie semnificativ crescută a PD-L1 în subtipurile morfologic anaplazice de DLBCL, sugerând un posibil mecanism de evaziune imună în aceste forme agresive. Această observație poate constitui o bază pentru introducerea terapiei anti-PD-L1 în tratamentul personalizat al acestor pacienți și completează datele limitate din literatura de specialitate privind corelația între morfologie și expresia imună.

Această lucrare reprezintă nu doar un demers academic, ci și o formă de răspuns la nevoia de a reduce incertitudinea din jurul unui diagnostic dur, de a contribui, chiar și modest, la îmbunătățirea parcursului diagnostic și terapeutic al pacienților. Astfel, teza de doctorat cu titlul „Variabilitatea morfologică și imunofenotipică a limfoamelor cu celulă B de grad înalt” să aducă și puțin mai multă claritate în zonele „gri” ale diagnosticului, de a sprijini echipa medicală cu informații utile și, mai presus de toate, de a susține pacientul în lupta cu o boală care nu oferă întotdeauna timp.

## Bibliografie selectivă

1. Eman Mohamad Ibrahim<sup>1</sup>, S.R., Shaimaa El-Ashwah<sup>2</sup>, Maryan Waheeb Fahmi<sup>3\*</sup> and Afaf Taha Ibrahim<sup>1</sup>, *Programmed death ligand 1 expression in diffuse large B cell lymphoma: correlation with clinicopathological prognostic factors*. Journal of the Egyptian National Cancer Institute, 2023.
2. Buruiana, S., *Incursiune în Limfoamele Non-Hodgkin asociate cu Sindromul Antifosfolipidic*.
3. Craig, A., et al., *Utility of PD-1, PD-L1, and IDO-1 Stains in Ocular Extranodal Marginal Zone Lymphoma (MZL) and Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL)*. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 2024. **32**(8): p. 395-399.
4. Romania, M.S. *Plan-National-de-Combatere-a-Cancerului*. 2022; Available from: <https://www.ms.ro/media/documents/Plan-National-de-Combatere-a-Cancerului.pdf>.
5. Patrascu, A.M., et al., *The prognostic role of Bcl-2, Ki67, c-MYC and p53 in diffuse large B-cell lymphoma*. Rom J Morphol Embryol, 2017. **58**(3): p. 837-843.
6. Dong, L., et al., *Is first-line treatment with polatuzumab vedotin-rituximab-cyclophosphamide, doxorubicin and prednisone (pola-R-CHP) for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma cost-effective in China? A cost-effectiveness analysis using a Markov model*. BMJ Open, 2025. **15**(1): p. e086251.
7. Linschoten, M., et al., *Rationale and design of the HOVON 170 DLBCL-ANTICIPATE trial: preventing anthracycline-induced cardiac dysfunction with dexrazoxane*. Cardiooncology, 2025. **11**(1): p. 8.
8. Yimpak, P., et al., *Immunohistochemistry-based investigation of MYC, BCL2, and Ki-67 protein expression and their clinical impact in diffuse large B-cell lymphoma in upper Northern Thailand*. PLoS One, 2024. **19**(7): p. e0307253.
9. Talaulikar, D., et al., *DETAILED IMMUNOPHENOTYPING OF B-CELL SUBSETS IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA*. Cytometry Part B-Clinical Cytometry, 2013. **84**(6): p. 423-423.
10. Zhang, S.X., *PD-1 Expression Is Upregulated in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Transformed from Marginal Zone Lymphoma and Significantly Higher in Comparison with de novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. Modern Pathology, 2019. **32**.
11. Alig, S.K., et al., *Evolving molecular classification of aggressive B-cell lymphoma*. Histopathology, 2025. **86**(1): p. 94-105.

