



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

AGRESİF B HÜCRELİ LENFOMALARDA DOUBLE-EKSPRESOR
GRUPLARIN BELİRLENMESİ, BU GRUPLARIN MOLEKÜLER
ETİYOPATOGENEZİNDE ROLÜ OLABİLECEK DNA TAMİR GEN
PROTEİN EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ VE PROGNOSTİK
ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. MUHAMMED HASAN TOPER
UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2017



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**AGRESİF B HÜCRELİ LENFOMALARDA DOUBLE-EKSPRESOR
GRUPLARIN BELİRLENMESİ, BU GRUPLARIN MOLEKÜLER
ETİYOPATOGENEZİNDE ROLÜ OLABİLECEK DNA TAMİR GEN
PROTEİN EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ VE PROGNOSTİK
ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. MUHAMMED HASAN TOPER
UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. SÜHEYLA UYAR BOZKURT

İSTANBUL 2017

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin başından beri pozitif yaklaşımları ve hayata karşı duruşları ile bana ilham veren, kendileri ile çalışırken en güzel yıllarımı geçirdiğim, her zaman bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım başta tez danışmanım Doç.Dr. Süheyla Uyar Bozkurt olmak üzere değerli hocalarım Prof.Dr. Funda Eren, Prof.Dr. Çiğdem Ataizi Çelikel, Prof.Dr. Rengin Ahıskalı, Prof.Dr. Handan Kaya, Prof.Dr. Leyla Cinel, Doç.Dr.Kemal Türköz, Doç.Dr. Pelin Bağcı, Yard.Doç.Dr. Deniz Filinte, Yard.Doç.Dr. Emine Baş Bozkurtlar ve Yard.Doç.Dr. İpek Erbarut Seven'e;

Asistanlığım boyunca bir arada olmaktan çok şanslı ve mutlu olduğum asistan arkadaşlarım Dr. Gökçe Aşkan, Dr. Gülçiçek Ayrancı, Dr. Dilek Kaymakçı, Dr. Hande Mollamemişoğlu, Dr. Fatma Gerin, Dr. Erdem Kombak, Dr. Gamze Akbaş, Dr. İdris Önem, Dr. Hülya Şahin, Dr. İrem Şahver İşgör, Dr.Yiğit Erçetin ve Dr. Medine Özgür Günay'a ve başta Banu Büyükturgay ve Mücahit Özkelle olmak üzere tezimde ve eğitimimde emeği geçen tüm laboratuvar ekibine;

Hep yanımda olan ve sevgilerini ve desteklerini daima hissettiğim canım anneme, babama, kız kardeşime ve değerli dostum Onur Kırtel'e, kaybetsem de hep benle olduğunu hissettiğim anneanneme sonsuz teşekkürlerimle.

Muhammed Hasan Toper

Haziran 2017

İstanbul

ÖZET

İmmünohistokimyasal olarak MYC ve BCL2 ekspresyonu izlenen diffüz büyük B-hücreli lenfoma olguları, double-ekspresör lenfoma grubu olarak tanımlanmaktadır ve bu grubun kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca olgular, immünohistokimya ile germinal merkez B-hücre benzeri/-dışı olarak gruplanarak hücre orijini belirlenmeye çalışılmaktadır. Çalışmamızda, Ocak 2007 ile Haziran 2015 tarihleri arasında retrospektif olarak incelenen diffüz büyük B-hücreli lenfoma, NOS tanılı 90 olgu değerlendirildi. Bu olgulara ait klinik ve demografik veriler incelenerek immünohistokimyasal değerlendirmeleri ve toplam sağkalım analizleri yapıldı. Klinik ve demografik olarak yaş, cinsiyet, tümör yerleşimi, Ann Arbor evresi, R-IPI skoru ve NCCN-IPI skoru değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak; double-ekspresör lenfoma grubunu belirlemek için MYC ve BCL2, germinal merkez B-hücre benzeri/-dışı grupları belirlemek için CD10, BCL6 ve MUM1, lenfoma etiopatogenezinde rolü olabilecek translokasyonlara neden olan DNA kırıkları oluşumunda ve tamirinde görevli AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53 ve ATM protein ekspresyonları değerlendirildi.

Olguların ortanca yaşı 59 olup, cinsiyetlerine göre erkek/kadın oranı 0,95 olarak bulundu. MYC proteininde $\geq 40\%$ ve BCL2 proteininde $\geq 50\%$ immünoekspresyon izlenen 11 olgu (%12,2) double-ekspresör DBBHL olarak gruplandı. Çalışmamızda; yaşın 60'tan büyük olması, ileri Ann Arbor evresi, yüksek R-IPI ve NCCN-IPI skoru, $\geq 40\%$ MYC immünoekspresyonu ve yüksek Ki67 proliferasyon indeksinin düşük toplam sağkalım ile ilişkili bulundu. Double-ekspresör lenfoma grubunda düşük toplam sağkalım seyri izlenmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53 ve ATM immünoekspresyonları ile double-ekspresör lenfoma ve toplam sağkalım arasında ilişki saptanmadı. P53 ve MYC immünoekspresyonlarının birlikteliğinin anlamlı olduğu saptandı.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, Double-ekspresör lenfoma, toplam sağkalım.

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Cases of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) which immunohistochemically exhibit MYC and BCL2 expressions are defined as double-expressor lymphomas and they are associated with adverse prognosis. Cases may also be grouped as germinal center B-cell-like (GCB) and non-GCB to determine the cell of origin. In this study, 90 cases of diffuse large B-cell lymphoma, NOS diagnosed between the dates of January 2007 and June 2015 have been evaluated retrospectively. For this purpose, clinical and demographical data including age, sex, localization of tumor, Ann Arbor stage, R-IPI and NCCN-IPI scores belonging to patients were collected and immunohistochemical evaluations as well as overall survival analyses have been carried out. For immunohistochemical evaluation; MYC and BCL2 protein expressions were used to determine double-expressor lymphoma group, while CD10, BCL6 and MUM1 expressions were used to determine non-/GCB groups. Also, protein expressions of AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53 and ATM were assessed since these proteins take role in formation and repair of double strand breaks, which cause translocations and may have a role in lymphoma etiopathogenesis.

Median age of the cases was 59, and male/female ratio was 0.95. 11 cases (12.2%) which exhibited $\geq 40\%$ MYC and $\geq 50\%$ BCL2 immunexpressions were classified as double-expressor DLBCL. Age greater than 60, advanced Ann Arbor stage, high R-IPI and NCCN-IPI scores, $\geq 40\%$ MYC immunexpression and high Ki67 proliferation index were all associated with lower overall survival. Although a trend of lower overall survival was observed in the double-expressor lymphoma group, this was not proven to be statistically significant. Also, no significant relation between AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53 and ATM immunexpressions with double-expressor lymphoma and overall survival could be detected. It was seen that the association of P53 and MYC immunexpressions were significant.

Keywords: Diffuse large B-cell lymphoma, double-expressor lymphoma, overall survival.

İÇİNDEKİLER

Sayfalar

Önsöz.....	i
Özet.....	ii
İngilizce Özet (Abstract).....	iii
İçindekiler.....	iv
Şekiller Dizini.....	vii
Tablolar Dizini.....	ix
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	x
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1. İmmun Sistem.....	2
2.2. Lenfoid Organ ve Dokular.....	3
2.2.1. Kemik iliği.....	4
2.2.2. Timus.....	4
2.2.3. Lenf nodu.....	5
2.2.4. Dalak.....	5
2.2.5. Mukoza-ilişkili lenf doku.....	6
2.3. B ve T Hücre Farklılaşması.....	6
2.3.1. B hücre farklılaşması.....	7
2.3.1.1. Pro-B ve pre-B hücre.....	7
2.3.1.2. İmmatür B hücre.....	8
2.3.1.3. Matür B hücre.....	8
2.3.1.4. B hücre aktivasyonu ve antikor üretimi.....	9
2.3.1.5. Plazma hücresi.....	10
2.3.1.6. Hafıza B hücresi.....	14
2.4. Matür B-Hücreli Lenfoma Sınıflandırması.....	14
2.5. Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma.....	16
2.5.1. Epidemiyoloji ve etiyoloji.....	16
2.5.2. Klinik özellikler ve yerleşim yeri.....	17
2.5.3. Morfolojik özellikler.....	17

2.5.3.1. Sentroblastik varyant.....	18
2.5.3.2. İmmünoblastik varyant.....	19
2.5.3.3. Anaplastik varyant.....	19
2.5.4. Diffüz büyük B-hücreli lenfoma alt grupları ve alt tipleri.....	20
2.5.5. Moleküler özellikler.....	22
2.5.5.1. Antijen reseptör genleri.....	22
2.5.5.2. Aberran somatik hipermutasyonlar.....	22
2.5.5.3. Kromozomal translokasyonlar.....	22
2.5.5.4. Double-hit lenfoma.....	23
2.5.5.5. Gen ekspresyon profili.....	24
2.5.5.6. Yeni nesil dizileme.....	24
2.5.6. İmmünohistokimyasal özellikler.....	25
2.5.6.1. İmmünohistokimyasal yöntemle gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi.....	25
2.5.6.2. Double-ekspresör DBHL.....	26
2.5.7. Klinik gidiş ve prognostik değerlendirme.....	27
2.5.8. Tedavi ve sağkalım.....	29
3. Gereç ve Yöntem.....	30
3.1. Olgu Seçimi.....	30
3.2. Etik Kurul.....	30
3.3. Yöntem.....	30
3.3.1. İmmünohistokimya.....	31
3.3.2. İmmünohistokimyasal değerlendirme.....	32
3.3.2.1. MYC ve BCL2.....	32
3.3.2.2. CD10, BCL6, MUM1.....	32
3.3.2.3. AID ve UNG.....	33
3.3.2.4. MLH1, MSH2, MSH6, PMS2.....	33
3.3.2.5. P53 ve ATM.....	34
3.3.2.6. Ki67.....	34
3.3.3. Hastalara ait klinik ve demografik veriler.....	34

3.3.4. İstatistiksel değerlendirme.....	34
4. Bulgular.....	35
4.1. Demografik ve Klinik Bulgular.....	35
4.1.1. Demografik bulgular.....	35
4.1.2. Tümör yerleşimi.....	35
4.1.3. Tümör evresi ve klinik skorlama verileri.....	36
4.2. Demografik ve Klinik Bulguların Toplam Sağkalım ile İlişkisi.....	37
4.2.1. Yaş ve cinsiyetin toplam sağkalımla ilişkisi.....	37
4.2.2. Tümör yerleşiminin toplam sağkalımla ilişkisi.....	38
4.2.3. Tümör evresinin ve klinik skorlamanın toplam sağkalımla ilişkisi.....	39
4.3. Germinal Merkez B-Hücre Benzeri ve Germinal Merkez B-Hücre Benzeri-Dışı Alt Gruplar ve Bunların Toplam Sağkalım ile İlişkisi.....	41
4.4. Double-Ekspresör Lenfoma ve Toplam Sağkalım ile İlişkisi.....	43
4.5. Double-Ekspresör Lenfomaların Demografik ve Klinik Bulgular ile İlişkisi.....	48
4.6. AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53 ve ATM Protein Ekspresyonları.....	49
4.7. Ki67 Proliferasyon İndeksi.....	57
4.8. Double-Ekspresör Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfomaların; AID, UNG, P53, ATM Protein Ekspresyonları ve Germinal Merkez B-Hücre Benzeri/-Dışı Gruplar ile İlişkisi.....	55
4.9. Cox Orantısal Regresyon Modeli ile Yaşam Analizi.....	55
5. Tartışma.....	58
6. Sonuçlar.....	68
7. Kaynaklar.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Primer ve sekonder (periferal) lenfoid dokular.

Şekil 2. B hücre farklılaşma aşamaları.

Şekil 3. Lenfoid follikül ve germinal merkez (H&E, 200X) **(a)**. Germinal merkezde B hücre aktivasyonu **(b)**.

Şekil 4. Somatik hipermutasyon **(a)** ve izotip değişimi **(b)**.

Şekil 5. Çift zincirli DNA kırıklarının oluşumu ve tamir edilmeleri.

Şekil 6. Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, lenf nodu (H&E, 40X)

Şekil 7. Sentroblastik varyant **(a)** ve immünoblastik varyant **(b)**.

Şekil 8. Gen ekspresyon profiline göre DBBHL moleküler alt grupları.

Şekil 9. Hans algoritması.

Şekil 10. Yaş gruplarına göre olguların toplam sağkalım grafiği(Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 11. Cinsiyetlere göre olguların toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 12. Tümör yerleşimine göre olguların toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 13. Ann-Arbor evrelerine göre olguların toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 14. R-IPI skoruna göre olguların toplam sağkalım grafiği. (Kaplan-Meier eğrisi)

Şekil 15. NCNN-IPI skoruna göre olguların toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 16. Hans algoritmasına göre germinal merkez B-hücre benzeri olarak saptanan örnek olgu (CD10, immünohistokimya, 100X).

Şekil 17. Hans algoritmasına göre germinal merkez B-hücre benzeri-dışı olarak saptanan örnek olgu (CD10 **(a)**, BCL6 **(b)** ve MUM1 **(c)**, immünohistokimya, 200X).

Şekil 18. Germinal merkez B-hücre benzeri ve germinal merkez B-hücre benzeri-dışı olgulara göre toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 19. MYC, %40 altı (a) ve %40 ve üzeri (b) immünoekspresyon (200X).

Şekil 20. Olgularda MYC immünoekspresyonu ile toplam sağkalım ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 21. BCL2, %50 altı (a), %50 ve üzeri (b) immünoekspresyon (100X).

Şekil 22. Olgularda BCL2 immünekspresyonu ile toplam sağkalım ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 23. Double ekspresör DBBHL, MYC immünekspresyonu (a), BCL2 immünekspresyonu (b), H&E (c) (200X).

Şekil 24. Double-ekspresör DBBHL olgularının toplam sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 25. Olgularda MYC ve BCL2 immünekspresyonlarının, tekli ve ikili pozitif ya da negatifliklerine göre toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 26. Ekstranodal yerleşimli Double-ekspresör DBBHL olgularının toplam sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 27. AID, \leq %20 immünekspresyon (a), $>$ %20 (b) immünekspresyon (100X).

Şekil 28. AID immünekspresyonu ile toplam sağkalımın ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 29. UNG, \leq %50 immünekspresyon (a), $>$ %50 immünekspresyon (b) (100X).

Şekil 30. UNG immünekspresyonu ile toplam sağkalımın ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 31. P53, \leq %50 immünekspresyon (a) ve $>$ %50 immünekspresyon (b) (100X).

Şekil 32. P53 immünekspresyonu ile toplam sağkalımın ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 33. ATM, \leq %10 immünekspresyon (a), $>$ %10 immünekspresyon (b) (200X).

Şekil 34. ATM immünekspresyonu ile toplam sağkalımın ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Şekil 35. Yanlış eşleşme tamir proteinleri immünekspresyonları. MLH1 (a), MSH2 (b), MSH6 (c), PMS2 (d) (200X).

Şekil 36. Zayıf MSH2 immünekspresyonu izlenen iki ayrı olgu (a ve b) (Aynı olguya ait MLH1, MSH6 ve PM2 immünekspresyonları sırasıyla yukarıdan aşağı doğru küçük resimlerde gösterilmiştir.)

Şekil 37. Ki 67 proliferasyon indeksi $<$ 50 (a), %50-90 (b), $>$ %90 (c) (100X).

Şekil 38. Ki67 proliferasyon indeksi gruplarına göre toplam sağkalım grafiği.

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Matür B-hücreli lenfoid neoplaziler.

Tablo 2. DSÖ 2008 yılı DBBHL alt grupları ve alt tipleri.

Tablo 3. DSÖ 2016 güncellemesine göre matür B-hücreli neoplazilerin sınıflandırılması.

Tablo 4. IPI ve R-IPI skollama sistemleri.

Tablo 5. NCCN-IPI skollama sistemi.

Tablo 6. DBBHL'da kötü prognostik özellikler.

Tablo 7. İmmünohistokimyasal incelemede kullanılan antikorlar ve özellikleri.

Tablo 8. Olgulara tanı verilirken immünohistokimyasal incelemede kullanılan antikorlar ve özellikleri.

Tablo 9. Demografik bulgular.

Tablo 10. Tümör yerleşimi.

Tablo 11. Olguların R-IPI ve NCCN-IPI skor dağılımları.

Tablo 12. MYC ve BCL2 immünohistokimya boyanma dağılımları ve bunlara göre double-ekspresör DBBHL olgularının dağılımı.

Tablo 13. Double-ekspresör DBBHL olguların klinik ve demografik bulgular ile ilişkisi.

Tablo 14. Double ekspresör DBBHL gruplarının AID, UNG, P53, ATM ve Ki67 immünoekspresyonları ile germinal merkez B-hücre benzeri/-dışı gruplarla ilişkisi.

Tablo 15. Klinik, demografik ve immünohistokimyasal parametrelerin toplam sağkalım üzerindeki etkisi.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABH	: Aktive B-hücre benzeri
AID	: Aktivasyonla-indüklenen sitidin deaminaz
cDNA	: Komplementer DNA
CI	: Güven aralığı (<i>confidence interval</i>)
DBBHL	: Diffüz büyük B-hücreli lenfoma
DBBHL, NOS	: Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, başka türlü belirtilmemiş olan (<i>Not otherwise specified</i>)
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
GMB	: Germinal merkez B-hücre benzeri
H&E	: Hematoksilen & Eozin boyası
IPI	: <i>International prognostic index</i>
KLL/SLL	: Kronik lenfositik lösemi / Küçük lenfositik lenfoma
LDH	: Laktat dehidrogenaz
NCCN-IPI	: <i>National comprehensive cancer network international prognostic index</i>
R-IPI	: <i>Revised international prognostic index</i>
UNG	: Urasil-DNA glikozilaz

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Agresif B-hücreli lenfomalar heterojen bir hastalık grubu olup, sınıflandırması moleküler, immünofenotipik, klinik ve prognostik veriler ışığında sürekli yenilenmektedir. Bu gruptaki olguların büyük çoğunluğunu oluşturan diffüz büyük B-hücreli lenfomalar (DBBHL), erişkinlerde en sık görülen Hodgkin-dışı lenfoma olarak bilinmektedir (1, 2). Heterojen tanı grubu olan DBBHL, ayrı alt tiplere ayrılıp değerlendirilmesine rağmen hastalığın seyrinde farklılıklar izlenmektedir. Bu nedenle DBBHL, NOS olgularında; klinik skorlama sistemleri, immünohistokimyasal ve moleküler alt gruplamalar ile hastalığın prognozu ve uygulanacak tedavi yaklaşımı belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla; moleküler olarak, hücre orijininin belirlenmesi veya MYC, BCL2, BCL6 genlerindeki translokasyonların araştırılması; immünofenotipik olarak ise MYC, BCL2 protein ekspresyonları izlenen olguların double-ekspresor lenfoma olarak değerlendirilmesi veya immünohistokimyasal algoritmalarla germinal merkez B-hücre benzeri/-dışı olarak hücre orijininin belirlenmesi gibi yaklaşımlar son yıllarda öne çıkmaktadır (3).

Lenfomaların büyük çoğunluğunda translokasyon mutasyonlarının lenfomagenez sürecinde önemli yeri vardır. Bu mutasyonların oluşumu ile ilgili normal B-hücre aktivasyonunda fizyolojik olarak gerçekleşen somatik hipermutasyon ve izotip değişimi sırasında oluşan DNA kırıklarının rolü olabileceği düşünülmektedir. Aktivasyonla-indüklenen sitidin deaminaz (AID), Urasil-DNA glikozilaz (UNG), yanlış eşleşme tamir proteinleri (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), P53, ATM proteinlerinin, somatik mutasyon ve izotip değişimi sırasında rolleri bulunmaktadır (4-9).

Çalışmamızda DBBHL olgularında; double-ekspresor grubun ve germinal merkez B-hücre benzeri/-dışı grubun belirlenerek prognozla ilişkisinin saptanması ve diffüz büyük B-hücreli lenfoma patogenezinde rolü olabilecek AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53 ve ATM protein ekspresyonlarının değerlendirilerek double-ekspresor DBBHL ve prognoz ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem

Canlılarda bağışıklığı sağlayan hücre ve moleküllerin bütünü ve bunların yabancı etkenlere karşı ortaya koyduğu kollektif ve koordine yanıtlar immüniteyi oluşturmaktadır. İmmün sistem, toksik moleküllerden mikroorganizmalara kadar pek çok etkenin tanınması ve yok edilmesinde görev alır. Ayrıca inflamasyon ya da tümör oluşumuna neden olabilecek vücut hücreleri de immün sistem tarafından tanınır. İmmünite terimi, eskiden Romalı senatörlere verilen dokunulmazlık anlamına gelen Latince *immunitas* sözcüğünden gelmektedir (10).

Doğal immün yanıt ve edinsel immün yanıt olarak iki tip immün reaksiyon vardır. Doğal immün sistem; patojenlerin enfeksiyonları oluşturmasını engelleyip, kontrol ve elimine edilmelerini sağlayarak ilk yanıtın verilmesinde rol oynar. Ayrıca hasar görmüş hücrelerin temizlenip doku tamirinin başlaması ve edinsel immün sistemin etkinliğe başlaması için gereklidir. Doğal immün sistemin hücresel komponentinde epitelyal bariyerler, fagositler (nötrofiller, monositler ve makrofajlar), dendritik hücreler, mast hücreleri, Natural killer hücreleri ve bazı T hücreleri ($\gamma\delta$ T hücreleri, intraepitelyal T hücreleri); moleküler komponentinde defensin, katalidisin, opsonin, pentrakisin, kollektin, fikolin, kompleman sistemi, interferon ve interlökin gibi sitokinler görev almaktadırlar. Doğal immün sistem, mikrobiyal ve hasar görmüş hücresel bir takım belirli ortak ürünlere (Toll-benzeri reseptör, formil peptid reseptör, mannoz reseptörü, scavenger reseptörler vb.) yönelik her seferinde aynı şekilde yanıt oluşturarak reaksiyon göstermektedir. Patojenler arasında tam bir ayırım yapılmadan immün yanıt oluştururlar (10, 11).

Edinsel immün sistem; mikrobiyal veya mikrobiyal olmayan çok sayıda yapının her birini özgül olarak tanıyan, patojenle her temasta giderek artan boyutta ve yetenekte immün yanıt oluşturulmasında görevlidir. Reaksiyon oluşturdukları patojeni hatırlayarak immün sistemde hafıza oluşmasını

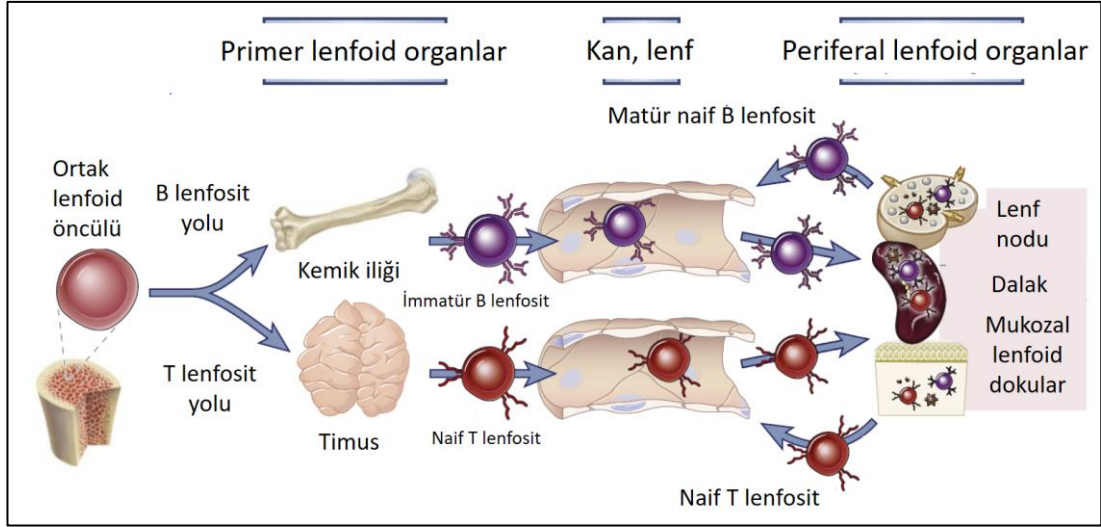
sağlarlar. Humoral ve hücreyel olarak iki tip edinsel immün yanıt vardır. Humoral immünitede, B lenfositler tarafından üretilen antikorlar görev alırlar. Özellikle hücre-dışı yerleşimli mikroplara karşı savunmada humoral immünite önemli rol oynamaktadır. Kan ve mukozal salgılarda bulunan antikorlar, mikrobiyal antijenleri tanımakta ve çeşitli mekanizmalarla onların eliminasyonunu sağlamaktadır. Hücreyel immünite ise T lenfositler aracılığıyla çalışmaktadır. Antikorların ulaşamadığı hücre içi yerleşimli mikroorganizmalara (virüs ve bazı bakteriler gibi) karşı savunmada etkinlik gösterirler (10, 11).

2.2. Lenfoid Organ ve Dokular

Öncü lenfoid hücrelerin immünolojik olarak aktivite kazanıp olgunlaştığı ve antijenlere immünolojik yanıtın gerçekleştiği bölgeler lenfoid doku olarak adlandırılmaktadır. Lenfositlerin farklılaştıkları, olgunlaştıkları ve etkinlik gösterdikleri bu lenfoid dokular vücutta kendilerine özel yerleşim göstermektedirler. Bu alanlarda lenfoid dokuların her biri kendisine özel yapısı, mikro çevresi ve farklı etkinlikleriyle immün yanıtta görev almaktadırlar. Lenfoid dokular, lenfoid hücrelerin farklılaşma aşamaları ve etkileşimlerine göre iki ana gruba ayrılmaktadır:

- Primer lenfoid dokular
 - Kemik iliği
 - Timus
 - Fetal karaciğer
- Sekonder (Periferal) lenfoid dokular
 - Lenf nodu
 - Dalak
 - Mukozal lenfoid dokular

Primer lenfoid dokular, immün yanıtı sağlayan hücrelerin farklılaştığı ve geliştiği dokular iken sekonder lenfoid dokular, bu hücrelerin aktivitelerini gösterdiği dokulardır (Şekil 1) (10).



