

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

**NODAL DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA, NOS'LARDA
MİKROÇEVRE VE KONTROL NOKTASI BLOKAJİ İLİŞKİLİ
MOLEKÜLLERİN (PD-1, PD-L1, CTLA-4, CD163 VE CD14)
PROGNOZA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ömer ATMIŞ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nalan NEŞE

Manisa, 2019

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

**NODAL DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMA, NOS'LARDA
MİKROÇEVRE VE KONTROL NOKTASI BLOKAJİ İLİŞKİLİ
MOLEKÜLLERİN (PD-1, PD-L1, CTLA-4, CD163 VE CD14)
PROGNOZA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Ömer ATMIŞ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nalan NEŞE

Manisa, 2019

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgisi, birikim ve deneyimleri ile bana yol gösterici olan, titiz, disiplinli ve azimli çalışma konusunda çok şey öğrendiğim, eğitim sürecim boyunca her zaman ufkumu açan tez danışmanım Prof. Dr. Nalan Neşe'ye, hoşgörüsü, sabrı ve anlayışıyla her konuda desteğini esirgemeyen, meslek hayatımdaki katkılarını asla unutamayacağım Prof. Dr. Aydın İşisağ'a, pratiklik ve hızlı düşünmenin patolojideki önemini bize öğreten, teknolojinin tüm olanaklarını bize sunan, bilimsel bakış açısıyla eğitime yön veren Prof. Dr. Ali Rıza Kandiloğlu'na, bilgisi, enerjisi ve titizliği ile bana çok şey katan, bilgi aktarımına hayran olduğum Prof. Dr. Semin Ayhan'a, şefkati, bilgisi, deneyimleri ve öğretmedeki sabrıyla kendisinden çok şey öğrendiğim Prof. Dr. Peyker Temiz'e, yoğun iş temposuna rağmen her zaman bana destek olan, bilgi ve deneyimlerinden çok şey öğrendiğim, neşesi ve çalışkanlığı ile örnek tablo oluşturan Öğr. Gör. Dr. Ayça Tan'a, tezimde hasta verilerinin edinilmesine yardımcı olan Prof. Dr. İsmet Aydoğdu ve Dr. İlknur Alaca'ya, birlikte çalışmaktan büyük zevk duyduğum, asistanlık hayatımda önemli, güzel dostluklar edindiğim asistan arkadaşlarıma, eğitim ve tez sürecindeki yardımlarından dolayı laboratuvar teknisyenlerimiz, arşiv çalışanlarımız, sekreterlerimiz ve personelimize, tezimin kesit ve boya işleriyle ilgilenen Duru Karakuzu, Ahmet Karakaya, Melek Türkdal, İlknur Çalışkan ve Emel Koyuncu'ya, yanımda olmasından güç aldığım, her zaman desteğini hissettiğim Sedya Uluçay'a ve tüm eğitim hayatım boyunca bana her zaman destek olan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ömer Atmış

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ.....	1
II. GENEL BİLGİLER	3
Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, NOS.....	3
Epidemiyoloji	5
Etiyoloji	5
Lokalizasyon.....	6
Klinik Özellikler	7
Morfolojik Özellikler	7
İmmunfenotipik Özellikler	8
Genetik Özellikler	10
Prognostik Faktörler	11
Tedavi.....	16
Kontrol Noktası Blokağı ve Tümör Mikroçevresi.....	16
Çalışmada Kullanılan Belirteçler	20
PD-1 ve PD-L1	20
CTLA-4	22
CD163	23
CD14	24
III. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	25
IV. BULGULAR.....	30
Yaş, Cinsiyet Dağılımı ve Klinikopatolojik Özellikler.....	30
Morfolojik ve İmmunfenotipik Özellikler	33
İstatistiksel Analiz.....	36
V.TARTIŞMA	59
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
VII. ÖZET.....	72
VIII. İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	74
IX. KAYNAKLAR.....	76

KISALTMALAR

ABC: Aktive B hücre tipi
BBA: Büyük büyütme alanı
CTLA-4: Sitotoksik T lenfosit-ilışkili antijen 4
DBBHL: Diffüz büyük B hücreli lenfoma
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
EBV: Epstein-Barr virüs
ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group
FDG: Fluorodeoksiglukoz
GCB: Germinal merkez B hücre tipi
HCV: Hepatit C virüsü
HE: Hematoksilen eozin
IFN: İnterferon
IPI: Uluslararası Prognostik İndeks
IRF-1: İnterferon regülatör faktör-1
KLL/SLL: Kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma
KT: Kemoterapi
LDH: Laktat dehidrogenaz
LM oranı: Lenfosit/monosit oranı
MDSC: Myeloid kökenli süpresör hücre
M-MDSC: Monositik myeloid kökenli süpresör hücre
MPV: Ortalama platelet hacmi
NHL: Non-Hodgkin lenfoma
NK: Doğal öldürücü
NL oranı: Nötrofil/lenfosit oranı

NOS: Başka türlü sınıflandırılmayan

PD-1: Programlanmış hücre ölümü 1

PD-L1: Programlanmış hücre ölümü ligand 1

PET: Pozitron emisyon tomografisi

PL oranı: Platelet/lenfosit oranı

R-CHOP: Rituksimab, siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin ve prednizolon

R-IPI: Revize Uluslararası Prognostik İndeks

TAM: Tümör ilişkili makrofaj (tümörü infiltre eden makrofaj)

TCR: T hücre reseptörü

TİL: Tümörü infiltre eden lenfosit

GİRİŞ

Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), non-Hodgkin lenfomaların (NHL) en sık görülen histolojik alt tipidir ve yeni tanı alan lenfomaların yaklaşık %30-40'ını oluşturur (1, 2). DBBHL'ler klinik özellikler de dikkate alınarak morfolojik varyantlar ve moleküler alt tiplere ayrılmıştır. Bununla birlikte, biyolojik olarak heterojen ve alt tiplere için açık ve kabul edilmiş bir ölçüte sahip olmayan pek çok olgu vardır (3). DBBHL'ler tipik olarak aylar içinde gelişen ve tedavi edilmediğinde ölümcül olabilecek semptomatik hastalığa neden olan agresif lenfomalardır (4). Buna karşın ileri evre olgularda dahi hastaların çoğu immunokemoterapi ile tedavi edilebilmektedir (4). Rituksimab, siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin ve prednizolon rejimi (R-CHOP) gibi rituksimab ile kombine edilen antrasiklin bazlı kemoterapiler, DBBHL için standart tedavi olmuştur (5). Rituksimab tedavisiyle gözlenen gelişmelere rağmen ileri evre DBBHL olgularının yaklaşık üçte biri tedaviye dirençlidir ya da hastalık sık nükslerle seyreder (6). Hastaların yarısından fazlası uzun süreli remisyona ulaşsa da, özellikle yüksek riskli hastalarda bu tedaviler etkisiz kalabilmektedir (7). Son on yılda moleküler genetikteki gelişmeler sonucu temel onkojenik yolların ve yeni tedavi hedeflerinin keşfedilmesine yol açan DBBHL'nin biyolojik çeşitliliğine dair anlayış büyük ölçüde gelişmiştir (4). Bu nedenle DBBHL hastalarının tedavisinde moleküler onkojenik mekanizmalara dayanan yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (7).

Son yıllarda malign hücreler ile tümör mikroçevresi arasındaki etkileşimin ve tümör hücrelerinin immun sistemden kaçış mekanizmalarının daha iyi anlaşılması sonucu kanser tedavisinde immun yanıtı uyaran ya da tümör hücrelerinin immun sistemden kaçışını engelleyen yeni tedavi yöntemleri tanımlanmaktadır (8). Tümör mikroçevresi ve tümör hücrelerinin immun

sistemden kaçışı ile ilgili moleküllerin prognozu öngörülebileceği de düşünülmektedir. Hastalarda tümöre karşı daha iyi bir immun yanıtın oluşturulabilmesine yönelik immun tedavi yöntemleri ve bu tedavilerden en yüksek yararı görecektir hasta gruplarının belirlenmesini sağlayacak belirteçler çalışmalarla ortaya konmuştur. Programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1), programlanmış hücre ölümü ligand 1 (PD-L1) ve sitotoksik T lenfosit-ilişkili antijen 4 (CTLA-4) gibi moleküllerin tanımlanması, bu molekülleri hedef alan yeni tedavilerin kullanıma girmesiyle sonuçlanmıştır. Örneğin CTLA-4'e karşı geliştirilmiş bir monoklonal antikor olan ipilimumab, ileri evre melanom hastalarında önemli bir tedavi seçeneği olmaya başlamıştır. Ayrıca PD-1'i hedef alan nivolumab ve pembrolizumab; PD-L1'i hedef alan atezolizumab gibi tedavi ajanları melanom, küçük hücreli dışı akciğer kanserleri, böbrek kanserleri ve mesane kanserleri gibi tümör gruplarında klinik kullanıma girmektedir (9). Bu moleküllerin lenfomalardaki durumu yanı sıra tümör mikroçevresinin ana bileşenlerinden olan makrofajların prognostik etkisini belirlemeye yönelik araştırmalar da artmaktadır.

Bu çalışmada; tümör mikroçevresi ve kontrol noktası blokajı ilişkili moleküllerden olan PD-1, PD-L1, CTLA-4, CD163 ve CD14'ün DBBHL'lerde immunohistokimyasal yöntemle boyanma durumunun saptanması, bu verilerle hastaların prognostik verilerinin karşılaştırılarak bu belirteçlerin DBBHL olgularında prognozu öngörüp göremeyeceğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma, NOS

DBBHL, diffüz gelişim paternine sahip, normal lenfosit boyutunun iki katından daha büyük, orta ya da büyük boy B lenfoid hücrelerin neoplazmidir (10). NHL'ler için 1960'lı yıllardan günümüze Rappaport, Lukes&Collins, revize Rappaport, Kiel, Working formulation ve REAL sınıflaması gibi farklı sınıflamalar kullanılmıştır (11-13). 2001 yılında REAL sınıflaması temel alınarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflaması oluşturulmuştur (12). 2016 yılında, lenfoid sistem tümörleri için kullanılan DSÖ, 2008 sınıflaması güncellenmiş olup günümüzde bu sınıflama kullanılmaktadır (Tablo 1) (14).

Morfolojik, biyolojik ve klinik çalışmalar sonucu DBBHL'ler morfolojik varyantlar, moleküler alt tipler ve farklı hastalıklar olarak gruplara ayrılmıştır. Bununla birlikte, biyolojik olarak heterojen olabilen ve alt tiplere için açık ve kabul edilmiş bir ölçüte sahip olmayan birçok olgu vardır. Bu olgular, Tablo 1'de listelenen spesifik tanı ölçütlerine sahip olmayan olgulardır ve tümü DBBHL, başka türlü sınıflandırılmayan (DBBHL, NOS) olarak gruplanır (10). DSÖ, 2016 sınıflamasına göre DBBHL, NOS'lar; 'germinal merkez B hücre tipi (GCB)' ve 'aktive B hücre tipi (ABC)' olmak üzere iki moleküler alt tip içerir (10, 14). Morfolojik varyantları ise sık ve nadir görülen varyantlar olarak 2 ana gruba ayrılmaktadır. Sentroblastik, immunoblastik ve anaplastik varyantlar DBBHL, NOS'ların sık görülen morfolojik varyantlarıdır (14). Bunların dışında; miksoid stroma ya da fibriler matriks içeren, psödorozet formasyonu oluşturan, iğsi görünümde veya taşlı yüzük benzeri morfolojide olan, sitoplazmik granüller, mikrovillus projeksiyonları ve intersellüler junksiyonlar oluşturan daha nadir görülen morfolojik varyantlar da tanımlanmıştır (10).

Tablo 1: DSÖ, 2016 sınıflamasına göre matür B hücre neoplazmları

Matür B hücre Neoplazmları
Kronik lenfosittik lösemi/küçük lenfosittik lenfoma
Monoklonal B hücre lenfositozu
B hücreli prolenfositik lösemi
Splenik marjinal zon lenfoma
'Hairy cell' lösemi (Tüylü hücreli lösemi)
<i>Splenik B hücreli lenfoma/lösemi, sınıflandırılmayan</i>
<i>Splenik diffüz kırmızı pulpa küçük B hücreli lenfoması</i>
<i>'Hairy cell' lösemi-varyant</i>
Lenfoplazmasitik lenfoma
Waldenström makroglobulinemisi
Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS), IgM
μ ağır zincir hastalığı
γ ağır zincir hastalığı
α ağır zincir hastalığı
Önemi bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS), IgG/A
Plazma hücreli myelom
Kemiğin soliter plazmasitomu
Ekstraosseöz plazmasitom
Monoklonal immunoglobulin depozisyon hastalıkları
Mukoza ilişkili ektranodal marjinal zon lenfoma (MALT lenfoma)
Nodal marjinal zon lenfoma
<i>Pediyatrik nodal marjinal zon lenfoma</i>
Foliküler lymphoma
in situ folliküler neoplazi
Duodenal tip folliküler lenfoma
Pediyatrik tip folliküler lenfoma
<i>IRF4 yeniden düzenlenimi gösteren büyük B hücreli lenfoma</i>
Primer kutanöz follikül merkez lenfoması
'Mantle' hücreli lenfoma
in situ 'mantle' hücreli neoplazi
Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), NOS
Germinal merkez B hücre tipi
Aktive B hücre tipi
T hücre/histiosit zengin büyük B hücreli lenfoma
Santral sinir sisteminin (SSS) primer DBBHL'si

Tablo 1: DSÖ, 2016 sınıflamasına göre matür B hücre neoplazmları (DEVAM)
Primer kutanöz DBBHL, bacak tipi
EBV+ DBBHL, NOS
<i>EBV+ mukokutanöz ülser</i>
Kronik yangı ilişkili DBBHL
Lenfomatoid granülomatozis
Primer mediastinal (timik) büyük B hücreli lenfoma
İntravasküler büyük B hücreli lenfoma
ALK+ büyük B hücreli lenfoma
Plazmablastik lenfoma
Primer efüzyon lenfoması
<i>HHV8+ DBBHL, NOS</i>
Burkitt lenfoma
<i>11q aberasyonu gösteren Burkitt benzeri lenfoma</i>
MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 yeniden düzenlenimi gösteren yüksek dereceli B hücreli lenfoma
Yüksek dereceli B hücreli lenfoma, NOS
DBBHL ve klasik Hodgkin lenfoma arasında özellikler gösteren B hücreli lenfoma, sınıflandırılmayan

Geçici antiteler italik olarak listelenmiştir.

Epidemiyoloji:

Non-Hodgkin lenfoma insidansı son birkaç on yılda artış göstermiştir. NHL'lerin yaklaşık %85-90'ı B hücre kökenli iken geri kalan NHL'ler T hücre ve NK hücrelerinden kaynaklanır (15). Spesifik lenfoma alt tiplerinin sıklığı, coğrafi bölgelere göre değişkenlik göstermektedir; ancak DBBHL tüm dünyada yaygındır (15) ve NHL'lerin en sık görülen histolojik alt tipidir. Yeni tanı alan lenfomaların yaklaşık %30-40'ını DBBHL'ler oluşturur (1, 2). Tüm yaşlarda görülebilmeye karşın yaşlılarda daha siktir ve ortanca hasta yaşı 65 yaştır (16). Erkeklerde kadınlara göre hafifçe daha siktir (17, 18).

Etiyoloji:

DBBHL'lerde çoğu olguda etiyoloji bilinmemekle birlikte (de novo), olguların bir kısmı daha az agresif bir lenfomanın transformasyonu (sekonder) sonucu gelişmiştir (10, 19). Kronik lenfosittik lösemi/küçük

lenfositik lenfoma, folliküler lenfoma, marjinal zon lenfoma ya da nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma gibi daha az agresif lenfomalar DBBHL'ye transforme olabilirler (10, 19).

Konjenital ya da kazanılmış immun yetmezlik durumlarının yanı sıra moleküler aberasyonlara neden olan ajanlar predispozan faktörler olarak belirtilmektedir (20). Altta yatan immun yetmezlik DBBHL gelişimi için önemli bir risk faktörüdür (10). Özellikle son yıllarda DBBHL ve virüsler arasındaki ilişkiler tartışma konusu haline gelmiştir. DBBHL ile hepatit C virüsü (HCV) arasında ilişki olduğu bildirilmektedir (21). Epidemiyolojik çalışmalar sonucu, HCV prevalansının yüksek olduğu bölgelerde düşük olanlara göre lenfoma riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (21, 22). Epstein-Barr virüs (EBV), DBBHL da dahil olmak üzere geniş bir lenfoproliferatif hastalık spektrumu ile ilişkilidir (23-25). İmmun yetmezlik zemininde ortaya çıkan DBBHL, NOS'larda EBV pozitifliği sporadik olgulara göre daha sıktır. Zeminde immun yetmezlik olmayan DBBHL olgularında EBV pozitifliği batı toplumlarında %3 oranında iken Asya ve Latin Amerika toplumlarında yaklaşık %10 olarak bildirilmiştir ve tipik olarak bu olgulardaki lenfomalar ABC alt tipindedir (25-31). Eğer tümör hücrelerinin çoğunda EBV pozitif ise EBV pozitif DBBHL, NOS ya da başka bir spesifik EBV pozitif lenfoma (kronik yangı ilişkili DBBHL, lenfomatooid granülomatozis vb.) tanısı düşünülmelidir (10).

Lokalizasyon:

DBBHL nodal ya da ektranodal hastalık şeklinde prezente olabilir. Olguların %40'ı başlangıçta ektranodal dokulara sınırlı olarak görülür (17, 32, 33). En sık ektranodal tutulum yeri gastrointestinal sistem olmasına karşın tüm dokular primer tutulum yeri olabilir (10, 34). En sık tutulan diğer ektranodal dokular; kemik, testis, dalak, Waldeyer halkası, tükürük bezi, tiroid, karaciğer, böbrek ve adrenal bezlerdir (10).

Tanı anında olguların yaklaşık %10-25'inde kemik iliği tutulumu saptanır (35, 36). DBBHL'de kemik iliği tutulumu uyumsuz (kemik iliğinde düşük dereceli B hücreli lenfoma) ya da uyumlu (kemik iliğinde büyük hücreli lenfoma) olabilir (36-40). Minimal tutulumun tespit edilme oranı morfolojik

incelemeye ek olarak flow sitometri, immunohistokimyasal çalışmalar ve moleküler genetik gibi yöntemlerin uygulanması ile artabilir (41, 42). Son çalışmalara göre fluorodeoksiglukoz-pozitron emisyon tomografisi (FDG-PET) uyumlu kemik iliği tutulumunu göstermede sensitif bir yöntemken uyumsuz tutlum için güvenilir bir yöntem değildir (43-45). Lenfoma evrelemesinde kabul edilen son ölçütlere göre FDG-PET sonucu negatif olgularda rutin kemik iliği biyopsisi önerilmemektedir (46). DBBHL'nin periferik kan tutulumu nadirdir (10).

Klinik Özellikler:

Hastalar genellikle tek veya multipl nodal ya da ektranodal yerleşimli hızlı büyüyen kitlelerle başvururlar. Hastaların yarısına yakını tanı anında erken evrededir (evre I ya da evre II). Ancak DBBHL'nin başlangıç evrelemesine PET-bilgisayarlı tomografinin (PET-BT) dahil edilmesi, erken evre hastalığı olan hastaların yüzdesinin azalmasıyla sonuçlanmıştır. Çoğu hasta tanı anında asemptomatiktir ancak B semptomları (ateş, gece terlemesi, kilo kaybı) görülebilir. Ektranodal tutulumlu olgularda lokalizasyona bağlı semptomlar görülebilir (17, 18).

Morfolojik Özellikler:

DBBHL'de tutulan lenf nodu ya da ektranodal dokular; normal yapılarını orta ya da büyük boy lenfoid hücrelerin diffüz proliferasyonu sonucu sıklıkla tamamen, bazen de parsiyel olarak kaybederler. Parsiyel nodal tutulum interfolliküler ve/veya daha az sıklıkla sinüzoidal olabilir. Nodal tutulumlu olgularda sıklıkla perinodal doku infiltrasyonu saptanır. Kalın ya da ince sklerotik bantlar görülebilir. DBBHL, NOS'ların morfolojik özellikleri çeşitlilik gösterir ve olgular sık ve nadir görülen morfolojik varyantlar olarak gruplanabilir. Morfolojik özelliklerin çeşitliliği nedeniyle ayırıcı tanıya yönelik ek incelemelerin yapılması gerekmektedir. Tüm varyantlarda tümör hücreleri, çok sayıda T lenfositler ve/veya histiositler ile karışık halde bulunabilir (10).

Sık görülen morfolojik varyantlar:

- a. Sentroblastik varyant:** Sentroblastlar; orta boy, oval ya da yuvarlak, veziküle nükleuslu, 2-4 nükleollü hücrelerdir. Genellikle bazofilik ya da amfofilik dar bir sitoplazmaya sahiptir. Sentroblastik varyant en sık görülen varyanttır ve bazı olgularda tümör monomorfik olup %90'dan fazla sentroblast içerirken bazıları sentroblast ve immunoblastları beraber içerecek şekilde polimorfik özelliktedir. Sentroblastik olgular genellikle GCB alt tipindedir (47). Ancak çoğu olgu sentroblastlar ve immunoblastların karışımı (<%90) şeklinde polimorfik özelliktedir.
- b. İmmunoblastik varyant:** %90'dan fazlası immunoblastlardan oluşur. İmmunoblastlar; tek ve santral yerleşimli nükleollü, belirgin bazofilik sitoplazmalı hücrelerdir. İmmunoblastik ve sentroblastik varyant ayrımının gözlemler/gözlemciler arasında tekrarlanabilirliği düşüktür (48, 49).
- c. Anaplastik varyant:** Daha nadir görülen varyanttır. Hodgkin/Reed-Sternberg hücresi ya da anaplastik büyük hücreli lenfoma hücrelerine benzer özellikte tümör hücreleri görülür. Hücreler sinüzoidal ve/veya koheziv gelişim paterni göstererek andifferansiye karsinomu taklit edebilir (50). Bu varyant, ALK pozitif büyük B hücreli lenfoma ile biyolojik ve klinik olarak ilişkisizdir (10).

Nadir görülen morfolojik varyantlar:

Miksoid stroma ya da fibriler matriks içeren, psödorozet formasyonu oluşturan, içsi görünümde veya taşlı yüzük benzeri morfolojide olan, sitoplazmik granüller, mikrovillus projeksiyonları ve intersellüler junktionlar oluşturan daha nadir görülen morfolojik varyantlar tanımlanmıştır (10).

İmmunfenotipik Özellikler:

DBBHL'nin hücreleri tipik olarak CD19, CD20, CD22, CD79a ve PAX5 gibi pan-B hücre belirteçlerini beraber eksprese ederler. Buna karşın bunlardan bir ya da birden fazlasında ekspresyon kaybı görülebilir (10). Rituksimab (anti-CD20) ya da anti-CD22 antikorları ile tedavi edilen DBBHL olgularında, rekürren hastalıklarda CD20 veya CD22 ekspresyon kaybı görülebilir (51).

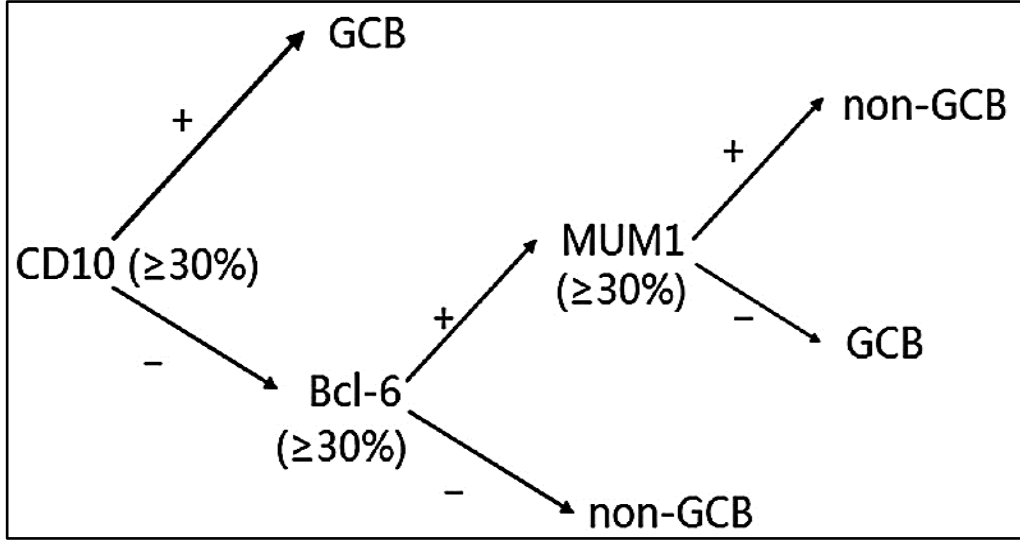
Olguların %50-75'inde yüzey ve sitoplazmik immunglobulin ekspresyonu görülebilir ancak sitoplazmik immunglobulin varlığı CD38 ve CD138 gibi plazma hücre belirteçlerinin ekspresyonu ile ilişkili değildir (52). Fakat nadiren CD20 pozitif hücrelerde CD38 ve CD138 pozitifliği de saptanabilir (10). Olguların %10-20'sinde, özellikle de anaplastik varyantta CD30 ekspresyonu görülebilir (27, 53).