12. Shao, Y., et al., *Artificial Intelligence-Driven Precision Medicine: Multi-Omics and Spatial Multi-Omics Approaches in Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)*. Front Biosci (Landmark Ed), 2024. **29**(12): p. 404.
13. Tanabe, A., J. Ndzinu, and H. Sahara, *Development and Validation of a Novel Four Gene-Pairs Signature for Predicting Prognosis in DLBCL Patients*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(23).
14. Chapuy, B., et al., *DLBclass: A Probabilistic Molecular Classifier to Guide Clinical Investigation and Practice in DLBCL*. Blood, 2024.
15. Vareli, A., et al., *Systems biology-enabled targeting of NF-kappaB and BCL2 overcomes microenvironment-mediated BH3-mimetic resistance in DLBCL*. bioRxiv, 2024.
16. Zanelli, M., et al., *A Diagnostic Approach in Large B-Cell Lymphomas According to the Fifth World Health Organization and International Consensus Classifications and a Practical Algorithm in Routine Practice*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(23).
17. Shold, J., et al., *EBV Positive Diffuse Large B Cell Lymphoma with Negative Pan-B Cell Markers, Case Report, and Literature Review*. Case Reports in Hematology, 2024. **2024**.
18. Collinge, B., et al., *The impact of MYC and BCL2 structural variants in tumors of DLBCL morphology and mechanisms of false-negative MYC IHC*. Blood, 2021. **137**(16): p. 2196-2208.
19. Jiang, Y.Y., et al., *Primary mediastinal large B cell lymphoma with coexisting aberrations of C-MYC and BCL-2: a case report and literature review*. Medical Molecular Morphology, 2020. **53**(2): p. 124-129.
20. Mehta, A., et al., *Double Hit and Double Expresser Diffuse Large B Cell Lymphoma Subtypes: Discrete Subtypes and Major Predictors of Overall Survival*. Indian J Hematol Blood Transfus, 2020. **36**(4): p. 627-634.
21. Mohammed, A.A., et al., *C-MYC and BCL2: Correlation between Protein Over-Expression and Gene Translocation and Impact on Outcome in Diffuse Large B Cell Lymphoma*. Asian Pac J Cancer Prev, 2019. **20**(5): p. 1463-1470.
22. Maillie, L., et al., *Prolonged neurologic symptoms following immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome in patients with large B cell lymphoma treated with chimeric antigen receptor-modified T cell therapy*. Transplant Cell Ther, 2025.
23. Hartmann, S. and M.L. Hansmann, *Large B-Cell Lymphoma Rich in PD-1+ T Cells An Overlooked Subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma?* American Journal of Clinical Pathology, 2014. **142**(2): p. 142-143.

24. Marinaccio, C., et al., *Microvascular Density, CD68 and Tryptase Expression in Human Diffuse Large B-Cell Lymphoma*. *Leukemia Research*, 2014. **38**(11): p. 1374-1377.

## Lista cu lucrările științifice publicate

1. **Halcu, G.**; Evsei-Seceleanu, A.; Cerbu, M.; Bara, M.A.; Turbatu, A.; Ceausu, M.C. *From Biopsy to Diagnosis: Navigating Aggressive B-Cell Lymphomas in Practice*. Medicina 2025, 61, 842. Revistă indexată ISI cu FI 2,4/2023, Q1, capitolul 7, pag. 46–60  
<https://doi.org/10.3390/medicina61050842>  
<https://www.mdpi.com/1648-9144/61/5/842>
2. **Halcu, G.**; Evsei-Seceleanu, A.; Tapoi, D. A.; Cerbu, M.; Barta, C.; Ceausu, M. *Correlations Between Immunophenotypic Markers and Clinical Progression in Romanian Patients Diagnosed with Diffuse Large B-cell Lymphoma*. Medicina 2025, 61, 948. Revistă indexată ISI cu FI 2,4/2023, Q1, capitolul 8, pag. 61–75  
<https://doi.org/10.3390/medicina61060948>  
<https://www.mdpi.com/1648-9144/61/6/948>
3. **Halcu, G. et al**; *PD-L1 Expression and Tumor Microenvironment Dynamics in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Immunophenotypic Insights*. Journal of Medicine and Life 2025. Pubmed, capitolul 9, pag. 79–92  
<https://doi.org/10.25122/jml-2025-0078>  
<https://medandlife.org/issues/>
4. Dumitru, A.V.; Țăpoi, D.A.; **Halcu, G.**; Munteanu, O.; Dumitrascu, D.-I.; Ceaușu, M.C.; Gheorghisan-Gălățeanu, A.-A. *The Polyvalent Role of CD30 for Cancer Diagnosis and Treatment*. Cells 2023, 12, 1783. Revistă indexată ISI cu FI 5,1/2023, Q1, capitolul 3, pag. 30–31  
<https://doi.org/10.3390/cells12131783>  
<https://www.mdpi.com/2073-4409/12/13/1783>

## **Mulțumiri**

Doresc să adresez mulțumiri deosebite domnului Conf. Dr. Ceașu Mihail, coordonatorul tezei de doctorat, pentru oportunitatea oferită și sprijinul constant primit pe parcursul întregii perioade de cercetare.

Sincere mulțumiri colegilor tehnicieni de la Spitalul Clinic Colțea pentru profesionalismul și disponibilitatea manifestate în desfășurarea activităților practice. Totodată, îmi exprim recunoștința pentru sprijinul și înțelegerea din partea colegilor medici din cadrul Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Colțea.

În mod special, adresez mulțumiri familiei și celor apropiați, care m-au susținut necondiționat și mi-au oferit echilibrul necesar pentru a duce la bun sfârșit acest parcurs academic.

**„Nu cunoaștem un lucru cu adevărat decât atunci când l-am cercetat în profunzime.”**

*Descartes*