Şekil 1. Primer ve sekonder (periferel) lenfoid dokular (10).

2.2.1. Kemik iliği

Kemik iliği, kendini yenileyen hematopoietik kök hücreler ve lenfoid hücrelerin ortak öncüllerinden oluşan, oldukça hücresel ve damar ağından zengin, aksiyel ve uzun kemiklerin merkezlerinde yer alan dokudur.

B hücrelerinin farklılaşması kemik iliğinde gerçekleşmektedir. Ayrıca sekonder lenfoid organlarda oluşan plazma hücreleri için depo görevi yapmaktadır (10, 12).

2.2.2. Timus

Kemik iliğinden gelen T hücresi öncüllerinin olgunlaştığı ve seçilime uğradığı anterior mediasten yerleşimli organdır. Erken yaşlarda normal T hücrelerinin gelişimi için kritik öneme sahiptir. Yaşamın geri kalanı boyunca da bu fonksiyonu az da olsa sürdürdüğüne dair kanıtlar mevcuttur (11, 12).

2.2.3. Lenf nodu

Çevre organlardan gelen antijen ve kemokinlerin en etkili şekilde yakalanabilmesi için stratejik noktalarda yerleşmiş, lenfatik sisteme ait kapsüllü dokulardır. Lenf nodları büyük ven yapıları ile aynı yerde ve sıklıkla kan damarlarının dallandığı alanlarda yerleşim gösterirler. Lenf nodu yapısı, morfolojik olarak kabaca üç bölgeye ayrılır: Korteks, parakorteks ve medulla. Korteks, lenfoid folliküllerin bulunduğu bölge olup çoğunlukla B hücreleri, foliküler dendritik hücreleri ve makrofajları içermektedir. Parakorteks ise korteksin altında yer alıp esas olarak T hücreleri ve antijen sunan hücreleri içermektedir. Lenf nodunun iç kısmında bulunan medullada ise B ve T lenfositler ve plazma hücreleri bulunmaktadır (10, 11, 13).

2.2.4. Dalak

Dalak, kan filtreleme sistemi olarak görev yapıp dolaşımdan gelen eritrositleri, debri ve antijenleri uzaklaştıran, ayrıca özellikle kan kaynaklı antijenlere karşı hızlı bir şekilde immün yanıtın oluşturulmasında görevli, yaklaşık 150 g ağırlığında, sol üst abdomen yerleşimli bir organdır. Hem dolaşım sistemi hem immün sistemde oynadığı bu çoklu rol nedeniyle kırmızı ve beyaz pulpadan oluşan kompleks bir yapıya sahiptir. Oldukça özelleşmiş splenik venöz damar ağından oluşan kırmızı pulpada, etkinliğini yitirmiş kan hücreleri ve yabancı elemanlar kan akışından uzaklaştırılır. Dalağın lenfoid yapıları içeren kısmı beyaz pulpa olarak adlandırılır. Beyaz pulpa, periarterioller lenfatik kılıf ve B-hücre zonu olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Periarterioller lenfatik kılıf, santral arter çevresini saran ve T hücrelerden baskın lenfoid kısımdır. Bu alandaki santral arterlerin küçük dalları marjinal sinüs olarak adlandırılan vasküler yapıya drene olmaktadır. B-hücre zonu ise marjinal sinüs ile periarterioller kılıf arasındaki bölgede, B hücrelerden zengin folliküllerden oluşan kısımdır. Marjinal sinüsün dış tarafında beyaz pulpanın dış sınırını oluşturan, B hücreleri ve özelleşmiş makrofajlardan zengin bölge ise marjinal zon olarak isimlendirilmektedir (10, 11, 13, 14).

2.2.5. Mukoza-ilişkili lenfoid doku

Gastrointestinal sistem, nazofarenks, orofarenks, akciğerde mukozal yüzeylerle ilişkili özelleşmiş lenfoid dokular mukoza-ilişkili lenfoid doku (Mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) olarak adlandırılmaktadır. Bu dokular, akciğerde BALT (Bronş-ilişkili lenfoid doku), gastrointestinal sistemde GALT (Gut-ilişkili lenfoid doku) ve Peyer plakları, orofarenks ve nazofarenkste Waldeyer halkası olarak da isimlendirilmektedir. MALT organize mukozal lenfoid doku, lamina propria, intraepitelyal lenfositler ve bölgesel lenf nodları olmak üzere özelleşmiş dört lenfoid kısımdan oluşmaktadır. Peyer plakları ve Waldeyer halkasında belirgin olarak görülmekte olan organize mukozal dokuda bulunan lenfoid folliküller lenf noduna benzemekle birlikte marjinal zon genişlemiş ve yüzey epiteline ulaşmış görünümündedir. Lamina propriada çok sayıda plazma hücresi ve daha az sayıda makrofaj ile dağınık lenfosit bulunmaktadır. İntraepitelyal lenfositler çoğunlukla T hücrelerinden oluşmaktadır. Ancak Peyer plaklarında epitel içerisinde, M hücresi olarak isimlendirilen B hücreleri de bulunmaktadır (10, 11, 13).

2.3. B ve T Hücre Farklılaşması

B ve T hücre farklılaşması, yabancı antijenden bağımsız ve yabancı antijene bağımlı olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır. Yabancı antijenden bağımsız aşamalar primer lenfoid organlarda (B hücre için kemik iliği, T hücre için timüs) gerçekleşmektedir. Bu aşamada yabancı antijenlere karşı yanıt oluşturma kabiliyeti olan ve genellikle vücudun kendi antijenlerine (oto-antijen) yanıt vermeyen naif B ve T lenfosit havuzu oluşturulur. Antijen ile karşılaşan naif B ve T lenfositler daha iri hücrelere dönüşerek antijene direk etki gösterebilen antijene özgül efektör hücreler haline gelirler (10).

Bu tezde B hücreli lenfomalar araştırıldığından, B hücre farklılaşma aşamaları daha ayrıntılı anlatılacaktır.

2.3.1. B hücre farklılaşması

B hücreler, doğumdan önce fetal karaciğerdeki ve sonra kemik iliğindeki öncül hücrelerden gelişmektedir. Bu gelişimde ana olarak; immünglobulin genlerinde belirli bir sırayla rearanjman ve ekspresyon izlenmesi, gelişen B hücrelerin kontrol noktalarında seçilimi ve çoğalması ile B hücre repertuarının belirlenmesi gerçekleşmektedir. B hücre gelişim aşamalarında hücreler morfolojik olarak birbirinden ayırt edilememektedir, ancak her bir aşamada farklı yüzey belirteçleri ve özgül immünglobulin gen ekspresyonları vardır (Şekil 2) (10).

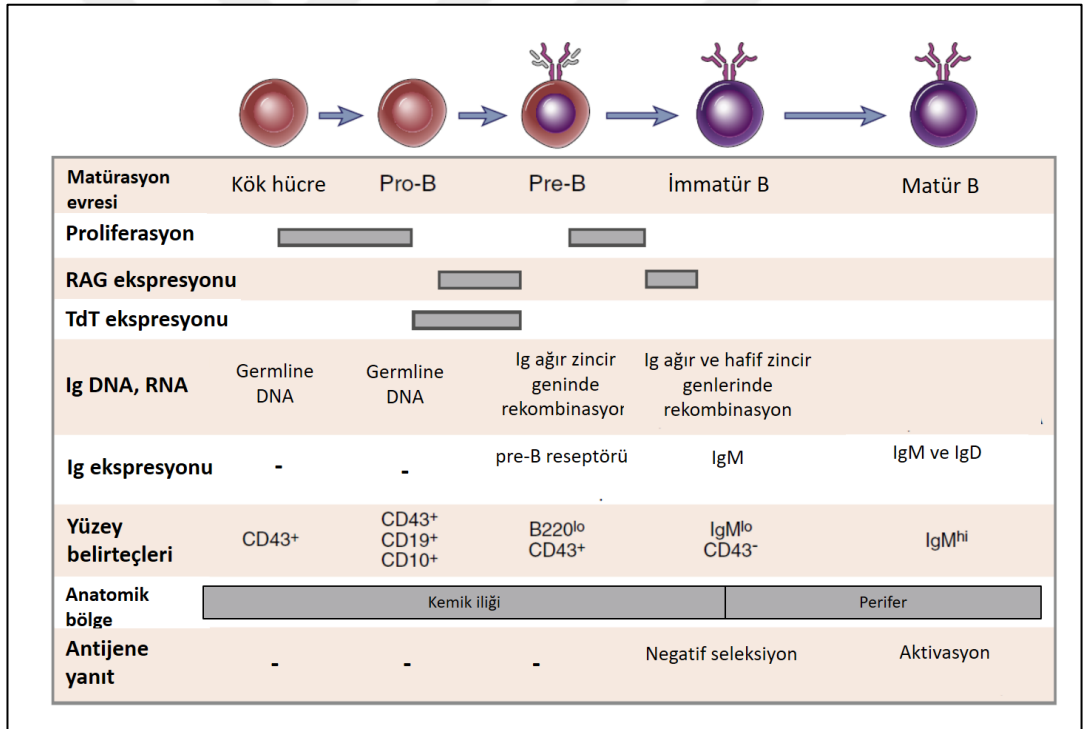
2.3.1.1. Pro-B ve pre-B hücre

B hücre serisinin gelişiminde, hematopoietik kök hücrelerden farklılaşan ilk B hücre prekürsör hücresi pro-B hücre olarak bilinmektedir. Pro-B hücre immünglobulin üretmemektedir. Ancak B hücre serisi belirteçleri olan CD19 ve CD10 yüzey molekülleri ekspresyonu ile diğer kök hücrelerden ayrılmaktadır. Rag-1 ve Rag-2 proteinleri ilk olarak bu evrede eksprese olmaya başlamaktadır. Bu proteinler ile immünglobulin ağır zincirlerinde rekombinasyon gerçekleşir. Rekombinasyon sırasında öncelikle immünglobulin μ ağır zincir geninde yer alan çok sayıda D ve J bölgesi içerisinde birer D ve J segmenti seçilmektedir. Sonra yine gendeki oldukça fazla sayıdaki V bölgesinden bir V segmenti ile V(D)J ekzonu oluşmaktadır. Sonrasında çeşitli posttranskripsiyonel modifikasyonlar ile immünglobulin μ ağır zincir ekspresyonu gerçekleşmektedir. Böylece hücreler, immünglobulin ağır zincir rearanjmanı gerçekleştikten sonra artık pre-B hücre ismini almaktadırlar. Pre-B hücreler, immünglobulin μ ağır zinciri ve bir takım diğer proteinlerden oluşan pre-B hücre reseptörünü taşımaktadırlar. Pre-B hücre reseptörü, B hücre diferansiyasyonundaki ilk kontrol noktasını oluşturur (10).

2.3.1.2. İmmatür B hücre

Pre- B hücrelerde immünglobulin κ hafif zincir rearranjmanı gerçekleştirdiği zaman yüzeyinde tam bir immünglobulin M (IgM) taşıyan hücreler immatür B hücre adını alırlar. İmmünglobulin hafif zincir geninde V ve J bölgeleri bulunmakta olup bu bölgeler rekombinasyon ile VJ ekzonunu oluştururlar. K hafif zincir rearranjmanı sağlıklı bir şekilde gerçekleşmeyen veya self-reaktif olan hücrelerde λ hafif zincir rearranjmanı olmaktadır. Böylece hücreler κ veya λ hafif zincirden birisini taşırlar (10).

İmmatür B hücreler kemik iliğinden ayrılarak matürasyon için öncelikle dalağa sonra da diğer periferik lenfoid dokular arasında göç ederler. Bu nedenle resirküle hücreler olarak da isimlendirilirler.



Şekil 2. B hücre farklılaşma aşamaları (10).

2.3.1.3. Matür B hücre

Farklı B hücre alt tipleri farklı öncüllerden gelişmektedir. Kemik iliği kaynaklı hematopoyetik kök hücreler B hücrelerin çoğunun (Foliküler ve marjinal zon B

hücreleri) öncülü iken fetal karaciğer kaynaklı hematopoietik kök hücreler B-1 hücrelerin öncülleridir (10).

Foliküler B hücreler; çoğu B hücrenin dahil olduğu IgM'ye ek olarak IgD üretmekte olan hücrelerdir. IgM⁺ ve IgD⁺ bu hücreler matür B hücre olarak adlandırılır ve B hücre repertuarının büyük kısmını oluştururlar.

B-1 hücreler; kısıtlı antijen reseptör çeşitliliğine sahip, periton ve mukozal bölgelerde yerleşimli, kendilerini yenileyebilen hücrelerdir. Belirgin antijenik uyarı olmadan antikor üretebildikleri için bu antikorlara doğal antikor da denmektedir.

Marjinal zon B hücreleri; çoğunlukla dalakta marjinal sinüs çevresinde yerleşimli, B-1 hücreler gibi kısıtlı antijen reseptör çeşitliliğine sahip hücrelerdir. Bu hücreler hem IgM hem de CD21 koekspresyonu gösterirler. Kan kaynaklı mikroplara karşı hızlı yanıt verilmesinde kısa ömürlü IgM salgılayan plazma hücrelerine dönüşerek rol oynamaktadırlar.

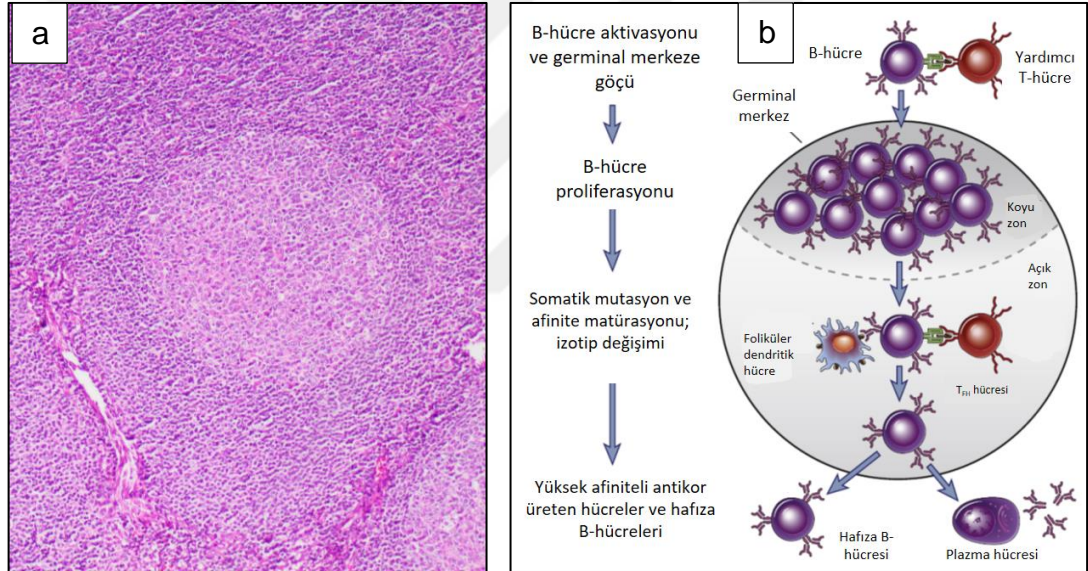
2.3.1.4. B hücre aktivasyonu ve antikor üretimi

B hücre aktivasyonu, B hücrelerinin klonal olarak çoğalıp farklılaşarak antikor üretebilen plazma hücrelerini ve hafıza B hücrelerini oluşturmasını kapsamaktadır. Kendilerine özgül antijenle karşılaştıklarında matür naif B hücreler, yüzeylerindeki IgM ve IgD'ye antijen bağlanması sonucu aktive olarak çoğalmaya başlarlar. Tek bir hücre bir hafta içerisinde 5000 hücreye kadar çoğalabilmekte ve 10^{12} antikor molekülü salgılayabilmektedir (10, 12).

Ana olarak T-bağımlı ve T-bağımsız olarak iki tip B hücre aktivasyon yolağı vardır. Tekrarlayan bölgeler içeren protein-dışı antijenlere (karbonhidratlar, bazı lipitler, bazı nükleik asitler gibi) karşı, antijene özgül T hücre gereksiz antikor üretilmesine T-bağımsız antikor üretimi denilmektedir. Bu yanıt sırasında antijen ile karşılaşan B hücrelerin bir kısmı çoğalan blastlara ve bir kısmı IgM antikorunu üreten kısa ömürlü plazma hücrelerine dönüşmektedir. Üretilen antikorlar genellikle düşük afinite ile

antijenlere bağlanmaktadır. T-bağımsız B hücre yanıtında hafıza hücreleri oluşmamaktadır (10).

Protein antijenlere karşı antikor üretimi sırasında CD4⁺ yardımcı T hücreler devreye girmektedir. Bu yanıt, T-bağımlı antikor üretimi olarak adlandırılır. Parakortikal alanlarda naif B hücreler, kendilerine özgül antijen ile karşılaştıkları zaman, primer follikül merkezlerine göç ederek folliküler dendritik hücreler ile germinal merkezleri oluştururlar (Şekil 3a). Her bir germinal merkezde T-bağımlı humoral immün yanıt, germinal merkez reaksiyonu oluşturarak proliferasyon, izotip değişimi, somatik hipermutasyon ve seleksiyon, diferansiyasyon olmak üzere dört aşama ile gelişmektedir (Şekil 3b) (10).



Şekil 3. Lenfoid follikül ve germinal merkez (H&E, 100X) (a). Germinal merkezde B hücre aktivasyonu (10) (b).

2.3.1.4.1. Proliferasyon

Antijen tarafından uyarılan B blast hücreleri sentroblastlara dönüşüp birikerek germinal merkezin koyu zonunu oluşturmaktadırlar. Sentroblastlar, hızlı çoğalan ve yüksek proliferatif endekse sahip hücrelerdir. Bunu hücre döngüsü inhibitörlerinin inaktivasyonu, hücre döngüsü aktivatörlerinin ekspresyonu ve telomeraz aktivitesi ile sağlarlar. Ayrıca BCL2 gibi anti-apoptotik genlerin

azalmış ekspresyonu ve CD95 gibi pro-apoptotik genlerin artmış ekspresyonu ile yüksek özgüllüğe sahip hücrelerin hayatta kalabilmesi hedeflenmektedir.

2.3.1.4.2. Somatik hipermutasyon

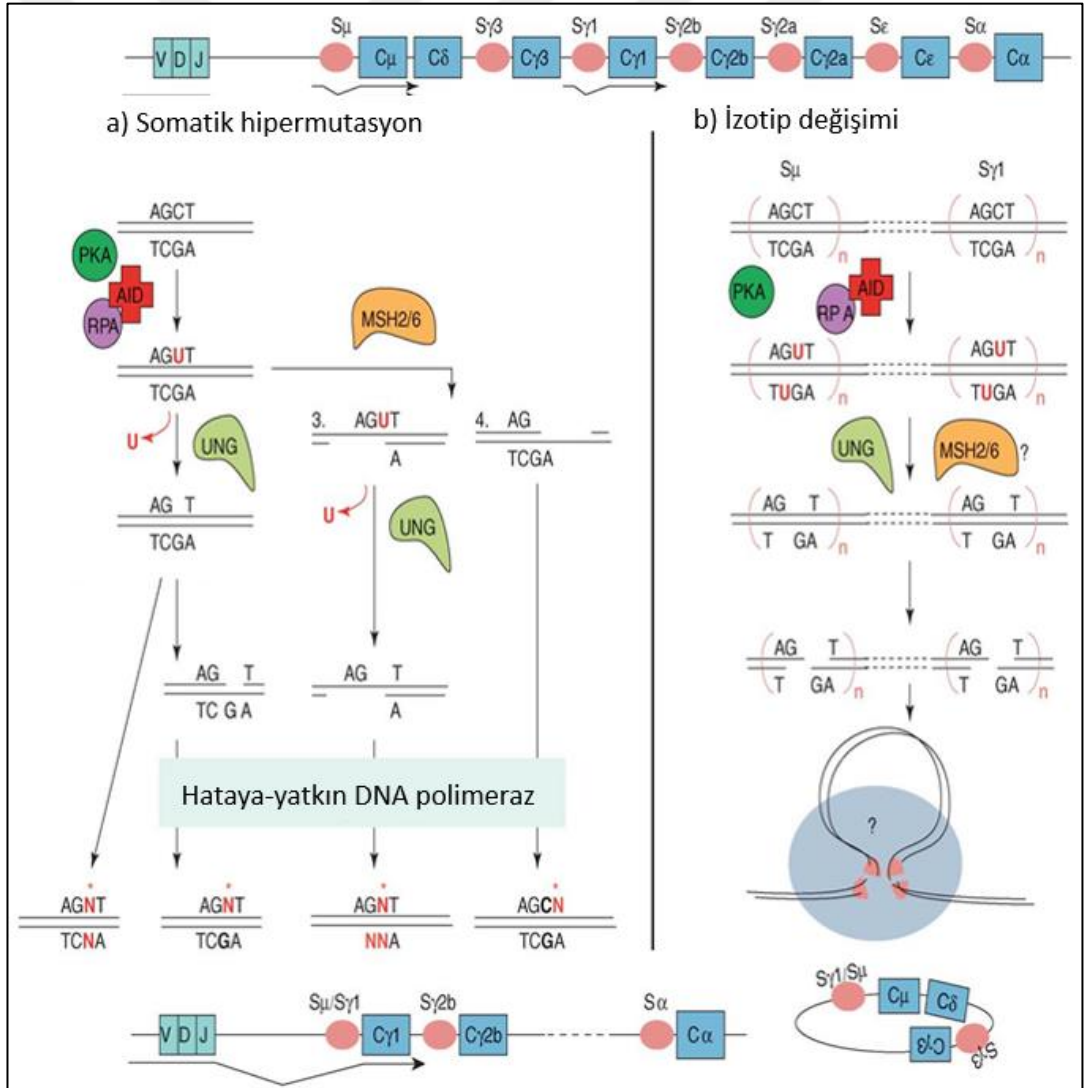
Sentroblastlarda, immünglobulin V bölgeleri genlerinde somatik hipermutasyon ile antikor afinitesinde değişiklik oluşması sağlanmaktadır. Böylece birkaç öncül hücreden çok sayıda çeşitlilikte antikor üretebilen B-hücre popülasyonu oluşturulmaktadır. Bunlar arasında sunulan antijene daha özgül antikor oluşması sağlanarak antikor afinitesinde artış (afinite matürasyonu) gerçekleşmektedir.

Somatik hipermutasyon oluşmasında, aktivasyonla-indüklenen sitidin deaminaz (AID) enzimi rol oynamaktadır. AID başta immünglobulin V bölgesi olmak üzere DNA üzerindeki sitozin nükleotidlerini urasile çevirmektedir. Böylece normalde DNA'da bulunmayan urasil nükleotidini içeren DNA dizileri oluşmasını sağlar. Hücreler, bu hatalı durumu iki çeşit mekanizma ile tamir etmeye çalışırlar. Birincisi, baz eksizyon tamir mekanizması olup UNG enzimi rol oynamaktadır. UNG, urasilleri DNA dizisinden çıkararak abazik DNA alanları oluşturur. İkincisi ise yanlış-eşleşme tamir mekanizması olup MLH1/PMS2 ve MSH2/MSH6 proteinleri dimerler halinde çalışarak urasil içeren daha geniş tek zincirli DNA dizilerini çıkararak etkinliklerini gösterirler. Sonra hataya-yatkın DNA polimeraz ile bu DNA boşlukları farklı nükleotidler ile doldurulmakta ve somatik hipermutasyon gerçekleşmektedir (Şekil 4a) (9, 15, 16).

2.3.1.4.3. Seleksiyon ve izotip değişimi

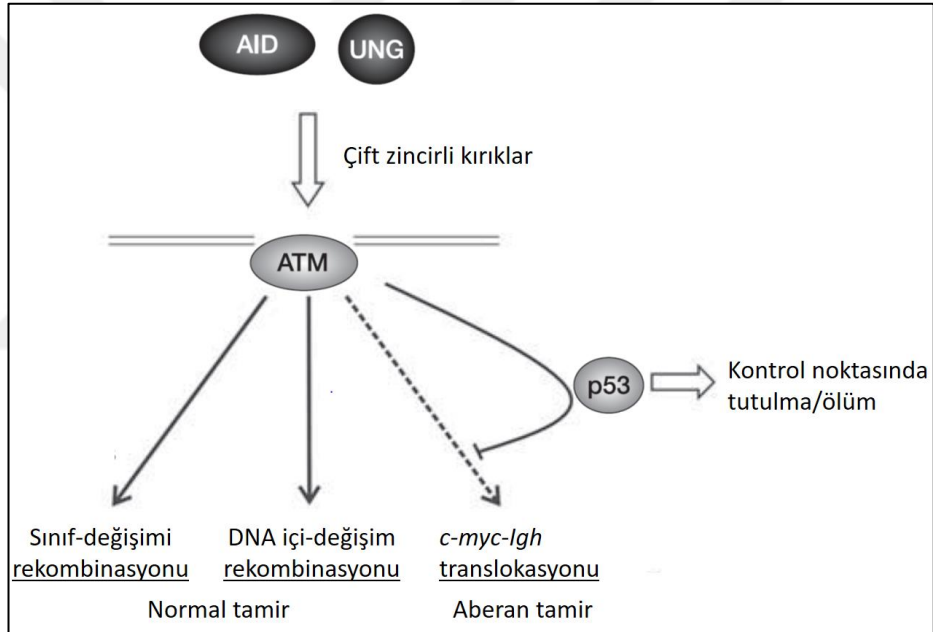
Olgunlaşan sentroblastlar, germinal merkezin diğer tarafındaki açık zonda sentrositlere dönüşmektedir. Sentrositler, immünglobulinleri yüzeylerinde yeniden eksprese etmeye başlayan ve çoğalamayan hücrelerdir. Sentrositler, ağır zincir (sınıf) izotip değişimi olarak isimlendirilen aşama ile IgM ve IgD dışındaki diğer antikor tiplerini sentezleyebilirler. Üretilen antikor tipi ve

miktarını; immün yanıtı neden olan antijen tipi, T hücrelerin katılımı, anatomik lokalizasyon ve antijenle daha önceden temas öyküsü gibi faktörler belirler. İzotip değişimi sırasında yine AID enziminin rolü bulunmaktadır (10). AID, UNG ve yanlış-eşleşme tamir proteinleri somatik mutasyondaki görevleri gibi mekanizmalar ile önce DNA'daki sitozenleri urasile çevirmekte, sonra ise tamir proteinleri ile abazik segmentler veya daha uzun tek zincirli DNA kırıkları oluşturmaktadır. Ancak izotip değişimi sırasında oluşan urasiller karşılıklı olarak hemen hemen komşu olduğu için çift zincirli DNA kırıkları oluşmaktadır. Çift zincir DNA kırık alanları palindromik olarak eşleştiginde aradaki DNA halka halinde çıkarılmakta ve izotip değişimi gerçekleşmektedir (Şekil 4b) (9, 15-17)



Şekil 4. Somatik hipermutasyon **(a)** ve izotip değişimi **(b)** (16).