DBBHL olgularının %5-10'unda CD5 ekspresyonu gözlenir (54, 55). CD5 pozitif olguların çoğu de novo olgulardır ve nadiren kronik lenfosittik lösemi/küçük lenfosittik lenfomadan (KLL/SLL) gelişir. CD5 pozitif DBBHL, 'mantle' hücreli lenfomanın blastoid varyantından Siklin D1 ve SOX11 negatifliği ile ayrılabilir (56).

DBBHL'lerde MYC ve BCL2 ekspresyonları oranları, pozitifliği tanımlamak için kullanılan eşik değere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Çoğu çalışmaya göre BCL2 ile tümör hücrelerinin $\geq$ %50, MYC ile tümör hücrelerinin nükleer boyanması $\geq$ %40 ise pozitif olarak kabul edilmektedir. Bu iki belirteç ile boyanan olgular 'double ekspresör' olarak adlandırılmaktadır ve bu olgular genellikle ABC alt tipindedir (57, 58).

DBBHL'lerde CD10 ekspresyonu %30-50, BCL6 ekspresyonu %60-90 ve MUM1 ekspresyonu %35-65 oranında bildirilmektedir (59-62). Normal germinal merkez B hücrelerinde BCL6 ve MUM1 koekspresyonu beklenmezken tüm DBBHL'lerin %50'sinde bu iki belirtecin birlikte eksprese edildiği bildirilmiştir (63). Olgular bu üç belirtecin kullanıldığı Hans algoritması ile GCB ve non-GCB alt tiplerine ayırmaktadır ve tümör hücrelerinin boyanma oranı $\geq$ %30 ise belirteç pozitif olarak kabul edilmektedir (Şekil 1) (64).

Klasik bilinen moleküller dışında da DBBHL'lerde çeşitli moleküllerin ekspresyonu gösterilmiştir. Örneğin, FOXP1 ekspresyonu, germinal merkez fenotipi olmayan ve t(14;18) göstermeyen olguların yaklaşık %20'sinde bildirilmiştir (65). Yine bir germinal merkez belirteci olan GCET1, olguların %40-50'sinde pozitifdir ve GCB alt tipiyle yüksek korelasyona sahiptir (66). LMO2 ekspresyonu ise olguların %45'inde görülür ve bu belirteç germinal merkez belirteçleri ile korele iken MUM1 ya da BCL2 ile korele değildir (67).



Şekil 1: Hans algoritmasına göre olguların GCB ve non-GCB alt tiplerine ayrılması

BCL2 ekspresyonu %47-84 oranında geniş bir değişkenlikte bildirilmektedir (61, 68-70). Ki67 ile proliferasyon indeksi genellikle %40'tan yüksektir ve bazı olgularda %90'ın üstünde olabilir (71-75).

Genetik Özellikler:

Antijen reseptör genleri:

İmmunglobulin hafif ve ağır zincir genlerinde yeniden düzenlenimler ve değişik bölgelerde somatik hipermutasyonlar saptanabilir (3).

Mutasyon bölgeleri:

Son dönemlerde birçok çalışmayla DBBHL'de görülen mutasyonlar ortaya konmaktadır. Bu mutasyonların bazıları GCB ve ABC alt tiplerine spesifik iken bazıları her ikisinde de görülebilir. Örneğin, EZH2 ve GNA13 mutasyonları neredeyse sadece GCB alt tipinde görülürken CARD11, MYD88 ve CD79B mutasyonları ABC alt tipinde karakteristiktir (76-79). Ayrıca, tekrarlayan kopya sayısı değişiklikleri de araştırmalara konu olmaktadır. Kromozomal kazanımlar ve delesyonlar yaygındır ve alt tiplerin hücresel kökenine (GCB ve ABC alt tipleri) bağlı olarak farklılıklar gösterirler (80, 81). MYC lokusundaki kazanımların sıklığı değişkendir ve MYC değişiklikleri her iki alt tipte de görülebilmekle birlikte GCB alt tipinde daha

yaygındırlar (58, 82, 83). Ayrıca ektranodal DBBHL olgularında gözlenen mutasyonları ortaya koymak ve lokalizasyona ve alt tipe bağlı olabilecek ortak genetik anormallikleri saptamak için çalışmalar bulunmaktadır (10).

Kromozomal translokasyonlar:

Olguların %30'unda DBBHL'de en yaygın translokasyon olan ve BCL6'yı içeren 3q27 bölgesinin yeniden düzenlenimleri görülmektedir (84-90). Bu yeniden düzenlenimler ABC alt tipinde daha yaygın saptanır (87). Folliküler lenfomanın ayırıcı özelliği olan BCL2 translokasyonu t(14;18) olguların yaklaşık %40'ında (daha sık olarak GCB alt tipinde) görülür ve BCL2 ve CD10 proteinlerinin ekspresyonu ile yakından ilişkilidir (58, 91-95).

MYC yeniden düzenlenimi olguların %8-14'ünde izlenir ve GCB alt tipi ile ABC alt tiplerinde benzer oranlarda saptanır. DBBHL'de, MYC yeniden düzenlenimi Burkitt lenfomadan farklı olarak karmaşık bir karyotip ile ilişkilidir. MYC translokasyonunu barındıran DBBHL olgularının yaklaşık yarısında ayrıca BCL2 ve/veya BCL6 translokasyonu da gözlenir. Bu olgular DSÖ, 2016 sınıflamasında 'MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 yeniden düzenlenimi gösteren yüksek dereceli B hücreli lenfoma' başlığı altında ayrı bir tip olarak tanımlanmıştır ('double hit lenfoma') (58, 96-101). Tipik DBBHL morfolojisi ve izole MYC translokasyonu olan olgular ise DLBCL, NOS kategorisinde sınıflandırılır (97, 98, 102). MYC translokasyonu olan çoğu DBBHL, NOS olgusu 'double ekspresör'dür (immunohistokimyasal olarak hem MYC hem de BCL2 ile pozitif) (57, 58, 103). DBBHL, NOS'lardaki daha nadir translokasyonlar ise GCB alt tipinde bulunan TBL1XR1 translokasyonu ile primer testiküler DBBHL'de daha sık görülen CD274 (PDCD1LG1 ya da PD-L1) ve PDCD1LG2 (PD-L2) yeniden düzenlenimleridir (104, 105).

Prognostik Faktörler:

Klinik özellikler:

DBBHL tedavi rejimine Rituksimab eklenmeden önce uzun dönem remisyon oranları %50-60 arasında idi (18). R-CHOP tedavi protokolü ile birlikte; remisyon oranları yaklaşık %70-80 (106), 5 yıllık progresyonsuz sağ kalım oranı %60, genel sağ kalım oranı ise %65 olarak bildirilmektedir (4).

Buna karşın hastaların yaklaşık %30-40'ında nüks hastalık saptanmaktadır (107). Hastalık evresi ve hasta yaşı, sağ kalımı etkileyen önemli faktörlerdir. Yüksek riskli klinik özellikleri olan hastaları daha iyi belirleyebilen yeni sistemler tanımlanmış olmasına rağmen, beş klinik değişken içeren Uluslararası Prognostik İndeks (IPI) değerli bir prognostik araç olarak kabul edilmektedir (108, 109).

IPI skoru (Tablo 2); yaş, serum laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performans durumu, Ann-Arbor evresi (Tablo 3) ve ektranodal tutulum varlığı maddelerinden oluşmaktadır (3, 18, 110). IPI skorlamasında her bir faktörün varlığı/yokluğu değerlendirilmekte olup 0-1 puan arası: düşük risk, 2 puan: düşük-orta risk, 3 puan: orta-yüksek risk ve 4-5 puan: yüksek risk grubu olarak sınıflandırılmaktadır (110). Revize IPI skorlamasında (R-IPI) ise aynı maddeler ve puanlama sistemi geçerli olup sadece prognostik gruplar farklılık göstermektedir. R-IPI skorlamasına göre risk skoru 0 olan hastalar 'çok iyi', 1 ve 2 olanlar 'iyi', 3, 4 ve 5 olanlar ise 'kötü' gidişli prognostik grup olarak sınıflandırılmışlardır (108).

R-IPI skorlama sistemine göre 'çok iyi' prognostik gruptaki hastalarda uzun dönem progresyonsuz sağ kalım oranı %94 olup bu grup R-CHOP tedavisinden yüksek fayda görmektedir. 'İyi' prognostik grupta progresyonsuz sağ kalım %80, 'kötü' prognostik grupta ise %53 olarak bildirilmiştir (108).

Büyük tümör kitlesi (≥ 10 cm), erkek cinsiyet, D vitamini eksikliği, düşük vücut kitle indeksi, serum serbest hafif zincirlerin yüksekliği, monoklonal serum IgM proteinleri, düşük mutlak lenfosit/monosit oranı (LM oranı) ve uyumlu kemik iliği tutulumu kötü prognozla ilişkili diğer faktörler olarak kabul edilmektedir (40, 111-119).

Morfoloji:

İmmunoblastik morfolojinin prognostik etkisi tartışmalıdır ve literatürde çelişkili yayınlar mevcuttur. Bazı çalışmalarda olumsuz prognostik etkisi olduğu söylenirken bazılarında ise kötü prognozla ilgisinin olmadığı bildirilmektedir (48, 49).

Tablo 2: Uluslararası Prognostik İndeks (IPI) Skoru

Prognostik Faktörler (Her biri 1 puan)	
Yaş >60	
Serum LDH yüksekliği	
Kötü performans durumu (ECOG skoru ≥ 2)	
Yüksek evre (Evre III-IV)	
1'den fazla ektranodal bölge tutulumu	
Risk Grubu (Standart IPI)	
0-1	Düşük risk
2	Düşük-orta risk
3	Orta-yüksek risk
4-5	Yüksek risk
Risk Grubu (R-IPI)	
0	Çok iyi
1-2	İyi
3-4-5	Kötü

LDH: Laktat dehidrogenaz, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

Tablo 3: Ann-Arbor Evreleme Sistemi:

I	Tek lenf nodu bölgesinin tutulumu veya tek bir ektranodal organ ya da bölgenin tutulumu (IE)
II	Diyaframın aynı tarafında iki veya daha fazla lenf nodu bölgesinin tutulumu ya da diyaframın aynı tarafında bir ektranodal bölge veya organın lokalize tutulumu (IIE) ile birlikte bir ya da daha fazla lenf nodu bölgesinin tutulumu
III	Diyaframın her iki tarafında lenf nodu bölgelerinin tutulumu Buna bir ektranodal organ veya bölgenin (IIIE) ya da dalağın (IIIS) ya da her ikisinin (IIISE) lokalize tutulumu eşlik edebilir
IV	Lenf nodu tutulumu olsun ya da olmasın, bir veya daha fazla uzak ektranodal organın diffüz ya da dissemine tutulumu
A: Asemptomatik	
B: Ateş, terleme, vücut ağırlığının %10'undan fazlasının kaybı	

İmmunfenotip:

Birçok immunohistokimyasal belirtecin prognostik etkisinin olduğu bildirilmesine karşın çoğu doğrulanamamış ve rutin belirteçler olarak kabul edilmemiştir (120-122). De novo CD5 (+) DBBHL'lerin agresif klinik özelliklerle ilişkili olduğu, CD5 (-) DBBHL'lere göre daha kötü prognozlu olduğu bildirilmektedir (54). BCL2 için bildirilen kötü prognostik etki ve BCL6 için bildirilen iyi prognostik etki, CHOP kemoterapi rejimine rituksimab eklenmesiyle değişmiştir (123, 124). Read ve arkadaşlarının yaptığı meta-analize göre gen ekspresyon profili ile belirlenen hücresel kökenin (GCB ve ABC subtipleri) prognostik öneminin olduğu, immunohistokimyasal algoritmaya dayanan yöntemin (Hans algoritması, GCB ve non-GCB alt grupları) ise prognozu yansıtmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre gen ekspresyon profili ile belirlenen GCB alt tipindeki olguların sağ kalımlarının ABC alt tipindekilere göre anlamlı derecede daha iyi olduğu saptanmıştır (125). Tüm DBBHL, NOS olgularının yaklaşık %30'u 'double ekspresör' lenfoma olup bu immunprofile sahip olguların prognozu konusunda da görüş birliği bulunmamaktadır (126, 127). MYC pozitif olguların daha kötü prognoza sahip oldukları bildirilmektedir (128, 129). Primer mediastinal büyük B hücreli lenfomalar hariç, EBV negatif DBBHL'lerde CD30 ekspresyonunun (olguların yaklaşık %10-20'sinde gözlenmektedir) olumlu klinik seyirle ilişkili olduğu saptanmıştır (27, 53). Literatürde DBBHL'lerde siklin D1 pozitifliğinin kötü prognozla ilişkili olduğunu bildiren yayınlar yanı sıra prognostik etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (130).

Proliferasyon:

Ki-67 proliferasyon indeksi ile değerlendirilen yüksek proliferatif oranın prognostik önemi tartışmalıdır. Hem CHOP hem de R-CHOP ile tedavi yapılan dönemlerdeki çalışmalarda elde edilen bulgular çelişkilidir. Bu durumun hasta yaşı, diğer klinik değişkenler ve hücresel kökenin göz ardı edilmesiyle oluşturulan çalışma grupları nedeniyle bu sonuçların ortaya çıktığı düşünülmektedir (57, 73, 131, 132).

Genetik:

Bazı çalışmalarda, BCL2'yi içeren bir translokasyonunun varlığı, R-CHOP ile tedavi edilen GCB alt tipindeki DLBCL olgularında kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (91, 93, 95). BCL2 kopya sayısının artması, ABC alt tipinde kötü prognozu göstermektedir (82). BCL6 translokasyonu ABC alt tipinde daha sıktır ve bazı çalışmalara göre kötü prognozu öngörür (85, 87, 90). MYC translokasyonları, DBBHL, NOS olgularının %8-14'ünde görülür ve kötü sağ kalım göstergesidir (97, 132-134). Çoğu çalışmaya göre MYC ve BCL2 'double hit' lenfomaların GCB alt tipinde daha yaygındır ve bu olgularda sağ kalım düşüktür (58, 98, 133, 135). MYC ve BCL6 translokasyonlarının prognostik önemi ise tartışmalıdır (128, 136, 137). Bu translokasyonlar ABC alt tipinde daha yaygındır (58, 128, 137). Ancak DSÖ, 2016 sınıflamasına göre bu 'double hit' lenfomalar 'MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 yeniden düzenlenimi gösteren yüksek dereceli B hücreli lenfoma' olarak sınıflanmaktadır (14). TP53 kaybı ve/veya mutasyonları olan DBBHL olgularında da sağ kalım düşüktür (138, 139). Ayrıca kromozom 9p21 ve trizomi 3 üzerindeki CDKN2A lokusunun delesyonları ABC alt tipi ve düşük sağ kalım ile ilişkilidir (140, 141).

Mikroçevre:

Gen ekspresyonu profili çalışmaları, DBBHL'deki tümör mikroçevresindeki hem non-neoplastik hücreler hem de hücre dışı matriks bileşenlerinin prognostik rolü olduğunu göstermektedir (142). R-CHOP tedavi protokolü döneminde 'stromal-1' (hücre dışı matriks birikimi ve histiositik infiltrasyon) ve 'stromal-2' (tümördeki kan damarı yoğunluğu/anjiyogenez) imzalarının prognostik öneminin olduğu bildirilmiştir (143). Mikroçevreyi temsil eden bir gen olan TNFRSF9 ekspresyonunun da prognozu öngördüğü gösterilmiştir (144). Ayrıca MHC sınıf II kaybının tümörü infiltre eden CD8+ T lenfositlerin azalmasına yol açtığı ve kötü klinik gidişle ilişkili olduğu saptanmıştır (145). İmmun sistemden kaçış mekanizmalarını ilgilendiren moleküler değişiklikler de DBBHL'de sağ kalım açısından önemlidir. Örneğin PD-L1'in fazla eksprese edilmesinin azalmış sağ kalım ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (7).

Diğer immün sistem hücrelerinin prognostik rolünü değerlendiren az sayıda çalışma da bulunmaktadır.

MikroRNA:

MikroRNA'ları içeren somatik mutasyonların DBBHL'de hücre köken ve IPI'den bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (146).

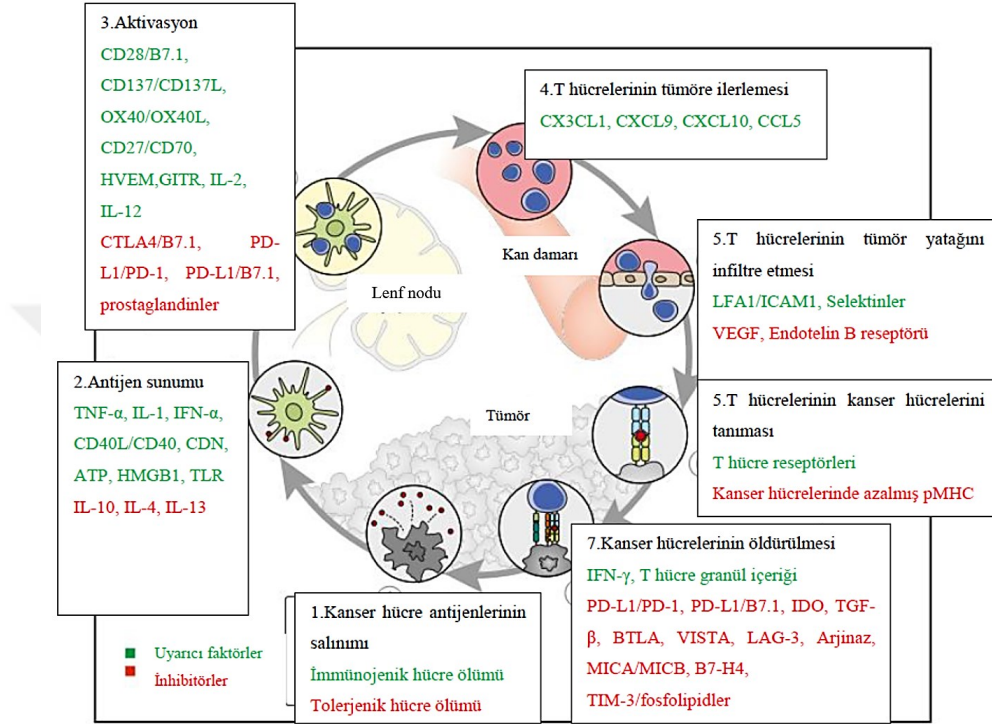
Tedavi:

DBBHL agresif fakat potansiyel olarak multi-ajan kemoterapi ile tedavi edilebilir bir hastalıktır. CHOP kemoterapi rejimi yıllardan beri tedavinin dayanak noktası olmuştur. CHOP rejimine bir anti-CD20 antikor olan rituksimab'ın eklenmesi ile yaşam sürelerinin önemli ölçüde uzadığı tespit edilmiştir (147). Farklı tedavi seçenekleri olsa da bunların sağ kalım üzerinde olumlu etkilerinin olup olmadığı belirsizdir (4). ABC alt tipindeki olgularda sağ kalımı arttırmak için R-CHOP rejimi temeline yeni ajanların eklenmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (148-154).

Kontrol Noktası Blokajı ve Tümör Mikroçevresi

İmmün sistem hücrelerinin kanser hücrelerine verdiği yanıt temel olarak yedi basamakta incelenebilir. İlk basamakta kanser hücrelerine ait antijenlerin salınması ve bunların işleminden geçmek üzere dendritik hücrelerce yakalanması yer alır. Bu durumun gerçekleşmesi için immunojenik sinyallerle bu sürecin desteklenmesi gereklidir. Bu sinyallerin proinflamatuar sitokinler ve ölen tümör hücrelerinden salınan proinflamatuar faktörler olduğu düşünülmektedir. İkinci basamakta dendritik hücrelerin yakalanan antijenleri MHC I ve MHC II molekülleri ile T hücrelerine sunması yer alır. Ardından üçüncü basamakta kanser spesifik antijenlere efektör T hücre yanıtlarının başlaması ve aktivasyonu izlenir. Oluşacak immün yanıtın çeşidi, regülatör T hücreleri ve efektör T hücreleri arasındaki orana bağlı olarak bu basamakta belirlenir. Dördüncü basamakta aktive efektör T hücreleri tümör yatağına doğru ilerler ve beşinci basamakta tümör yatağını infiltre eder. Ardından kanser hücresi-T hücresi bağlanması T hücre reseptörü (TCR)-MHC I

bağlanması ile gerçekleşir ve son basamakta hedef kanser hücreleri öldürülür. Kanser hücre ölümü ile ortaya çıkan tümör ilişkili antijenler siklusu yeniden ilk basamağa döndürür. Bu süreç, basamakları etkileyen uyarı ve inhibitör faktörlerle birlikte Şekil 2’de özetlenmiştir (155).



Şekil 2: Kanser immünite siklusunda uyarıcı ve inhibitör faktörler (155)

B hücreli lenfomalarda tümör mikroçevresi; çok sayıda immun sistem hücrelerini, stromal hücreleri, kan damarlarını ve ekstrasellüler matriksi içerir. Tümör mikroçevresinin boyutu ve bileşenleri; malign hücrelerdeki genetik anormallikler yanı sıra mikroçevredeki hücrelerin hayatta kalma, proliferasyon ve immun sistemden kaçmak için dış uyaranlara ve konağın yangısal yanıtına bağlı kalma derecesine bağlıdır. (142).

Gen ekspresyon profili ve yeni nesil sekanslama ile yapılan çalışmalar, tümöre karşı gelişen yangısal yanıtların ve tümör mikroçevresinin DBBHL'nin belirleyici özellikleri olduğunu göstermektedir (143, 156). Tümör mikroçevresinin bileşenleri ve işlevi, hem tümör sağ kalımı (immun sistemden kaçış) hem de antitümöral savunma için en önemli faktörlerden biridir (157).

Tümör mikroçevresi; tümörü infiltrate eden lenfositler (TİL) (özellikle regülatör T lenfositler), tümörü destekleyen M2 makrofajlar, tümör baskılayıcı

M1 makrofajlar ve myeloid kökenli süpresör hücrelerden (MDSC) oluşur. MDSC'ler, granülositer hücrelerin, makrofajların ve dendritik hücrelerin öncüllerini temsil eden, immatür myeloid hücrelerin heterojen bir popülasyonudur (157). MDSC'ler granülositik köken (G-MDSC) ve monositik köken (M-MDSC) olarak ayrılabilir ve M-MDSC'ler CD14 pozitif immunfenotip gösterirken G-MDSC'ler CD14 negatiftir (158-160). MDSC'ler, malignitelerde T hücre defektlerine yol açan başlıca immunsupresif hücrelerdir (161). Son yıllarda, tümörü infiltre eden makrofajlar (tümör ilişkili makrofaj; TAM), en önemli biyolojik belirteçlerden biri haline gelmiştir ve tümör mikroçevresindeki ana bileşenlerdendir. Bu hücreler normal makrofajlar olarak davranırken, tümör büyümesini inhibe eden immun düzenleyici faktörler ya da enzimler salgırlar. Bununla birlikte, tümör hücreleri tarafından olumsuz etkilendiğinde, yangısal faktörleri ve ekstrasellüler matriks düzenleyici faktörleri salgılayarak antitümör immun reaksiyonunu inhibe edebilir, tümör anjiyogenezi hızlandırabilir ve lokal bazal membran hasarı yapabilirler. Bu aktiviteler ile tümör büyümesi, invazyon ve metastaza yol açabilirler (162-164). TAM'lar, fonksiyonel olarak M1 ve M2 olarak iki farklı tipte sınıflandırılabilir ve bu hücre tiplerinin dengesinin, tümörlere karşı etkileri belirlediği bildirilmektedir (165).

Monositler, inflamasyon ya da tümör gelişimi ve progresyonu sırasında sitokinlere bağlı olarak makrofajlarının işlevsel olarak farklı iki alt tipi olan M1 ve M2 alt tipine diferansiye olabilirler. M1 ve M2 makrofajlar farklı yüzey molekülleri eksprese eder ve farklı sitokinler üretirler. Klasik olarak aktive olan M1 makrofajlar proinflamatuvar sitokinler üretir ve patojenleri yok eden efektör hücreler olarak işlev görürler. M1 makrofajlar aynı zamanda tümör baskılayıcı bir fonksiyon sergiler ve antitümör immun yanıtı uyarırlar. M1 makrofajların aksine, alternatif olarak aktive edilen M2 makrofajlar, IL-4, IL-13 ve TGF- β gibi Th2 sitokinleri ile diferansiye olur ve CD163 ve CD204 gibi reseptörleri eksprese ederler. M2 makrofajlar bol miktarda IL-10, CCL17 ve CCL20 salgırlar, yara iyileşmesinde rol oynarlar ve tümör hücrelerinin sağ kalımı, invazyon, metastaz ve anjiyogenezi desteklerler. M2 makrofajlar ayrıca M1 makrofajlar ve Th1 hücrelerinin aracılık ettiği antitümör immun

yanıtları 'down-regüle' ederek ve regülatör T hücreleri ile Th2 hücrelerini aktive ederek immunosupresif rol oynarlar (166-168). İnsanlarda TAM'ların 'upregüle' genlerinin ekspresyonlarının in vitro olarak M1 ve M2 makrofajlarla karşılaştırılması sonucunda TAM profilinin M2 makrofajlara daha yakın olduğu gözlenmiştir (169).

Çeşitli lenfomalarda tümör hücrelerine eşlik eden makrofajların varlığı, hastalığın klinik ya da laboratuvar bulguları, prognoz ya da kemoterapinin etkinliği gibi çeşitli özelliklerinin bir göstergesi olabilir. Hücreler kanseröz hale gelmeden önce bile, makrofajlar onkogenezi destekleyebilen veya artırabilen reaktif oksijen radikalleri gibi mutajen maddeler üretebilirler. Buna ek olarak, M2 makrofajlar PD-1 ve PD-L1 dahil olmak üzere immun yanıtı engelleyen, tümör hücrelerinin antitümör immun yanıtıdan kaçmasını sağlayan immun kontrol noktası moleküllerini eksprese edebilirler. (106).

TAM'ların çeşitli kanserlerin prognozlarına etkileri araştırılmaktadır ve hematolojik malignitelerde de bu etki üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Folliküler lenfoma (170) ve klasik Hodgkin lenfomada (171) TAM'ların kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilirken, DBBHL'de TAM'ların prognozla ilişkisi tartışmalıdır (165, 172, 173) ve bu durumun makrofajların heterojenitesine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

T hücrelerin proliferasyonu, efektör ya da bellek T hücrelerine dönüşebilmeleri için gerekli temel iki basamak bulunmaktadır. Bunlardan ilki antijen sunan hücrelerin yüzeyindeki MHC molekülleri ile TCR etkileşimidir. Bu aşamada T hücresi antijenik peptid-MHC kompleksinin TCR ile etkileşimi sayesinde sunulan antijeni tanır. İkinci aşamada ise T hücresi antijene karşı oluşturacağı yanıtın belirlenebilmesi için gerekli doğrulama sinyallerini alır. İkinci sinyalin yokluğunda, antijene spesifik lenfositler etkili bir şekilde tepki veremezler, fonksiyonel olarak etkisiz hale gelirler ya da anerjiktirler ve antijen ile tekrar karşılaşma durumunda aktivasyona dirençlidirler. Bu sinyaller çeşitli koreseptörler tarafından oluşturulan kostimülatör sinyallerdir (174). Aktive edici sinyaller, kontrol noktası molekülleri olarak adlandırılan inhibitör reseptörler tarafından düzenlenir. Bu moleküllerin başlıca işlevi, özellikle kronik enfeksiyon ve yangı varlığında yıkıcı immun yanıtları önlemek

ve aynı zamanda otoimmün hasarı engellemektir (8). Bu koreseptörlerden ikisi olan PD-1 ve CTLA-4 detaylı biçimde çalışmalara konu olmuş ve antijen tanıma durumunda T lenfosit fonksiyonunu 'down-regüle' eden kritik inhibitör sinyaller gönderdikleri saptanmıştır (174-177).

Bu immün kontrol noktaları, immün yanıtın normal olarak işleminde önemli bir rol oynasa da aynı zamanda tümörler için immün sistemden kaçış mekanizması sağlar. Tümör hücreleri, kontrol noktası reseptörlerinin ligandlarını aşırı eksprese ederek T hücrelerinin tepki vermemesini sağlayarak ya da T hücrelerini tükenme durumuna getirerek immün sistemden kaçabilirler (8, 178). Bu kaçış mekanizmalarının anlaşılmasıyla bu yolların çeşitli bölgelerini hedef alarak tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışını önlemek amacıyla terapötik monoklonal antikorlar geliştirilmektedir (175). Bu yolların immün kontrol noktası inhibisyonu ile terapötik manipülasyonu, T hücre enerjisini tersine çevirerek etkin bir T hücre aracılı antitümör yanıtı oluşturur (8). Kontrol noktası blokajı tedavisi; melanom, akciğer kanseri, renal hücreli karsinom gibi birçok tümörde başarılı sonuçlar vermiş ve tedavi protokollerinde önemli değişikliklere yol açmıştır (179-181).

Çalışmada Kullanılan Belirteçler

PD-1 ve PD-L1:

T hücrelerin antijene karşı oluşturacağı yanıtın belirlenebilmesi için gerekli doğrulama sinyallerini çeşitli koreseptörler tarafından oluşturulur. Koreseptörler başlıca B7/CD28 ailesi ve TNF/TNF reseptör ailesi olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. B7/CD28 ailesi üyeleri genellikle efektör T hücre yanıtını baskılayan sinyaller oluştururken, TNF/TNF reseptör ailesi genellikle T hücre aktivasyonu ve proliferasyonunu uyaran sinyaller oluşturur. B7/CD28 ailesinin bir üyesi olan PD-1 de inhibitör sinyaller oluşturan ve antijenle karşılaşan T hücrelerin oluşturacağı yanıtları düzenleyen koreseptörlerden biridir (174).

PD-1, 2. kromozom üzerindeki *Pdcd1* geni tarafından kodlanan 288 aminoasitlik tip I transmembran proteindir (174). PD-1, esas olarak aktive T ve B lenfositler ile NK hücreleri tarafından eksprese edilir (182). T ya da B hücre reseptörü ligasyonu, lenfositlerin yüzeyinde PD-1 'upregülasyonunu' sağlayabilir.

PD-1'in PD-L1 ve PD-L2 olmak üzere iki ligandı bulunmaktadır (174). PD-L1, 9. kromozom üzerindeki *CD274* geni tarafından kodlanan 290 aminoasitlik tip I transmembran proteinidir (183, 184). İmmün hücreler (makrofajlar, dendritik hücreler ve lenfositler) ve immün olmayan hücrelerde (tümör hücreleri) PD-L1 ekspresyonu görülebilir (182). Ayrıca aktivasyon sonrası birçok hücre tipinde PD-L1 'upregülasyonu' gözlenebilir. Tip I ve tip II interferonlar (IFN) PD-L1'in 'upregülasyonunu' sağlarlar (183, 184). Hem yapısal hem de uyarılabilir PD-L1 ekspresyonunun, transkripsiyon başlama bölgesindeki 200-320 bazlık iki interferon regülatör faktör-1 (IRF-1) bağlama bölgesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (185). PD-L1 ekspresyonu için gerekli sinyal yollarını araştıran çalışmalarda, MYD88, TRAF6 ve MEK inhibe edildiğinde PD-L1 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (186). JAK2 de PD-L1 indüksiyonunda rol almaktadır (187). Kanselerde PTEN kaybı ya da inhibisyonu durumunda, post-transkripsiyonel PD-L1 ekspresyonu artmaktadır (188).

PD-1/PD-L1, T hücre yanıtının efektör fazını baskılamaktadır. Bu durum, T hücre aktivasyonunun regülasyonu, T hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve aktive T hücrelerinin apoptozise yönlendirilmesi gibi T hücre yanıtlarının çeşitli fazlarında immün toleransın oluşmasına sebep olur. PD-1/PD-L1 regülasyon mekanizması, TCR ilişkili sinyal moleküllerinin defosforilasyonu ve T hücrelerine inhibitör sinyallerin aktarımı ile yakından ilişkilidir. TCR sinyali hücre içine Ca^{2+} akışına neden olur. Bunun sonucunda T hücresinin aktivasyonu ve diferansiyasyonu için gerekli çok sayıda sinyal yolu aktive edilmiş olur. PD-1 ve PD-L1 bağlanması, CD8 (+) sitotoksik T hücrelerin proliferasyonunu, yaşam süresini ve efektör etkilerini sınırlar, TİL'lerde apoptozise yol açar. Yüksek düzeylerdeki PD-1 ekspresyonu, diğer inhibitör

reseptörlerin oluşturduğu sinyallerle birlikte, TİL işlevlerini kısıtlar ve tümör mikroçevresinde sayılarının azalmasına neden olur (188).

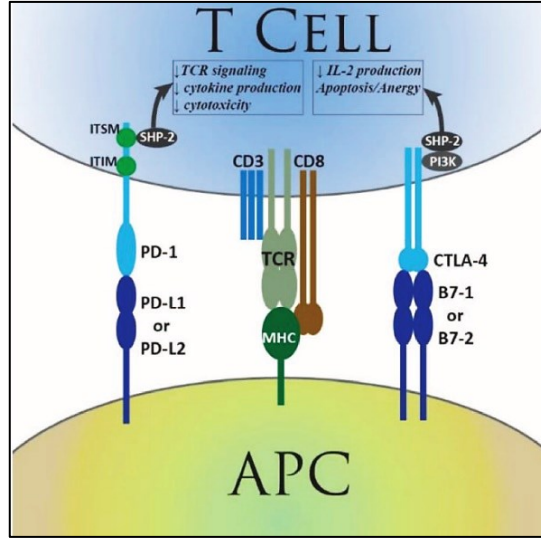
PD-1 sinyal yolunun aktivasyonu efektör T hücre işlevlerini baskılayanın yanı sıra, immunsupresif regülatör T hücre işlevlerini de artırır. Çalışmalarda, akciğer kanserli hastalarda dolaşımdaki regülatör T hücre sayısının sağlıklı bireylerdekinin yaklaşık iki katı düzeye ulaştığı ve tümör dokusunda PD-1 eksprese eden regülatör T hücrelerinin daha yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar PD-1/PD-L1 yolunun regülatör T hücre indüksiyonunda ve adaptif immunitenin bozulmasında rol oynadığını ortaya koymaktadır (188).

CTLA-4:

T hücrelerin proliferasyonu, efektör ya da bellek T hücrelerine dönüşebilmesi için gerekli koreseptörlerden bir diğeri ise CTLA-4'tür. CTLA-4, naif T hücre yüzeyinde bulunmayan, ancak T hücresi aktive olduğunda yüksek düzeyde eksprese edilerek CD28'in bağlandığı B7.1 (CD80) ve B7.2 (CD86) moleküllerinin her ikisine birden yüksek affinite ile bağlanarak immun sistem üzerinde negatif düzenleyici bir etki yapan 36 aminoasitlik bir moleküldür. CTLA-4 bir yüzey reseptörü olmayıp hücrede intrasellüler veziküller içinde bulunur ve bir ligand bağlandığında yapısal değişikliğe uğrar. T hücre supresör fonksiyonlarının yerine getirilerek periferik tolerans gelişiminin sağlanması ve otoimmunitenin gelişiminin önlenmesinde fonksiyonları olduğu gösterilmiştir. Tümöre karşı immun yanıtta ise, inhibitör etki göstererek tümörün immun sistemden kaçışını hızlandırmaktadır (189).

CTLA-4 temel olarak aktive T lenfositlerde eksprese edilmektedir. Ancak aktive B lenfositler, plasental fibroblastlar, iskelet kası hücreleri ve monositlerin de CTLA-4 eksprese ettikleri bildirilmiştir (190).

CTLA-4'ün özofagus kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, melanom, melanom dışı deri kanserleri, servikal kanserler, kronik lenfositik lösemi ve non-Hodgkin lenfomalar dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde immun disregulasyona neden olduğu bildirilmektedir (191).



Şekil 3: PD-1 ve CTLA-4'ün fonksiyonlarının özeti. APC: antijen sunan hücre; TCR: T hücre reseptörü; MHC: majör doku uyumluluğu kompleksi; IL-2: interlökin-2; ITIM: immunoreseptör tirozin bazlı inhibitör motif; ITSM: immunoreseptör tirozin bazlı anahtar motifi (175).

CD163:

CD163, monosit ve makrofajlar tarafından sentezlenen, 130 kDa ağırlığında, transmembran glikoprotein yapısında bir reseptör olup hemoglobin-haptoglobin kompleksinin endositozundan sorumludur. 12. kromozom üzerinde 12p13.31 pozisyonunda yer alan genler tarafından kodlanmaktadır ve sisteinden zengin çöçü reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Bu reseptör, monositlerin (düşük ekspresyon) ve doku makrofajlarının (yüksek ekspresyon) yüzeyinde eksprese edilir (192).

Monositler, inflamasyon ya da tümör gelişimi ve progresyonu sırasında sitokinlere bağlı olarak makrofajların işlevsel olarak farklı iki alt tipi olan M1 ve M2 alt tipine diferansiye olabilirler. M1 ve M2 makrofajlar farklı yüzey molekülleri eksprese ederler. TAM profiline daha yakın olan ve alternatif olarak aktive edilen M2 makrofajlar, CD163 reseptörünü eksprese ederken M1 makrofajların yüzeyinde CD163 eksprese edilmez (165). M2 makrofajlar yara iyileşmesinde rol oynarlar ve tümörlerde invazyon, metastaz ve anjiyogenezi desteklerler. M2 makrofajlar ayrıca M1 makrofajlar ve Th1

hücrelerinin aracılık ettiği antitümör immun yanıtları 'down-regüle' ederek ve regülatör T hücreleri ile Th2 hücrelerini aktive ederek immunsupresif rol oynarlar (166-168).

CD14:

CD14, endotoksin bağlanmasında ve apoptotik hücrelerin tanınmasında rol oynayan 55 kDa ağırlığında bir glikozil-fosfatidilinositol-benzeri membran proteindir. CD14; monositler, makrofajlar, interstisyel myeloid dendritik hücreler (dermal dendritik hücreler vb.) tarafından eksprese edilir (193). Bu protein, gram pozitif ve gram negatif bakterilerin mikrobiyal hücre duvarı bileşenlerinde immun tanıma ve reaktivasyonda önemli bir rol oynar. Ayrıca apoptotik hücrelerin fagositozla temizlenmesinde rol oynamaktadır (194). Granülositler, endotelyal ve epitelyal hücreler yanı sıra plasental trofoblastlar tarafından eksprese edilir (193).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Etik Kurul:

43569 numaralı projemiz, 11.10.2017 tarihli toplantıda 20.478.486 karar no ile Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Olgular

Çalışmamızda, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde yer alan, 1998-2017 yılları arasında tanı almış, tanı anında bilinen ektranodal tutulumu bulunmayan toplam 58 nodal DBBHL, NOS olgusu değerlendirildi. Bu 58 olgunun tümü insizyonel ya da eksizyonel biopsi ile tanı alan olgular olup uygulanacak geniş immunohistokimyasal panelde dokularının tükenebileceği düşünülen kalın iğne biopsi materyali ile tanı alan olgular çalışmaya dahil edilmedi. Olguların hematoksilen eozin (HE) boyalı preparatları, parafin blokları ve immunohistokimyasal preparatları arşivden çıkarıldıktan sonra tüm preparatlar gözden geçirilerek DSÖ, 2016 sınıflamasına göre tanımlar tekrar değerlendirildi. Bu gözden geçirme sırasında uygun blok seçimi yapıldı ve bloklardaki dokuların yeterliliği kontrol edildi. Tekrar değerlendirme sonucunda yeterli doku elde edilemeyecek 1 olgu, folliküler lenfomadan transforme olduğu anlaşılan 1 olgu, 'mantle' hücreli lenfoma olarak değerlendirilen 1 olgu, marjinal zon lenfoma olarak değerlendirilen 1 olgu ile pür sinüzoidal patern sergileyen 2 olgu olmak üzere toplam 6 olgu çalışmadan çıkarıldı ve kalan 52 olgu çalışmaya alındı. Önceki yıllara ait olgularda DSÖ, 2016 sınıflamasına göre tanı için gerekli olan ancak

uygulanmamış immunohistokimyasal belirteçler belirlendi. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nın rutin işleyişi sırasında istem yapılan preparatların altına çalışma grubundaki eksik boyaları olan olguların bloklarından kesitler alınarak bu eksikler tamamlandı. Tanı sırasında EBER-ISH yapılmayan olgulara EBER-ISH yapıldı ve böylelikle çalışmaya dahil edilen tüm olguların EBER-ISH negatif olduğu saptanarak olguların EBV ilişkili olmadıkları gösterildi.

Hastane kayıtlarından hastalığın evresi (Ann Arbor sistemine göre), klinik özellikleri (cinsiyet, yaş, LDH, hemoglobin, albumin değerleri, periferik kan lenfosit, monosit, trombosit ve nötrofil sayısı ile MPV değerleri), Uluslararası Prognostik İndeks skoru, ECOG skalası performans durumu, klinik gidişi (tanı aldığı andan itibaren yaşam süresi, son durumu), tedavisi (hangi kemoterapiyi aldığı, radyoterapi alıp almadığı, otolog veya allojenik kök hücre nakli yapılıp yapılmadığı), nüks olup olmadığı öğrenilerek bu bulgular prognostik analizler için kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen 52 olgudan 8'inde sayılan bu klinik prognostik verilere ulaşılamazken diğer olgularda bu bilgiler elde edilebildi.

İmmunohistokimyasal İnceleme

Formalin ile tespitli ve parafine gömülü dokulardan elde edilen 3,5 mikron kalınlığındaki kesitler pozitif yüklü elektrostatik lamlara (Isotherm Technical Laboratory Glass Materials) alındı ve 58°C'lik etüvde 4 saat tutuldu ve ardından barkodları basılarak çalışmaya hazır hale getirildi. Elde edilen tüm kesitler tam otomatik immunohistokimyasal boyama cihazına (BenchMark Ultra automated IHC/ISH slide staining system, Ventana Medical Systems; BenchMark XT automated IHC/ISH slide staining system, Ventana Medical Systems) yerleştirildi. İmmunohistokimyasal boyamalar için cihaz ile uyumlu Ultraview Universal DAB Detection Kit (PD-1, CTLA-4, CD163, CD14 için), Optiview Universal DAB Detection Kit (PD-L1 için) ve EZ prep, LCS, SSC, Cell Condition 1 (CC1), Reaction Buffer Concentrate solüsyonları ile Hematoksilen ve Blue Reagent kullanıldı.

İmmunohistokimyasal boyama için predilüe form fare monoklonal anti-human PD-1 (Klon NAT105, Cell Marque), predilüe form tavşan monoklonal anti-human PD-L1 (Klon SP263, Ventana), konsantre tavşan poliklonal anti-human CTLA-4/CD152 (Poliklonal, Abbkine), predilüe form fare monoklonal anti-human CD163 (Klon MRQ-26, Cell Marque) ve predilüe form tavşan monoklonal anti-human CD14 (Klon EPR3653, Cell Marque) antikorları uygulandı.

PD-1 için CC1 (EDTA) (36 dakika), inkübasyon (37°C, 60 dakika), Hematoksilen (8 dakika), Blue reagent (4 dakika) uygulandı. PD-L1 için CC1 (EDTA) (64 dakika), inkübasyon (37°C, 20 dakika), Hematoksilen (8 dakika), Blue reagent (4 dakika) uygulandı. CD163 için CC1 (EDTA) (36 dakika), inkübasyon (37°C, 32 dakika), Hematoksilen (4 dakika), Blue reagent (4 dakika) uygulandı. CD14 için CC1 (EDTA) (64 dakika), inkübasyon (37°C, 32 dakika), Hematoksilen (4 dakika), Blue reagent (4 dakika) uygulandı.

Pozitif kontrol olarak tüm immunohistokimyasal boyalar için tonsil dokusu kullanıldı.

CTLA-4 için 1:50 ile 1:200 arasında değişen dilüsyonlarda ve 32-100 dakika arasında değişen inkübasyon sürelerinde denemeler yapıldı. Bu denemelerde; 36-90 dakika arasında değişen sürelerde CC1 (EDTA), 8-32 dakika arasında değişen sürelerde proteaz enzimi, amplifikasyon ve blok işlemlerinin farklı kombinasyonları uygulandı. Ancak pozitif kontrol olarak belirlenen dokularda (tonsil, böbrek, appendiks) 12 deneme yapılmasına karşın kontrol dokularında istenen boyanma elde edilememesi üzerine firma ile irtibata geçilerek yeni antikor temin edilmesi sağlandı. Yeni kutu antikorla da tüm bu farklı kombinasyonlardaki denemeler tekrarlandı. Toplamda 24 deneme yapılmasına rağmen sağlıklı boyanma elde edilemediği için olgulara CTLA-4 uygulanamadı ve bu belirteç çalışmadan çıkarıldı.

Cihazda boyama işlemi tamamlandıktan sonra lamalar ılık deterjanlı su ile yıkanıp alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırma işlemi için ksilolden geçirildi ve Entellan^R (Merck and Co., Berlin) ile kapatıldı.

İmmunohistokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi

Tüm değerlendirmeler standart ışık mikroskopunda yapıldı.

Tüm belirteçler için sitoplazmik-membranöz boyanmalar pozitif kabul edildi. Non-neoplastik hücre skorlamaları, neoplastik solid hücre kümelerinin olduğu alanlarda yapıldı ve bu alanlarda boyanan hücrelerin tüm hücrelere oranı verildi. Çevre non-neoplastik alanlar, parsiyel tutulumlu alanlar ile nekroza yakın alanlar değerlendirmeye alınmadı.

PD-1 için kesit içinde tüm neoplastik hücre alanları taranarak TİL'lerin en fazla boyandığı birbirinden bağımsız 5 büyük büyütme alanı (BBA) seçildi ve 5 BBA'daki toplam pozitif hücre sayısı 5'e bölünerek ortalama değer hesaplandı. Bu ortalama değere göre; skor 1: <5 pozitif hücre/BBA, skor 2: $5 \leq$ pozitif hücre/BBA <10, skor 3: $10 \leq$ pozitif hücre/BBA <30, skor 4: $30 \leq$ pozitif hücre/BBA <50, skor 5: ≥ 50 pozitif hücre/BBA olacak şekilde kesme değerleri belirlendi.

PD-L1 ile bazı olgularda sadece tümör mikroçevresinde boyanma saptanırken bazı olgularda mikroçevredeki boyanmalara ek olarak tümör hücrelerinin de PD-L1 pozitif olduğu gözlemlendi. İkili boyama yapılmadığı için büyük hücre boyanmalarının histiosit mi yoksa tümör hücresi mi olduğu çoğu olguda net ayırt edilemediğinden, daha çok histiosit oldukları düşünülerek boyanan hücrelerin hangi hücre olduğuna dikkat edilmeksizin değerlendirme pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranı verilerek yapıldı. PD-L1 değerlendirilirken kesitteki neoplastik alanlar içerisinde pozitif hücrelerin en yoğun bulunduğu 5 alan (x200) seçildi ve pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranı verilerek bir boyanma yüzdesi elde edildi. Daha sonra olgular boyanma yüzdelere göre 5 gruba ayrıldı (<%5; %5-19; %20-39; %40-59; $\geq$ %60).

CD163 ve CD14 de benzer şekilde semikantitatif olarak değerlendirildi. Neoplastik alanlar içerisinde CD14 ve CD163 pozitif hücrelerin en yoğun bulunduğu 5 alan (x200) seçildi ve pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranının ortalaması alınarak bir boyanma yüzdesi elde edildi. Daha sonra olgular bu boyanma yüzdelere göre dağılımı göz önüne alınarak 4 gruba ayrıldı (<%5; %5-9; %10-19; $\geq$ %20).

Çalışma immunohistokimyasal belirteçleri yanı sıra benzer şekilde tüm kesitteki solid neoplastik alanlar içerisinde CD3 pozitif hücrelerin en yoğun bulunduğu 5 alan (x200) seçildi ve pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranının ortalaması alınarak semikantitatif olarak bir boyanma yüzdesi elde edildi. Daha sonra olgular bu boyanma yüzdelerinin dağılımı göz önüne alınarak 5 gruba ayrıldı ($\leq 5\%$; $5-9\%$; $10-19\%$; $20-39\%$; $\geq 40\%$).