B hücrelerde, somatik hipermutasyon ve izotip değişimi sırasında, AID ve UNG DNA tamir proteinleri ile fizyolojik olarak DNA mutasyonları ve DNA kırıkları oluşmaktadır. Bu yolakta görevli proteinlerin, immünglobulin genleri dışındaki genlerde de kontrolsüz ve hatalı olarak DNA kırıkları oluşturdukları bilinmektedir. Böylece lenfoma patogeneğinde, translokasyon mutasyonlarının oluşmasında rolleri olduğu yönünde bilgiler mevcuttur. Ayrıca son kontrol noktalarında yer alan ATM ve P53 gibi tümör baskılayıcı proteinlerin işlevlerinin bozulması da lenfomagenez sürecinde önemli olduğu düşünülmektedir (Şekil 5) (5-8, 18-27).



Şekil 5. Çift zincirli DNA kırıklarının oluşumu ve tamir edilmeleri (5).

2.3.1.4.4. Diferansiyasyon

Germinal merkezde seçilen sentrositler, post-germinal merkez diferansiyasyonu ile plazma hücresi veya hafıza hücrelerine dönüşmektedirler. Bu dönemde BCL6 inaktivasyonu ve CD40-CD40L aktivasyonun önemli rol oynamaktadır (10).

2.3.1.5. Plazma hücresi

Plazma hücreleri morfolojik olarak farklı görünümde, antikör üretimine yoğunlaşan farklılaşmış B hücrelerinin son gelişim basamağını oluşturan hücrelerdir. Morfolojik olarak, nükleer membran çevresinde dağılım gösteren kromatin izlenen ekzantrik yerleşimli nükleus ve düz endoplazmik retikulum ve golgi organları ile bol ve yoğun sitoplazmalı görünümde dir Sentrositlerin plazma hücresine farklılaşması yolağında, IRF4 ve BLIMP1 artışı ile PAX5 inaktivasyonu rol oynamaktadır (10).

2.3.1.6. Hafıza B hücresi

Hafıza B hücreleri aynı antijenle tekrar karşılaşma durumunda hızlı yanıtta sorumlu germinal merkezde T-bağımlı B hücre aktivasyonunda oluşturulan hücrelerdir. Bu hücreler uzun ömürlü olup, yüksek seviyede anti-apoptotik BCL2 proteini içerirler (10).

2.4. Matür B-Hücreli Lenfoma Sınıflandırması

DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü)'nün 2008 yılı sınıflamasına göre matür B-hücreli lenfoid neoplaziler Tablo 1'deki gibi gruplara ayrılarak incelenmektedir (1).

Tablo 1. DSÖ 2008 Matür B-hücreli lenfoid neoplaziler sınıflandırması (1).

Kronik lenfositik lösemi / Küçük lenfositik lenfoma (KLL / SLL)
B-hücreli prolenfositik lösemi
Splenik marjinal zon lenfoma
Saçlı hücreli lösemi
Lenfoplazmasitik lenfoma
Ağır zincir hastalıkları
Plazma hücreli myelom
Kemiğin soliter plazmasitomu
Ekstraosseöz plazmasitom
Mukoza ilişkili lenfoid dokunun ektranodal marjinal zon lenfoması (MALT lenfoma)
Nodal marjinal zon lenfoma
Foliküler lenfoma
Primer kutanöz follikül merkez lenfoması
Mantle hücreli lenfoma
Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, NOS
T hücre/Histiyositten zengin büyük B-hücreli lenfoma
Primer santral sinir sistemi DBBHL'sı
Primer kutanöz DBBHL, bacak tipi
Yaşlılığın EBV+ DBBHL'sı
Lenfomatoid granulomatosis
Kronik inflamasyon ilişkili diffüz büyük B-hücreli lenfoma
Primer mediastinal büyük B-hücreli lenfoma
İntravasküler büyük B-hücreli lenfoma
ALK pozitif büyük B-hücreli lenfoma
Plazmablastik lenfoma
HHV8-ilişkili multisentrik Castleman hastalığından kaynaklanan büyük B-hücreli lenfoma
Primer efüzyon lenfoma
Burkitt lenfoma
B-hücreli lenfoma, diffüz büyük B-hücreli lenfoma ile Burkitt lenfoma arası özellikler gösteren
B-hücreli lenfoma, diffüz büyük B-hücreli lenfoma ile klasik Hodgkin lenfoma arası özellikler gösteren

2.5. Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma

Diffüz büyük B-hücreli lenfoma (DBBHL), diffüz büyüme paterni gösteren normal makrofaj çekirdeğine eşit veya daha büyük boyutta B-lenfoid hücrelerden oluşan ve erişkinlerde en sık görülen Hodgkin-dışı lenfoma tipidir (1, 2). DBBHL'lar morfolojik bulgular, immünofenotipik bulgular, gen ekspresyonu, tedavi yanıtı ve prognoz açısından oldukça heterojen bir hastalık grubudur (28).

2.5.1. Epidemiyoloji ve etiyoloji

Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, erişkinlerde izlenen en sık Hodgkin-dışı lenfoma olup bunların yaklaşık %25-30'unu oluşturmaktadır (29-31). Yaşlılarda daha sık olmakla birlikte genç erişkin ve çocuklarda da görülebilmektedir. Hastalığın izlendiği median yaş 7. dekattır. Erkeklerde kadınlara göre hafif daha çok oranda görülmektedir (1, 12, 32).

T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu verilerine göre ülkemizde 2014 yılında 100 000 erkekte 7,4'ünde ve 100 000 kadından 5'inde Hodgkin dışı-lenfoma görülmüştür (33).

Diffüz büyük B-hücreli lenfomanın etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Genellikle *de novo* (primer) olarak gelişmektedir. Ancak daha az agresif olan lenfomalardan (KLL/SLL, folliküler lenfoma, marjinal zon lenfoma veya nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma) progresyon veya transformasyon (sekonder) şeklinde de görülebilmektedir (1, 12).

İmmünyetmezlik varlığı hastalığın gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Ataksi-telenjiyektazi, Wiscott-Aldrich sendromu, ağır kombine immünyetmezlik, Nijmegen kırılma sendromu, hiper IgM sendromu, otoimmün lenfoproliferatif hastalık, sistemik lupus eritematozis, kazanılmış immün yetmezlik sendromu gibi durumlar ile DBBHL arasında ilişki gösterilmiştir. İmmünyetmezlik olan diffüz büyük B-hücreli lenfoma olgularda Epstein-Barr virüs enfeksiyonunun daha sık görüldüğü bildirilmiştir(12, 28, 30).

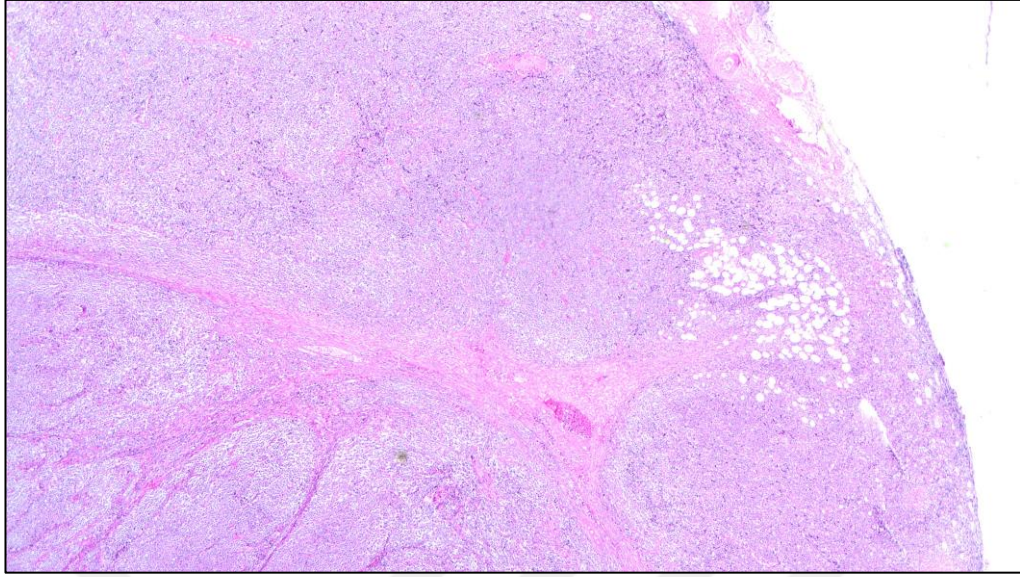
2.5.2. Klinik özellikler ve yerleşim yeri

Hastalar genellikle nodal veya ektranodal yerleşimli, tek veya çok sayıda, hızlı büyüyen kitle ile tanı almaktadır. Olguların bir kısmı asemptomatik iken yerleşim yerine bağlı olarak farklı semptomlar izlenebilir (1).

Hastalık ilk olarak ektranodal bölgeden gelişebileceği gibi nodal hastalık ilerleyerek ektranodal tutulum da gösterebilir Hastalık ektranodal yerleşimde en sık olarak gastrointestinal sistemde izlenmektedir. Kemik, testis, dalak, Waldeyer halkası, tükürük bezi, tiroid, böbrek ve adrenal bezler de hastalığın sıklıkla görüldüğü ektranodal bölgelerdir. Kemik iliği tutulumu olguların %11-27'sinde görülebilmektedir. Kemik iliğinde, diffüz büyük B-hücreli lenfoma tutulumu konkordan tutulum, düşük dereceli diğer lenfomaların tutulumu ise diskordan tutulum olarak isimlendirilmektedir. Diffüz büyük B-hücreli lenfomada, konkordan kemik iliği tutulumu daha kötü klinik seyirle ilişkiliyken, diskordan kemik iliği tutulumunun kötü prognoz ile ilişkisi gösterilememektedir (1, 12).

2.5.3. Morfolojik özellikler

Lenf nodu yapısını sıklıkla tamamen değiştiren, diffüz proliferasyon gösteren iri lenfoid infiltrasyon izlenmektedir. Lenf nodunda parsiyel tutulum, interfolliküler alanda ve daha az olarak sinüzoidal yerleşimli olarak izlenebilir. Perinodal dokuda sıklıkla infiltrasyon görülebilmektedir. Kalın veya ince fibröz bantlar izlenebilir (Şekil 6) (1, 12).



Şekil 6. Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, lenf nodu (H&E, 40X).

DBBHL sitomorfolojik olarak çeşitli varyantlara ayrılabilir (1, 12):

- Histolojik varyantlar
 - Sentroblastik
 - İmmünoblastik
 - Anaplastik
 - Nadir morfolojik varyantlar (Miksoid, fibriller, psödorozet oluşturan, iğsi hücreli, taşlı yüzük hücreli, mikrovillöz, rozet oluşturan, alveoler, dokuda belirgin eozinofili izlenen, kristal depolayan çok sayıda histiyosit içeren gibi)

Histolojik varyantların prognoz ile ilişkisi tam olarak gösterilememekle ve ayrımlarının sıklıkla gözlemciler arası farklılıklar göstermesi ile birlikte immünoblastik ve anaplastik varyantın daha kötü seyirli hastalık ile birlikteliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (34-36) .

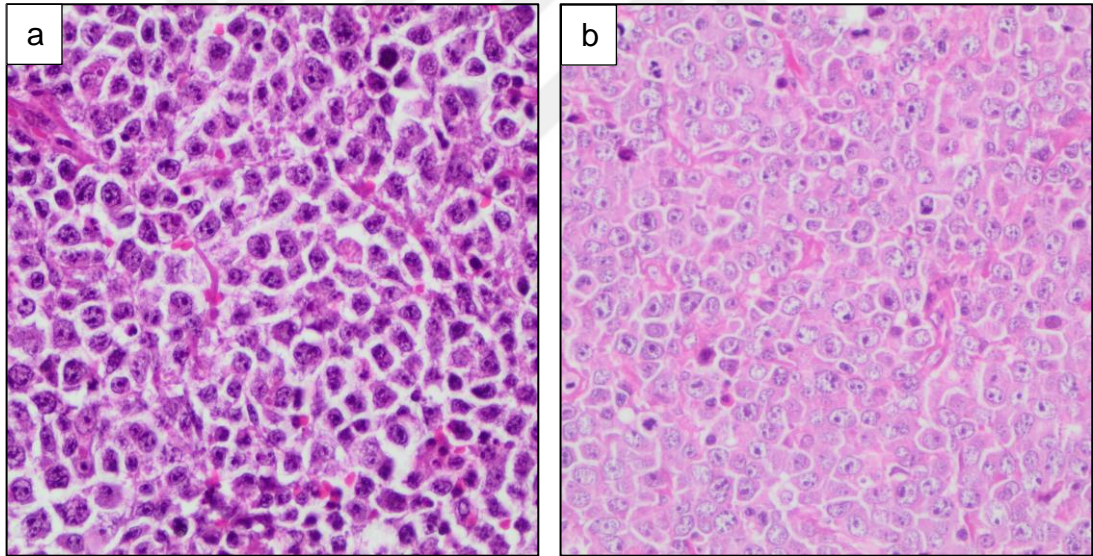
2.5.3.1. Sentroblastik varyant

En sık izlenen morfolojik varyanttır. Sentroblastlar, orta-iri boyutta, oval-yuvarlak şekilde ince kromatin içeren nükleuslu, nükleer membran sınırında yerleşimli 2-4 nükleol içeren hücrelerdir. Hücreler genellikle dar sitoplazmalı

amfofilik veya bazofilik görünümündedir (Şekil 7a). Bazı tümörler monomorfik olarak (%90'dan fazla) sentroblastik hücre içermekteyken çoğu olguda hücreler, polimorfik olarak immünoblastlar ile sentroblastlardan (%90'dan az) karışık olarak görülmektedir. Kemik veya diğer ektranodal yerleşimli olgularda multilobe nükleuslu tümör hücreleri izlenebilir (1).

2.5.3.2. İmmünoblastik varyant

Bu varyantta hücrelerin %90'dan fazlasını, merkezde yerleşim gösteren tek nükleollü ve görece daha geniş sitoplazmaya sahip immünoblastik hücreler oluşturmaktadır (Şekil 7b). İmmünoblastik hücrelerde plazmasitoid farklılaşma görülebilir. Bu hücreler, bazı kaynaklarda plazmablastik varyant olarak isimlendirilebilmektedir (1, 12).



Şekil 7. Sentroblastik varyant **(a)** ve immünoblastik varyant **(b)** (H&E, 200X).

2.5.3.3. Anaplastik varyant

Anaplastik varyantta yuvarlak, oval veya poligonal şekilli pleomorfik nükleusa sahip iri hücreler izlenmektedir. Bu hücreler Hodgkin lenfomada izlenen Reed-Sternberg hücreleri veya anaplastik büyük hücreli lenfomada izlenen anaplastik hücreler ile karışabilir (1).

2.5.4. Diffüz büyük B-hücreli lenfoma alt grupları ve alt tipleri

DSÖ 2008 yılı lenfoma sınıflandırmasına göre DBBHL'larda morfolojik, biyolojik, immünohistokimyasal ve klinik özelliklere bağlı olarak farklı alt gruplamalar ve alt tiplendirmeler yapılmaktadır (Tablo 2). Özel alt tip ve antiteler dışında olgulara "Diffüz Büyük B-hücreli lenfoma, NOS" tanısı verilmektedir (1).

Tablo 2. DSÖ 2008 yılı DBBHL alt grupları ve alt tipleri (1).

<u>Moleküler alt gruplar</u> <ul style="list-style-type: none">▪ Germinal merkez B-hücre-benzeri▪ Aktive B-hücre-benzeri
<u>İmmünohistokimyasal alt gruplar</u> <ul style="list-style-type: none">▪ Germinal merkez B-hücre▪ Germinal merkez B-hücre dışı▪ CD5-pozitif DBBHL
<u>Diffüz büyük B-hücreli lenfoma alt tipleri</u> <ul style="list-style-type: none">▪ T-hücre/histiyositten-zengin büyük B-hücreli lenfoma▪ Primer santral sinir sistemi DBBHL'sı▪ Primer kutanöz DBBHL, bacak tipi▪ Yaşlılığın EBV-pozitif DBBHL'sı
<u>Diğer büyük B-hücreli lenfomalar</u> <ul style="list-style-type: none">▪ Primer mediastinel büyük B-hücreli lenfoma▪ İntravasküler büyük B-hücreli lenfoma▪ Kronik inflamasyon ile ilişkili DBBHL▪ Lenfomatoid granülomatozis▪ ALK-pozitif büyük B-hücreli lenfoma▪ Plazmablastik lenfoma▪ HHV8-ilişkili multisentrik Castleman hastalığından gelişen büyük B-hücreli lenfoma▪ Primer efüzyon lenfoması
<u>Arada kalınan olgulara yönelik antiteler</u> <ul style="list-style-type: none">▪ B-hücreli lenfoma, sınıflanamayan, diffüz büyük B-hücreli lenfoma ile Burkitt lenfoma arası özellikler gösteren▪ B-hücreli lenfoma, sınıflanamayan, diffüz büyük B-hücreli lenfoma ile klasik Hodgkin lenfoma arası özellikler gösteren

2016 yılında DSÖ lenfoma sınıflamasında güncelleme yapılmıştır (3). Buna göre matür B-hücre sınıflaması, Tablo 3'de görüldüğü gibidir.

Tablo 3. DSÖ 2016 güncellemesine göre matür B-hücreli neoplazilerin sınıflandırılması (3).

Kronik lenfositik lösemi / Küçük lenfositik lenfoma (KLL / SLL)
Monoklonal B-hücreli lenfositozis *
B-hücreli prolenfositik lösemi
Splenik marjinal zon lenfoma
Saçlı hücreli lösemi
Splenik B-hücreli lenfoma/lösemi, sınıflandırılmayan
Lenfoplazmasitik lenfoma
Ağır zincir hastalıkları
Önemi belirlenemeyen IgM monoklonal gamapati *
Önemi belirlenemeyen IgG/A monoklonal gamapati *
Plazma hücreli myelom
Kemiğin soliter plazmasitomu
Ekstraosseöz plazmasitom
Monoklonal immünglobulin depo hastalığı *
Mukoza ilişkili lenfoid dokunun ektranodal marjinal zon lenfoması (MALT lenfoma)
Nodal marjinal zon lenfoma
Foliküler lenfoma
Pediyatrik tip folliküler lenfoma *
IRF4 reorganizmanı izlenen büyük B-hücreli lenfoma **
Primer kutanöz follikül merkez lenfoması
Mantle hücreli lenfoma
Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, NOS
T hücre/Histiyosit zengin büyük B-hücreli lenfoma
Primer santral sinir sistemi DBBHL'sı
Primer kutanöz DBBHL, bacak tipi
EBV+ DBBHL *
EBV+ mukokutanöz ülser **
Lenfomatoid granülomatosis
Kronik inflamasyon ilişkili diffüz büyük B-hücreli lenfoma
Primer mediastinel büyük B-hücreli lenfoma
İntravasküler büyük B-hücreli lenfoma

Tablo 3 (devamı). DSÖ 2016 güncellemesine göre matür B-hücreli neoplazilerin sınıflandırılması (3).

ALK+ büyük B-hücreli lenfoma
Plazmablastik lenfoma
Primer efüzyon lenfoma
HHV8+ DBBHL, NOS **
Burkitt lenfoma
11q aberasyonu izlenen Burkitt-benzeri lenfoma **
Yüksek dereceli B-hücreli lenfoma, MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 rearranjmanı izlenen *
Yüksek dereceli B-hücreli lenfoma, NOS *
B-hücreli lenfoma, sınıflanamayan, diffüz büyük B-hücreli lenfoma ile klasik Hodgkin lenfoma arası özellikler gösteren

* Matür B-hücreli neoplazilerin sınıflandırmasında DSÖ 2008 yılı sınıflandırmasına göre farklı tanı grupları.

** Matür B-hücreli neoplazilerin sınıflandırmasında önerilen ancak kesin olmayan antiteler.

2.5.5. Moleküler özellikler

2.5.5.1. Antijen reseptör genleri

Klonal olarak immünglobulin ağır ve hafif zincir genlerinde rearranjman izlenmektedir. T hücre reseptör (TCR) genlerinde genellikle mutasyon saptanmamaktadır (1).

2.5.5.2. Aberran somatik hipermutasyonlar

Olguların %50'den fazlasında *PIMI*, *MYC*, *RhoH/TTF* ve *PAX5* genlerinde somatik hipermutasyon izlenmektedir (1).

2.5.5.3. Kromozomal translokasyonlar

En sık olarak, olguların yaklaşık %30-40'nda *BCL6* geninde translokasyon izlenmektedir. *BCL6* geni, sıklıkla *IgH* geni ve daha az sıklıkla diğer genlerle translokasyon mutasyonu oluşturmaktadır. *BCL6* translokasyonunun özellikle

de novo DBBHL patogenezinde önemli olduğu bilinmektedir. *BCL6* geninde izlenen somatik mutasyonların da hastalık patogenezinde rolü olabileceği düşünölmektedir. *BCL6* geni 3q27 kromozom yerleşimli olup germinal merkez B hücrelerinde DNA hasar tamiri, hücre döngüsü, proliferasyon ve farklılaşma gibi görevleri olan birçok genin ekspresyonunu baskılayan transkripsiyon faktörü kodlamaktadır. *In vitro* ve hayvan modellerinde DBBHL patogenezinde, *BCL6* translokasyonu ile B-hücre farklılaşmasının inhibisyonu ve *P53* gibi önemli genlerin baskılandığı gösterilmiştir (19, 37).

BCL2 geninde yaklaşık %20-30 oranında rearanjman izlenmektedir. *BCL2* geni 18q21 kromozom yerleşimli olup apoptozisi inhibe eden ve fizyolojik DNA tamirinde görevli proteini kodlamaktadır. *BCL2* geninin özellikle *IGH* geninin promoter bölgesine translokasyonu, *BCL2* geninin aşırı ekspresyonuna yol açmaktadır (19, 38).

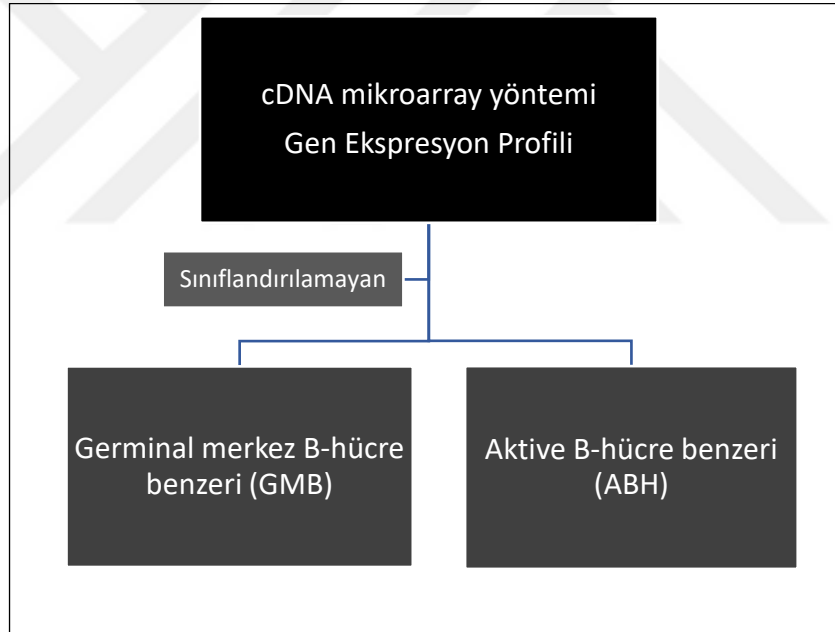
DBBHL olgularında, *MYC* geninde translokasyon varlığı yaklaşık %5-14 oranında bildirilmiştir. *MYC* geni 8q24 kromozom yerleşimli olup onkojenik hücre transformasyonuna katkıda bulunan birçok genin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü kodlamaktadır. *MYC* proteininin hücresel proliferasyon, apoptozis, metabolizma ve farklılaşma gibi birçok fizyolojik aşamada görevi vardır (19, 39, 40).

2.5.5.4. Double-hit lenfoma

MYC geni ve beraberinde *BCL2* veya *BCL6* genlerinde mutasyon izlenen olgular double-hit lenfoma, her üç gende translokasyon izlenen olgular triple-hit lenfoma olarak tanımlanmaktadır (19). Bu olguların oldukça kötü klinik seyirlerinin olduğu bildirilmiştir (41). Double-hit lenfoma olgularının büyük çoğunluğunun, DSÖ 2008 yılı lenfoma sınıflandırmasında “B-hücreli lenfoma, diffüz büyük B-hücreli lenfoma ile Burkitt lenfoma arası özellikler gösteren” grupta olduğu düşünölmektedir (42). Ancak son DSÖ lenfoma sınıflamasının 2016 yılı güncellemesinde “Yüksek dereceli B-hücreli lenfoma, *MYC* ve *BCL2* ve/veya *BCL6* rearanjmanı izlenen” olarak ayrı bir tanı grubu olarak tanımlanmaktadır (3).

2.5.5.5. Gen ekspresyon profili

Olgular, gen ekspresyon profillerine göre germinal merkez B-hücre benzeri (GMB) ve aktive B-hücre benzeri (ABH) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (Şekil 8) (43). GMB grupta ABH grubuna göre daha iyi klinik seyir izlenmektedir (44). Hastaların beş yıllık toplam sağkalım oranları, GMB grubunda %76 iken ABH grubunda %34 olarak bilinmektedir (45). Diffüz büyük B-hücreli lenfomanın moleküler alt gruplarında farklı malign transformasyon yollarının etkili olduğu bildirilmektedir (46, 47). Germinal merkez B-hücre benzeri alt grupta, *BCL2* ve *MYC* translokasyonu, *EZH2* mutasyonu ile *PTEN* delesyonu daha sık izlenirken, aktive B-hücre benzeri alt grupta NF- κ B yolağının aktivasyonu ile *CARD11*, *CD79B*, *TNFAIP3* ve *MYD88* mutasyonları daha sık izlenmektedir (48).



Şekil 8. Gen ekspresyon profiline göre DBBHL moleküler alt grupları (43).

2.5.5.6. Yeni nesil dizileme

P53, *BCL6*, *CREBBP/EP300*, *KMT2D/C [MLL2/3]*, *MEF2B*, *B2M*, *CD58* mutasyonları gösterilmektedir. GMB-DBBHL olgularında *EZH2*, *GNA13* mutasyonları ve *BCL2* translokasyonları daha sık izlenirken ABH-DBBHL

olgularında *MYD88*, *CD79a*, *CARD11*, *TNFAIP3* mutasyonları ve NF-kB yolağındaki mutasyonlar daha sık görülmektedir (49, 50).

2.5.6. İmmünohistokimyasal özellikler

Neoplastik hücrelerde, CD19, CD20, CD22, CD79a gibi B-hücre belirteçleri ile ekspresyon izlenmektedir. Bunlardan bir veya daha fazlasında ekspresyon kaybı görülebilir. Özellikle rituksimab tedavisi alan olgularda CD20 ekspresyon kaybı görülebilir. Olguların %50-75'inde yüzeysel veya sitoplazmik yerleşimli immünglobulin ekspresyonu (IgM>IgG>IgA>IgD) izlenebilir. CD45 ve PAX5 pozitifliği izlenebilir. CD30 pozitifliği özellikle anaplastik varyantta izlenebilmektedir. CD10, BCL6 ve IRF4/MUM1 ekspresyonları değişen oranlarda görülebilir (1). CD10 ile %30-60, BCL6 ile %60-90, IRF4/MUM1 ile %35-65 olguda boyanma izlenmektedir. BCL2 antikoru ile olguların %60'ında pozitiflik saptanmaktadır. Yaklaşık olarak olguların %10'unda CD5 immünekspresyonu saptanmaktadır. Bazı olgularda CD38, CD138 gibi plazma hücre belirteçleri ile boyanma görülebilmektedir. Olguların %25-40'ında MYC antikoru ile boyanma görülebilmektedir. Neoplastik hücrelerde, Ki67 immünohistokimyasal boyaması ile yüksek proliferatif endeks (%40-90) izlenmektedir. Olguların %20-60'ında P53 ile boyanma görülebilmektedir.(12).

2.5.6.1. İmmünohistokimyasal yöntemle gen ekspresyon profillerinin belirlenmesi

Diffüz büyük B hücreli lenfoma, gen ekspresyon profillerine göre moleküler olarak, germinal merkez B-hücre-benzeri ve aktive B-hücre-benzeri iki ayrı gruba ayrılmaktadır. Klinik uygulanabilirlik, maliyet gibi nedenlerle her hastada gen ekspresyon profil analizi yapılamadığından immünohistokimyasal algoritmalarla bu gruplar belirlenmeye çalışılmıştır. Literatürde bu yönde immünohistokimya temelli algoritma belirlemeye çalışan çok sayıda çalışma olmakla beraber en çok kabul gören Hans algoritması olarak bilinmektedir (51-

53). Buna göre CD10, BCL6 ve MUM1 immünohistokimya belirteçleri ile hastalar Germinal merkez B-hücre benzeri (GMB) ve Germinal merkez B-hücre benzeri dışı (GMB-dışı) olarak iki gruba ayrılmaktadır. CD10 pozitif veya CD10negatif/BCL6pozitif/MUM1negatif olgular GMB benzeri gruptayken CD10negatif/BCL6negatif veya CD10negatif/BCL6pozitif/MUM1 pozitif olgular GMB-dışı grupta yer alırlar. Pozitiflik için eşik değer olarak, neoplastik hücrelerin %30'undan fazla boyanma varlığı kabul edilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile immünohistokimyasal yöntemlerin, gen ekspresyon profilini saptamada güvenilirliğinin tam olmadığı bildirilmektedir. Buna göre moleküler olarak belirlenen gruplarda izlenen prognoz farkı, immünohistokimyasal algoritmalarla belirlenen gruplarda izlenmemektedir (54). Ancak yine de immünohistokimyasal gruplandırma, farklı tedavi modalitelerinin uygulanması nedeniyle önerilmektedir (55-58). Ayrıca son yıllarda immünohistokimyasal algoritmalara alternatif olarak, RNA transkriptlerinin kantifikasyonu ile gen ekspresyonu profilinin belirlenmesine yönelik yeni yöntemler geliştirilmektedir (44, 59).

2.5.6.2. Double-ekspresor DBBHL

Son yıllarda MYC ve BCL2 ile immünoekspresyon izlenen olgular double-ekspresor DBBHL olarak tanımlanmaktadır. Bu olguların, kaynaklandığı hücre tipinden bağımsız olarak agresif klinik seyir ve daha kötü toplam sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (60-64). Bu olgular belirlenirken eşik değer olarak literatürde farklı değerlerin varlığı görülmüştür. Ancak en sık olarak, MYC belirteci için neoplastik hücrelerin %40'ından ve BCL2 belirteci için neoplastik hücrelerin %50'sinden fazla pozitiflik izlenen olguların double-ekspresor gruba girdiği kabul edilmektedir (3). Double-ekspresor DBBHL olgularında double-hit lenfoma olgularına göre daha iyi prognoz izlendiği ancak geri kalan DBBHL olgularına göre daha kötü prognoz izlendiği bilinmektedir. Bu nedenle double-ekspresyonun ayrı bir antiteden çok prognostik bir faktör olduğu düşünülmektedir. En son olarak DSÖ lenfoma sınıflamasının 2016 yılı

revizyonunda, MYC ve BCL2 pozitifliği izlenen diffüz büyük B-hücreli lenfoma olguları kötü prognoz ile ilişkili olarak kabul edilmiş ve double-ekspresor lenfoma olarak tanımlanmıştır (3).

2.5.7. Klinik gidiş ve prognostik değerlendirme

Olguların yaklaşık %60'ında tam remisyona sağlanabilse de çoğu olguda relaps veya tedaviye refrakter hastalık izlenmektedir. Klinik gidişi tahmin edebilmek için klinik ve laboratuvar verileriyle belirlenen "Uluslararası prognostik endeks skoru (IPI skoru)" sistemi oluşturulmuştur (65). İlerleyen yıllarda yaşa göre düzeltilmiş IPI skorlama sistemi (AA-IPI) ve revize edilmiş IPI skorlama sistemleri (R-IPI) oluşturulmuştur (Tablo 4) (66). En son olarak ise özellikle tedaviye rituksimab eklenmesi sonrası skorlama sistemlerinin prediktif değeri azalması sonucu genişletilmiş IPI skorlama sistemi (NCCN-IPI) kullanılmaya başlanmıştır (Tablo 5) (67). R-IPI ve NCCN-IPI skorlama sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tablo 4. IPI ve R-IPI skorlama sistemleri (66).

<u>IPI risk grupları</u>	<u>Kötü prognostik değişken sayısı</u>
➤ Düşük	0 veya 1
➤ Düşük/Orta	2
➤ Yüksek/Orta	3
➤ Yüksek	4 veya 5
<u>Revize edilmiş IPI (R-IPI) risk grupları</u>	<u>Kötü prognostik değişken sayısı</u>
➤ Çok iyi	0
➤ İyi	1 veya 2
➤ Kötü	3, 4 veya 5
<u>Kötü prognostik değişkenler (Her biri 1 puan)</u>	
<ul style="list-style-type: none">▪ 60 yaşından büyük olma▪ Kötü performans skoru (ECOG≥2)▪ İleri Ann Arbor evresi (III-IV)▪ İki veya daha fazla bölgede ektranodal tutulum▪ Serum LDH seviyesinin normalden fazla olması	

Tablo 5. NCCN-IPI skorumlama sistemi (67).

<u>NCCN-IPI Risk grupları</u>	<u>Skor</u>
➤ Düşük	0-1
➤ Düşük/Orta	2-3
➤ Yüksek/Orta	4-5
➤ Yüksek	≥6
<u>Kötü prognostik değişkenler</u>	<u>Puan</u>
▪ Yaş	
○ >40 ve ≤60	1
○ >60 ve ≤75	2
○ >75	3
▪ Serum LDH seviyesi	
○ Normalden fazla, 3 kata kadar	1
○ Normalin 3 katından fazla	2
▪ İleri Ann Arbor evresi (III-IV)	1
▪ Ekstranodal tutulum (Gastrointestinal sistem, karaciğer, akciğer, santral sinir sistemi, kemik iliği)	1
▪ Kötü performans skoru (ECOG≥2)	1

DBBHL'de kötü prognostik özellikler aşağıda (Tablo 6) belirtilmiştir:

Tablo 6. DBBHL'de kötü prognostik özellikler (12, 28).

Klinik	▪ Yüksek IPI skoru
Morfoloji	▪ İmmünoblastik varyant
İmmünohistokimya	▪ Double-ekspresör lenfoma ▪ GMB-dışı DBBHL ▪ Yüksek Ki67 proliferasyon endeksi ▪ P53 ekspresyonu ▪ CD5 pozitifliği ▪ CD44s ekspresyonu ▪ EBV pozitif olgular
Moleküler	▪ ABH DBBHL ▪ <i>BCL2</i> gen rearranjmanı ▪ <i>TP53</i> mutasyonu ▪ 3p11-p12 kromozom bölgesinde kazançlar

2.5.8. Tedavi ve sağkalım

Tedavide rituksimab, siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin ve prednizon'dan oluşan ve R-CHOP olarak tanımlanan çoklu ilaçtan oluşan kemoterapi rejimi kullanılmaktadır (68). Özellikle 2001 yılından beri kullanılmaya başlanan anti-CD20 ajanı olan rituksimab tedaviye yanıtta belirgin artışa neden olmuştur (69). Deri, testis, beyin gibi belirli alanlarda yerleşim gösteren büyük tümör kitlesine sahip olgularda tedaviye radyoterapi de eklenebilmektedir (70).

DBBHL olgularında 5 yıllık toplam sağkalım %46 olarak bilinmektedir (12).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgu Seçimi

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda Ocak 2007 ile Haziran 2015 yılları arasında "Diffüz Büyük B-hücreli lenfoma, NOS" tanısı almış 187 olgu arasında, sağkalım verilerini bildiğimiz, arşivimizde tümör örneği bulunan 90 olgu çalışmaya alındı.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- Olguya ait parafin bloğun mevcut olması
- Parafin blok üzerinde yeterli tümör alanının bulunması (>0,5cm)
- Tümör örneklerinin fiksasyon sorunu/mekanik artefakt içermemesi
- Olguya ait sağkalım bilgisine ulaşılması

3.2. Etik Kurul

Projemiz, 09.2016.578 sayılı protokol ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Projemiz; SAG-C-TUP-131216-0526 proje no ile, Marmara Üniversitesi BAPKO'nun (Bilimsel Araştırma ve Projeler Komisyonu) finansal desteği ile gerçekleştirilmiştir.

3.3. Yöntem

Olgulara ait formalin fikse parafine gömülmüş dokulardan, olgulara tanı verme sırasında hazırlanan H&E boyalı lamalar tekrar değerlendirildi ve histopatolojik inceleme yapıldı.

3.3.1. İmmünohistokimya

Formalin fikse parafine gömülü dokulardan, pozitif şarjlı lamlara 4µm kalınlığında kesitler alınarak AID, UNG, MLH-1, MSH-2, MSH-6, PMS-2, P53, ATM antikoru ile immünohistokimyasal yöntem uygulandı (Tablo 7). Olguların bir kısmında (36 olgu) manuel mikroarray yöntemi uygulanarak tümörü temsil eden bölgeler seçilerek çalışmaya dahil edildi. Otomatize immünohistokimya cihazı (Ventana medical systems inc., BenchMark Ultra) kullanılarak tüm örneklerde immünohistokimya boyama işlemi gerçekleştirildi. BCL2, BCL6, CD10, MUM1 ve Ki67 immünohistokimya analizi ise olgulara tanı verilme sırasında uygulanan lamların tekrar değerlendirilmesi ile gerçekleştirildi (Tablo 8).

Boyama işlemi esnasında eksternal pozitif kontrol dokuları kullanıldı. Pozitif kontrol dokusu olarak AID, UNG, ATM antikoru için olağan tonsil dokusuna ait kesitler; MLH-1, MSH-2, MSH-6, PMS-2, P53 antikoru için olağan kolon duvarına ait kesitler; MYC antikoru için önceden MYC mutasyonu olduğu gösterilmiş Burkitt lenfoma olgusuna ait kesitler kullanıldı.

Tablo 7. İmmünohistokimyasal incelemede kullanılan antikolar ve özellikleri.

Antikor	Marka	Klon	Dilüsyon	İnkübasyon süresi
MYC	Cell Marque	EP121	1:50	32 dk
AID	ThermoFischer	PA5-28077	1:100	60 dk
UNG	ThermoFischer	PA1-41024	2:100	60 dk
P53	Dako	D0-7	Kullanıma hazır kit	32 dk
ATM	ThermoFischer	MA1-23154	1:100	32 dk
MLH1	Dako	ES05	Kullanıma hazır kit	92 dk
MSH2	Dako	FE11	Kullanıma hazır kit	92 dk
MSH6	Dako	EP49	Kullanıma hazır kit	92 dk
PMS2	Dako	EP51	Kullanıma hazır kit	120 dk

Tablo 8. Olgulara tanı verilirken immünohistokimyasal incelemede kullanılan antikorlar ve özellikleri.

Antikor	Marka	Klon	Dilüsyon	İnkübasyon süresi
CD10	Leica	56C6	1:100	60 dk
BCL6	Biocare	LN22	1:100	40 dk
MUM1	Biocare	BCS	1:100	32 dk
Ki67	Biocare	SP6	1:100	32 dk

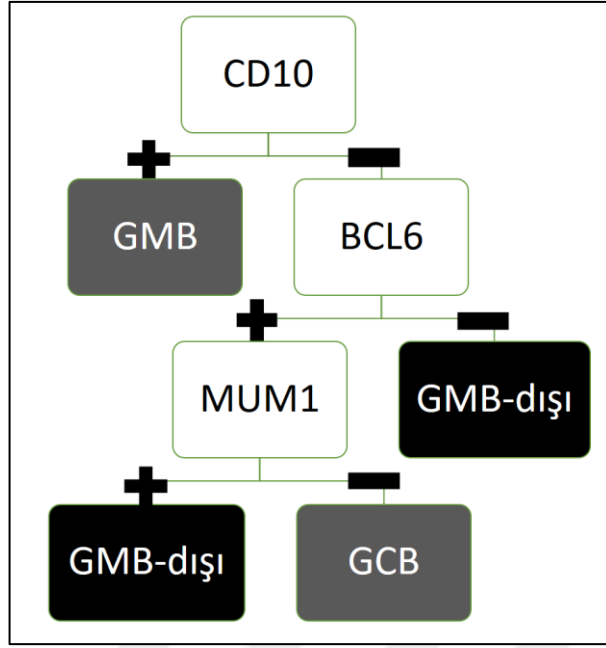
3.3.2. İmmünohistokimyasal değerlendirme

3.3.2.1. MYC ve BCL2

Çalışmadaki olgularda double-ekspresör grubun belirlenmesi için MYC ve BCL2 antikorları ile immünohistokimyasal analiz yapıldı. MYC pozitifliği için neoplastik hücrelerin %40'ı ve daha fazlasında, BCL2 pozitifliği için neoplastik hücrelerin %50'si ve daha fazlasında immünoekspresyon izlenmesi kriter olarak kabul edildi (3). Her iki antikorla pozitif saptanan olgular double-ekspresör olarak gruplandı.

3.3.2.2. CD10, BCL6, MUM1

Olgular, CD10, BCL6 ve MUM1 immünoekspresyonları ile Hans algoritmasına göre (Şekil 9) değerlendirilerek "germinal merkez B-hücre benzeri" ve "germinal merkez B-hücre dışı" olarak gruplandı (51). Bu antikorlar ile boyanma değerlendirilirken eşik değer olarak neoplastik hücrelerin %30'undan fazla boyanma kabul edildi.



Şekil 9. Hans algoritması (51).

3.3.2.3. AID ve UNG

AID ve UNG antikoru ile sitoplazmik immünekspresyon varlığı değerlendirildi. Lenfoma olgularında AID ve UNG antikolarını değerlendirme için henüz bir standardizasyon geliştirilmemiştir(71, 72). Çalışmamızda bu antikoların ekspresyonları değerlendirilirken, AID antikoru ile neoplastik hücrelerin %20'si ve üzeri, UNG antikoru ile neoplastik hücrelerin %50'si ve üzeri boyanan olgular değerlendirildi.

3.3.2.4. MLH1, MSH2, MSH6, PMS2

MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 yanlış eşleşme tamir genlerine ait protein ekspresyonları değerlendirilirken neoplastik hücrelerin tamamında bu antikolar ile immünekspresyonun izlenmediği olgular belirlendi. Ayrıca bu antikolar ile zayıf boyanan olgular değerlendirildi.

3.3.2.5. P53 ve ATM

P53 antikoru değerlendirilirken literatürde daha çok kullanılmış olan %50 eşik değeri olarak kabul edildi. Neoplastik hücrelerde nükleer P53 immünekspresyonu %50'den fazla ve %50'den az olarak gruplandı. ATM antikoru ile immünekspresyon kaybı olan olgular değerlendirildi ve %10'dan az ekspresyon izlenen olgular gruplandı.

3.3.2.6. Ki67

Olgularda neoplastik hücrelerde izlenen Ki67 proliferasyon indeksi sayıldı. Buna göre Ki67 antikoru ile saptanan nükleer immünekspresyon varlığı %50'nin altı, %50 ile 90 arası ve %90'ın üzeri olarak üç grupta incelendi.

3.3.3. Hastalara ait klinik ve demografik veriler

Hastane arşivinden klinik takip dosyalarına ulaşılabilen olgulara ait klinik ve demografik veriler elde edildi. Bu bağlamda tüm olguların tanı sırasındaki yaşları, cinsiyetleri ve tümör yerleşimleri değerlendirildi. Olguların klinik dosyalarına ulaşılabilen bir kısmında ise Ann Arbor evresi, IPI skoru, ECOG performans skorları, B semptom varlığı, serum LDH düzeyleri gibi klinik veriler değerlendirildi.

3.3.4. İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel analizler IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS) paket programı kullanılarak yapıldı. Kategorik verilerin değerlendirilmesinde çapraz tablolar oluşturularak Pearson ki-kare veya "*Fisher's exact*" testi yapıldı. Toplam sağkalım değerlendirmesi için Kaplan-Meier eğrileri oluşturuldu. Bağımsız faktörlerin toplam sağkalım ile ilişkisini değerlendirme için Log-rank testi uygulandı. Ayrıca toplam sağkalım açısından önemli ve bağımsız prognostik faktörleri belirlemek için Cox orantısal regresyon testi ile tek değişkenli ve çok değişkenli analizler uygulandı. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Demografik ve Klinik Bulgular

4.1.1. Demografik bulgular

Çalışmamıza dahil edilen 90 olgunun, 46'sı kadın (%51,1), 44'ü erkek (%48,9) olup erkek/kadın oranı: 0,96 olarak bulundu. Olguların tanı anındaki yaşlarının ortancası 59 idi (Minimum 5 ve maksimum 88). Olguların yaşlarını gruplandırdığımızda, 42 olgunun (%46,7) 60 üzeri yaşta, 48 olgunun (%53,3) ise 60 altı yaşta olduğu görüldü (Tablo 9). Hastaların sağkalım bilgileri değerlendirildiğinde, 46 olgunun (%51,1) hayatta olduğu, 44 olgunun (%48,9) ise hayatta olmadığı görüldü. Hastalara ait toplam sağkalım değerlendirilirken takip süresi ortalama 123 hafta (Minimum 1, maksimum 415 hafta) olarak saptandı.

Tablo 9. Demografik bulgular.

Demografik bulgular	Hasta Sayısı ve Yüzdesi	
	n	%
Erkek	44	48,9
Kadın	46	51,1
>60 yaş	42	53,3
≤60 yaş	48	46,7
Toplam	90	100

4.1.2. Tümör yerleşimi

Olgulara ait örneklerin 48'inin (%53,3) lenf nodu yerleşimli olduğu, 42'sinin ise (%46,7) lenf nodu-dışı (ekstranodal) yerleşimli olduğu görüldü. Lenf nodu dışı bölge yerleşimli olan olgulara ait tümör örneklerinin 12'sinin gastrointestinal sistemden, 11'inin Waldeyer halkasından, 11'inin kemikten ve 2'sinin akciğerden alındığı saptandı (Tablo 10).

Tablo 10. Tümör yerleşimi.

Tümör yerleşimi	Hasta Sayısı ve Yüzdesi	
	n	%
Lenf nodu	48	53,3
Ekstranodal	42	46,7
▪ GİS	12	
▪ Waldeyer halkası	11	
▪ Kemik	11	
▪ Akciğer	2	
▪ Diğer	6	

4.1.3. Tümör evresi ve klinik skorlama verileri

Ann Arbor evresi bilgilerine ulaşılabilen 58 hastadan 32'sinin evre IV hastalığa sahip olduğu, daha az sayıda olgunun ise evre I (3 olgu, %5,2), evre II (11 olgu, %19) ve evre III (12 olgu, %20,7) hastalık olduğu izlendi.

Tümör boyutu değerlendirilebilen 57 hastanın 10'unda (%17,5) 10 cm'den büyük kitle olduğu saptandı ve bunlar "Bulky" hastalık olarak kabul edildi.

R-IPI skorları ve NCCN-IPI skorları, skorlama için gerekli bilgilere ulaşılabilen 52 hastada hesaplandı. R-IPI ve NCCN-IPI skorları Tablo11'deki gibi dağılım göstermektedir. Olguların en sık aldıkları skorlar, R-IPI için 3 (17 olgu, %32,7) ve NCCN-IPI için 4 (13 olgu, %25) olarak belirlendi.

Tablo 11. Olguların R-IPI ve NCCN-IPI skor dağılımları.

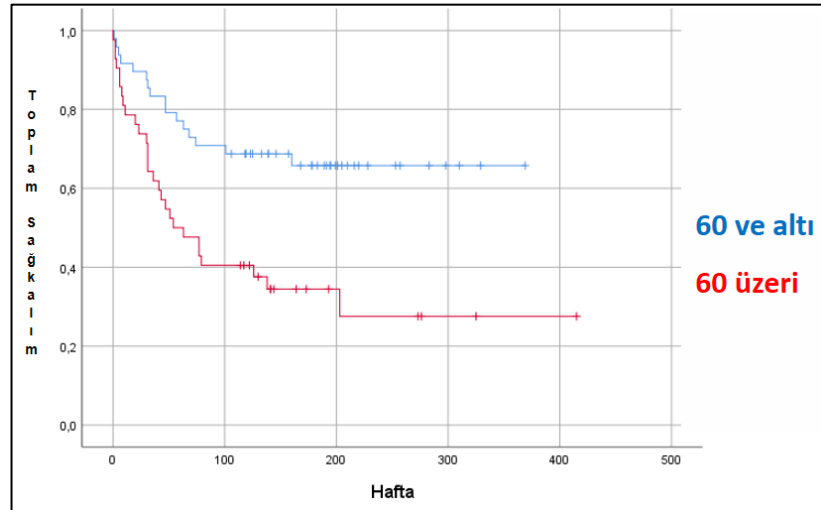
R-IPI skoru		Hasta Sayısı ve Yüzdesi n=52	
Çok İyi	0	8	(%15,4)
	1	9	(%17,3)
İyi	2	8	(%15,4)
	3	17	(%32,7)
Kötü	4	6	(%11,5)
	5	4	(%7,7)

NCCN-IPI skoru		Hasta Sayısı ve Yüzdesi n=52	
Düşük	0	2	(%3,8)
	1	7	(%13,5)
Düşük/Orta	2	3	(%5,8)
	3	9	(%17,3)
Yüksek/Orta	4	13	(%25,0)
	5	12	(%23,1)
Yüksek	6	3	(%5,8)
	7	3	(%5,8)

4.2. Demografik ve Klinik Bulguların Toplam Sağkalım ile İlişkisi

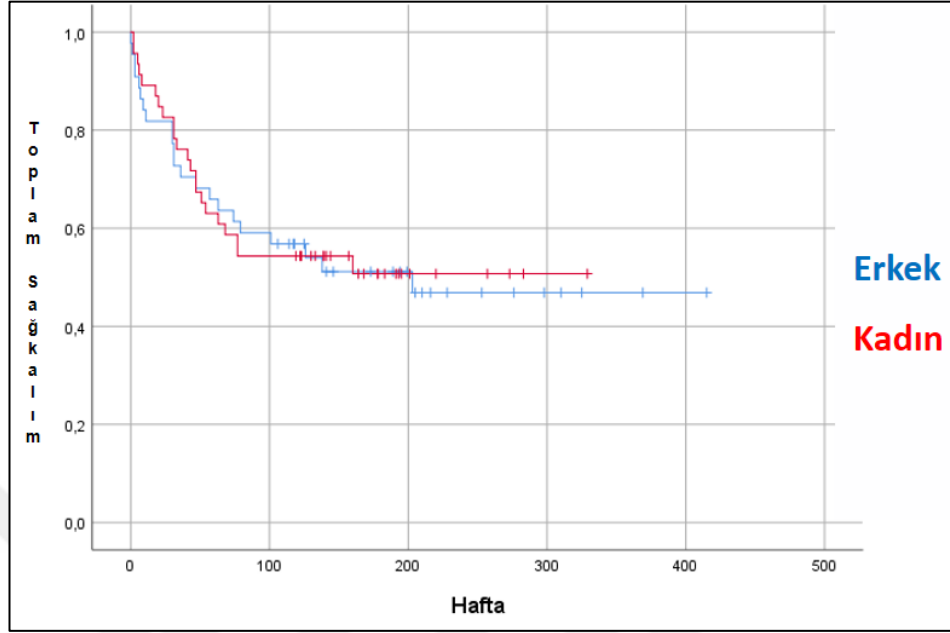
4.2.1. Yaş ve cinsiyetin toplam sağkalımla ilişkisi

Olgular, 60 yaş ve altı ve 60 yaşın üzeri olarak gruplandırıldığında toplam sağkalım açısından anlamlı fark izlendi. Buna göre, 60 yaşın üzerinde olan olgularda daha kötü toplam sağkalım olduğu izlendi (Şekil 10, log-rank testi, $p=0,001$).