Tüm kesitte neoplastik hücrelerdeki Ki67 pozitiflik oranı semikantitatif olarak değerlendirildi. Daha sonra olgular bu boyanma yüzdelerinin dağılımı göz önüne alınarak literatürdeki çalışmalara benzer şekilde 2 gruba ayrıldı ($\leq 80\%$; $> 80\%$).

Semikantitatif değerlendirmeler sırasında iki gözlemci arasında uyumsuzluk olan olgular tekrar değerlendirilerek görüş birliği sağlandı.

İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde kişisel bilgisayarda çalışan IBM® SPSS® (Statistical Package for Social Sciences) programının 25.0 versiyonu kullanıldı. Değişkenlerin dağılımının normal dağılıma uygun olup olmadığını saptamak için Kolmogorov Smirnov testi, korelasyonun araştırılmasında Spearman korelasyon analizi, kategorik değişkenlerin anlamlılığının sınanmasında Fischer exact test, sürekli değişkenler ile kategorik değişkenler arasındaki ilişkinin saptanmasında one-way ANOVA temel alındı. Sağ kalım analizinde kullanılacak uygun kesme değerlerinin belirlenmesinde ROC analizi kullanıldı. Sağ kalım analizi için Kaplan-Meier yöntemi ile sağ kalım eğrilerinin istatistiksel karşılaştırılması için log-rank testi kullanıldı. Sonuçlar $p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

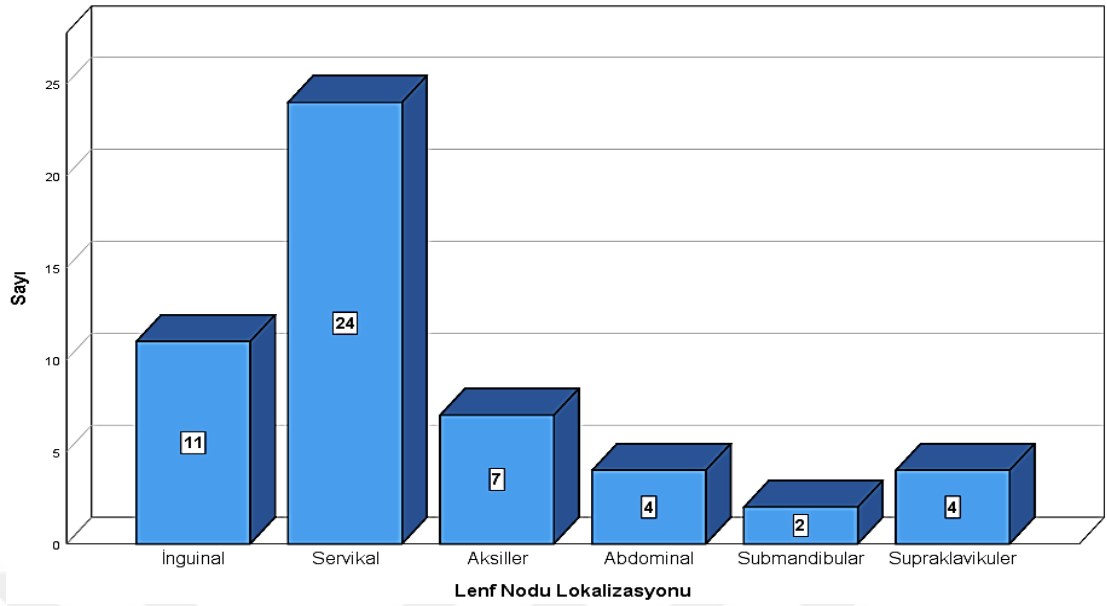
Yaş, Cinsiyet Dağılımı ve Klinikopatolojik Özellikler

Çalışmaya toplam 52 nodal DBBHL, NOS olgusu alınmış olup olguların 31'i kadın (%59,6), 21'i erkekti (%40,4). Olguların yaşları 28 ile 89 arasında değişmekte olup ortanca değeri 64,5, ortalama değeri ise 59,4 olarak saptandı. 60 yaşında ya da altında 22 olgu (%42,3) bulunmaktaydı.

Tablo 4: Olguların yaş aralıklarına göre dağılımı

Yaş (n=52)	Yaş Aralıkları	Olgu sayısı	Oran (%)
	20-29 yaş	3	5,8
	30-39 yaş	5	9,6
	40-49 yaş	8	15,4
	50-59 yaş	6	11,5
	60-69 yaş	13	25
	70-79 yaş	12	23,1
	80-89 yaş	5	9,6
	Toplam	52	100

Olguların 9'u insizyonel biopsi (%17,3), 43'ü ise eksizyonel biopsi (%82,7) ile tanı almıştı. Lenf nodu biopsilerinin 11'i (%21,2) inguinal, 24'ü (%46,2) servikal, 7'si (%13,5) aksiller, 4'ü (%7,7) abdominal, 2'si (%3,8) submandibular, 4'ü (%7,7) ise supraklavikuler bölgeden yapılmıştı. Lenf nodlarının dağılımı şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4: Lenf nodlarının lokalizasyonuna göre dağılımı

Çalışmaya dahil edilen 52 olgudan 44'üne (%84,6) ait klinik bilgi ve prognostik verilere ulaşılırken 8 olguya (%15,4) ait bilgi elde edilemedi.

LDH, olguların 20'sinde (%45,5) yüksek iken 24'ünde (%54,5) normaldi. Olguların 20'si (%45,5) düşük ECOG performans skoruna sahipken 24 olgu (%54,5) kötü performans durumuna sahipti. Olguların IPI skorlarına ve evrelerine göre dağılımları Tablo 5'te özetlenmiştir. Olgular R-IPI skorlamasına göre kategorilere ayrıldığında; 5 olgu (%11,4) 'çok iyi', 14 olgu (%31,8) 'iyi', 25 olgu (%56,8) ise 'kötü' kategorisinde yer almaktaydı. 13 olgu (%29,5) evre I-II olarak, 31 olgu (%70,5) ise evre III-IV olarak değerlendirildi.

Kemoterapi (KT) rejimi olarak 26 olguya (%59,1) rituksimab içeren R-CHOP ya da benzeri bir tedavi protokolü; 10 olguya (%22,7) ise rituksimab içermeyen CHOP ve benzeri bir KT rejimi uygulanmıştı. 8 olguda (%18,2) düşük performans durumu ya da tedaviyi reddetme gibi nedenlerle KT uygulanmamıştı (Tablo 5). Olguların tedavi yanıtları değerlendirildiğinde ise KT uygulanan 36 hastanın 14'ünde tam yanıt, 8'inde kısmi yanıt saptanırken 14 olgu tedaviye yanıtsız olarak değerlendirildi.

Hiçbir olguya allojenik kök hücre nakli uygulanmazken yalnızca 1 olguya KT sonrası otolog kök hücre nakli uygulanmıştı. 2 hastada KT'ye ek olarak

radoterapi tedavisi de uygulandığı saptandı. Olgulardan yalnızca 2'sinde (%4,5) nüks saptandı.

Klinik verilerine ulaşılan 44 olgu göz önüne alındığında, takip süresi 1 ay ile 127 ay arasında değişmekteydi. Olgulardan 20'sinin (%45,5) yaşıadığı, 24'ünün (%54,5) ise öldüğü tespit edildi (Tablo 5). Ölen 24 olgu ele alındığında sağ kalım süreleri 1 ay ile 100 ay arasında dağılım göstermekteydi ve bu olgularda ortalama sağ kalım süresi 12,8 ay olarak saptandı. Takip süresi 8 aydan kısa olan tüm olgular ilk 8 ayda ölen olgulardı ve yaşayan olguların takip süresi 8 ile 127 ay arasında değişmekteydi. Yaşayan 20 olguda ortalama takip süresi 54,7 ay olarak hesaplandı.

Tablo 5: Klinik bilgileri bulunan 44 olgunun özellikleri

Klinik Özellikler	Değer	Olgu sayısı (n=44)	Oran (%)
IPI Skoru	0	5	11,4
	1	8	18,2
	2	6	13,6
	3	11	25
	4	13	29,5
	5	1	2,3
ECOG Performans Durumu	0-1	20	45,5
	≥2	24	54,5
LDH	Yüksek	20	45,5
	Normal	24	54,5
Evre	I	5	11,4
	II	8	18,2
	III	12	27,2
	IV	19	43,2
Kemoterapi	R-CHOP ve benzeri	26	59,1
	CHOP ve benzeri	10	22,7
	Tedavi yok	8	18,2
Nüks	Var	2	4,5
	Yok	42	95,5
Mortalite	Sağ	20	45,5
	Ölen	24	54,5

R-IPI: Revize Uluslararası Prognostik İndeks, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group, LDH: Laktat dehidrogenaz

Morfolojik ve İmmunfenotipik Özellikler

Olguların 20'si sentroblastik, 4'ü immunoblastik, 8'i anaplastik varyant özellikleri sergilerken 20 olgu sentroblastik ve immunoblastik varyantların morfolojik özelliklerini birlikte taşımaktaydı (mikst) (Tablo 6).

Olgular Hans algoritması kullanılarak immunfenotipik özelliklerine göre alt tiplere ayrıldı. Buna göre 17 olgu GCB subtipinde iken 35 olgu non-GCB subtipinde değerlendirildi (Tablo 6).

Tablo 6: Morfolojik ve immunfenotipik özelliklere göre olguların dağılımı

Morfolojik Varyant ve Subtipler		Olgu Sayısı (n=52)	Oran (%)
Morfolojik Varyant	Sentroblastik	20	38,5
	İmmunoblastik	4	7,7
	Mikst	20	38,5
	Anaplastik	8	15,3
Subtip	GCB	17	32,7
	non-GCB	35	67,3

GCB: Germinal merkez B hücre tipi

BCL2; 18 olguda (%34,6) pozitif, 34 olguda (%65,4) negatif olarak değerlendirildi. CD10 ile 14 olgu (%26,9) pozitif, 38 olgu (%73,1) negatif; BCL6 ile 35 olgu (%67,3) pozitif, 17 olgu (%32,7) negatif; MUM1 ile 40 olgu (%76,9) pozitif, 12 olgu (%23,1) negatif olarak değerlendirildi. CD5 ile 5 olguda (%9,6), CD30 ile 2 olguda (%3,8), siklin D1 ile ise yalnızca 1 olguda (%1,9) boyanma saptandı (Tablo 7). Siklin D1 pozitif bu olguya SOX11 ve CD5 çalışıldı. Her ikisi de negatif olduğundan, morfolojik olarak 'mantle' hücreli lenfomanın blastoid ya da anaplastik varyantına benzemediğinden ve siklin D1 boyanması zayıf olduğundan t(11,14) translokasyonuna bakılmaksızın olgu DBBHL, NOS olarak kabul edildi.

Olgularda immunohistokimyasal olarak MYC ekspresyonu %0 ile %90 arasında değişmekte iken ortanca değer %25, ortalama değer %27,6 idi. %40 ya da daha fazla hücrede MYC ile boyanma olan olgular pozitif olarak

kabul edildi. Buna göre MYC 17 olguda (%32,7) pozitif, 35 olguda (%67,3) negatif olarak değerlendirildi (Tablo 7).

Ki67 proliferasyon indeksi %20 ile %100 arasında değişmekte olup ortanca değer %92,5, ortalama değer %85,4 idi. Olguların 18'inde (%34,6) Ki67 proliferasyon indeksi %80 ya da altında iken 34 olguda (%65,4) %80'in üzerindeydi (Tablo 7).

Tablo 7: İmmunohistokimyasal incelemelere göre olguların dağılımı

İmmunohistokimyasal Özellikler	Değer	Olgu sayısı (n=52)	Oran (%)
BCL2	- Pozitif	18	34,6
	- Negatif	34	65,4
CD10	- Pozitif	14	26,9
	- Negatif	38	73,1
BCL6	- Pozitif	35	67,3
	- Negatif	17	32,7
MUM1	- Pozitif	40	76,9
	- Negatif	12	23,1
Ki67	- ≤%80	18	34,6
	- >%80	34	65,4
CD5	- Pozitif	5	9,6
	- Negatif	47	90,4
CD30	- Pozitif	2	3,8
	- Negatif	50	96,2
Siklin D1	- Pozitif	1	1,9
	- Negatif	51	98,1
MYC	- Pozitif	17	32,7
	- Negatif	35	67,3

Olgularda PD-1 skoru, skor 1 ile skor 5 arasında dağılmakta olup ortalama değer 2,38, ortanca değer ise 2 olarak bulundu (Tablo 8). 19 olgu (%36,5)

skor 1 (<5 pozitif hücre/BBA), 12 olgu (%23,1) skor 2 (5≤ pozitif hücre/BBA <10), 10 olgu (%19,2) skor 3 (10≤ pozitif hücre/BBA <30), 4 olgu (%7,7) skor 4 (30≤ pozitif hücre/BBA <50), 7 olgu (%13,5) ise skor 5 (≥50 pozitif hücre/BBA) olarak değerlendirildi (Tablo 9). Olgulardan ikisinde ise TİL'lere ek olarak tümör hücrelerinde de odaksal boyanmalar saptandı. PD-1 ile boyanan iki olgu da anaplastik varyant morfolojisindeydi.

PD-L1 boyanmaları %2 ile %100 arasında değişmekte olup ortalama değer %25,88, ortanca değer %12,5 idi (Tablo 8). Belirlenen kesme değerlerine göre olgular gruplara ayrıldığında, boyanma yüzdeleri 8 olguda (%15,4) %5'ten az, 22 olguda (%42,3) %5-19 arasında, 11 olguda (%21,2) %20-39 arasında, 1 olguda (%1,9) %40-59 arasında, 10 olguda (%19,2) ise %60 ya da üstünde saptandı (Tablo 9).

Olgularda CD163 boyanmaları %1 ile %60 arasında değişmekte olup ortalama değer %9,75, ortanca değer %5 idi (Tablo 8). Belirlenen kesme değerlerine göre olgular gruplara ayrıldığında, boyanma yüzdeleri 14 olguda (%26,9) %5'ten az, 17 olguda (%32,7) %5-9 arasında, 14 olguda (%26,9) %10-19 arasında, 7 olguda (%13,5) %20 ya da üstünde saptandı (Tablo 9).

CD14 boyanmaları %1 ile %60 arasında değişmekte olup ortalama değer %14,21, ortanca değer %10 olarak bulundu (Tablo 8). Belirlenen kesme değerlerine göre olgular gruplara ayrıldığında, boyanma yüzdeleri 11 olguda (%21,2) %5'ten az, 13 olguda (%25) %5-9 arasında, 9 olguda (%17,3) %10-19 arasında, 19 olguda (%36,5) ise %20 ya da üstünde saptandı (Tablo 9).

Tablo 8: PD-1, PD-L1, CD163 ve CD14 boyanmalarının dağılımı

(n=52)	PD-1 Skoru	PD-L1	CD163	CD14
Aralık	1-5	%2-100	%1-60	%1-60
Ortalama	2,38	%25,88	%9,75	%14,21
Ortanca	2	%12,5	%5	%10

PD-1: Programlanmış hücre ölümü 1, PD-L1: Programlanmış hücre ölümü ligand 1

CD3 pozitif hücrelerin oranı %1 ile %60 arasında değişmekte olup ortanca değer %15, ortalama değer %19,25 idi. Belirlenen kesme değerlerine göre olgular gruplara ayrıldığında, boyanma yüzdeleri 9 olguda (%17,3)

%5'ten az, 7 olguda (%13,5) %5-9 arasında, 14 olguda (%26,9) %10-19 arasında, 14 olguda (%26,9) %20-39 arasında, 8 olguda (%15,4) ise %40 ya da üstünde saptandı (Tablo 9).

Tablo 9: PD-1, PD-L1, CD163, CD14 ve CD3 boyanmalarının kesme değerlere göre dağılımı

İmmünohistokimyasal Özellikler	Değer	Olgu sayısı (n=52)	Oran (%)
PD-1	Skor 1	19	36,5
	Skor 2	12	23,1
	Skor 3	10	19,2
	Skor 4	4	7,7
	Skor 5	7	13,5
PD-L1	<%5	8	15,4
	%5-19	22	42,3
	%20-39	11	21,2
	%40-59	1	1,9
	≥%60	10	19,2
CD163	<%5	14	26,9
	%5-9	17	32,7
	%10-19	14	26,9
	≥%20	7	13,5
CD14	<%5	11	21,2
	%5-9	13	25
	%10-19	9	17,3
	≥%20	19	36,5
CD3	<%5	9	17,3
	%5-9	7	13,5
	%10-19	14	26,9
	%20-39	14	26,9
	≥%40	8	15,4

PD-1: Programlanmış hücre ölümü 1, PD-L1: Programlanmış hücre ölümü ligand 1

İstatistiksel Analiz

Klinik parametrelerin birbirleriyle olan ilişkilerini araştırmak üzere korelasyon analizi yapıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bulunan klinik parametreler, bu ilişkilere ait p değerleri ve korelasyonun yönü Tablo 10'da

özetlenmiştir. İmmunohistokimyasal parametrelerin birbirleriyle ve klinik verilerle ilişkilerini karşılaştırmak için yapılan korelasyon analizi sonucunda anlamlı bulunan parametreler, bu ilişkilere ait p değerleri ve korelasyonun yönü ise Tablo 11’de özetlenmiştir.

Tablo 10: Aralarında istatistiksel anlamlı ilişki bulunan klinik prognostik parametreler (Spearman korelasyon testi)

Parametreler	p değeri	Korelasyon Yönü
IPI skoru - Albumin	<0,001	Negatif
IPI skoru - Hemoglobin	0,012	Negatif
IPI skoru - Lenfosit	0,001	Negatif
IPI skoru - LM oranı	0,036	Negatif
IPI skoru - PL oranı	0,013	Pozitif
Evre - LDH	<0,001	Pozitif
Evre - Albumin	0,001	Negatif
Evre - Hemoglobin	0,013	Negatif
Evre - ECOG skoru	0,001	Pozitif
ECOG skoru - Yaş	<0,001	Pozitif
ECOG skoru - LDH	<0,001	Pozitif
ECOG skoru - Albumin	<0,001	Negatif
ECOG skoru - Hemoglobin	0,011	Negatif
ECOG skoru - Lenfosit	0,001	Negatif
ECOG skoru - NL oranı	0,007	Pozitif
ECOG skoru - PL oranı	0,005	Pozitif
LDH - Albumin	<0,001	Negatif
LDH - Hemoglobin	0,040	Negatif
LDH - Lenfosit	<0,001	Negatif
Albumin - Yaş	0,012	Negatif
Albumin - Hemoglobin	<0,001	Pozitif

IPI: Uluslararası Prognostik İndeks, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group performans durumu, LDH: Laktat dehidrogenaz, LM oranı: Lenfosit/monosit oranı, PL oranı: Platelet/lenfosit oranı, NL oranı: Nötrofil/lenfosit oranı

Tablo 11: Arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunan klinik prognostik parametreler ve immunohistokimyasal belirteçler (Spearman korelasyon testi)

Parametreler	p değeri	Korelasyon Yönü
PD-1 - Yaş	0,039	Negatif
PD-1 - ECOG skoru	0,009	Negatif
PD-1 - CD3	0,039	Pozitif
PD-L1 - CD3	0,048	Pozitif
PD-L1 - MYC	0,002	Pozitif
PD-L1 - CD163	<0,001	Pozitif
PD-L1 - CD14	<0,001	Pozitif
CD163 - CD3	0,049	Pozitif
CD163 - CD14	<0,001	Pozitif
CD14 - CD3	0,004	Pozitif
CD3 - Ki67	0,043	Negatif
MYC - Ki67	0,020	Pozitif

IPI: Uluslararası Prognostik İndeks, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group performans durumu, PD-1: Programlanmış hücre ölümü 1, PD-L1: Programlanmış hücre ölümü ligand 1

Ki67 proliferasyon indeksi, sentroblastik varyantta %60 ile %100 arasında değişmekte olup ortalama değer %86,4, ortanca değer %90, immunoblastik varyantta ise %30 ile %95 arasında değişmekte olup ortalama değer %63,75, ortanca değer %65 olarak saptandı. Anaplastik varyant olarak değerlendirilen olgularda %90 ile %100 arasında değişmekte olup ortalama değer %98,5, ortanca değer ise %100'dü. İmmunoblastik ve sentroblastik varyantın özelliklerini bir arada bulunduran mikst olgularda ise %20 ile %100 arasında değişmekte olup ortalama değer %83,5, ortanca değer %95'ti (Tablo 12). Bu veriler karşılaştırıldığında, immunoblastik varyantta Ki67 proliferasyon indeksinin diğer varyantlara göre daha düşük ($p=0,019$), anaplastik varyantta ise diğer varyantlara göre daha yüksek ($p=0,037$) olduğu görüldü.

Tablo 12: Morfolojik varyantlara göre Ki67 boyanma oranlarının dağılımı

	Ki67		
	Aralık	Ortalama	Ortanca
Sentroblastik (n=20)	%60-100	%86,4	%90
İmmunoblastik (n=4)	%30-95	%63,75	%65
Mikst (n=20)	%20-100	%83,5	%95
Anaplastik (n=8)	%90-100	%98,5	%100

GCB ve non-GCB subtipleri karşılaştırıldığında, PD-L1 ve CD14'ün non-GCB subtipinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla boyandığı görüldü (Tablo 13).

Tablo 13: GCB ve non-GCB subtipleri arasında PD-L1 ve CD14 boyanmalarının dağılımı

		GCB (n=17)	non-GCB (n=35)	p değeri
PD-L1	Aralık	%2-100	%2-100	0,041
	Ortalama	%13,65	%31,83	
	Ortanca	%8	%20	
CD14	Aralık	%1-20	%1-60	0,024
	Ortalama	%8,47	%17	
	Ortanca	%7	%15	

PD-L1: Programlanmış hücre ölümü ligand 1, GCB: Germinal merkez B hücre tipi

Ölen ve yaşayan hastaların BCL6 pozitiflikleri karşılaştırıldığında, yaşayan 20 hastanın 17'sinde (%85), ölen 24 hastanın ise 13'ünde (%54,2) BCL6 pozitif bulundu. Bu fark istatistiksel anlamlılık sınırında ($p=0,50$) olmasına karşın (Tablo 14), sağ kalım analizinde BCL6 pozitifliği ile genel sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0,163$).

Tablo 14: Mortalite ile BCL6 boyanması arasındaki ilişki

		BCL6		Toplam	p değeri
		Negatif	Pozitif		
Mortalite	Sağ	3	17	20	0,050
	Ölen	11	13	24	
Toplam		14	30	44	

Ölen ve yaşayan hastaların evreleri karşılaştırıldığında, evre I-III olguların 15'inin (%60) yaşadığı, 10'unun (%40) ise öldüğü, evre IV olguların ise 5'inin (26,3) yaşadığı, 14'ünün (%73,7) ise öldüğü görüldü. Bekleneceği üzere evre IV olgularda mortalite oranı daha yüksekti ve iki grubun mortalite oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,035$) (Tablo 15).

Tablo 15: Mortalite ile evre arasındaki ilişki

		Evre		Toplam	p değeri
		I-III	IV		
Mortalite	Sağ	15	5	20	0,035
	Ölen	10	14	24	
Toplam		25	19	44	

Yaşayan ve ölen hasta gruplarının klinik ve patolojik verilerinin karşılaştırılması sonucunda anlamlı olarak bulunan veriler Tablo 16'da özetlenmiştir. Bekleneceği üzere; yaş, IPI, ECOG performans skoru, LDH, albumin ve hemoglobin değerlerinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Yaşayan ve ölen olguların PD-1 skorları arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü (Tablo 16).

Altmış yaşının üstündeki hastalar ile 60 yaş ve altındaki hastaların sağ kalımları karşılaştırıldığında, 60 yaş ve altındaki olguların daha iyi genel sağ kalıma sahip oldukları gözlemlendi ($p=0,001$) (Şekil 5). 60 yaş ve altındaki 20 olgunun (%45,5) 6'sının (%30) öldüğü, 14'ünün (%70) yaşadığı saptanırken 60 yaşının üstündeki 24 olgunun (%54,5) 18'inin (%75) öldüğü, 6'sının (%25) ise yaşadığı görüldü (Şekil 5). İlk grupta ortalama sağ kalım 89,9 ay olarak bulunurken ikinci grupta ortalama sağ kalım 26,9 ay idi (Tablo 17).