Şekil 10. Yaş gruplarına göre olguların toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

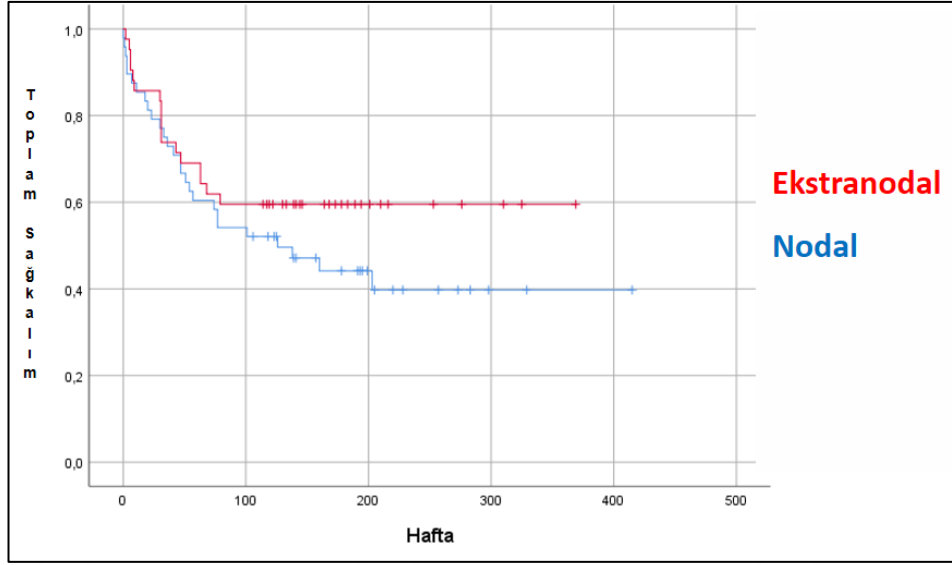
Toplam sağkalım değerlendirmesi cinsiyetlere göre yapıldığında, erkek ve kadın arasında fark saptanmadı (Şekil 11, log-rank testi, $p=0,906$).



Şekil 11. Cinsiyetlere göre olguların toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

4.2.2. Tümör yerleşiminin toplam sağkalımla ilişkisi

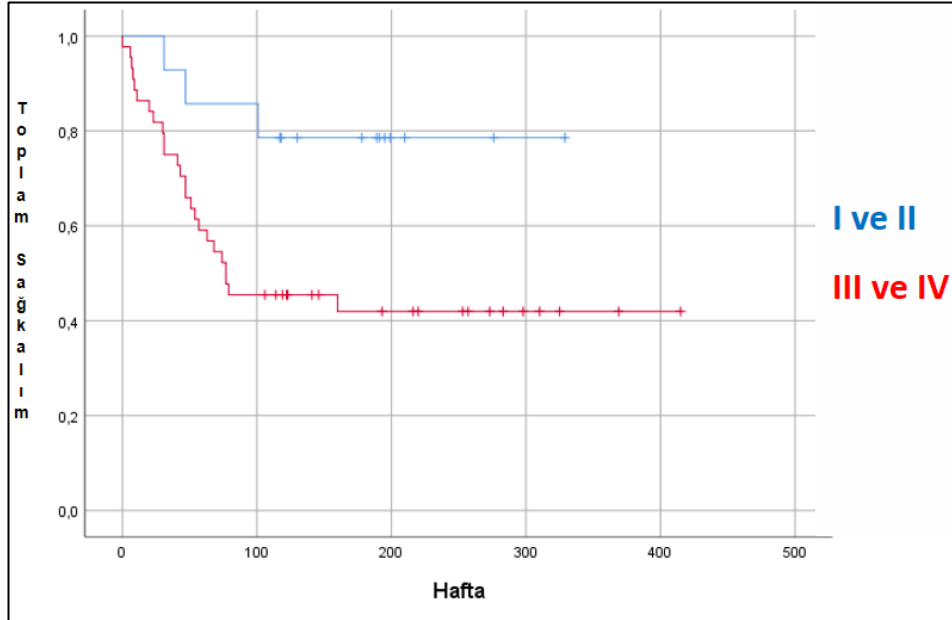
Olgulara ait örnekler, alındığı bölgeye göre nodal ve ektranodal olarak ayrıldığında, toplam sağkalım açısından anlamlı fark izlenmedi (Şekil 12, log-rank testi, $p=0,222$). Ancak ektranodal yerleşimli olgularda, bunlar içerisinde de özellikle Waldeyer halkası ve kemik yerleşimli olanlarda diğerlerine göre daha iyi toplam sağkalım seyri olduğu gözlemlendi.



Şekil 12. Tümör yerleşimine göre olguların toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

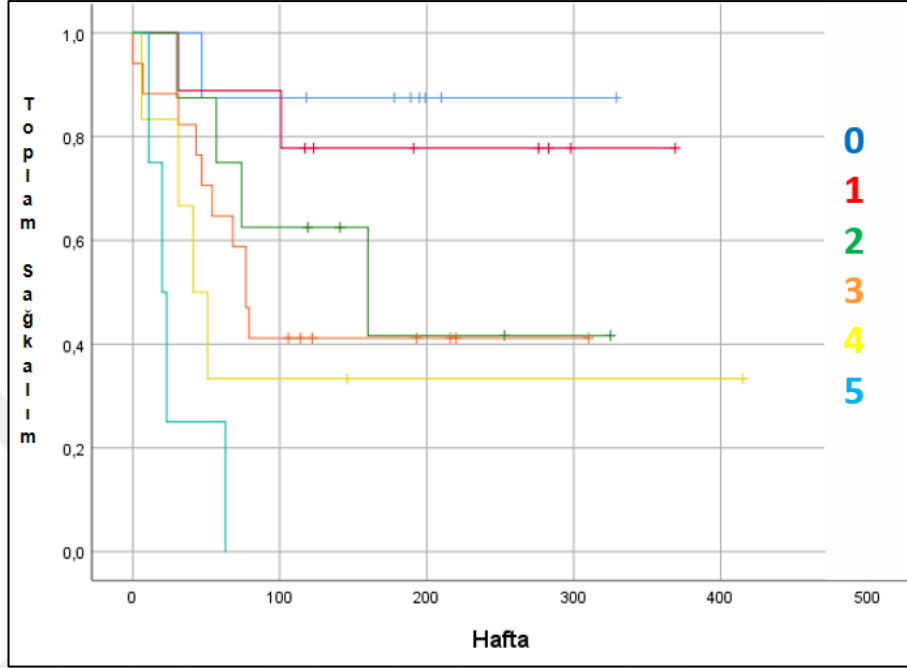
4.2.3. Tümör evresinin ve klinik skorlamanın toplam sağkalımla ilişkisi

Olgular Ann Arbor evresine göre değerlendirildiğinde, evre I ve II olan olguların evre III ve IV olan olgulara göre daha iyi toplam sağkalım ile ilişkili olduğu görüldü (Şekil 13, log-rank testi, $p=0,026$).

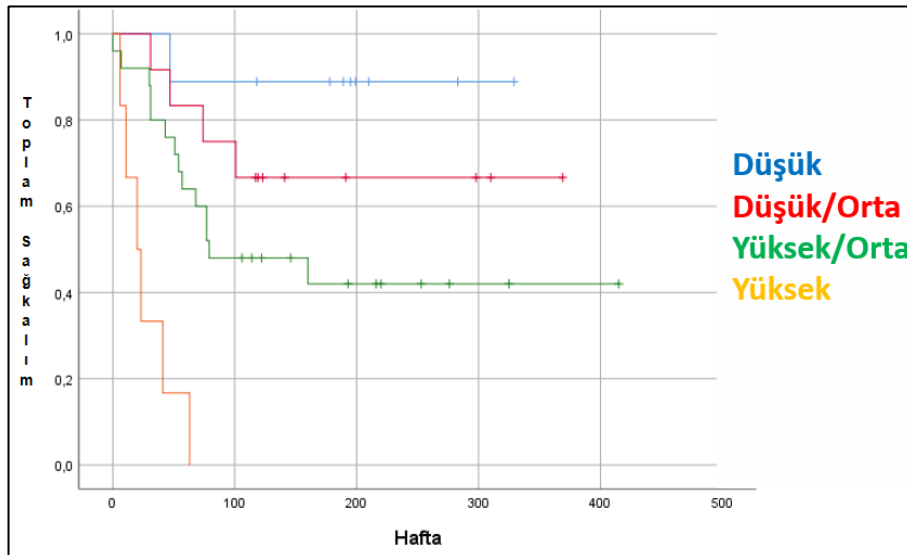


Şekil 13. Ann-Arbor evrelerine göre olguların toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

R-IPI skoru ve NCCN-IPI skoru ile olgular incelendiğinde, toplam sağkalım ile R-IPI ve NCCN-IPI skoru arasında kuvvetli ilişki olduğu görüldü (Şekil 14, log-rank testi $p < 0,001$). Buna göre düşük skor alan olguların daha iyi toplam sağkalım ile ilişkisi saptandı.



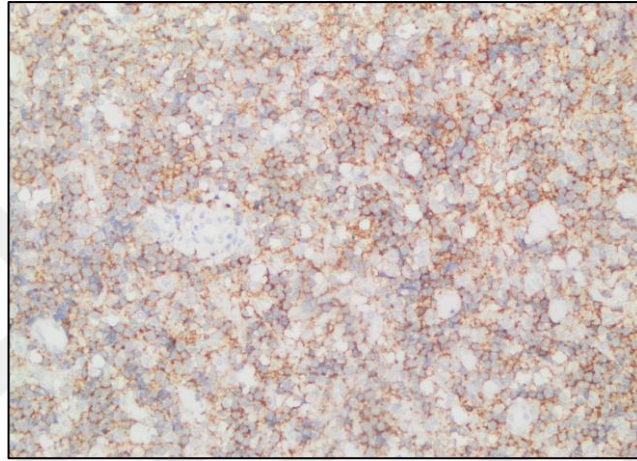
Şekil 14. R-IPI skoruna göre olguların toplam sağkalım grafiği. (Kaplan-Meier eğrisi)



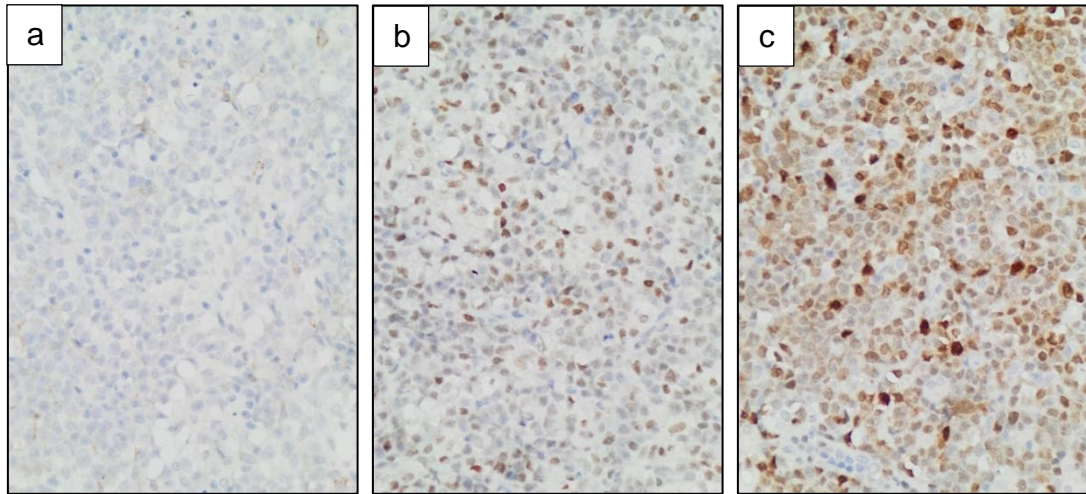
Şekil 15. NCCN-IPI skoruna göre olguların toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

4.3. Germinal Merkez B-Hücre Benzeri ve Germinal Merkez B-Hücre Benzeri-Dışı Alt Gruplar ve Bunların Toplam Sağkalım ile İlişkisi

Olgular, Hans algoritmasına göre, germinal merkez B-hücre benzeri ve germinal merkez B-hücre benzeri-dışı olarak iki grupta incelendi. Germinal merkez B-hücre benzeri grupta 41 olgu (%45,6), germinal merkez B-hücre benzeri-dışı grupta ise 49 olgu (%54,4) olduğu görüldü. Bu olgulara ait örnek immünohistokimya görüntüleri Şekil 16 ve 17'deki gibi izlendi.

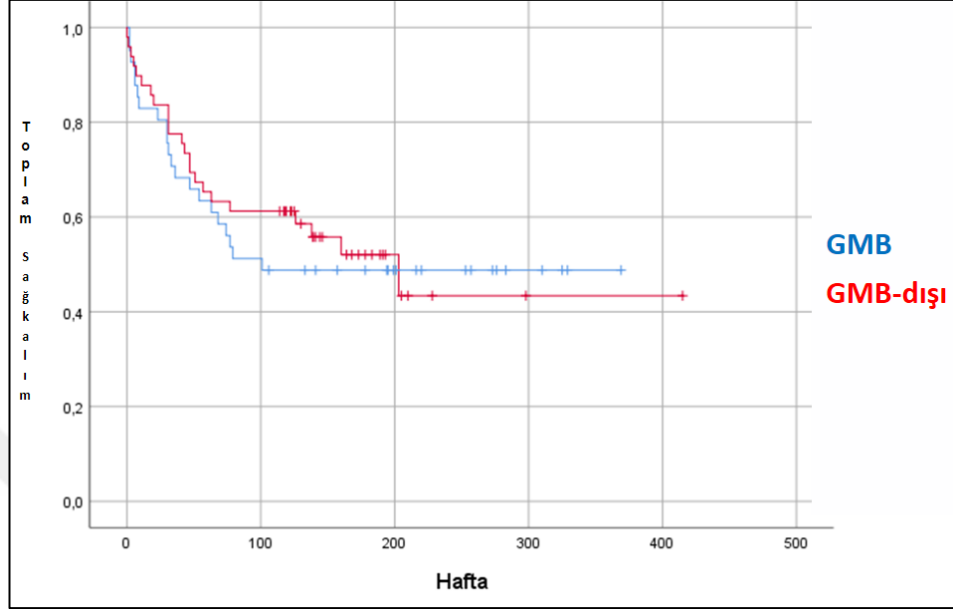


Şekil 16. Hans algoritmasına göre germinal merkez B-hücre benzeri olarak saptanan örnek olgu (CD10, immünohistokimya, 100X).



Şekil 17. Hans algoritmasına göre germinal merkez B-hücre benzeri-dışı olarak saptanan örnek olgu (CD10 (a), BCL6 (b) ve MUM1 (c), immünohistokimya, 200X).

Germinal merkez B-hücre benzeri ve germinal merkez B-hücre benzeri-dışı gruplar toplam sağkalım açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 18, log-rank testi, $p=0,707$).



Şekil 18. Germinal merkez B-hücre benzeri ve germinal merkez B-hücre benzeri-dışı olgulara göre toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

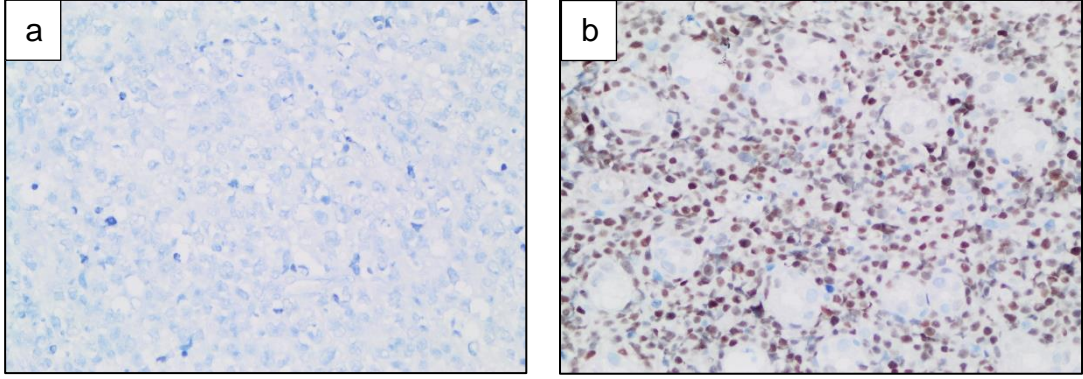
4.4. Double-Ekspresor Lenfoma ve Toplam Sağkalım ile İlişkisi

MYC immünohistokimya belirteci ile %40 ve daha fazla ekspresyon varlığı 19 olguda (%21,1) saptandı. BCL2 immünohistokimya belirteci ile ise %50 ve daha fazla ekspresyon varlığı 53 olguda (%58,9) izlendi. Hem MYC hem BCL2 immünoekspresyonunun belirlenen eşik değerlerden yüksek olduğu olgular Double-ekspresor DBBHL olarak kabul edildi. Buna göre 11 olgu (%12,2) Double-ekspresor DBBHL olarak saptandı (Tablo 12).

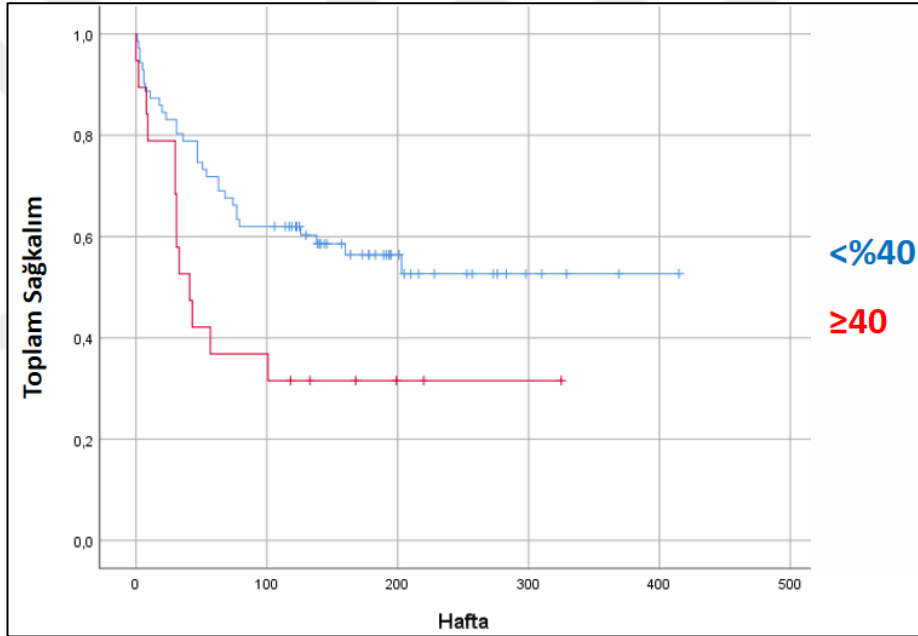
Tablo 12. MYC ve BCL2 immünohistokimya boyanma dağılımları ve bunlara göre double-ekspresor DBBHL olgularının dağılımı.

DBBHL	MYC <%40	MYC ≥%40	Toplam
BCL2 <%50	29 %32,2	8 %8,9	37 (%41,1)
BCL2 ≥%50	42 %46,7	11 (%12,2)	53 (%58,9)
Toplam	71 %78,9	19 (%21,1)	90 (%100)

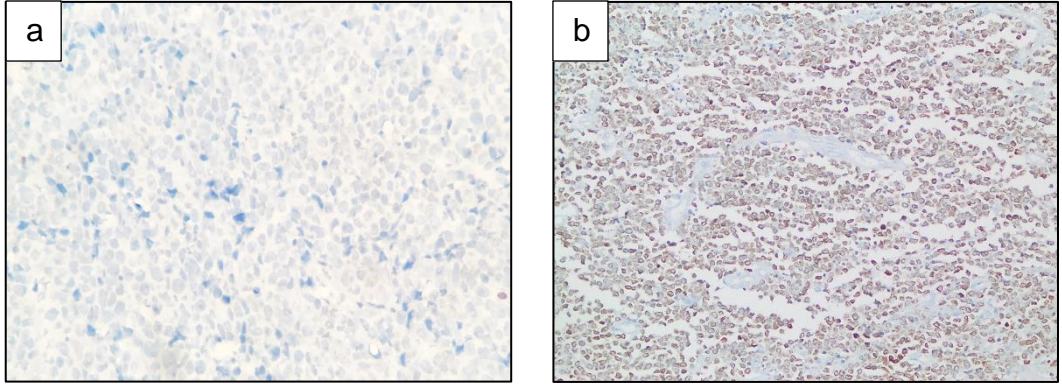
MYC immünoekspresyonu toplam sağkalım açısından değerlendirildiğinde (Şekil 19), MYC ile %40 ve üzeri pozitiflik izlenen 19 olguda (%21,1) anlamlı olarak daha kötü toplam sağkalım izlendi (Şekil 20, log-rank testi, p=0,018). BCL2 immünohistokimya belirteci ile %50 ve üzeri pozitiflik izlenen (Şekil 21) 53 olguda %58,9) daha düşük toplam sağkalım seyri izlenmekle birlikte bu ilişki istatistiksel açıdan anlamlı olarak görülmedi (Şekil 22, log-rank testi, p=0,073).



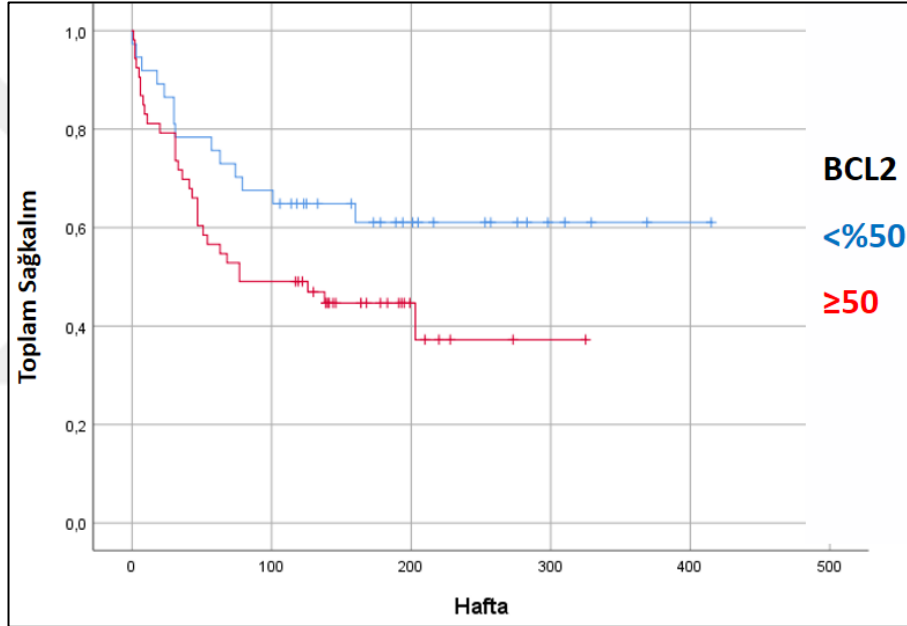
Şekil 19. MYC, %40 altı (a) ve %40 ve üzeri (b) immünekspresyon (200X).



Şekil 20. Olgularda MYC immünekspresyonu ile toplam sağkalım ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi)

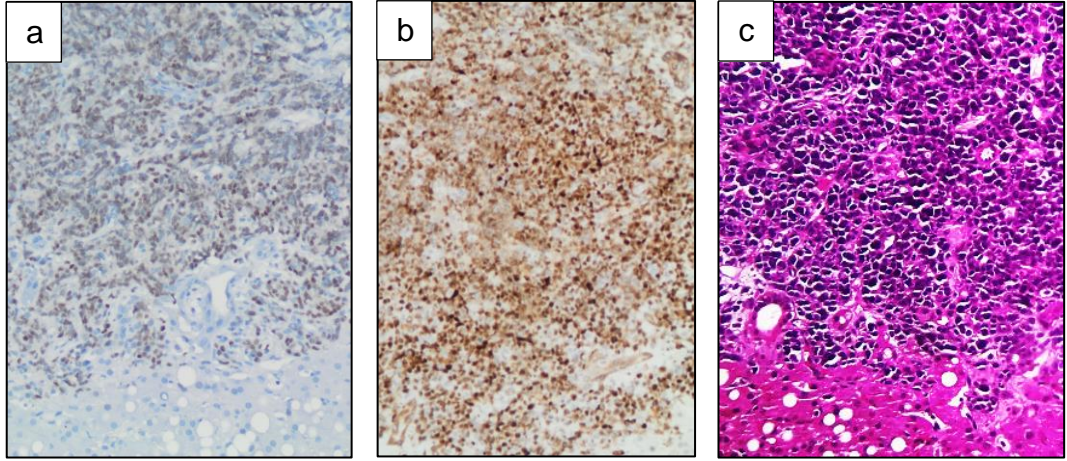


Şekil 21. BCL2, %50 altı (a), %50 ve üzeri (b) immünoekspresyon (200X,100X).

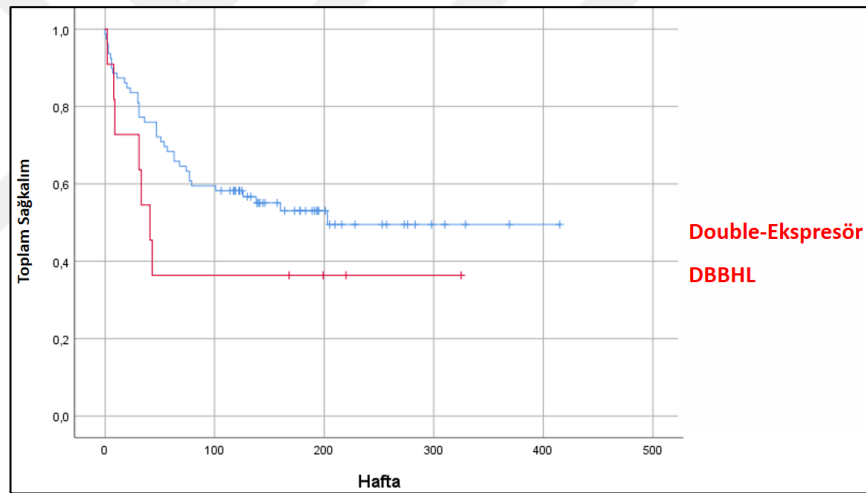


Şekil 22. Olgularda BCL2 immünoekspresyonu ile toplam sağkalım ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Double-ekspresor DBBHL olgularında diğer olgulara göre toplam sağkalım farkı açısından anlamlı ilişki saptanmadı (Şekil 24, log-rank testi, $p=0,169$). Ancak bu olgularda düşük toplam sağkalım seyri dikkati çekti. Double ekspresor DBBHL'ya ait örnek olguya ait resimler Şekil 23'te gösterilmiştir.

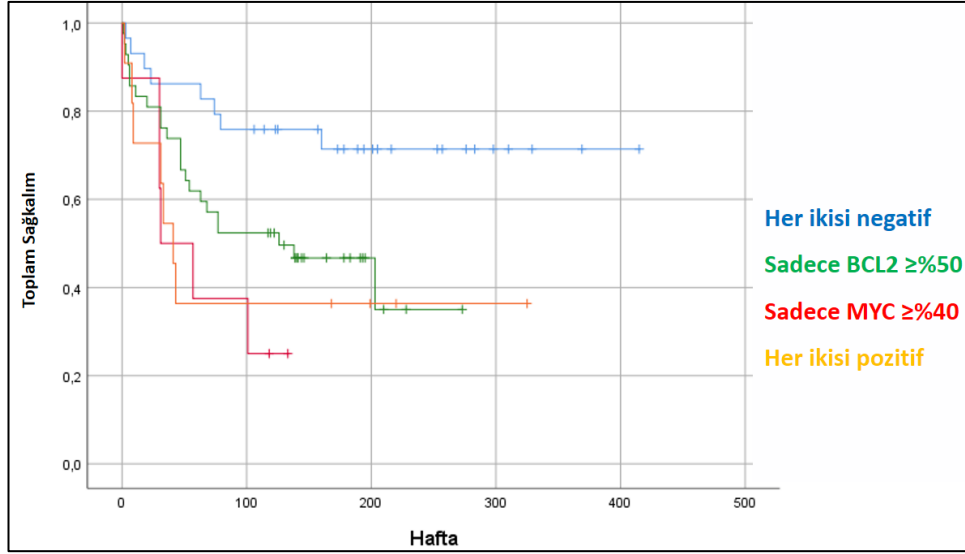


Şekil 23. Double ekspresör DBBHL, MYC immünekspresyonu (a), BCL2 immünekspresyonu (b), H&E (c) (200X).



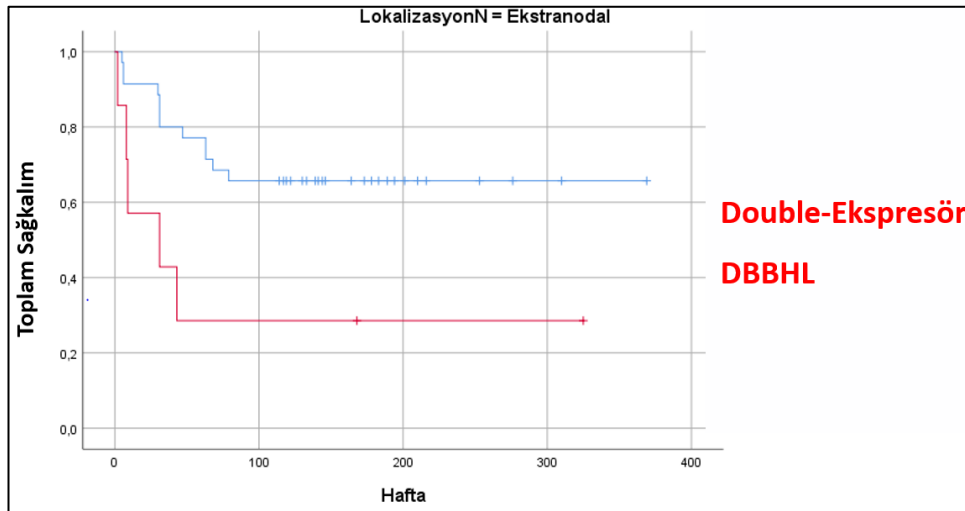
Şekil 24. Double-ekspresör DBBHL olgularının toplam sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

Olgular; sadece MYC pozitif ($\geq\%40$) (8 olgu, %8,9), sadece BCL2 pozitif ($\geq\%50$) (42 olgu %46,7), her ikisi negatif (29 olgu %32,2) ve her ikisi pozitif (11 olgu, %12,2) olarak gruplandırıldığında, her iki belirtecin negatif olduğu olgularda toplam sağkalımın anlamlı olarak daha iyi olduğu görüldü (Şekil 25, log-rank testi, $p=0,015$).



Şekil 25. Olgularda MYC ve BCL2 immünoekspresyonlarının, tekli ve ikili pozitif ya da negatifliklerine göre toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

DBBHL olguları, yerleşimlerine göre ayrılıp incelendiğinde, ektranodal yerleşimli olan 42 olgu içerisinde Double-ekspresör DBBHL grubunda saptanan 7 olgunun daha kötü toplam sağkalım ile ilişkili olduğu görüldü (Şekil 26, log-rank testi, $p=0,017$).



Şekil 26. Ektranodal yerleşimli Double-ekspresör DBBHL olgularının toplam sağkalım ile ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

4.5. Double-Ekspresor Lenfomaların Demografik ve Klinik Bulgular ile İlişkisi

Çalışmamızdaki Double-ekspresor lenfoma olgularının cinsiyet, yaş, tümör yerleşimi, “bulky” hastalık varlığı, Ann Arbor evresi, R-IPI ve NCCN-IPI skorları ile ilişkisi aşağıdaki Tablo 13’te gösterilmiştir. Bu faktörler ile Double-ekspresor lenfoma varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. (Klinik dosyalarında yeterli veriye ulaşılabilen 57 olguda “Bulky” hastalık varlığı, 54 olguda Ann Arbor evresi, 52 olguda R-IPI ve NCCN-IPI skorları değerlendirilebilmiştir.)

Tablo 13. Double-ekspresor DBBHL olguların klinik ve demografik bulgular ile ilişkisi.

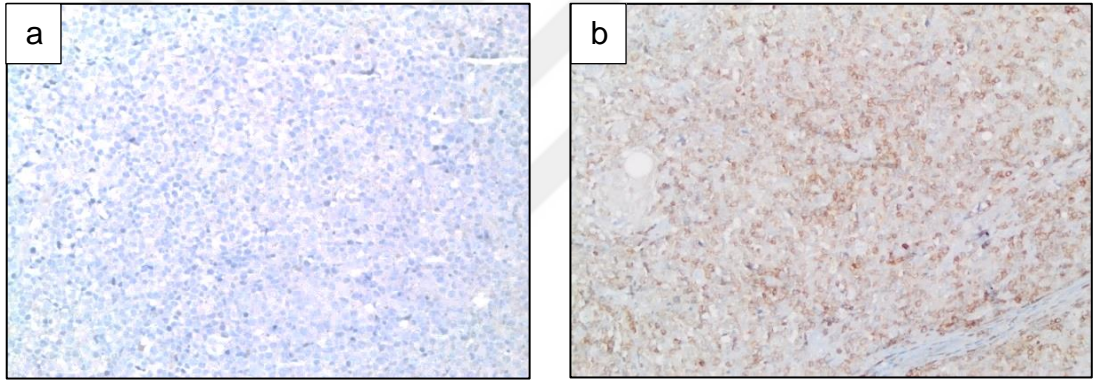
	Double-Ekspresor DBBHL olguları	Diğer olgular	p*
Erkek	4	40	0,375
Kadın	7	39	
≤60 yaş	4	44	0,229
>60 yaş	7	35	
Lenf nodu	4	44	0,229
Ekstranodal	7	35	
«Bulky» hastalık varlığı (N=57)	2 / 7	8 / 50	0,413
Ann Arbor Evresi III ve IV (N=54)	2 / 8	38 / 46	0,951
R-IPI skoru ≥3 (N=52)	3 / 6	24 / 46	0,920
NCCN-IPI skoru ≥4 (N=52)	2 / 6	27 / 46	0,708

* “Fischer’s exact” testi, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

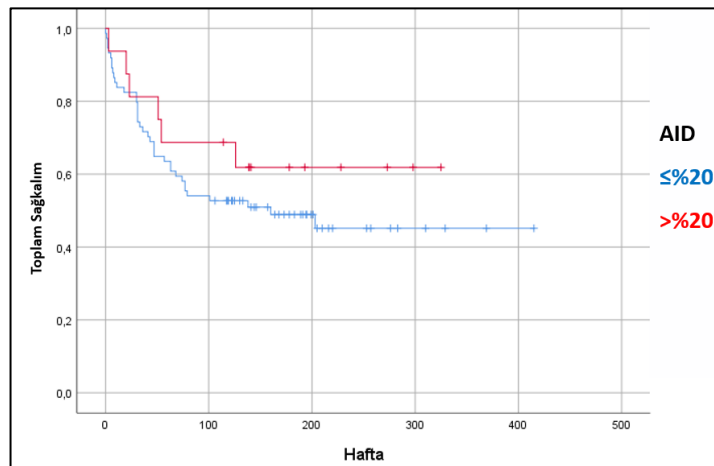
4.6. AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53 ve ATM Protein Ekspresyonları

Çalışmadaki olgularda, lenfoma patogenezinde rolü olabilecek AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53 ve ATM proteinlerinin immünekspresyonları değerlendirildi.

- Olgularda izlenen AID immünhistokimya belirteci boyanma miktarı, eşik değer olarak neoplastik hücrelerin %20'sinde boyanma kabul edilerek iki grupta incelendi. Buna göre %20 ve altı neoplastik hücrede immünekspresyon varlığı izlenen 74 olgu (%82,2) var iken %20'den fazla immünekspresyon varlığı 16 olguda (%17,8) saptandı (Şekil 27). Bu gruplar arasında toplam sağkalım açısından anlamlı fark izlenmedi (Şekil 28, log-rank testi, $p=0,330$).

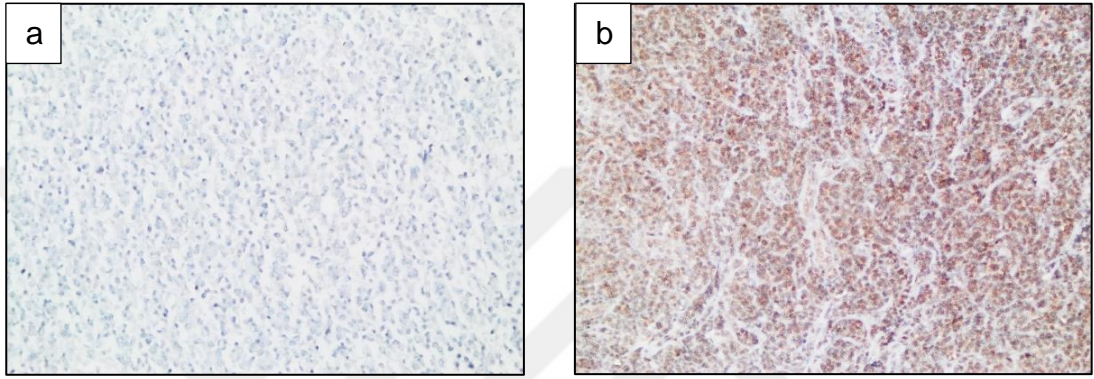


Şekil 27. AID, ≤%20 immünekspresyon (a), >%20 (b) immünekspresyon (100X).

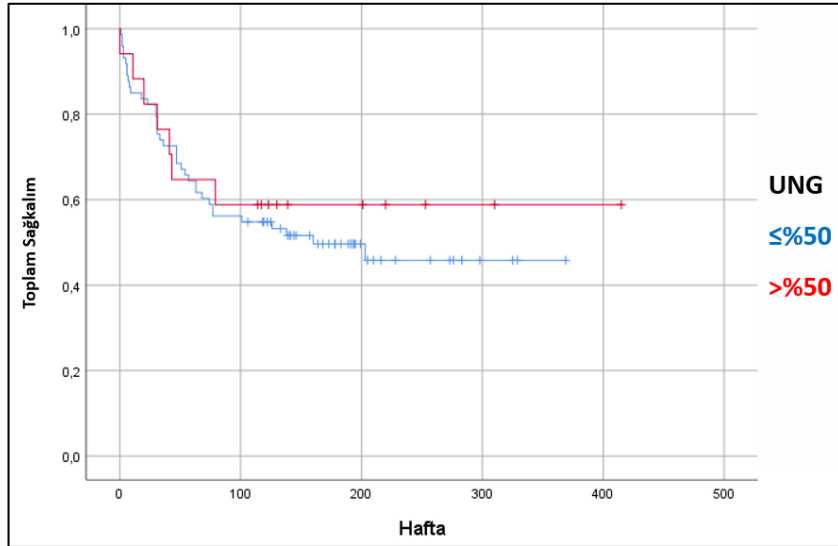


Şekil 28. AID immünekspresyonu ile toplam sağkalımın ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi)

- Olgular, UNG immünohistokimya belirteci ile değerlendirilirken, %50 ve altında ekspresyon ile %50'den fazla ekspresyonun izlendiği iki grupta incelendi. Olguların 17'sinde (%18,9) %50'den fazla, 73'ünde (%81,1) ise %50 ve daha azını oluşturan neoplastik hücrede immünoekspresyon saptandı (Şekil 29). Bu gruplar arasında toplam sağkalım açısından anlamlı fark izlenmedi (Şekil 30, log-rank testi, $p=0,559$).

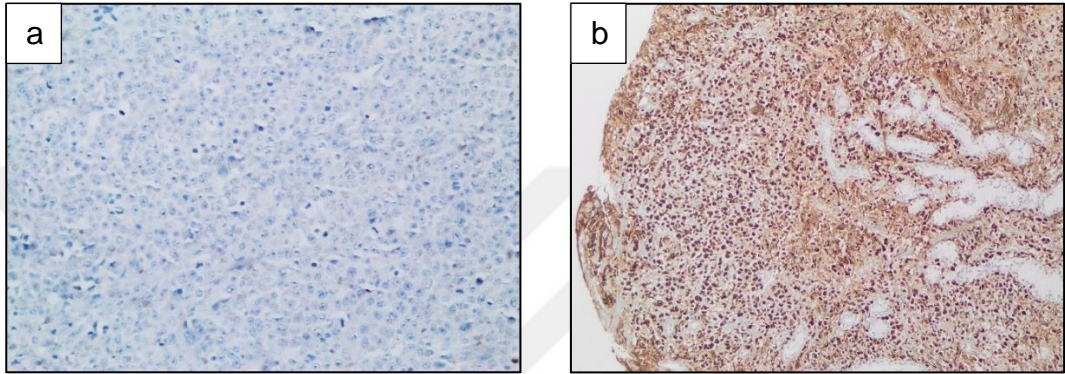


Şekil 29. UNG, ≤%50 immünoekspresyon (a), >%50 immünoekspresyon (b) (100X).

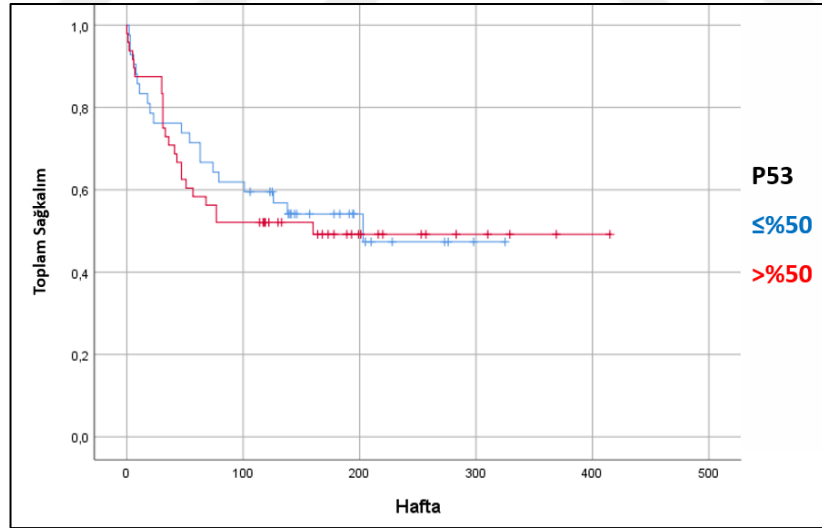


Şekil 30. UNG immünoekspresyonu ile toplam sağkalımın ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

- P53 immünekspresyonu değerlendirilirken, neoplastik hücrelerin %50'sinde izlenen boyanma eşik değeri olarak kabul edildi. Buna göre 42 olguda (%46,7) neoplastik hücrelerin %50'sinden fazla immünekspresyon, 48 olguda (%53,3) ise %50 ve daha az neoplastik hücrede immünekspresyon izlendi (Şekil 31). Bu gruplar arasında toplam sağkalım açısından fark saptanmadı (Şekil 32, log-rank testi, $p=0,740$).

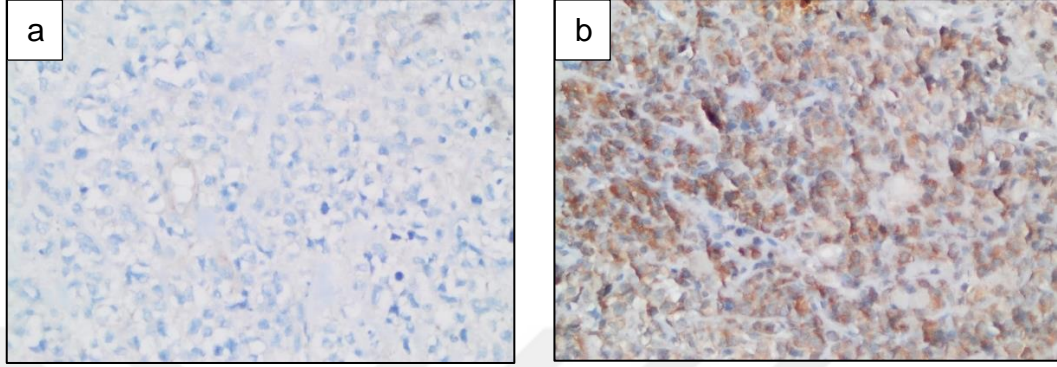


Şekil 31. P53, $\leq\%50$ immünekspresyon (a) ve $>\%50$ immünekspresyon (b) (100X).

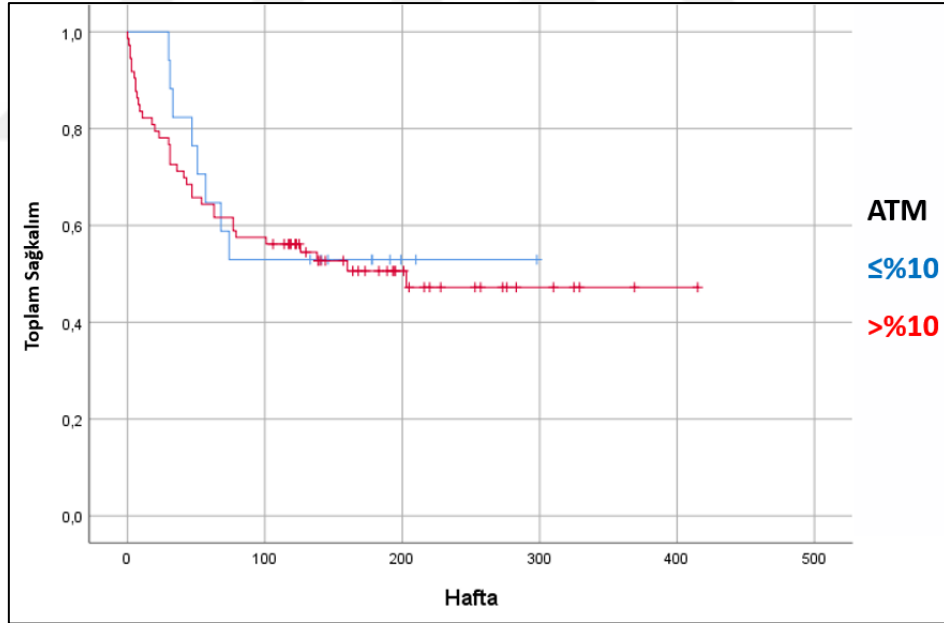


Şekil 32. P53 immünekspresyonu ile toplam sağkalımın ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

- ATM immünoekspresyonu, 19 olguda (%21,1) neoplastik hücrelerin %10 ve daha azında, 71 olguda (%78,9) ise %10'dan fazla neoplastik hücrede izlendi (Şekil 33). Bu gruplar arasında toplam sağkalım açısından anlamlı fark saptanmadı (Şekil 34, log-rank testi, $p=0,720$).

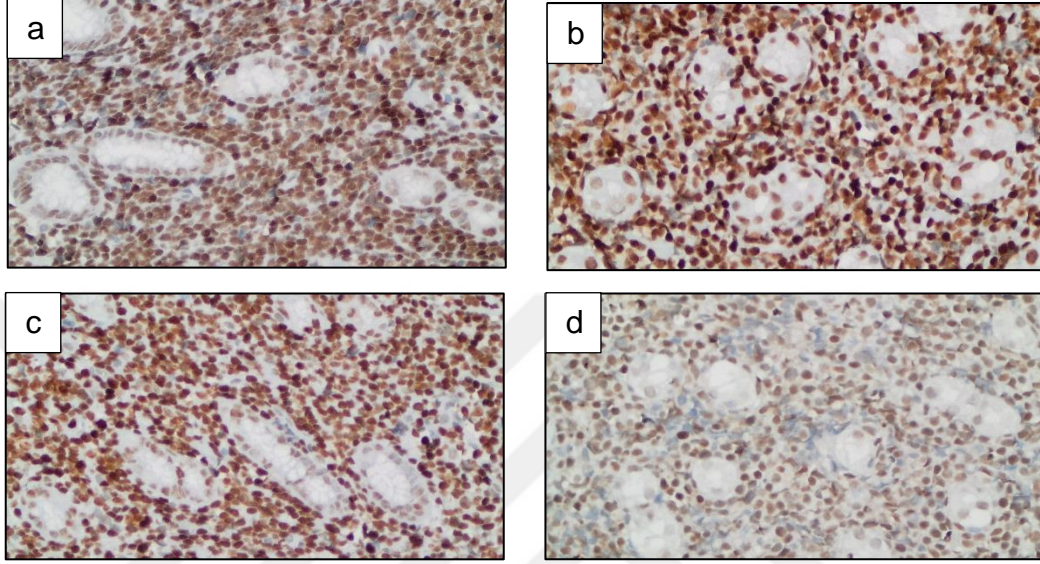


Şekil 33. ATM, \leq %10 immünoekspresyon (a), $>$ %10 immünoekspresyon (b) (200X).

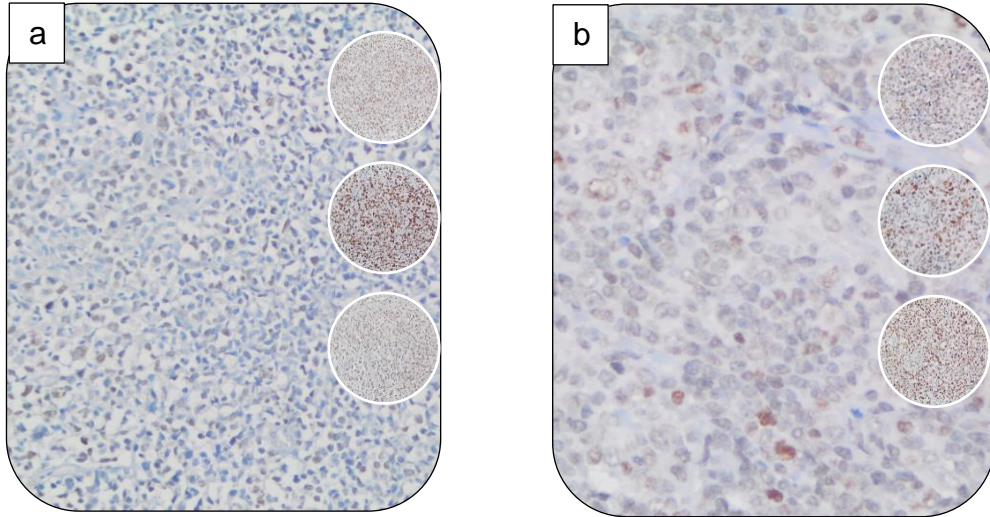


Şekil 34. ATM immünoekspresyonu ile toplam sağkalımın ilişkisi (Kaplan-Meier eğrisi).

- MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 yanlış eşleşme tamir proteinlerinin immünekspresyonlarında kayıp varlığı değerlendirildi. Olguların tamamında immünekspresyon izlendi (Şekil 35). Ancak iki olguda MSH2 proteininde zayıf immünekspresyon dikkati çekti (Şekil 36).