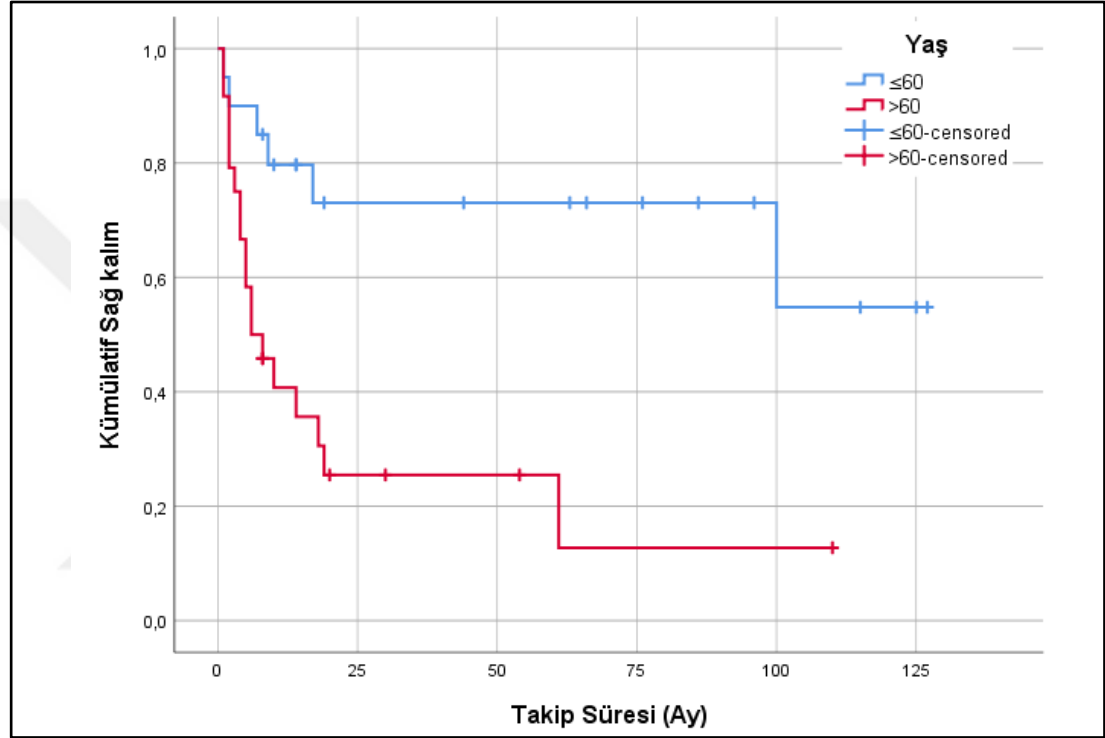
Tablo 16: Yaşayan ve ölen hasta gruplarında klinikopatolojik özelliklerin dağılımı

		Sağ (n=20)	Ölen (n=24)	
Yaş	Aralık	28-75	28-89	p=0,006
	Ortalama	50,5	65,13	
	Ortanca	50	70,5	
IPI Skoru	0	5 (%100)	0 (%0)	p<0,001
	1	7 (%87,5)	1 (%12,5)	
	2	3 (%50)	3 (%50)	
	3	2 (%18,2)	9 (%81,8)	
	4	3 (%23,1)	10 (%76,9)	
	5	0 (%0)	1 (%100)	
ECOG Performans Skoru	0	14 (%93,3)	1 (%6,7)	p<0,001
	1	4 (%80)	1 (%20)	
	2	1 (%8,3)	11 (%91,7)	
	3	1 (%9,1)	10 (%90,9)	
	4	0 (%0)	1 (%100)	
LDH (U/L)	Aralık	131-462	190-2623	p=0,023
	Ortalama	232,25	501,38	
	Ortanca	190	357	
Albumin (g/dL)	Aralık	3,6-4,7	2,0-4,3	p<0,001
	Ortalama	4,21	3,525	
	Ortanca	4,25	3,75	
Hemoglobin (g/dL)	Aralık	9,0-15,1	5,3-14,7	p=0,040
	Ortalama	12,885	11,625	
	Ortanca	13,35	11,35	
PD-1 skoru	Aralık	1-5	1-5	p=0,007
	Ortalama	2,95	1,83	
	Ortanca	3	1	

IPI: Uluslararası Prognostik İndeks, ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group, LDH: Laktat dehidrogenaz, PD-1: Programlanmış hücre ölümü 1

Tablo 17: Yaş ile sağ kalım ilişkisi

Yaş	Toplam Olgu (%)	Yaşayan (%)	Ölen (%)	Ortalama Sağ kalım (Ay)	p değeri
≤60	20 (%45,5)	14 (%70)	6 (%30)	89,9	0,001
>60	24 (%54,5)	6 (%25)	18 (%75)	26,9	



Şekil 5: Yaş ile sağ kalım ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi

Olgular ECOG performans durumuna göre iki gruba ayrılarak sağ kalım analizi yapıldığında, ECOG performans skoru 0 ya da 1 olan olguların ECOG performans skoru ≥ 2 olan olgulara göre daha iyi genel sağ kalıma sahip olduğu saptandı ($p < 0,001$).

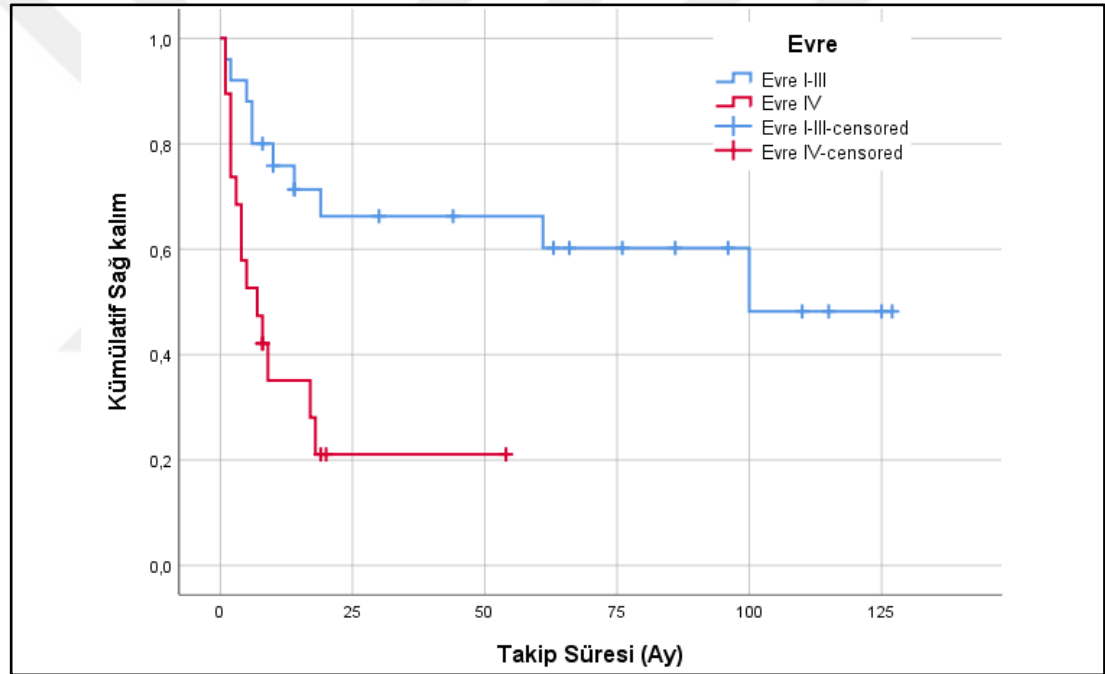
R-IPI ve IPI skorlamalarına göre olgular gruplara ayrılarak sağ kalım analizi yapıldığında, R-IPI ve IPI gruplarının sağ kalım ile ilişkili olduğu olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$).

Evre ile sağ kalım ilişkisi araştırıldığında, evre IV olguların istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha kısa genel sağ kalıma sahip oldukları gözlemlendi ($p = 0,002$) (Şekil 6). Evre I-III grubundaki 25 olgudan (%56,8) 10'unun (%40)

öldüğü, 15'inin (%60) yaşadığı saptanırken evre IV grubunda yer alan 19 olgudan (%43,2) 14'ünün (%73,7) öldüğü, 5'inin (%26,3) ise yaşadığı saptandı (Tablo 18). Evre I-II olgularla evre III-IV olguların sağ kalımları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 18: Evre ile sağ kalım ilişkisi

Evre	Toplam Olgu (%)	Yaşayan (%)	Ölen (%)	Ortalama Sağ kalım (Ay)	p değeri
I-III	25 (%56,8)	15 (%60)	10 (%40)	79,7	0,002
IV	19 (%43,2)	5 (%26,3)	14 (%73,7)	16,5	



Şekil 6: Evre ile sağ kalım ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi

LDH değerleri normal olguların LDH değerleri yüksek olan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha uzun genel sağ kalıma sahip oldukları saptandı ($p<0,001$).

Albuminin sağ kalım üzerindeki etkisini saptamak için kesme değeri belirlemek amacıyla ROC analizi yapıldığında, en uygun kesme değerin 3,95 g/dL olduğu tespit edildi ($p<0,001$). Bu kesme değere göre, albumin değeri $>3,95$ g/dL olan olguların anlamlı olarak daha uzun genel sağ kalım gösterdikleri görüldü ($p<0,001$). Hemoglobinin için kesme değeri saptamaya

yönelik uygulanan ROC analizinde, en uygun kesme değeri 12 g/dL olduğu saptandı ($p=0,048$). Bu kesme değere göre sağ kalım analizi yapıldığında, hemoglobin ≥ 12 g/dL olan olguların düşük hemoglobin değerlerine sahip olanlara göre anlamlı olarak uzun genel sağ kalıma sahip oldukları görüldü ($p=0,001$). Periferik kan lenfosit sayısı için kesme değeri belirlemeye yönelik yapılan ROC analizinde, en uygun kesme değeri 1470/ μ L olduğu saptandı ($p=0,007$). Buna göre yapılan sağ kalım analizinde; periferik kan lenfosit sayısı ≥ 1470 / μ L olan olgularda genel sağ kalımın anlamlı olarak uzadığı gözlemlendi ($p<0,001$).

Periferik kan nötrofil/lenfosit oranı (NL oranı) için 2,31 kesme değeri, periferik kan platelet/lenfosit oranı (PL oranı) için ise 180 kesme değeri belirlendiğinde, NL oranı $\leq 2,31$ olan olguların ve PL oranı ≤ 180 olan olguların daha iyi genel sağ kalım gösterdikleri saptandı (sırasıyla $p=0,022$ ve $p=0,024$).

Periferik kan monosit sayısı için kesme değeri belirlemeye yönelik yapılan ROC analizi sonunda ise istatistiksel olarak anlamlı kesme değeri elde edilemedi.

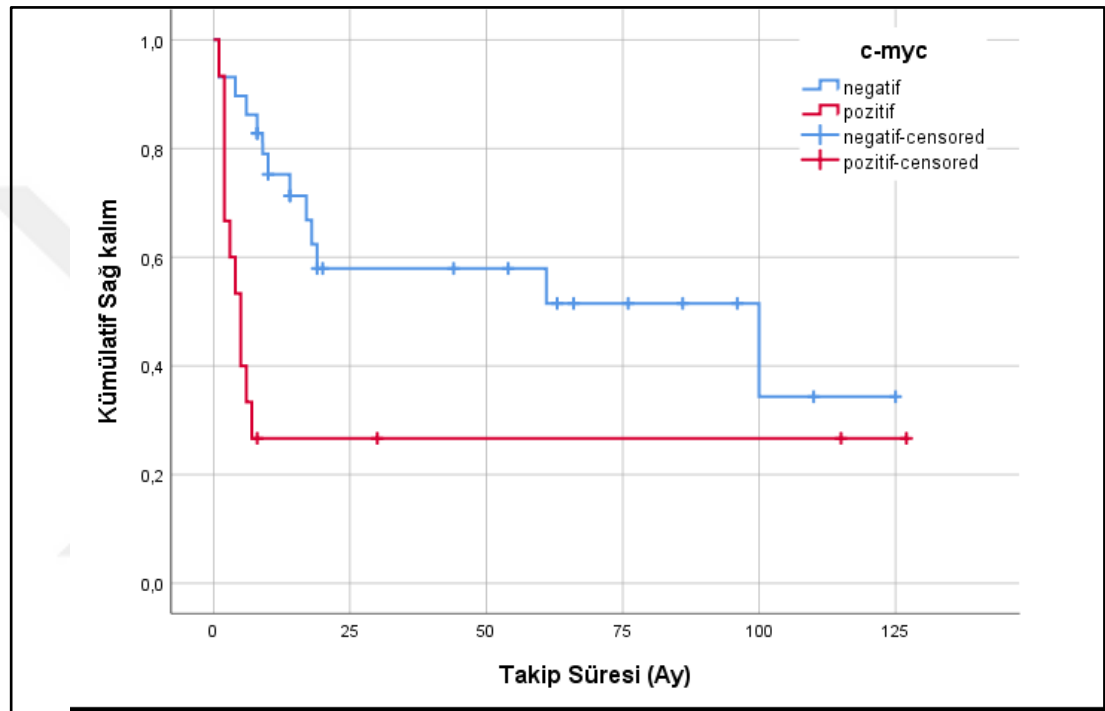
Periferik kan lenfosit/monosit oranı (LM oranı), platelet sayısı, nötrofil sayısı, MPV gibi klinik parametreler için yapılan sağ kalım analizlerinde anlamlı ilişki saptanmadı.

İmmunohistokimyasal belirteçlerin ve morfolojik özellikleri sağ kalıma etkileri araştırıldığında, CD3 için farklı kesme değerlerle uygulanan sağ kalım analizleri sonucunda anlamlı ilişki gözlenmedi. Benzer şekilde Ki67 proliferasyon indeksi ile de anlamlı ilişki saptanmadı. Morfolojik varyant ve suptip ile sağ kalım arasında anlamlı ilişki bulunmamaktaydı.

MYC için $\geq 40\%$ kesme değeri pozitiflik olarak belirlendiğinde, MYC pozitif olguların negatif olgularla kıyaslandığında anlamlı şekilde daha kısa genel sağ kalıma sahip oldukları izlendi ($p=0,010$) (Şekil 7). MYC pozitif 15 olgunun (%34,1) 11'inin (%73,3) öldüğü, 4'ünün (%26,7) ise yaşadığı gözlenirken negatif 29 olgunun (%65,9) 13'ünün (%44,8) öldüğü, 16'sının (%55,2) ise yaşadığı tespit edildi. Ortalama sağ kalım süreleri MYC pozitif grupta 36,5 ay iken negatif grupta 68,3 ay idi (Tablo 19).

Tablo 19: MYC ekspresyonunun sağ kalıma etkisi

MYC	Toplam Olgu (%)	Yaşayan (%)	Ölen (%)	Ortalama Sağ kalım (Ay)	p değeri
Pozitif	15 (%34,1)	4 (%26,7)	11 (%73,3)	36,5	0,010
Negatif	29 (%65,9)	16 (%55,2)	13 (%44,8)	68,3	

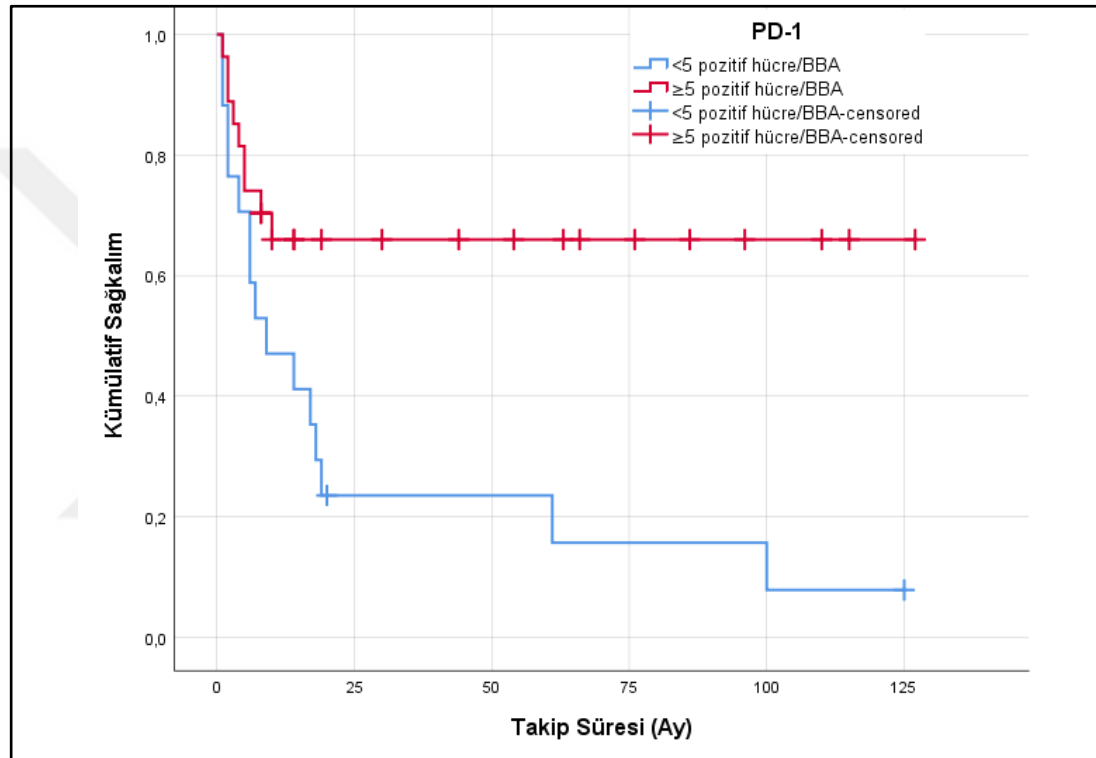


Şekil 7: MYC ekspresyonunun sağ kalımla ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi

PD-1 için skor 1 (<5 pozitif hücre/BBA) ve skor 2-5 (≥5 pozitif hücre/BBA) grupları karşılaştırılarak sağ kalım analizi yapıldığında, BBA'da 5'ten az PD-1 pozitif hücre içeren olguların (skor 1) 5 veya daha fazla pozitif hücre içerenlere (skor 2-5) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha uzun genel sağ kalıma sahip oldukları saptandı (p=0,005) (Şekil 8). PD-1 skoru 1 olan 17 olgunun (%38,6) 15'inin (%88,2) öldüğü, 2'sinin (%11,8) ise yaşadığı saptandı. PD-1 skoru 2, 3, 4 ve 5 olan 27 olgunun (%61,4) 9'unun (%33,3) öldüğü, 18'inin (%66,7) ise yaşadığı saptandı. Ortalama sağ kalım süreleri ise PD-1 (+) hücre sayısı düşük grupta 28,7 ay, yüksek grupta ise 85,3 ay olarak hesaplandı (Tablo 20).

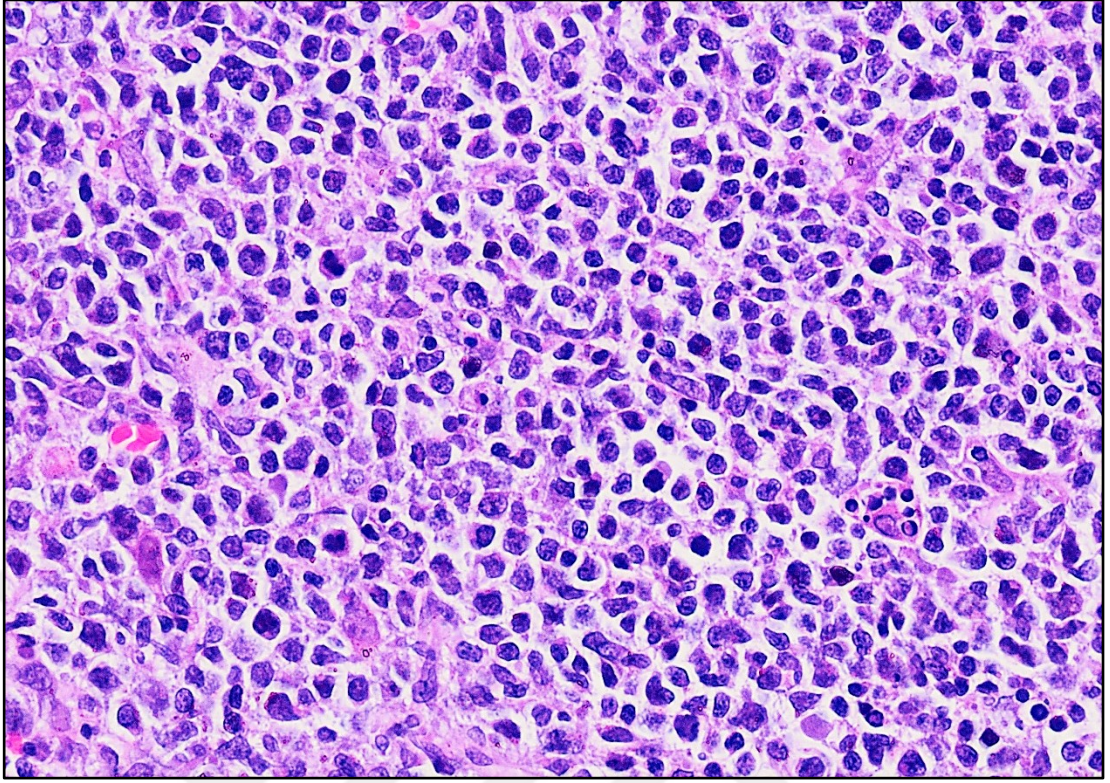
Tablo 20: PD-1 pozitifliğinin sağ kalıma etkisi

PD-1 (pozitif hücre/BBA)	Toplam Olgu (%)	Yaşayan (%)	Ölen (%)	Ortalama Sağ kalım (Ay)	p değeri
<5	17 (%38,6)	2 (%11,8)	15 (%88,2)	28,7	0,005
≥5	27 (%61,4)	18 (%66,7)	9 (%33,3)	85,3	

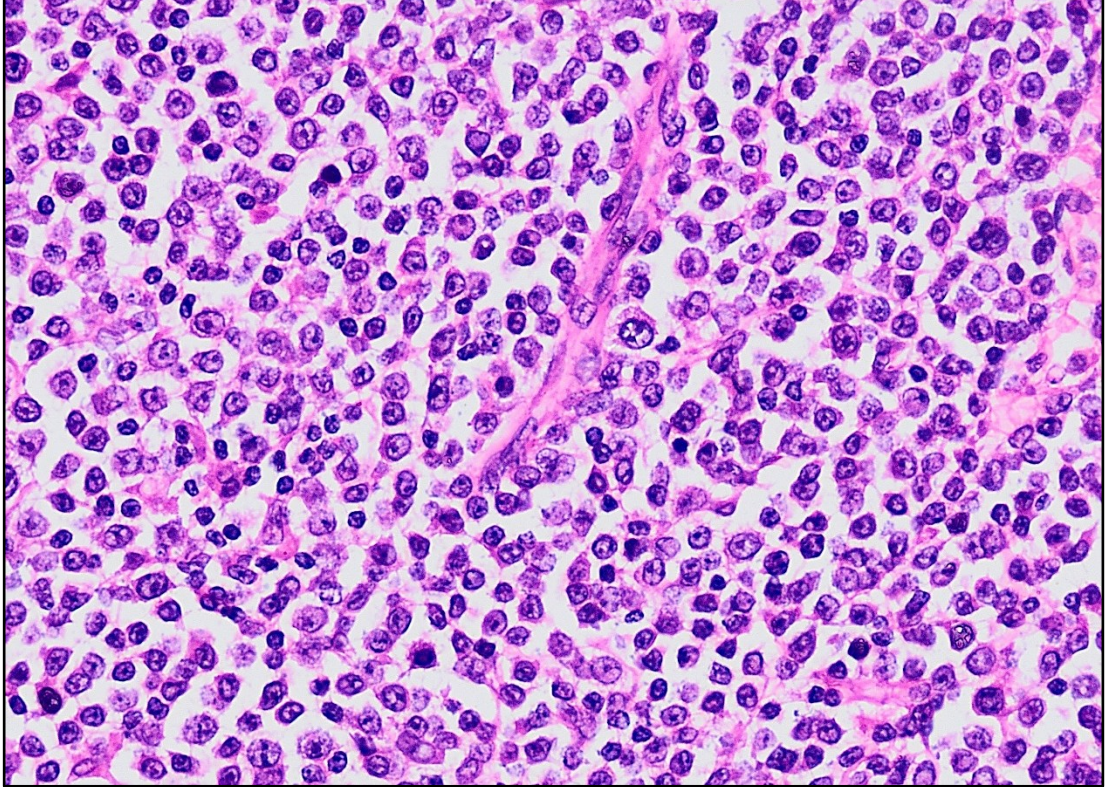


Şekil 8: PD-1 pozitifliğinin sağ kalımla ilişkisini gösteren Kaplan-Meier eğrisi

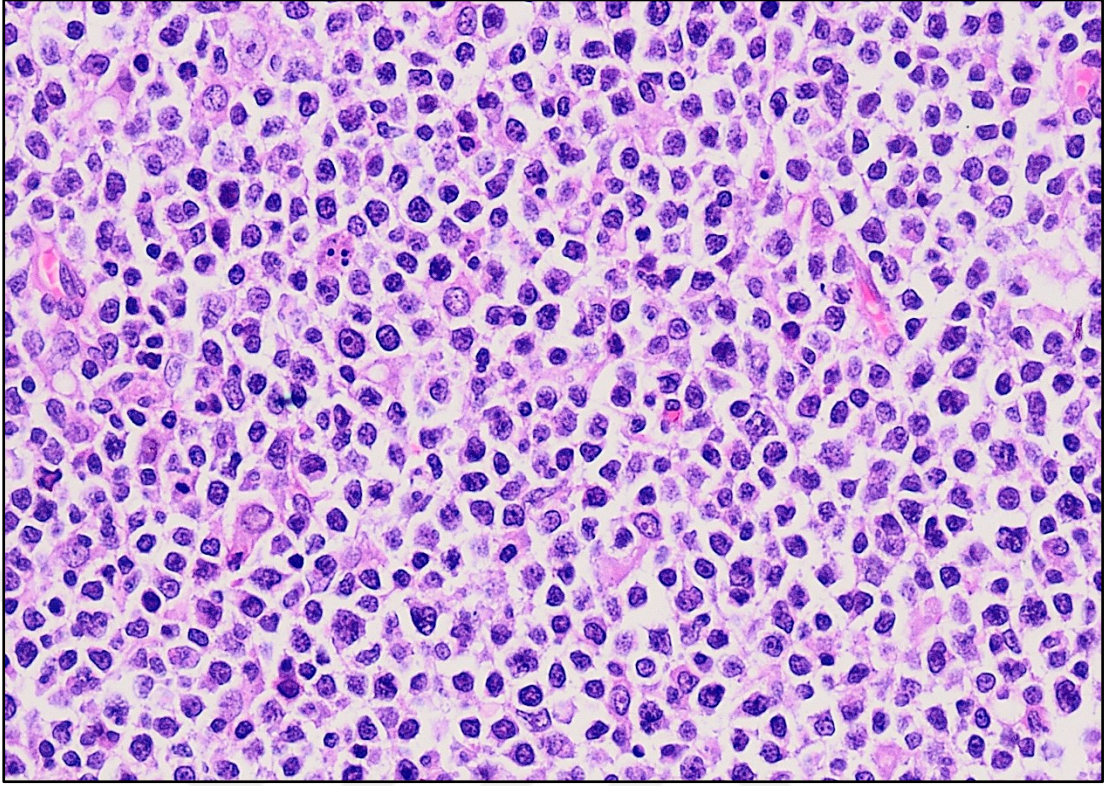
PD-L1, CD163 ve CD14 için farklı kesme değerleri ile tekrarlanan sağ kalım analizleri sonucunda ise bu belirteçlerle sağ kalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.