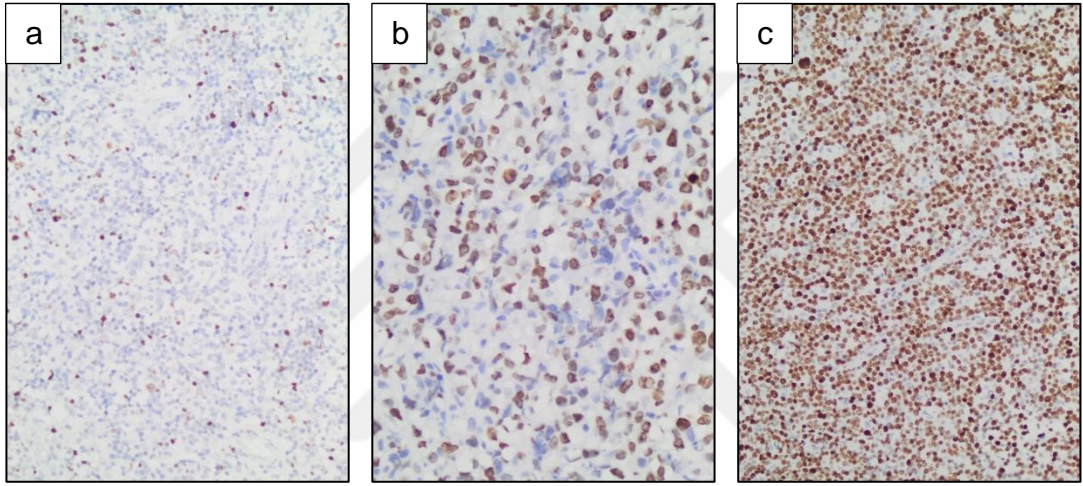
Şekil 35. Yanlış eşleşme tamir proteinleri immünekspresyonları. MLH1 (a), MSH2 (b), MSH6 (c), PMS2 (d) (200X).



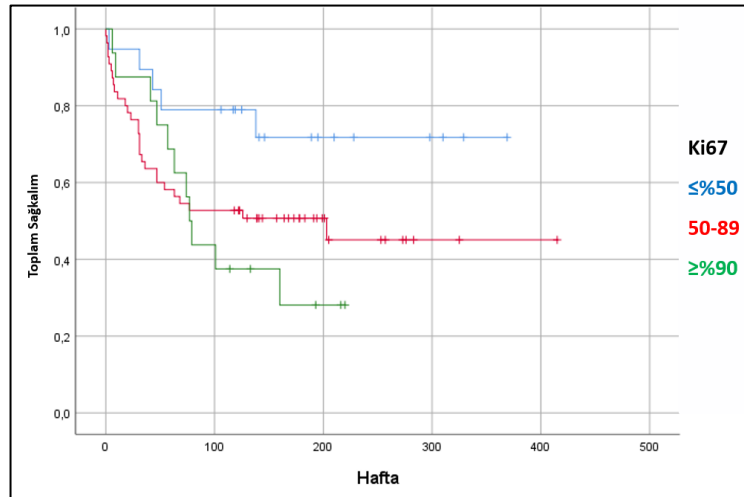
Şekil 36. Zayıf MSH2 immünekspresyonu izlenen iki ayrı olgu (a ve b) (Aynı olguya ait MLH1, MSH6 ve PM2 immünekspresyonları sırasıyla yukarıdan aşağı doğru küçük resimlerde gösterilmiştir.).

4.7. Ki67 proliferasyon indeksi

Olgular Ki67 proliferasyon indeksine göre; %50 ve altı, %50 ile 90 arası, %90 ve üzeri olmak üzere üç grupta incelendi. Olguların 19'unda (%21,1) %50 ve daha az immünekspresyon, 55'inde (%61,1) %50 ile 90 arası immünekspresyon, 16'sında (%17,8) %90 ve daha fazla immünekspresyon saptandı (Şekil 37). Bu gruplar arasında log-rank testi ile anlamlı fark izlenmemekle birlikte Ki67 proliferasyon indeksi yüksek olan gruplarda daha düşük toplam sağkalım seyri dikkati çekti (Şekil 38, log-rank testi, $p=0,092$)



Şekil 37. Ki 67 proliferasyon indeksi <50 (a), %50-90 (b), >%90 (c) (100X).



Şekil 38. Ki67 proliferasyon indeksi gruplarına göre toplam sağkalım grafiği (Kaplan-Meier eğrisi).

4.8. Double-Ekspresor Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfomaların; AID, UNG, P53, ATM protein ekspresyonları ve Germinal Merkez B-Hücre Benzeri/-Dışı Gruplar ile İlişkisi

Double-ekspresor DBBHL, MYC immünekspresyonu ve BCL2 immünekspresyonu ile lenfoma patogenezinde rolü olabilecek AID, UNG, P53 ve ATM proteinlerinin immünekspresyonları arasında ilişki değerlendirildi. Ayrıca double-ekspresor DBBHL ile GMB/-dışı gruplar ve Ki67 proliferasyon indeksi arasındaki ilişki değerlendirildi. Buna göre %40 ve üzerinde MYC immünekspresyonu ile %50 üzerinde P53 immünekspresyonunun birlikte izlenmesi anlamlı olarak saptandı (Tablo 14, “*Fischer’s exact*” testi, $p=0,012$). Ayrıca %50 ve üzerinde BCL2 immünekspresyonunun izlenmesi ile germinal merkez B-hücre benzeri-dışı grubun birlikteliği arasında anlamlı ilişki izlendi (Tablo 14, Pearson ki kare testi, $p=0,008$). Kalan değişkenler arasında ise anlamlı bir ilişki saptanamadı (Tablo 14, “*Fischer’s exact*” / Pearson ki kare testi, $p>0,05$).

4.9. Cox Orantısal Regresyon Modeli ile Yaşam Analizi

Olguların yaşam süresi analizi, Cox orantısal regresyon modeline göre tek değişkenli analiz ile değerlendirildiğinde; 60 üzeri yaş, R-IPI skorunun 3’ten büyük olması, NCCN-IPI skorunun 4’ten büyük olması, Ann Arbor evresinin III veya IV olması, MYC immünekspresyonunun %40 veya daha fazla izlenmesi, Ki67 skorunun yüksek olmasının sağkalım üzerinde kötü etkiye sahip olduğu izlendi. Çok değişkenli regresyon analizi uygulandığında ise 60 üzeri yaş ile MYC immünekspresyonunun %40 ve daha fazla olmasının bağımsız faktörler olarak toplam sağkalımı etkilediği saptandı (Tablo 15).

Tablo 14. Double ekspresor DBBHL gruplarının AID, UNG, P53, ATM ve Ki67 immünoekspresyonları ile germinal merkez B-hücre benzeri/-dışı gruplarla ilişkisi.

		Double-Ekspresor DBBHL		MYC		BCL2	
		+	-	≥%40	<%40	≥%50	<%50
		(n=11)	(n=79)	(n=19)	(n=71)	(n=53)	(n=37)
AID	≤%20 (n=74)	10	64	18	56	41	33
	>%20 (n=16)	1	15	1	15	12	4
UNG	≤%50 (n=73)	8	65	14	59	45	28
	>%50 (n=17)	3	14	5	12	8	9
P53	≤%50 (n=42)	3	39	4	38	26	16
	>%50 (n=48)	8	40	15	33	27	21
ATM	≤%10 (n=17)	3	14	6	11	11	6
	>%10 (n=73)	8	65	13	60	42	31
Ki67	≤%50 (n=19)	1	18	1	18	12	7
	%50-90 (n=55)	7	48	12	48	33	22
	≥%90 (n=16)	3	13	6	13	8	8
GMB (n=41)		7	34	12	29	18	23
GMB-dışı (n=49)		4	45	7	42	35	14

Tablo 15. Klinik, demografik ve immünohistokimyasal parametrelerin toplam sağkalım üzerindeki etkisi.

	Tek değişkenli analiz			Çok değişkenli analiz		
	p	HR	%95 CI	p	HR	%95 CI
Cinsiyet	0,906	0,965	0,534-1,745			
Yaş	0,002	2,663	1,436-4,938	0,006	2,804	1,341-9,847
Lokalizasyon	0,227	0,688	0,375-1,262			
R-IPI skoru ≥ 3	0,005	3,578	1,485-8,625	*		
NCCN-IPI skoru ≥ 4	0,007	3,865	1,446-10,332	*		
Ann Arbor evresi III - IV	0,038	3,553	1,071-11,789	*		
GMB vs GMB-dışı	0,709	0,893	0,494-1,616			
MYC ≥ 40	0,021	2,150	1,120-4,128	0,018	3,947	1,261-12,361
BCL2 ≥ 50	0,079	1,770	0,936-3,346			
P53 > 50	0,741	1,105	0,610-2,003			
Ki67	0,039	1,617	1,024-2,553	0,270	1,360	0,788-2,347
Double - ekspresör DBBHL	0,176	0,571	0,254-1,286			

Cox orantısız regresyon analizi, $p < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

CI: Güven aralığı; HR: Risk oranı

* Yeterli olgu sayısı olmadığı için çok değişkenli analiz uygulanamamıştır.

5. TARTIŞMA

Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, erişkinlerde en sık görülen Hodgkin-dışı lenfoma tipi olup agresif seyirli bir hastalıktır. Hodgkin-dışı Lenfomaların yaklaşık %30-40'ını oluşturmaktadır. T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu verilerine göre ülkemizde 100 000 erkekte 7,4'ünde ve 100 000 kadından 5'inde Hodgkin dışı-lenfoma görülmektedir. Görülme sıklığı açısından, etnik köken ve ırklar arasında belirgin farklılık bildirilmemiştir. Ancak Asyalılar gibi bazı popülasyonlarda folliküler lenfoma sıklığı daha az olduğu için DBBHL göreceli olarak Hodgkin-dışı lenfomaların daha yüksek oranında izlenebilmektedir (12, 33).

DBBHL en sık 6. dekatta görülmekte olup, "Hodgkin-dışı lenfoma sınıflandırma projesi"ne göre DBHHL'nin izlendiği ortanca yaş 64 olarak izlenmiştir (32). Ayrıca diğer tüm yaş gruplarında da bu hastalık izlenebilmektedir. Çalışmamızda ise DBBHL olgularında ortanca yaş, 59 olarak saptanmıştır. Literatürdeki farklı yayınlarda 55 ile 77 arasında değişen farklı ortanca yaş değerleri izlenmekte olup bunların genellikle 6. dekat civarında olduğu görülmüştür (32, 73-77).

Diffüz büyük B-hücreli lenfoma olgularında yaş ile toplam sağkalım arasında ilişki değerlendirilirken sıklıkla 60 yaş üzeri ve altı olarak değerlendirilmektedir (65). Literatürde 60 yaş üzeri olguların düşük toplam sağkalımla ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (32, 66, 67, 73-77). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak, 60 yaş üzeri olguların, çok değişkenli analiz değerlendirmesinde dahi düşük toplam sağkalım ile ilişkili olduğu saptanmıştır.

DBBHL'nin erkeklerde hafifçe daha sık görüldüğü bildirilmektedir (Erkek/kadın=1,2/1) (1). Çalışmamızda ise kadınlarda hafifçe daha sık görülmüş olup, erkek/kadın oranı 0,95 olarak saptanmıştır. Literatürdeki diğer çalışmalarda da erkeklerde hafifçe daha fazla izlendiği bildirilmekte olup erkek kadın oranı 1,28 ile 1,10 arasında değişmektedir (32, 67, 73-75, 77).

Çalışmamızda olgu sayısının daha az olması ve çalışmamızın popülasyon bazlı olmaması nedeniyle böyle bir farkın olabileceği düşünüldü.

Literatürdeki bazı çalışmalarda erkek cinsiyetin kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmekteyken, bazı çalışmalarda ise erkek kadın cinsiyet arasında fark saptanamamaktadır (67, 74, 78-80). Erkeklerde kötü prognoz izlenen çalışmalarda, aradaki sağkalım farkının farmakokinetik açıdan ritüksimab metabolizmasına bağlı olabileceği yönünde tartışmalar mevcuttur (81). Tam açıklanamamış bu durumun bağımsız bir risk faktörü olmadığı, erkek hastaların daha düşük beden-kitle endeksine sahip olmasının veya cinsiyet ile ilişkili gen polimorfizminin ritüksimab etkinliği ve dolaşımdan temizlenmesi ile ilişkili olabileceği yönünde teoriler ileri sürülmüştür (74, 75, 82). Çalışmamızda ise erkek ve kadın cinsiyet açısından toplam sağkalım farkı saptanamamıştır.

Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, lenf nodunda hızlı büyüme veya ektranodal yerleşim gösteren tümör kitlesi oluşturarak bulgu vermektedir. Hastalık olguların yaklaşık %40'ında ektranodal bölgeden gelişmekte ve olguların yaklaşık %70'inde hastalık seyri sırasında ektranodal tutulum izlenmektedir. Ektranodal yerleşim, en sık olarak gastrointestinal sistemde görülmekle birlikte Waldeyer halkası, kemik, testis, dalak, karaciğer, tiroid bezi, böbrek, adrenal bez gibi diğer organlarda da izlenmektedir (1). Literatürdeki bazı yayınlarda Waldeyer halkası ve dalağın nodal veya ekstanodal kabul edilmesi ile ilgili tartışmalar mevcuttur (83, 84). Ancak çalışmalardaki geniş kanı ve DSÖ sınıflandırmasında bu organların ektranodal olarak kabul edilmesi yönündedir. DSÖ lenfoma sınıflandırmasına göre primer olarak deri, santral sinir sistemi, mediasten (timus), vücut boşluğu ve intravasküler yerleşimli olanlar ise ayrı tanımlar olarak değerlendirilip, DBBHL, NOS'tan ayrı olarak incelenmektedir (1).

Olguların değerlendirilirken nodal ve ektranodal ayrımının yapılması, birtakım zorluklar barındırmaktadır. Ektranodal bölge yerleşimli olgularda tümörün komşu lenf nodlarına invazyonu/metastazının olduğu olgular veya hem nodal hem ektranodal bölgede tutulumu olan olgular değerlendirmeyi güçleştirmektedir. DBBHL olgularında yerleşim değerlendirilirken, literatürde

bu zorluklar bildirilmiş olup klinik ve görüntüleme bulgularından yardım alınarak bu ayrımın yapılabileceği ve “klinik olarak uyumlu” terminolojisinin kullanılmasının uygun olduğu yönünde görüşler mevcuttur (85).

Çalışmamızda “Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, NOS” olguları incelenmiş olup primer santral sinir sistemi, deri, mediasten, vücut boşluğu ve intravasküler yerleşimli olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Olgular biyopsinin alındığı yer göz önünde bulundurularak klinik veya görüntüleme bulgularıyla birlikte değerlendirilip nodal ve ektranodal olarak iki grupta incelenmiştir. Buna göre olguların %53’ü nodal, %47’si ektranodal yerleşimli olarak kabul edilmiştir. Tümör, ektranodal yerleşim olarak literatür ile uyumlu olarak en sık gastrointestinal sistemde izlenmiştir. Bunu, Waldeyer halkası ve kemik yerleşimli olgular takip etmektedir.

Nodal ve ekstanodal bölgelerde yerleşim gösteren tümörler arasında sağkalım açısından genel geçer bir fark belirlenmemiştir. Ancak bazı çalışmalarda özellikle Waldeyer halkası yerleşimli olan tümörlerin daha iyi seyirli olduğu gösterilmektedir (86). Gastrointestinal sistem yerleşimli olanların ise daha iyi seyirli olduğunu gösteren çalışmalar mevcut olmakla birlikte daha kötü seyirli olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (86, 87). Bir çalışmada ise erken evrede nodal yerleşimli olguların, ileri evrede ise ektranodal yerleşimli olguların daha iyi seyirli olduğu gösterilmektedir (88). Çalışmamızda, nodal ve ektranodal yerleşimli olguların prognozları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemektedir. Ancak ektranodal yerleşimli olanların daha iyi seyirli olduğu bunlar arasında da Waldeyer halkası ve kemik yerleşimli olguların daha iyi seyirli olduğu gözlemlenmiştir. Bunun, literatürdeki Waldeyer halkası yerleşimli olguların daha iyi sağkalım sonuçları ile paralel olduğu düşünülmüştür (86, 89).

DBBHL lenfoma olgularının yaklaşık yarısının erken evre (Ann Arbor evre I veya II) hastalık ile başvurduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda ise olguların büyük çoğunluğunun (%75,9) ileri Ann Arbor evresi (Evre III veya IV) ile başvurduğu izlendi.

Olguların yaklaşık üçte birinde B semptomu olduğu bildirilmektedir (90). Çalışmamızda B semptomu değerlendirilebilen olguların %34,5'inde (55 olgu) B semptomları olduğu görülmüştür.

Kemik iliği tutulumu olguların %16'sında görülebilmektedir (90). Çalışmamızda kemik iliği tutulumu 52 olguda değerlendirilmiş olup bunların %30'unda tutulum olduğu görülmüştür.

DBBHL olguları çoğunlukla primer olmakla birlikte sekonder olarak düşük dereceli B-hücreli lenfomalardan da (Foliküler lenfoma, KLL/SLL, lenfoplazmasitik lenfoma, marjinal zon lenfoma, nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma) gelişebilmektedir (12). Çalışmamızda, dış merkez kaynaklı konsültasyon amaçlı merkezimize kabul edilen olgular da mevcut olduğu için ayrıntılı klinik öykü tam bilinmemekle birlikte değerlendirilebildiği kadarıyla tümörlerin primer DBBHL olduğu görülmüştür.

DBBHL klinik seyir açısından heterojen seyirli bir hastalık olup çeşitli evreleme ve skorlama sistemleri ile prognoz belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla Ann Arbor evreleme sistemi sıklıkla kullanılmaktadır (83). Çalışmamızda, literatür ile uyumlu olarak Ann Arbor evresi ile toplam sağkalım arasında ilişki olduğu görülmüştür. Klinik seyri tahmin etmek açısından ayrıca IPI skorlama sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle tedaviye ritüksimabın eklenmesi ile bu skorlama sistemi revize edilerek R-IPI veya NCCN-IPI skorlama sistemleri oluşturulmuştur (66, 67). Çalışmamızda, R-IPI ve NCCN-IPI skorlarının literatürle uyumlu olarak klinik seyri tahmin etme açısından oldukça başarılı oldukları izlenmiştir.

Diffüz büyük B-hücreli lenfoma gen ekspresyon profillerine göre moleküler olarak germinal merkez B-hücre ve aktive B-hücre lenfoma olarak gruplanmaktadır (43). Bu gruplar arasında lenfoma patogenezi ve hastalık prognozu açısından belirgin farklılıklar bulunmaktadır (44, 91). Moleküler olarak bu ayrımın yapılması oldukça gerekli ve faydalı olmasına rağmen rutin laboratuvar koşullarında uygulanması zor ve pahalı olmaktadır (3). Bu nedenle gen ekspresyon profili ile tanımlanan hücre orijini, Hans algoritması gibi immünohistokimyasal yöntemlerle belirlenmeye çalışılmaktadır (51).

Çalışmamızdaki olgular, Hans algoritması ile germinal merkez B-hücre benzeri ve germinal merkez B-hücre benzeri-dışı iki grupta incelendi. Germinal merkez B-hücre benzeri-dışı grubun diğerine göre daha fazla sayıda olguya sahip olduğu izlendi. Literatürde, çalışmamızla benzer olarak germinal merkez B-hücre benzeri-dışı grupta daha fazla hasta olduğu bildirilmektedir (54).

Çalışmamızda germinal merkez B-hücre benzeri ve germinal merkez B-hücre benzeri-dışı arasında toplam sağkalım açısından anlamlı fark izlenmemiştir. Hans algoritmasının kabul edilebilir geçerliliği olmasına rağmen gen ekspresyon profili ile sınıflandırılmayan %10-15 olguyu tanınamaması, tekrarlanabilirlik sorunları, uygulama hataları, prognozu belirleme açısından etkinliğinin sınırlı olduğu bildirilmektedir (54, 92-96). İmmünohistokimyasal algoritmaların kullanımı, prognostik bilgiyi elde etmekten çok tedaviyi şekillendirebilmesi nedeniyle önerilmektedir (3, 55, 56, 58). Son yıllarda immünohistokimyasal algoritmalara alternatif olarak; formalin fikse parafine gömülü dokularda çalışılabilen, daha kolay uygulanabilir, daha ucuz moleküler ve gen ekspresyon profili ile belirlenen prognoz farkını daha iyi yansıtan moleküler yöntemler geliştirilmektedir (44, 59).

Ayrıca yaş, cinsiyet, R-IPI skoru, NCCN-IPI skoru, Ann Arbor evresi, “bulky” hastalık varlığı, double-ekspresyon varlığı ve yerleşim yerine göre farklı alt gruplarda incelendiğinde, germinal merkez B-hücre benzeri/-dışı gruplar arasında toplam sağkalım açısından anlamlı fark saptanmamıştır.

MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu izlenen agresif B-hücreli lenfoma olguları, Double-hit/Triple-hit lenfoma olarak tanımlanmaktadır (19). DSÖ 2016 yılı revizyonunda bu olgulara, “Yüksek dereceli B-hücreli lenfoma, MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 rearanjmanı izlenen” olarak tanı verilmesi gerektiği bildirilmektedir (1, 3). MYC ve BCL2 immünoekspresyonu izlenen olgular ise double-ekspresor lenfoma olarak tanımlanmaktadır (61, 62). Double-ekspresor lenfoma olguları, “Diffüz büyük B-hücreli lenfoma, NOS” tanısı içerisinde prognostik bir grup olarak değerlendirilmektedir. Literatürdeki çalışmalarda, double-ekspresor lenfoma olguları belirlenirken immünoekspresyon boyanma yüzdeleri için farklı eşik değerler kullanılmıştır

(61-63, 97-99). Ancak en son olarak, 2016 yılında DSÖ revizyonunda, MYC için %40, BCL2 için %50 kabul edilmesinin uygun olacağı görüşü bildirilmektedir (3). Çalışmamızda bu veri ile uyumlu olarak eşik değerler kullanıldı.

Double-ekspresor lenfoma, DBBHL olgularının yaklaşık %20 ile %35'i arasında bildirilmektedir (100). Çalışmamızda, double-ekspresor lenfoma oranı %12,2 olarak görüldü. Literatürdeki birçok çalışmada, Double-ekspresor lenfoma olgularının düşük toplam sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (61, 62, 97, 98). Ancak double ekspresor lenfomanın toplam sağkalım ile ilişkisinin olmadığı, sadece MYC ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu yönünde az sayıda çalışma da mevcuttur (99). DSÖ 2016 yılı revizyonunda, Double-ekspresor lenfomanın kötü prognostik grup olarak kabul edilmesi gerektiği söylenmektedir (3). Çalışmamızda double-ekspresor lenfoma olgularında toplam sağkalım açısından daha kötü seyir görülmekle birlikte istatistiksel olarak ilişki gösterilemedi. Double-ekspresor lenfoma olgu sayısının, diğer yayınlara göre daha az sayıda olması nedeniyle toplam sağkalım ile ilişkisi açısından istatistiksel değerlendirmenin sınırlı olabileceği düşünüldü. Ancak çalışmamızda, MYC ekspresyonun %40 ve daha fazla izlendiği olgular kötü toplam sağkalım ile ilişkili olduğu görüldü. Literatürde de, MYC immünekspresyonu ile düşük toplam sağkalımın ilişkili bulunduğu ancak double ekspresor-lenfoma ile bu ilişkiyi saptayamayan yayın mevcuttur (99). Ayrıca DBBHL olguları, Double-ekspresor lenfoma, sadece MYC pozitif (≥ 40), sadece BCL2 pozitif (≥ 50) ve her ikisi negatif olarak dört gruba ayrılarak incelendiğinde her ikisi de negatif olan gruptaki olgularda diğerlerine göre anlamlı olarak daha iyi toplam sağkalım gösterdiği saptandı. Double-ekspresor lenfoma ile toplam sağkalım ilişkisi, nodal ve ektranodal olarak ayrı ayrı değerlendirildiğinde, çalışmamızdaki ektranodal yerleşimli olgularda Double-ekspresor lenfomanın kötü prognoz ile ilişkisi gösterildi. Ancak nodal yerleşimli olgularda az sayıda double-ekspresor lenfoma (4 olgu) olgusu olması nedeniyle bu değerlendirmenin sınırlı olabileceği düşünüldü. Çalışmamızda Double ekspresor lenfoma; yaş, cinsiyet, R-IPI skoru, NCCN-IPI skoru, Ann Arbor evresi, "bulky" hastalık varlığı ve immünohistokimyasal yöntemle

belirlenen hücre orijinine göre farklı alt gruplarda incelendiğinde toplam sağkalım açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Çalışmamızda demografik ve klinik bulgularla double-ekspresor lenfoma arasında ilişki saptanmadı. Literatürde, double-ekspresor lenfoma olgularının daha ileri evre ve yüksek IPI skoru ile ilişkili olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (62). Bazı yayınlarda ise santral sinir sistemi tutulumu ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (98).

Lenfosit farklılaşması ve aktivasyonu sırasında, antijenlere karşı üretilen antikorların özgüllüğünün, çeşitliliğinin ve etkinliğinin artması için immünglobulin genlerinde rekombinasyon, somatik hipermutasyon, izotip değişimi gibi DNA kırıkları ve mutasyonuna yol açan basamaklar görülmektedir (18). Fizyolojik olarak normalde gerçekleşen bu durumların patolojik durumlara yol açabildiğini ileri süren yayınlar mevcuttur. Lenfoma patogenezinde sıklıkla özellikle immünglobulin genlerini de kapsayan translokasyonların görülmesi bunu destekler niteliktedir. Lenfoma patogenezinde izlenen *MYC* ve *BCL6* genlerindeki translokasyon mutasyonlarında AID aracılı DNA kırıklarının rolü birçok çalışmada bildirilmektedir (6, 7, 21-23, 101-103). Bu yolda yer alan UNG ve yanlış-eşleşme tamir proteinlerinin ve P53, ATM gibi tümör baskılayıcı proteinlerin, translokasyon mutasyonlarının oluşumunda etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (8, 9, 104-107).