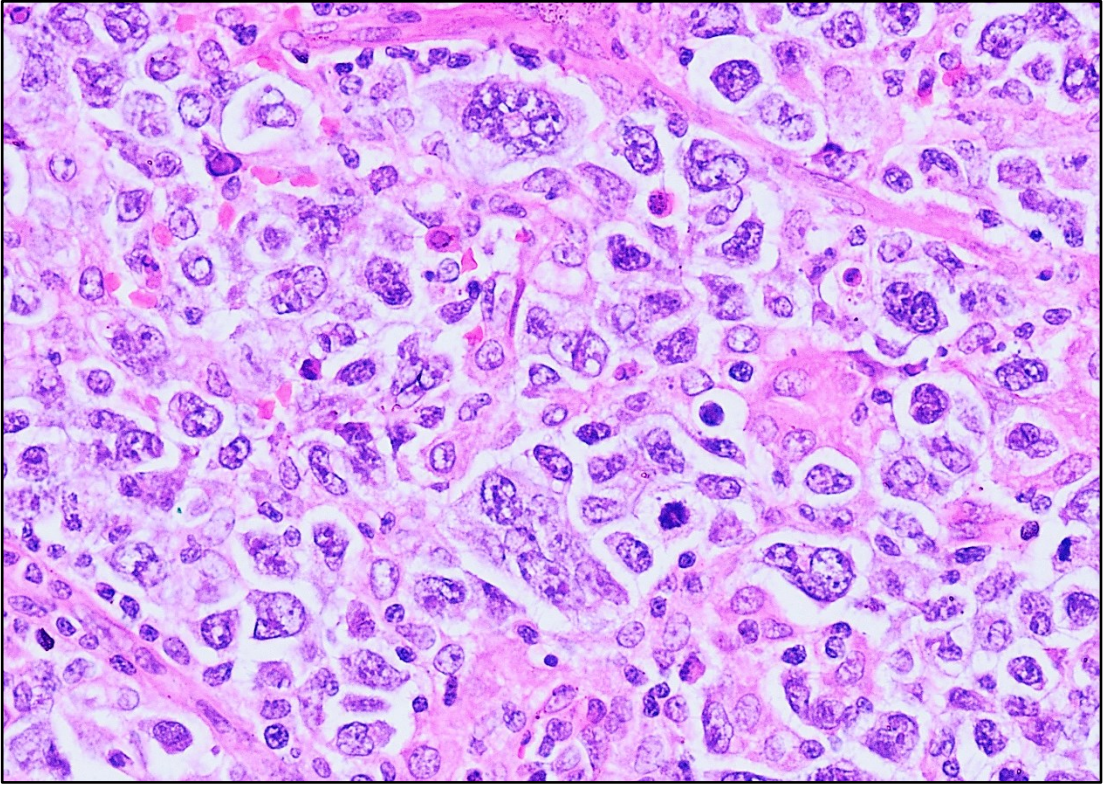
Resim 1: DBBHL'nin sentroblastik varyantı (H&E, x400).



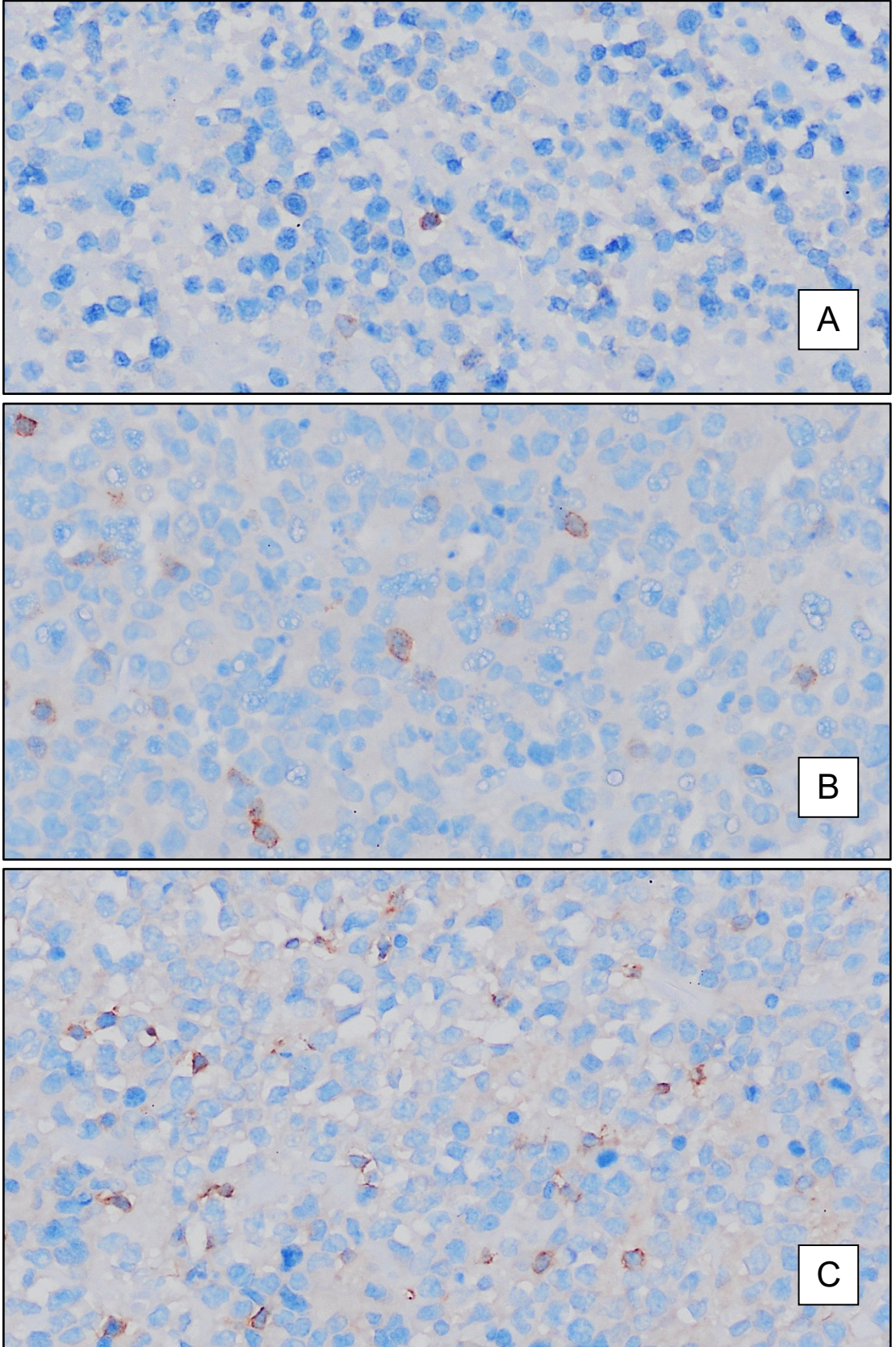
Resim 2: DBBHL'nin immunoblastik varyantı (H&E, x400).



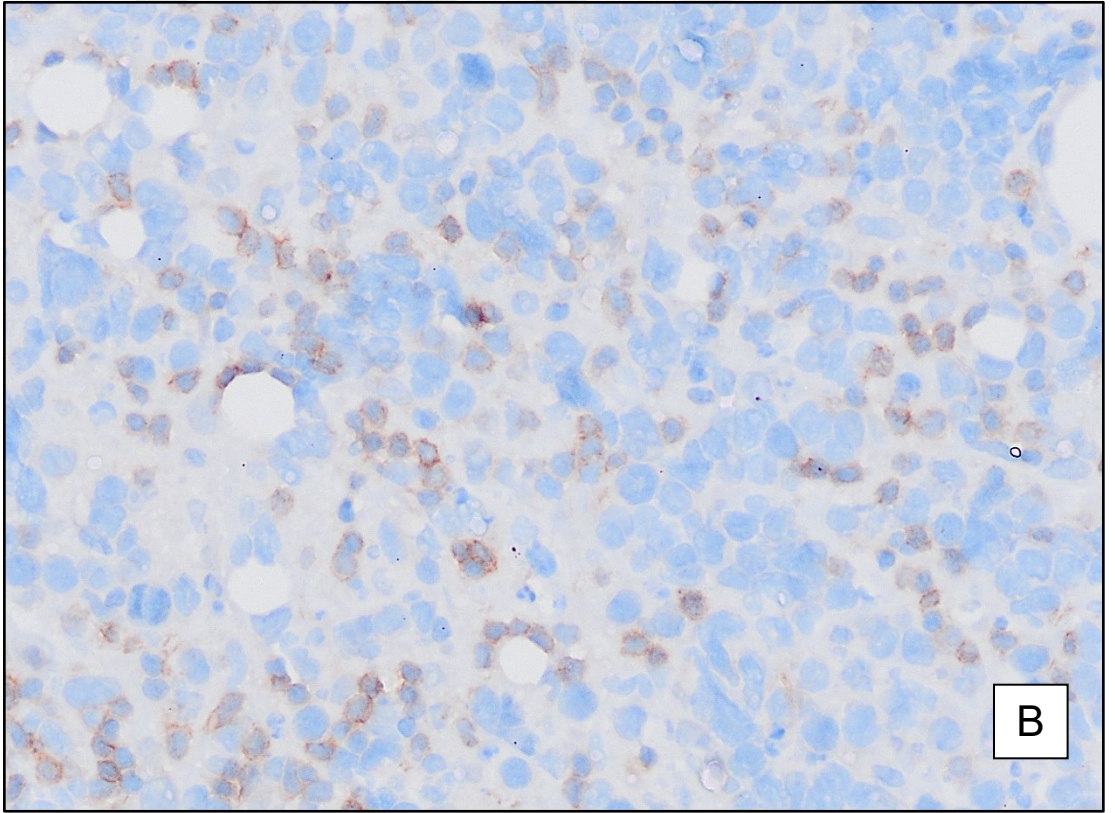
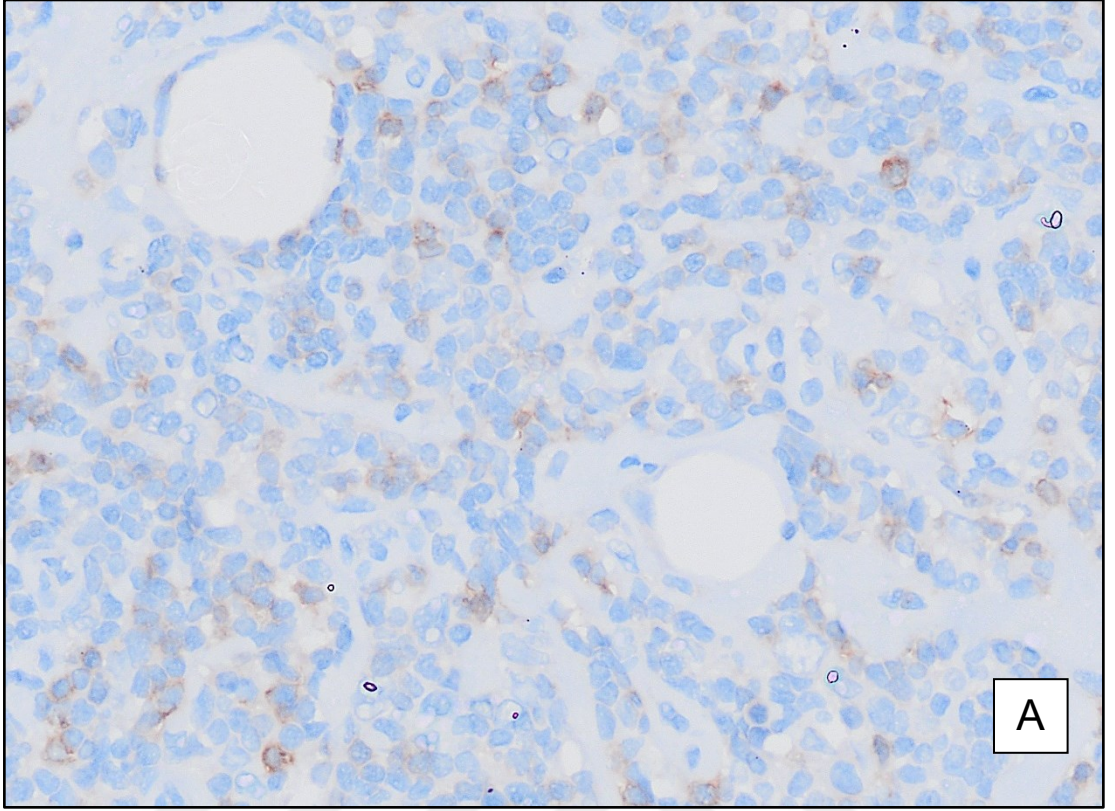
Resim 3: DBBHL'nin mikst varyantı (H&E, x400).



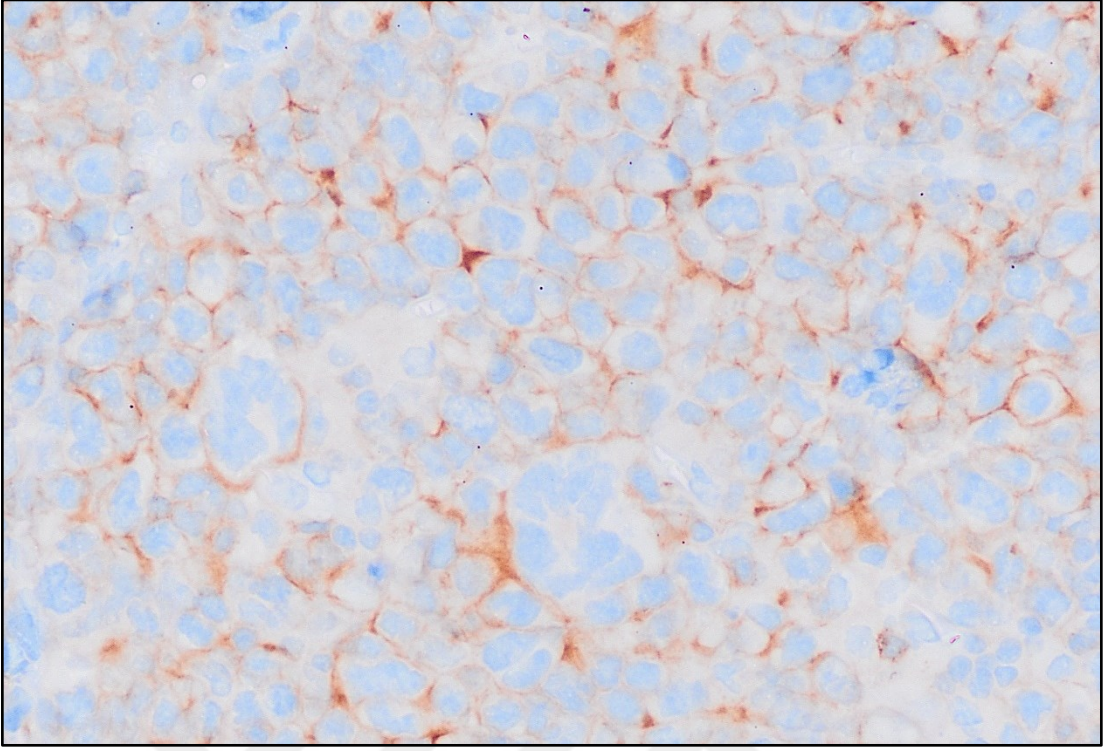
Resim 4: DBBHL'nin anaplastik varyantı (H&E, x400).



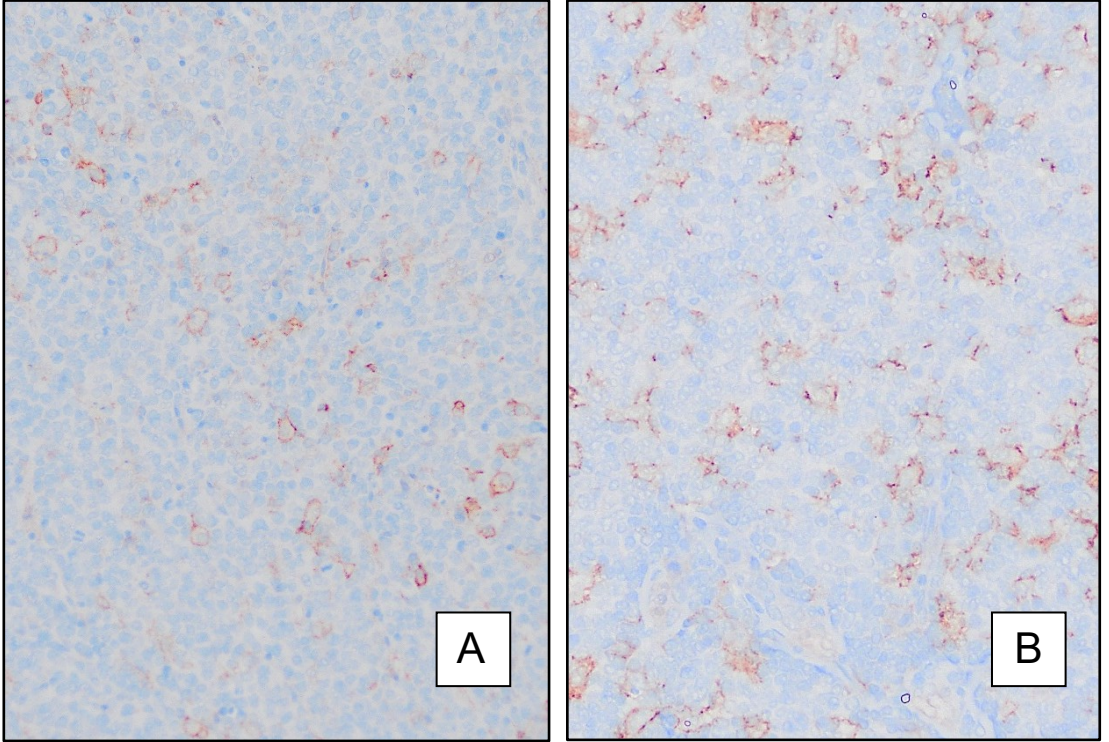
Resim 5: PD-1 ekspresyonları. **A.** Skor 1, **B.** Skor 2, **C.** Skor 3 (DAB, x400).



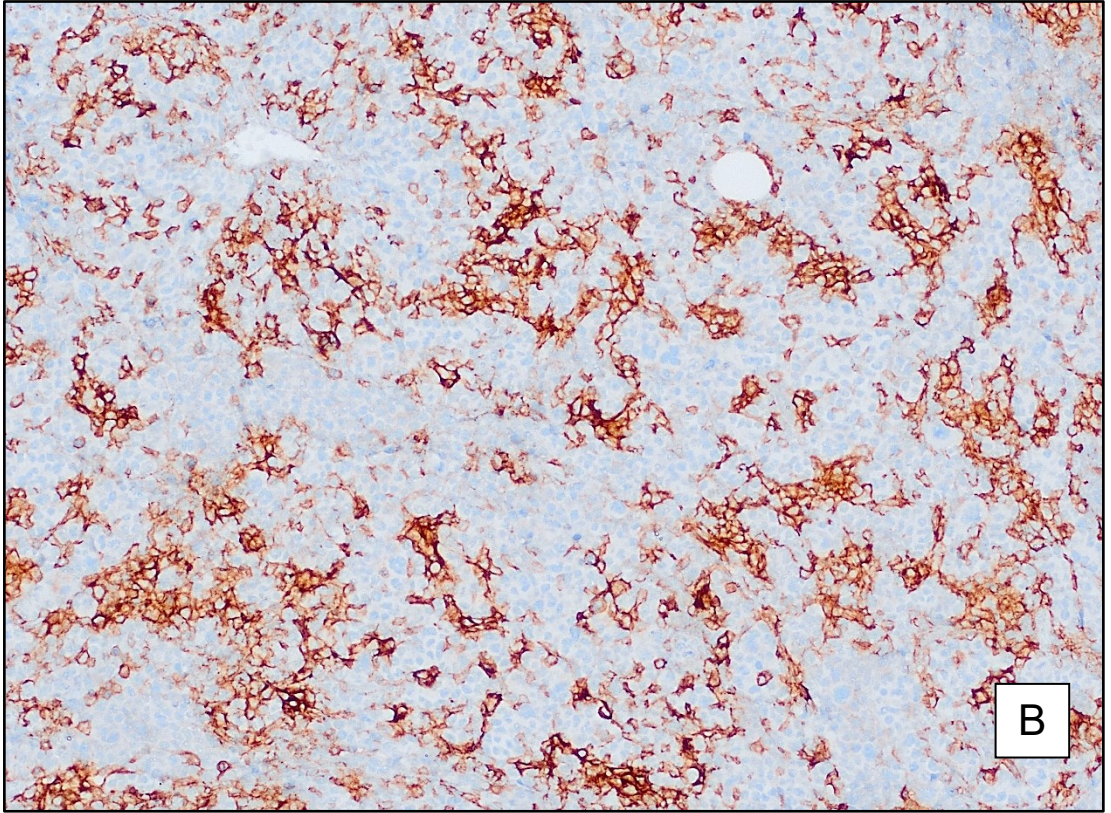
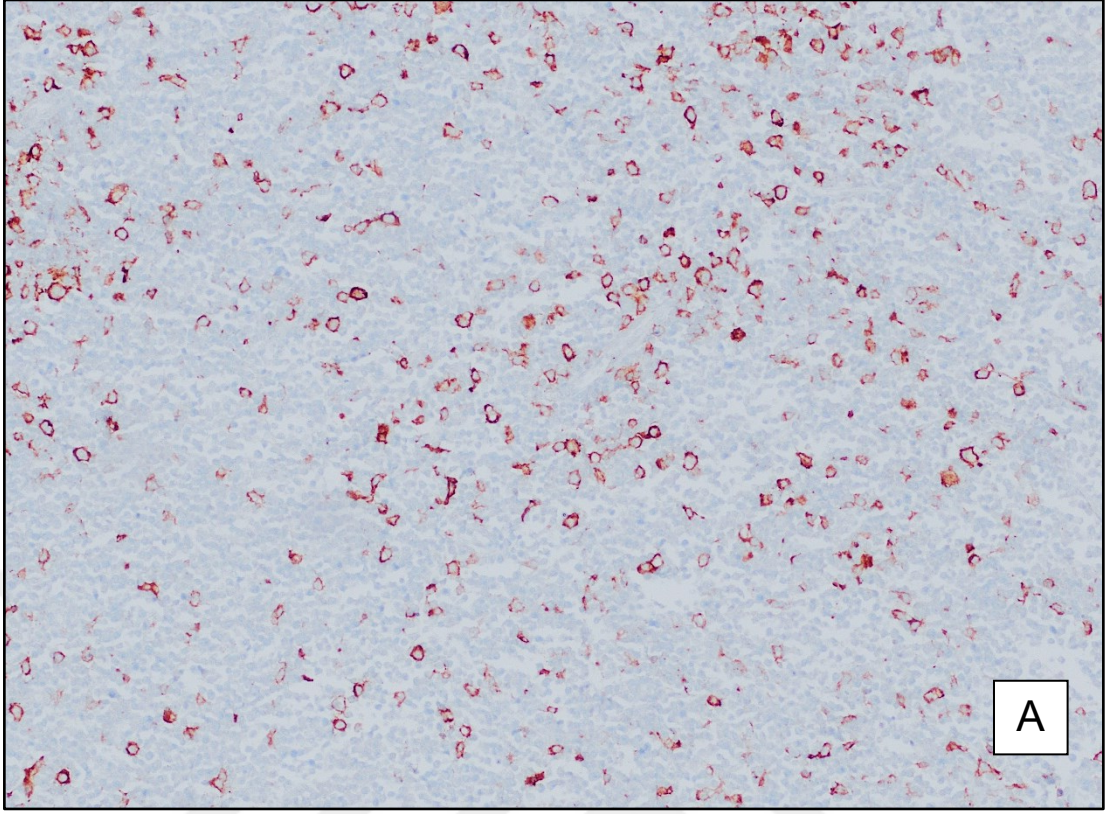
Resim 6: PD-1 ekspresyonları. **A.** Skor 4, **B.** Skor 5 (DAB, x400).



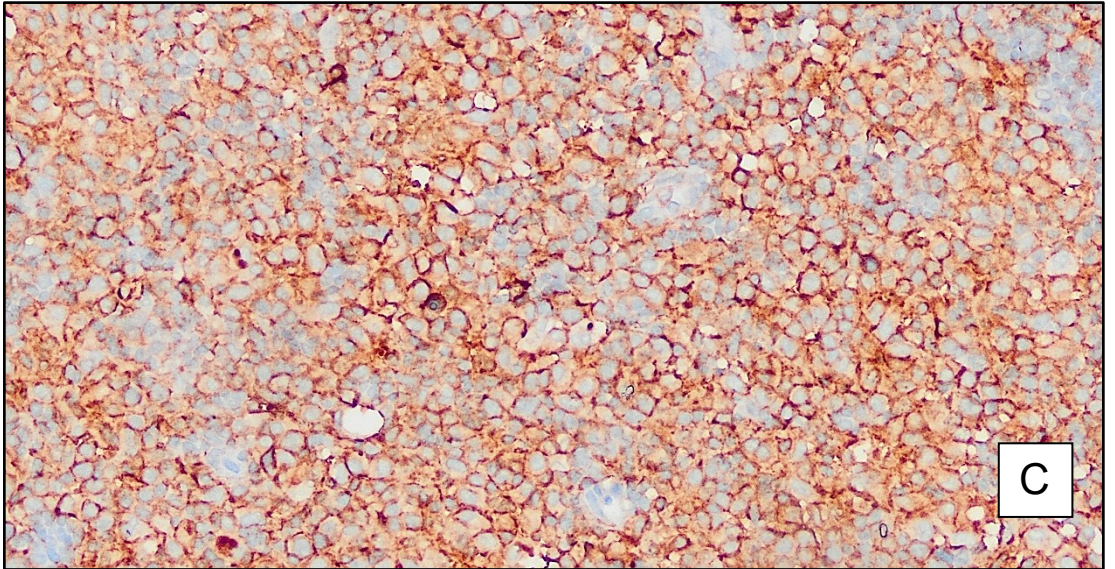
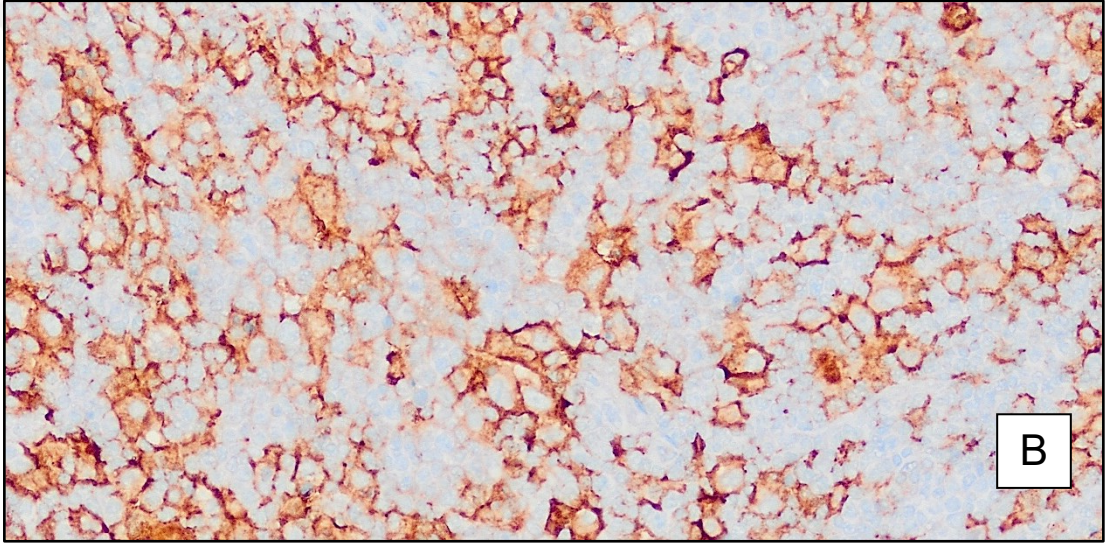
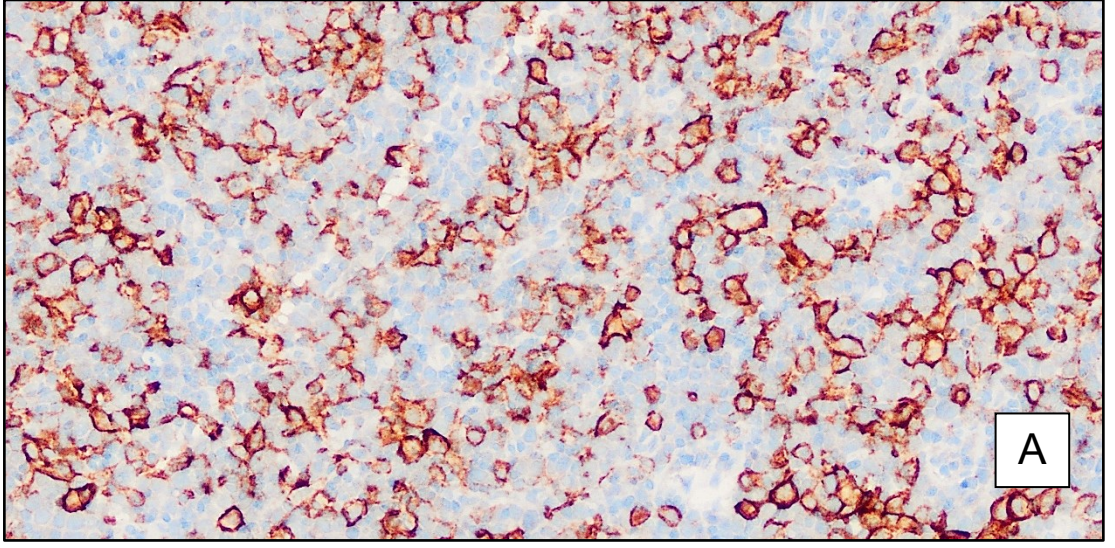
Resim 7: PD-1 ile tümörün boyandığı olgulardan örnek (DAB, x400).



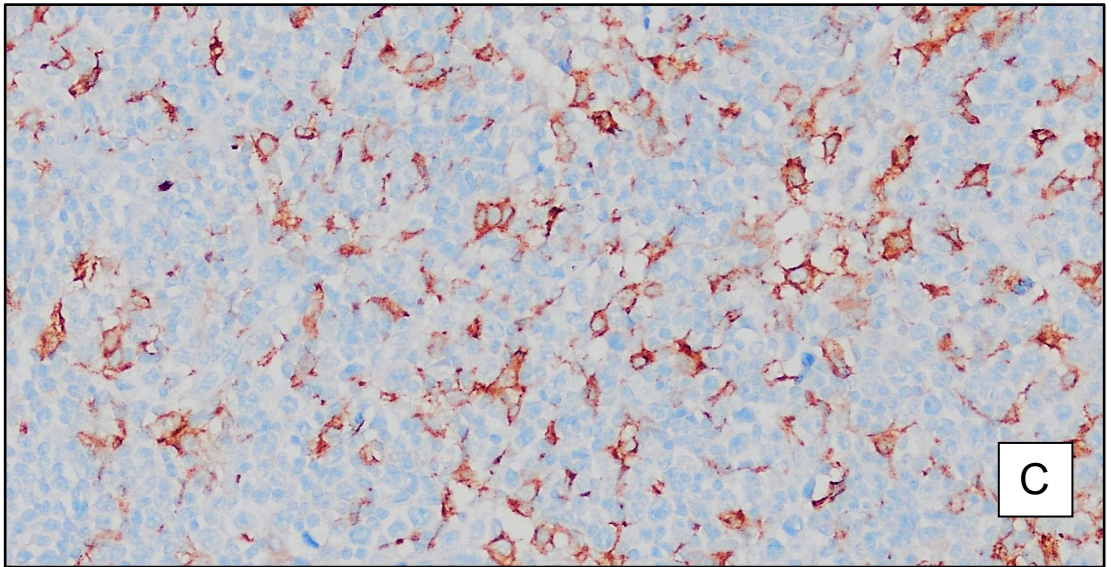
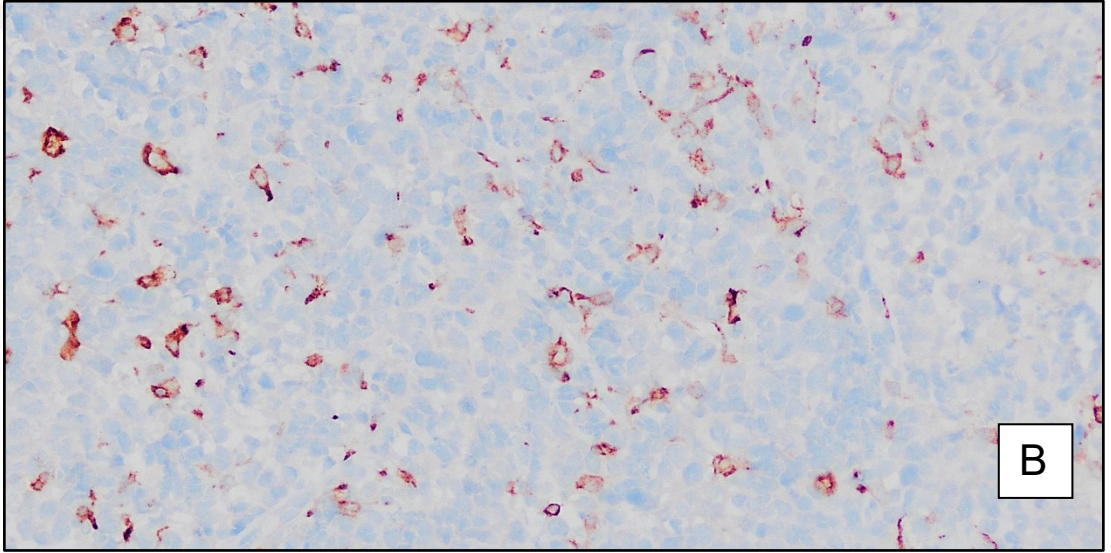
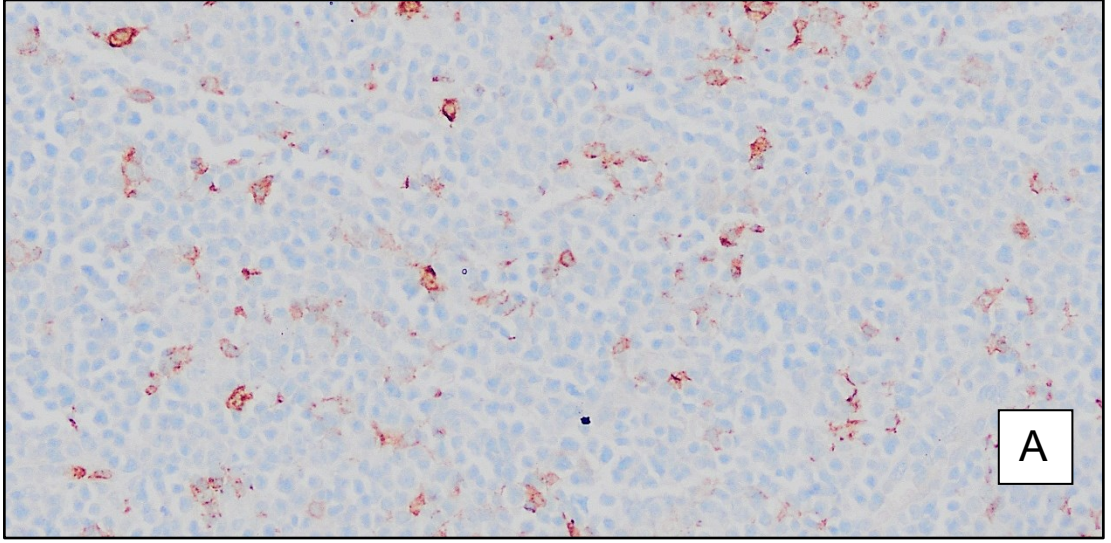
Resim 8: PD-L1 ekspresyonları. **A.** %5, **B.** %10 (DAB, x200)



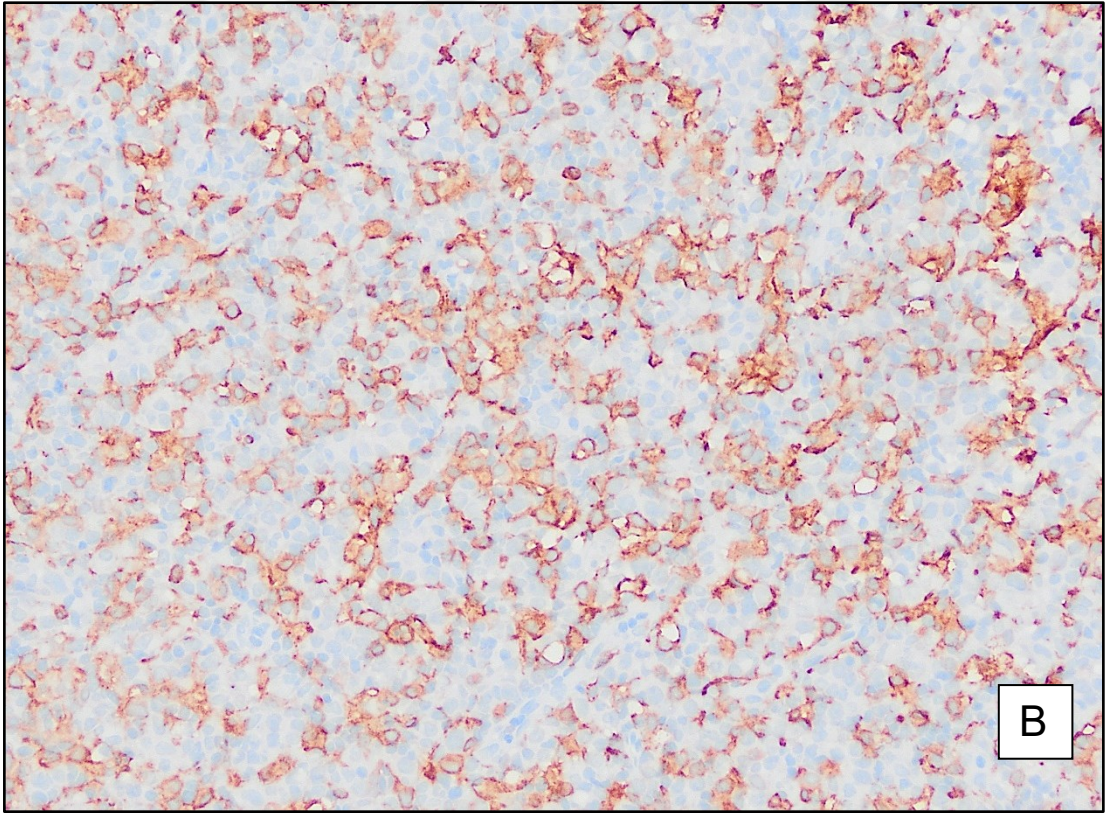
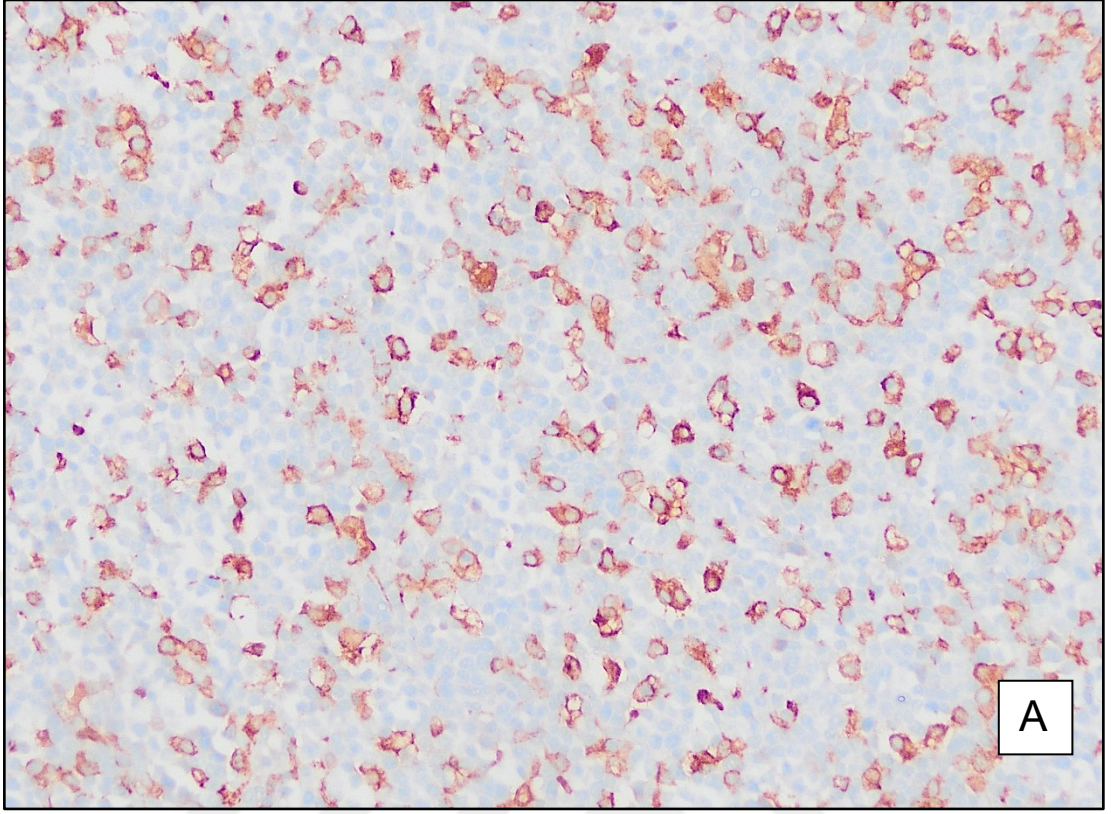
Resim 9: PD-L1 ekspresyonları. **A.** %15, **B.** %30 (DAB, x100).



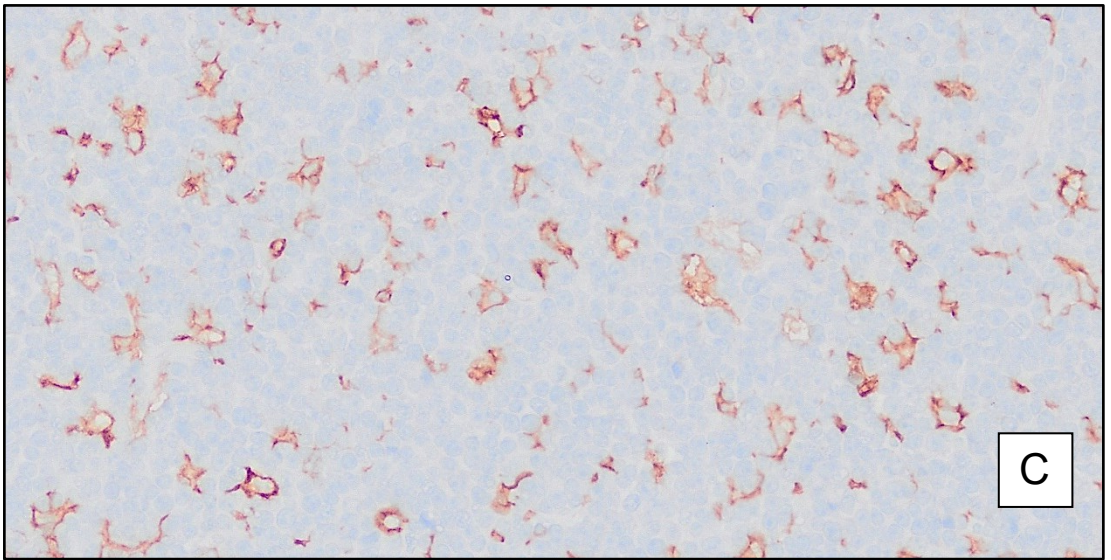
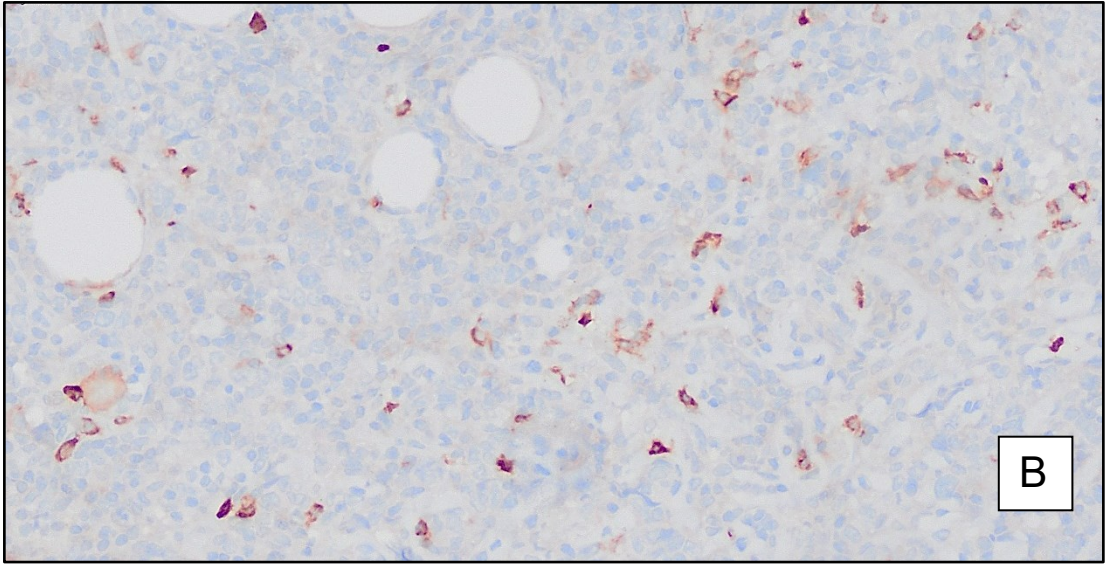
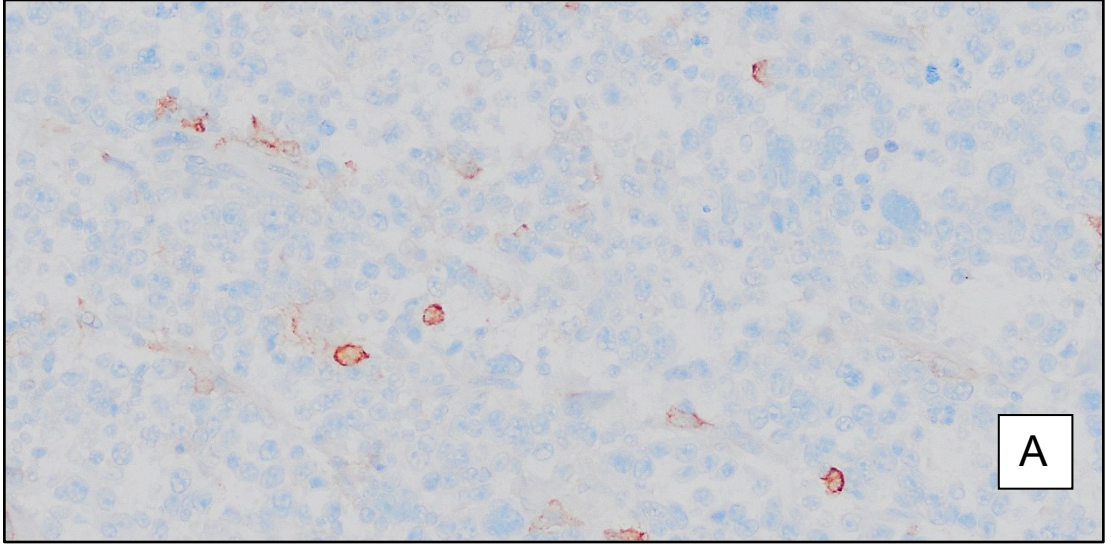
Resim 10: PD-L1 ekspresyonları. **A.** %60, **B.** %80, **C.** %100 (DAB, x200).