AID proteininin immünekspresyonu, DBBHL ve Hodgkin lenfoma başta olmak üzere birçok lenfomada bildirilmiştir (4, 72, 108-111). KLL/SLL ve folliküler lenfoma olgularında, AID immünekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (112). Literatürde, UNG ve yanlış-eşleşme tamir proteinleri ile daha az sayıda çalışma vardır. DBBHL lenfoma olgularında UNG immünekspresyonu pek incelenmemiş olup, mürinlerde UNG ve yanlış eşleşme tamir proteinlerinin beraber kaybının mutasyon oranını artırarak DBBHL benzeri hastalık oluşturduğu, sadece UNG eksikliğinin ise koruyucu olduğu gösterilmektedir (22). Çalışmamızda ise AID ve UNG proteinlerinin ekspresyonları ile toplam sağkalım arasında ilişki saptanamadı.

Literatürdeki çalışmalarda, DBBHL olgularında, yanlış eşleşme tamir proteinlerinde immünohistokimyasal yöntemle kayıp varlığı çoğunlukla izlenmemekte olup az sayıda olguda immünoekspresyon kaybı gösterilmektedir(113). Moleküler olarak yanlış-eşleşme tamir genlerinde mutasyon saptanan olgular, immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde ise bu olguların bir kısmında zayıf immünoekspresyon varlığına dikkat çekilmektedir (113). Zayıf immünoekspresyona tek yanlış-eşleşme tamir proteinini etkileyen mutasyonların, immünoekspresyon kaybına ise dimer olarak iki yanlış-eşleşme tamir proteinini etkileyen mutasyonların yol açabildiğine yönelik görüşler bildirilmektedir (114). Tam olarak açıklığa kavuşmamış bu konu için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bizim çalışmamızda, iki olguda MSH6 ile zayıf immünoekspresyon dikkati çekti. Ancak moleküler olarak bu olgularda yanlış-eşleşme tamir gen mutasyon/metilasyon analizi uygulanamadı.

Çift zincirli DNA kırıkları oluştuktan sonra, kontrol basamaklarında P53 ve ATM proteinlerinin etkili olabileceği yönünde görüşler mevcuttur. Tam açıklığa kavuşturulamamış bu basamakta, normal hücrelerde görülen DNA kırıkları ile oluşturulan *IG* gen rekombinasyonu ile patolojik translokasyonlar arasında kontrol yolağında P53 ve ATM proteinlerinin işlevi olduğu düşünülmektedir. Bu proteinler, normal mutasyonların oluşması sırasında yardımcı olarak ancak patolojik translokasyonlar oluştuğunda ise bunları engelleyici olarak fonksiyon gösterdikleri ileri sürülmektedir. Çalışmalarda, P53 proteininin fazla ekspresyonunun, P53 genindeki mutasyonlar ve lenfomagenезle ilişkili olabileceği bildirilmektedir (115). Diffüz büyük B-hücreli lenfomalarda, P53 ekspresyonu ile MYC protein ekspresyonu ve/veya *MYC* geni translokasyonu arasında ilişki olduğuna dair yayınlar mevcuttur (5, 27, 116, 117). Birçok çalışmada, artmış P53 immünoekspresyonun, DBBHL'da kötü prognostik faktör olduğu bildirilmektedir (116-119). ATM mutasyonunun P53 yolağını inhibe ederek DBBHL patogenezinde önemli olabileceği yönünde çalışmalar bildirilmiştir (120, 121). Mürinlerde ATM kaybının, DBBHL benzeri hastalığa yol açtığı ve lenfomagenезde rolü olabileceği bildirilmektedir (122). ATM proteini kaybının, daha çok primer santral sinir sistemi diffüz büyük B-hücreli lenfoma olgularında olup prognoz ile ilişkisi olmadığı yayınlar mevcuttur (123).

Fizyolojik olarak normal B-hücre gelişimi sırasında AID ile başlayan UNG ve yanlış-eşleşme tamir proteinlerini ve P53, ATM gibi tümör baskılayıcı proteinleri kapsayan mekanizma tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu proteinlerin lenfomagenezdeki rolleri ise araştırılmaya devam etmekte ve şimdiye kadar bilinmeyenlerin oldukça fazla olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda DBBHL olgularında, bu proteinlerin immünekspresyonlarının dağılımlarına dair veri ortaya koymak ve double-ekspresor lenfoma, MYC ekspresyonu $\geq\%40$ olan olgular ve BCL2 ekspresyonu $\geq\%50$ olan olgular ile ilişkilerinin saptanması hedeflendi. Çalışmamızda; AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53, ATM immünekspresyonları ile toplam sağkalım arasında ilişki saptanmadı. Çalışmamızdaki olgular; “AID pozitifliği + UNG negatifliği veya zayıf MMR immünekspresyonu”, “AID pozitifliği + UNG pozitifliği”, “AID pozitifliği + P53 ekspresyonu ve/veya ATM ekspresyon kaybı” olarak gruplandırıldığında da toplam sağkalım arasında ilişki saptanmadı. Bu proteinlerin ekspresyonları ile double-ekspresor lenfoma, MYC ekspresyonu ($\geq\%40$) ve BCL2 ekspresyonu ($\geq\%50$) arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, sadece P53 ile MYC ekspresyonu birlikteliği arasında ilişki saptandı. Ayrıca yanlış-eşleşme tamir proteinlerinde immünekspresyon kaybı izlenmemesi nedeniyle DBBHL lenfoma patogenezinde bu proteinlerin yerinin daha geri planda olduğunu düşünülmüştür.

Ki67 proteini, proliferasyonu gösteren belirteç olarak kullanılmakta olup, DBBHL olgularında prognoz ile ilişkili olduğu yönünde çok sayıda çalışma mevcuttur. Ki67 ile proliferatif indeks arttıkça daha kötü prognoz izlendiği bildirilmekle birlikte bu konuda tartışmalar devam etmektedir. Bazı çalışmalarda prognostik öneminin olmadığı bildirilmektedir. Literatürde farklı çalışmalarda, immünhistokimyasal değerlendirmede farklı Ki67 eşik değerlerinin kullanıldığı görülmüştür (63, 64, 124-126). Çalışmamızda; %50 altı, %50-90 arası ve %90 üzeri immünekspresyon varlığı ile gruplama yapılmıştır. Çalışmamızda Ki67 indeksinin, tek değişkenli Cox orantısal regresyon analizi ile düşük toplam sağkalım ilişkili olduğu gösterilmiş ancak bu fark log-rank testinde ve çok değişkenli Cox orantısal regresyon analizinde

saptanamamıştır. Bu nedenle Ki67 proliferasyon indeksinin bağımsız kötü prognostik faktör olmadığı düşünülmüştür.



6. SONUÇLAR

Bu çalışmada;

- DBBHL'larda, yaşın 60'tan büyük olmasının, ileri Ann Arbor evresinin, yüksek R-IPI ve NCCN skorunun; kötü toplam sağkalım ile ilişkili olduğu görülmüştür.
- DBBHL'larda, MYC ekspresyonu ($\geq\%40$) ile düşük toplam sağkalım arasında ilişki saptanmıştır.
- Double-ekspresor DBBHL alt grupta ve BCL2 ekspresyonu ($\geq\%50$) varlığında daha düşük sağkalım izlenmekle birlikte anlamlı ilişki bulunamamıştır.
- Lenfoma etiyopatogenezinde rolü olabilecek DNA kırıklarının oluşumunda ve tamirinde görevli AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53, ATM proteinlerinin immünekspresyonları ile DBBHL'larda toplam sağkalım arasında ilişki olmadığı görülmüştür.
- AID, UNG, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, P53, ATM proteinlerinin immünekspresyonları ile Double-ekspresor lenfoma grubu ile arasında ilişki olmadığı görülmüştür.
- DBBHL'larda, P53 immünekspresyonu ($>\%50$) ve MYC immünekspresyonu ($\geq\%40$) birlikteliğinin ilişkili olduğu gösterilmiştir.
- Yanlış-eşleşme proteinlerinin immünekspresyonlarında kayıp izlenmemesi nedeniyle bu proteinlerin DBBHL patogenezinde belirgin rolü olmadığı kanısına varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, et al. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues 4th Ed.(2008). 2008.
2. Schmidt MT, Huang Q, Alkan S. Aggressive B-cell lymphomas: a review and practical approach for the practicing pathologist. *Advances in anatomic pathology*. 2015;22(3):168-80.
3. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
4. Greiner A, Tobollik S, Buettner M, Jungnickel B, Herrmann K, Kremmer E, et al. Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J Pathol*. 2005;205(5):541-7.
5. Ramiro AR, Jankovic M, Callen E, Difilippantonio S, Chen HT, McBride KM, et al. Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-Igh translocations. *Nature*. 2006;440(7080):105-9.
6. Dorsett Y, Robbiani DF, Jankovic M, Reina-San-Martin B, Eisenreich TR, Nussenzweig MC. A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med*. 2007;204(9):2225-32.
7. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, Compagno M, Smith P, Muramatsu M, et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet*. 2008;40(1):108-12.
8. Liu M, Duke JL, Richter DJ, Vinuesa CG, Goodnow CC, Kleinstein SH, et al. Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature*. 2008;451(7180):841-5.
9. Liu M, Schatz DG. Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends Immunol*. 2009;30(4):173-81.
10. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology: Elsevier Health Sciences; 2014.

11. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *New England journal of medicine*. 2000;343(1):37-49.
12. Jaffe ES, Harris NL, Vardiman J, Arber DA, Campo E. *Hematopathology*: Elsevier Health Sciences; 2010.
13. Mills SE. *Histology for pathologists*: Philadelphia; 2007.
14. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(8):606-16.
15. Fear DJ. Mechanisms regulating the targeting and activity of activation induced cytidine deaminase. *Curr Opin Immunol*. 2013;25(5):619-28.
16. Longerich S, Storb U. The contested role of uracil DNA glycosylase in immunoglobulin gene diversification. *Trends Genet*. 2005;21(5):253-6.
17. Matthews AJ, Zheng S, DiMenna LJ, Chaudhuri J. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv Immunol*. 2014;122:1-57.
18. Gazumyan A, Bothmer A, Klein IA, Nussenzweig MC, McBride KM. Activation-induced cytidine deaminase in antibody diversification and chromosome translocation. *Adv Cancer Res*. 2012;113:167-90.
19. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319-31.
20. Ramiro AR, Jankovic M, Eisenreich T, Difilippantonio S, Chen-Kiang S, Muramatsu M, et al. AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell*. 2004;118(4):431-8.
21. Robbiani DF, Bothmer A, Callen E, Reina-San-Martin B, Dorsett Y, Difilippantonio S, et al. AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell*. 2008;135(6):1028-38.
22. Gu X, Booth CJ, Liu Z, Strout MP. AID-associated DNA repair pathways regulate malignant transformation in a murine model of BCL6-driven diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2016;127(1):102-12.

23. Casellas R, Basu U, Yewdell WT, Chaudhuri J, Robbiani DF, Di Noia JM. Mutations, kataegis and translocations in B cells: understanding AID promiscuous activity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(3):164-76.
24. Cortizas EM, Zahn A, Safavi S, Reed JA, Vega F, Di Noia JM, et al. UNG protects B cells from AID-induced telomere loss. *J Exp Med*. 2016;213(11):2459-72.
25. Girelli Zubani G, Zivojnovic M, De Smet A, Albagli-Curiel O, Huetz F, Weill JC, et al. Pms2 and uracil-DNA glycosylases act jointly in the mismatch repair pathway to generate Ig gene mutations at A-T base pairs. *J Exp Med*. 2017;214(4):1169-80.
26. de Miranda NF, Peng R, Georgiou K, Wu C, Falk Sorqvist E, Berglund M, et al. DNA repair genes are selectively mutated in diffuse large B cell lymphomas. *J Exp Med*. 2013;210(9):1729-42.
27. Tessoulin B, Eveillard M, Lok A, Chiron D, Moreau P, Amiot M, et al. p53 dysregulation in B-cell malignancies: More than a single gene in the pathway to hell. *Blood Rev*. 2017.
28. Aguilera N. Knowles' Neoplastic Hematopathology. LWW; 2014.
29. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Annals of oncology*. 1998;9(7):717-20.
30. Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 2004;23(38):6524-34.
31. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63(1):11-30.
32. Armitage JO. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;89(11):3909-18.
33. Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2014;43.
34. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, Gerhartz HH, Meusers P, Siegert W, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood*. 1997;89(7):2291-7.

35. Baars J, De Jong D, Willemse E, Gras L, Dalesio O, v Heerde P, et al. Diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphomas: the clinical relevance of histological subclassification. *British journal of cancer*. 1999;79(11-12):1770.
36. Salar A, Sevilla AF, Romagosa V, Domingo-Claros A, González-Barca E, Pera J, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: is morphologic subdivision useful in clinical management? *European journal of haematology*. 1998;60(3):202-8.
37. Kramer M, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, Van Krieken J, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998;92(9):3152-62.
38. 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. *Haematologica*. 2013;98(2):255-63.
39. Karube K, Campo E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol*. 2015;52(2):97-106.
40. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F, editors. The c-Myc target gene network. *Seminars in cancer biology*; 2006: Elsevier.
41. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*. 2009;114(11):2273-9.
42. Swerdlow SH. Diagnosis of 'double hit'diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *ASH Education Program Book*. 2014;2014(1):90-9.
43. 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(6769):503-11.
44. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin

Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol.* 2015;33(26):2848-56.

45. 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. *New England Journal of Medicine.* 2002;346(25):1937-47.

46. Lenz G, Wright GW, Emre NT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2008;105(36):13520-5.

47. Pasqualucci L, Dalla-Favera R, editors. *The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma.* Seminars in hematology; 2015: Elsevier.

48. Sweetenham JW. Molecular signatures in the diagnosis and management of diffuse large B-cell lymphoma. *Current opinion in hematology.* 2011;18(4):288-92.

49. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(10):3879-84.

50. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature genetics.* 2011;43(9):830-7.

51. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 2004;103(1):275-82.

52. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Tzankov A, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia.* 2012;26(9):2103-13.

53. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Journal of clinical oncology*. 2010;29(2):200-7.
54. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzman T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011;117(18):4836-43.
55. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, Dave SS, Wright G, Grant N, et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2009;113(24):6069-76.
56. Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, Reeder CB, Foran JM, Nelson GD, et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-Cell lymphoma: a phase II study. *J Clin Oncol*. 2015;33(3):251-7.
57. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clinical cancer research*. 2009;15(17):5494-502.
58. Molina TJ, Canioni D, Copie-Bergman C, Recher C, Brière J, Haioun C, et al. Young Patients With Non-Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Benefit From Intensified Chemotherapy With ACVBP Plus Rituximab Compared With CHOP Plus Rituximab: Analysis of Data From the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte/Lymphoma Study Association Phase III Trial LNH 03-2B. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(35):3996-4003.
59. Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, Marchand V, Cornic M, Jais J-P, et al. Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse

Transcriptase–Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2015;17(3):273-83.

60. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*. 2013;121(20):4021-31; quiz 250.

61. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3452-9.

62. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3460-7.

63. Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL, et al. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol*. 2014;165(3):382-91.

64. Salles G, de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood*. 2011;117(26):7070-8.

65. Shipp M, Harrington D, Anderson J, Armitage JO, Bonadonna G, Brittinger G, et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 1993;329(14):987-94.

66. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857-61.

67. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123(6):837-42.
68. Advani RH, Chen H, Habermann TM, Morrison VA, Weller EA, Fisher RI, et al. Comparison of conventional prognostic indices in patients older than 60 years with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP in the US Intergroup Study (ECOG 4494, CALGB 9793): consideration of age greater than 70 years in an elderly prognostic index (E-IPI). *British journal of haematology*. 2010;151(2):143-51.
69. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(1):12-23.
70. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;87(2):146-71.
71. Greiner A, Tobollik S, Buettner M, Jungnickel B, Herrmann K, Kremmer E, et al. Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *The Journal of pathology*. 2005;205(5):541-7.
72. Engels K, Jungnickel B, Tobollik S, Hansmann M-L, Kriener S, Willenbrock K. Expression of activation-induced cytidine deaminase in malignant lymphomas infiltrating the bone marrow. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2008;16(6):521-9.
73. Diebold J, Anderson JR, Armitage JO, Connors JM, Maclennan KA, Muller-Hermelink HK, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic analysis of 444 cases classified according to the updated Kiel classification. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(1):97-104.
74. Carella AM, de Souza CA, Luminari S, Marcheselli L, Chiappella A, di Rocco A, et al. Prognostic role of gender in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab containing regimens: a Fondazione Italiana

Linfomi/Grupo de Estudos em Molestias Onco-Hematológicas retrospective study. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(1):53-7.

75. Kanemasa Y, Shimoyama T, Sasaki Y, Tamura M, Sawada T, Omuro Y, et al. Analysis of the prognostic value of BMI and the difference in its impact according to age and sex in DLBCL patients. *Hematol Oncol*. 2017.

76. Pregno P, Chiappella A, Bellò M, Botto B, Ferrero S, Franceschetti S, et al. Interim 18-FDG-PET/CT failed to predict the outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated at the diagnosis with rituximab-CHOP. *Blood*. 2012;119(9):2066-73.

77. Le Guyader-Peyrou S, Orazio S, Dejardin O, Maynadie M, Troussard X, Monnereau A. Factors related to the relative survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma in a population-based study in France: does socio-economic status have a role? *Haematologica*. 2017;102(3):584-92.

78. Riihijärvi S, Taskinen M, Jerkeman M, Leppä S. Male gender is an adverse prognostic factor in B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *European journal of haematology*. 2011;86(2):124-8.

79. Ngo L, Hee S-W, Lim L-C, Tao M, Quek R, Yap S-P, et al. Prognostic factors in patients with diffuse large B cell lymphoma: before and after the introduction of rituximab. *Leukemia & lymphoma*. 2008;49(3):462-9.

80. Pfreundschuh M. How I treat elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010;116(24):5103-10.

81. Pfreundschuh M, Murawski N, Zeynalova S, Poeschel V, Reiser M, Ho AD, et al. Male Sex Is Associated with Lower Rituximab Trough Serum Levels and Evolves as a Significant Prognostic Factor in Elderly Patients with DLBCL Treated with R-CHOP: Results From 4 Prospective Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin-Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Blood*. 2009;114(22):3715-.

82. Cartron G, Trappe RU, Solal-Céligny P, Hallek M. Interindividual variability of response to rituximab: from biological origins to individualized therapies. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(1):19-30.

83. Lister T, Crowther D, Sutcliffe S, Glatstein E, Canellos G, Young R, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of

patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *Journal of Clinical Oncology*. 1989;7(11):1630-6.

84. Takahashi H, Tomita N, Yokoyama M, Tsunoda S, Yano T, Murayama K, et al. Prognostic impact of extranodal involvement in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer*. 2012;118(17):4166-72.

85. López-Guillermo A, Colomo L, Jiménez M, Bosch F, Villamor N, Arenillas L, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(12):2797-804.

86. Castillo JJ, Winer ES, Olszewski AJ. Sites of extranodal involvement are prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Am J Hematol*. 2014;89(3):310-4.

87. Lopez-Guillermo A, Colomo L, Jimenez M, Bosch F, Villamor N, Arenillas L, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J Clin Oncol*. 2005;23(12):2797-804.

88. Møller MB, Pedersen NT, Christensen BE. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation—a population-based study of 1575 cases. *British journal of haematology*. 2004;124(2):151-9.

89. Yao S, Li J, Yao Z, Xu Y, Chu J, Zhang J, et al. Extranodal involvement in young patients with diffuse large B-cell lymphoma: distribution, prognostic value and treatment options. *Chin J Cancer Res*. 2017;29(1):57-65.

90. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Journal of Clinical Oncology*. 1998;16(8):2780-95.

91. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(17):9991-6.

92. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2014;14(6):460-7 e2.
93. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3360-5.
94. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd H-W, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood.* 2010;116(23):4916-25.
95. Hong J, Park S, Park J, Jang SJ, Ahn HK, Sym SJ, et al. CD99 expression and newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP immunochemotherapy. *Annals of hematology.* 2012;91(12):1897-906.
96. Seki R, Ohshima K, Fujisaki T, Uike N, Kawano F, Gondo H, et al. Prognostic impact of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer science.* 2009;100(10):1842-7.
97. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2013;121(12):2253-63.
98. Savage KJ, Slack GW, Mottok A, Sehn LH, Villa D, Kansara R, et al. Impact of dual expression of MYC and BCL2 by immunohistochemistry on the risk of CNS relapse in DLBCL. *Blood.* 2016;127(18):2182-8.
99. Valera A, Lopez-Guillermo A, Cardesa-Salzman T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica.* 2013;98(10):1554-62.

100. Rosenthal A, Younes A. High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Rev.* 2017;31(2):37-42.
101. Robbiani DF, Bunting S, Feldhahn N, Bothmer A, Camps J, Deroubaix S, et al. AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol Cell.* 2009;36(4):631-41.
102. Pettersen HS, Galashevskaya A, Doseth B, Sousa MM, Sarno A, Visnes T, et al. AID expression in B-cell lymphomas causes accumulation of genomic uracil and a distinct AID mutational signature. *DNA Repair (Amst).* 2015;25:60-71.
103. Hardianti MS, Tatsumi E, Syampurnawati M, Furuta K, Saigo K, Nakamachi Y, et al. Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular lymphoma: association between AID expression and ongoing mutation in FL. *Leukemia.* 2004;18(4):826-31.
104. Krokan HE, Saetrom P, Aas PA, Pettersen HS, Kavli B, Slupphaug G. Error-free versus mutagenic processing of genomic uracil--relevance to cancer. *DNA Repair (Amst).* 2014;19:38-47.
105. Lenz G, Nagel I, Siebert R, Roschke AV, Sanger W, Wright GW, et al. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine.* 2007;204(3):633-43.
106. Péron S, Metin A, Gardès P, Alyanakian M-A, Sheridan E, Kratz CP, et al. Human PMS2 deficiency is associated with impaired immunoglobulin class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine.* 2008;205(11):2465-72.
107. Roa S, Li Z, Peled JU, Zhao C, Edelmann W, Scharff MD. MSH2/MSH6 complex promotes error-free repair of AID-induced dU: G mispairs as well as error-prone hypermutation of A: T sites. *PLoS One.* 2010;5(6):e11182.
108. Willenbrock K, Renne C, Rottenkolber M, Klapper W, Dreyling M, Engelhard M, et al. The expression of activation induced cytidine deaminase

in follicular lymphoma is independent of prognosis and stage. *Histopathology*. 2009;54(4):509-12.

109. Shi Y, Zhao X, Durkin L, Rogers HJ, Hsi ED. Aberrant activation-induced cytidine deaminase expression in Philadelphia chromosome-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hum Pathol*. 2016;52:173-8.

110. Lossos IS, Levy R, Alizadeh AA. AID is expressed in germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large-cell lymphomas and is not correlated with intraclonal heterogeneity. *Leukemia*. 2004;18(11):1775-9.

111. Greeve J, Philipsen A, Krause K, Klapper W, Heidorn K, Castle BE, et al. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003;101(9):3574-80.

112. Leuenberger M, Frigerio S, Wild PJ, Noetzli F, Korol D, Zimmermann DR, et al. AID protein expression in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma is associated with poor prognosis and complex genetic alterations. *Mod Pathol*. 2010;23(2):177-86.

113. Rossi D, Rasi S, Di Rocco A, Fabbri A, Forconi F, Ghoghini A, et al. The host genetic background of DNA repair mechanisms is an independent predictor of survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2011;117(8):2405-13.

114. Couronne L, Ruminy P, Wautier-Rascalou A, Rainville V, Cornic M, Picquenot JM, et al. Mutation mismatch repair gene deletions in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(5):1079-86.

115. Lu TX, Young KH, Xu W, Li JY. TP53 dysfunction in diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;97:47-55.

116. Wang XJ, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE, Tang G, Wang S, Oki Y, et al. P53 expression correlates with poorer survival and augments the negative prognostic effect of MYC rearrangement, expression or concurrent MYC/BCL2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2017;30(2):194-203.

117. Li S, Weiss VL, Wang XJ, Desai PA, Hu S, Yin CC, et al. High-grade B-cell lymphoma with MYC rearrangement and without BCL2 and BCL6 rearrangements is associated with high P53 expression and a poor prognosis. *The American journal of surgical pathology*. 2016;40(2):253-61.

118. Fiskvik I, Beiske K, Delabie J, Yri O, Spetalen S, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Combining MYC, BCL2 and TP53 gene and protein expression alterations improves risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(6):1742-9.
119. Schiefer AI, Kornauth C, Simonitsch-Klupp I, Skrabs C, Masel EK, Streubel B, et al. Impact of Single or Combined Genomic Alterations of TP53, MYC, and BCL2 on Survival of Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphomas: A Retrospective Cohort Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(52):e2388.
120. Gronbaek K, Worm J, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Hokland P, Guldborg P. ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2002;100(4):1430-7.
121. Starczynski J, Simmons W, Flavell JR, Byrd PJ, Stewart GS, Kullar HS, et al. Variations in ATM protein expression during normal lymphoid differentiation and among B-cell-derived neoplasias. *The American journal of pathology*. 2003;163(2):423-32.
122. Hathcock KS, Padilla-Nash HM, Camps J, Shin DM, Triner D, Shaffer AL, 3rd, et al. ATM deficiency promotes development of murine B-cell lymphomas that resemble diffuse large B-cell lymphoma in humans. *Blood*. 2015;126(20):2291-301.
123. Kim SH, Cheong J-W, Park KH, Kim TS, Yang W-I. Comparison of Ataxia-Telangiectasia Mutated Protein Expression in Diffuse Large B-Cell Lymphomas of Primary Central Nervous System and Non-Central Nervous System Origin. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(3):457-67.
124. Broyde A, Boycov O, Strenov Y, Okon E, Shpilberg O, Bairey O. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol*. 2009;84(6):338-43.
125. Yoon DH, Choi DR, Ahn HJ, Kim S, Lee DH, Kim SW, et al. Ki-67 expression as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP. *Eur J Haematol*. 2010;85(2):149-57.

126. Hasselblom S, Ridell B, Sigurdardottir M, Hansson U, Nilsson-Ehle H, Andersson P-O. Low rather than high Ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2008;49(8):1501-9.