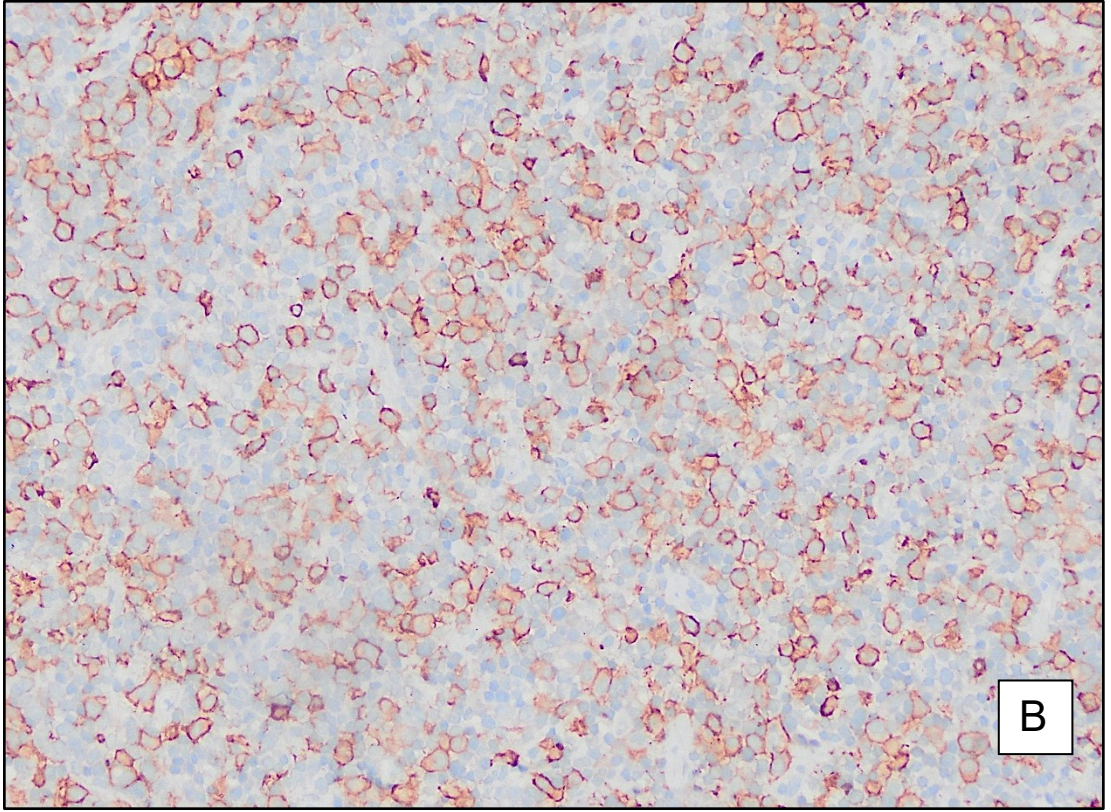
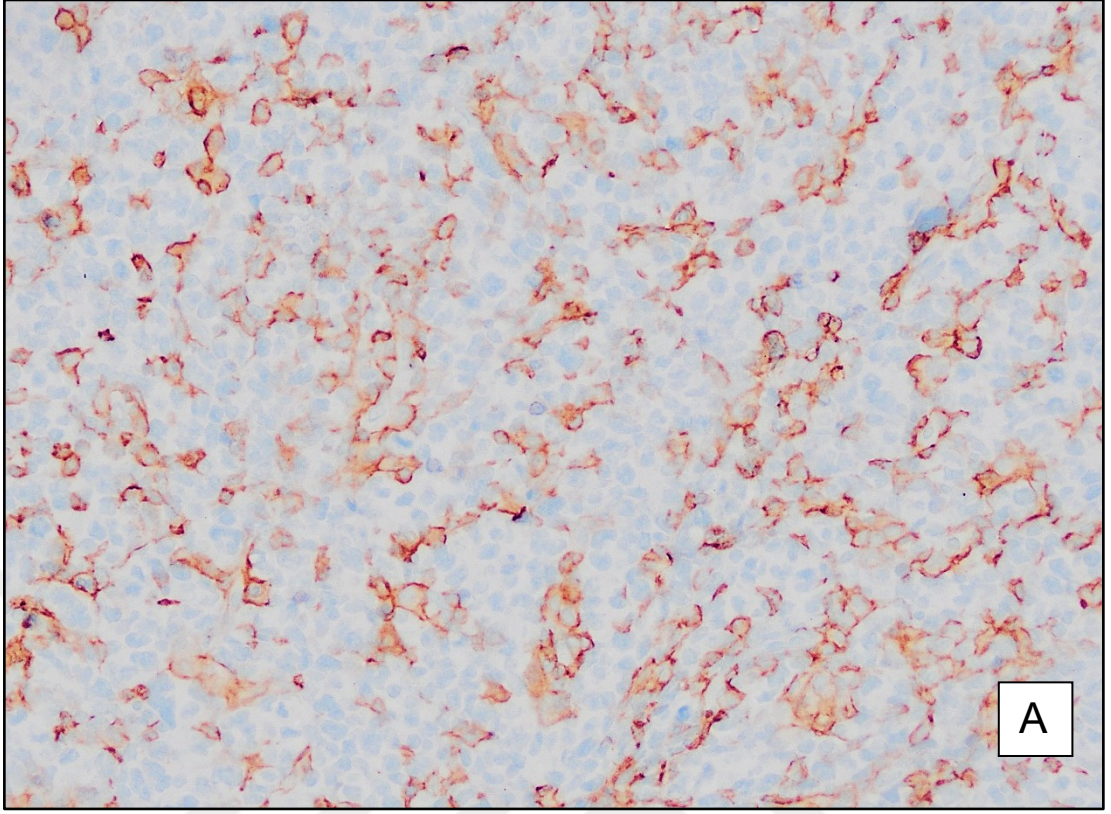
Resim 11: CD163 ekspresyonları. **A.** %5, **B.** %8, **C.** %15 (DAB, x200).



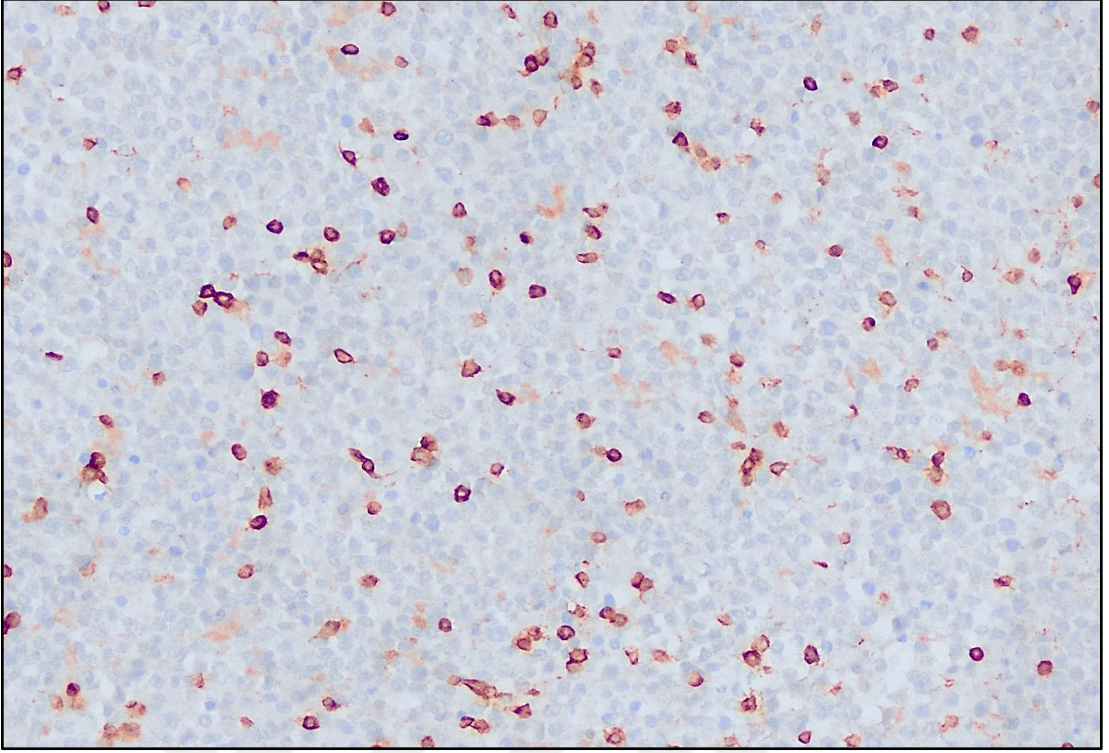
Resim 12: CD163 ekspresyonları. **A.** %20, **B.** %50 (DAB, x200).



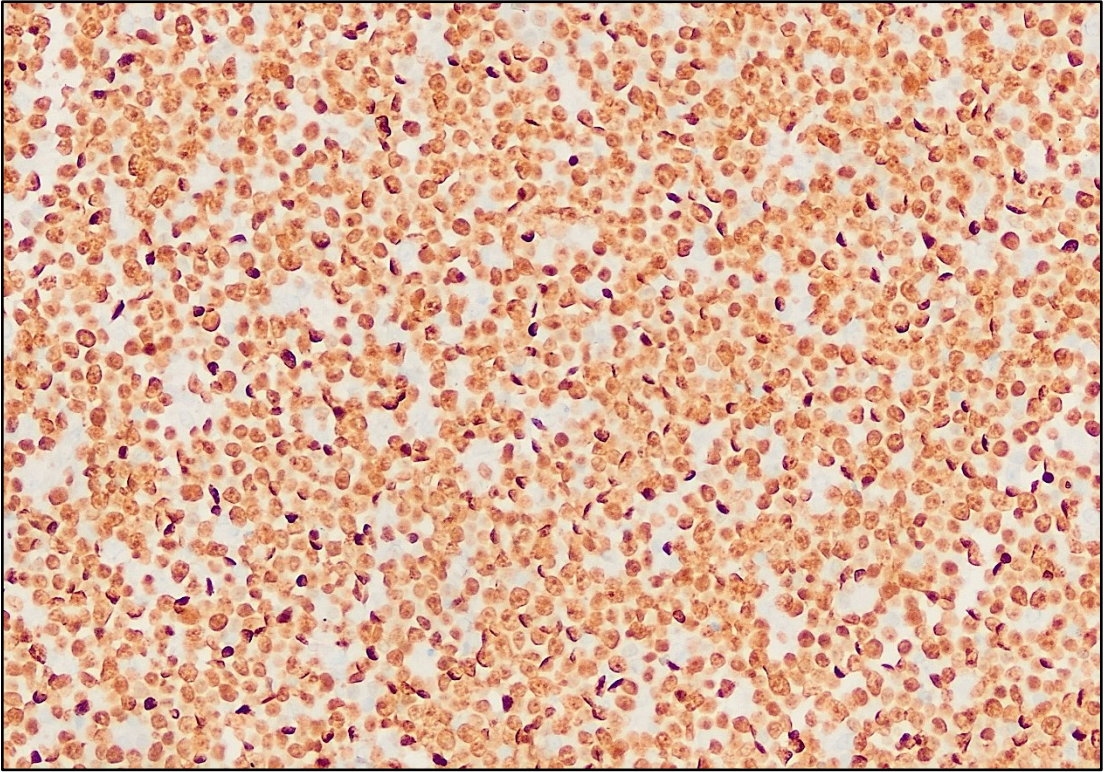
Resim 13: CD14 ekspresyonları. **A.** %2, **B.** %5, **C.** %10 (DAB, x200).



Resim 14: CD14 ekspresyonları. **A.** %25, **B.** %50 (DAB, x200).



Resim 15: CD3 ekspresyonu; %10 (DAB, x200).



Resim 16: Ki67 ekspresyonu; %100 (DAB, x200).

TARTIŞMA

Diffüz büyük B hücreli lenfomalar, non-Hodgkin lenfomaların en sık görülen histolojik alt tipidir ve yeni tanı alan lenfomaların yaklaşık %30-40'ını oluşturur (1, 2). Tüm yaşlarda görülebilmesine karşın yaşlılarda daha sıktır ve ortalama hasta yaşı 65 yaştır (16). Erkeklerde kadınlara göre hafifçe daha sıktır (17, 18). Farklı olarak çalışmamıza alınan 52 olgunun 31'i kadın (%59,6), 21'i erkektir (%40,4). Olguların yaşları 28 ile 89 arasında değişmekte olup ortalama değeri 64,5, ortalama değeri ise 59,4 olarak bulunmuştur.

DBBHL; klinik, morfolojik özellikleri, tedaviye yanıtları, prognoz ve sağ kalımları ile heterojen bir lenfoma grubudur (3). DBBHL'ler tipik olarak aylar içinde gelişen ve tedavi edilmediğinde ölümcül olabilecek semptomatik hastalığa neden olan agresif lenfomalardır (4). Agresif olmasına karşın potansiyel olarak multi-ajan kemoterapi ile tedavi edilebilir bir hastalıktır. CHOP kemoterapi rejimi yıllardır tedavinin dayanak noktası olmuştur. CHOP rejimine bir anti-CD20 antikoru olan rituksimab'ın eklenmesi ile yapılan tedavi çalışmalarında ise DBBHL hastalarının yaşam sürelerinin önemli ölçüde uzadığı tespit edilmiştir (147). Çalışmamızdaki klinik verilerine ulaşılabilen 44 olgu ele alındığında, 26 olguya (%59,1) rituksimab içeren R-CHOP ya da benzeri bir tedavi protokolü uygulandığı saptanmıştır. 10 olguya (%22,7) rituksimab içermeyen ve CHOP ve benzeri bir KT rejimi uygulanmıştır. 8 olguda (%18,2) ise düşük performans durumu ya da tedaviyi reddetme gibi nedenlerle KT uygulanmamıştır.

IPI skorum sistemi, DBBHL hastalarında prognozu öngörmede değerli bir prognostik araç olarak kabul edilmektedir ve yüksek IPI skoruna sahip olguların kısa sağ kalımla ilişkili olduğu bildirilmektedir (108). Çalışmamızda

yüksek IPI skorunun kısa genel sağ kalımla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, IPI skorum sisteminin parametrelerinden olan yaş, evre, ECOG performans skoru ve LDH ile genel sağ kalım arasında da istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır. Çalışmamız verilerine göre bir başka kısa sağ kalım göstergesi olan PD-1 ile yaş ve ECOG performans skoru arasında ise negatif korelasyon bulunmuştur.

DBBHL olgularında periferik kan monositleri, lenfosit/monosit oranı ve periferik kan lenfosit sayısının prognostik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Feng ve arkadaşlarının yapmış olduğu meta-analizde, düşük mutlak lenfosit sayısının kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (195). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da benzer şekilde düşük periferik kan lenfosit sayısının kısa genel sağ kalımla ilişkili olduğu bulunmuştur. Zhou ve arkadaşları lenfosit/monosit oranı 3,2'den düşük olan olguların daha kısa sağ kalıma sahip olduklarını saptamışlardır (196). Ancak literatürde lenfosit/monosit oranının prognostik etkilerini öngörebilmek için araştırmalarda kullanılan kesme değerleri arasında görüş birliği bulunmamaktadır. Tanı anındaki lenfosit/monosit oranının DBBHL'lerdeki klinik sonuçları öngören kesme değerleri 2,1 ile 3,8 arasında değişmektedir (196). Literatürde farklı kesme değerleri kullanılarak yapılan ve düşük lenfosit/monosit sayısının kötü prognostik faktör olduğu bildirilen çalışmalar bulunmaktadır (2, 197-199). Buna karşın çalışmamızda lenfosit/monosit oranı ile sağ kalım arasında ilişki saptanmamıştır.

DBBHL'lerde mutlak lenfosit sayısı $\geq 1,28 \times 10^9/L$ (2), mutlak monosit sayısı $< 0,575 \times 10^9/L$ (2), nötrofil/lenfosit oranı $< 2,81$ (2), platelet/lenfosit oranı < 150 (200), hemoglobin ≥ 12 g/dL (201), normal LDH düzeyi (199) olan olguların daha iyi genel sağ kalım ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda farklı kesme değerleri kullanılmış olsa da benzer şekilde düşük lenfosit sayısı, yüksek nötrofil/lenfosit oranı, yüksek platelet/lenfosit oranı, düşük hemoglobin ve yüksek LDH değerlerine sahip olguların düşük genel sağ kalım oranları gösterdikleri saptanmıştır. Ancak periferik kan monosit sayısı ile sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır.

Ochi ve arkadaşları, 391 DBBHL albümin <3,5 g/dL olan olguların düşük sağ kalımla ilişkili oldukları saptanmıştır (202). Yine albumin için de farklı kesme değeri belirlediğimiz çalışmamızda benzer şekilde albumin değerleri düşük olguların daha düşük genel sağ kalıma sahip oldukları saptanmıştır. Bairey ve arkadaşlarının çalışmasında, albumin ve hemoglobinin benzer şekilde sağ kalımla ilişkili olduğunu bildirmiş ve mutlak lenfosit ve monosit sayılarının ise sağ kalımla ilişkili olmadığı saptanmıştır (203). Bu çalışmada monosit sayısı ile sağ kalımın ilişkili olmaması, çalışmamızla benzer sonuçlar içermektedir.

Literatürde birçok çalışmada PD-L1 pozitifliğinin non-GCB subtipinde daha fazla görüldüğü bildirilmektedir (7, 204-206). Çalışmamızda da literatür bilgisine benzer şekilde non-GCB subtipinde PD-L1 boyanma oranlarının anlamlı şekilde daha fazla olduğu saptanmıştır. PD-L1 yanı sıra non-GCB subtipinde CD14 boyanma oranları da anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda, bekleneneği üzere, TİL'leri boyayan PD-1 ile CD3'ün pozitif korele olduğu; tümör mikroçevresinde temel olarak makrofajları boyayan PD-L1, CD163 ve CD14'ün de birbirleriyle pozitif korele oldukları görülmüştür. Shi ve arkadaşlarının çalışmasında da bizimkine benzer şekilde PD-L1, CD163 ve CD14 ile CD3 arasında pozitif korelasyon bulunmuştur (207). Bu çalışmada CD3 ile Ki67 arasında negatif korelasyon saptanmış olup bu sonuç da çalışmamız ile benzerdir. Çeşitli kanserlerde MYC ekspresyonu ile PD-L1 ekspresyonunun pozitif korele olduğu ve MYC'nin kanserlerde PD-L1 ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (208). Li ve arkadaşlarının çalışmasında, PD-1 (-)/CD3 (yüksek) olan gruptaki PD-L1 pozitif olguların yüksek MYC ekspresyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (209). Hu ve arkadaşlarının çalışmasında mikroçevrede PD-L1 pozitifliğinin MYC ekspresyonu ile negatif korelasyon gösterdiği saptanırken (206), Xing ve arkadaşlarının çalışmasında ise PD-L1 ile MYC arasında ilişki saptanmamıştır (205). Bizim çalışmamızda ise PD-L1 ile MYC arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Agarwal ve arkadaşları, MYC pozitif olguların daha yüksek (>%90) Ki67 proliferasyon indeksine sahip olduklarını bildirmiş

olup (210) bizim çalışmamızda da MYC ile Ki67 arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. MYC; hücre proliferasyonu, büyümesi, diferansiasyonu ve apoptozunda yer alan çok sayıda gen ürününün ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (208). Proliferatif aktiviteyi gösteren Ki67 ekspresyonu ile MYC'nin korele olmasının, MYC'nin hücre proliferasyonundaki bu rolü nedeniyle olabileceği düşünülmüştür. İmmunoblastik varyant olarak değerlendirilen olgularda diğer olgulara göre daha düşük Ki67 proliferasyon indeksi görülmüştür ve bu bulgu Ott ve arkadaşlarının çalışması ile uyumludur (49). Ott ve arkadaşlarının çalışmasında immunoblastik varyantın kötü prognozla ilişkili olduğu ancak bu olguların düşük Ki67 proliferasyon indeksine sahip olduğu saptanmıştır (49). Çalışmamızda immunoblastik varyantta düşük Ki67 ekspresyon oranları gözlenmiş ancak morfolojik varyantlar arasında sağ kalım açısından fark saptanmamıştır.

İmmun kontrol noktaları, immün yanıtın normal olarak işleminde önemli bir rol oynasa da aynı zamanda tümörler için immün sistemden kaçış mekanizması sağlar. Tümör hücreleri, kontrol noktası reseptörlerinin ligandlarını aşırı eksprese ederek T hücrelerinin tepki vermemesini sağlayarak ya da T hücrelerini tükenme durumuna getirerek immün sistemden kaçabilirler (8, 178). Bu yolların immün kontrol noktası inhibisyonu ile terapötik manipülasyonu, T hücre anerjisini tersine çevirerek etkin bir T hücre aracılı antitümör yanıtı oluşturur (8). İmmün sistemden kaçışın anlaşılması ile son yıllarda, hematolojik maligniteler yanı sıra birçok solid tümörde kontrol noktası ilişkili moleküllerin prognoza etkisinin araştırıldığı çalışmalar yapılmaktadır. Bu yolların çeşitli bölgelerini hedef alarak tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışını önlemek amacıyla terapötik monoklonal antikorlar geliştirilmektedir (175). Literatürde DBBHL'lerde tümör mikroçevresinin ve kontrol noktası blokajı ilişkili moleküllerin prognozla ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda çelişkili bilgiler bulunmaktadır.

Çalışmamızda bir BBA'da ortalama 5'in altında PD-1 pozitif hücre içeren olguların BBA'da 5 ve üzerinde PD-1 pozitif hücre içeren olgularla

kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük genel sağ kalım verilerine sahip olduğu saptanmıştır. Bu bulgu literatürdeki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, PD-1 pozitifliğinin diğer çalışmalarda da sağ kalım üzerindeki etkisinin benzer olduğu görülmüştür. Buna karşın çalışmalarda PD-1 için farklı kesme değerleri kullanılmaktadır. Ahearne ve arkadaşlarının çalışmasında, 70 DBBHL olgusu incelenmiş ve yüksek PD-1 pozitifliği içeren olguların daha iyi klinik gidişe sahip olduğu bildirilmiştir (211). Kwon ve arkadaşları DBBHL tanısı alan 126 olguda PD-1 pozitifliğini 0: BBA'da pozitif hücre yok, 1: <10 pozitif hücre/BBA, 2: 10-30 pozitif hücre/BBA, 3: >30 pozitif hücre/BBA şeklinde skorlamıştır. Olguların %68,6'sında TİL'de değişen skorlarda (skor 1-3) PD-1 pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışma sonucunda PD-1 pozitif olguların (skor 1-3) daha iyi prognoza sahip olduğu, PD-1 pozitifliğinin bağımsız prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (182). Yetmiş altı DBBHL olgusunun incelendiği Fang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da benzer bir skorlama kullanılmış ve benzer şekilde PD-1 (+) TİL'ler uzamış sağ kalımla ilişkili bulunmuştur (212). Wang ve arkadaşları ise 355 DBBHL olgusundan oluşan hasta grubunda PD-1 (+) TİL sayısı için 4,5/BBA kesme değerini belirlemiş ve PD-1 (+) TİL sayısı <4,5/BBA saptanan olguların kötü prognoza sahip olduklarını bildirmiştir. (2).

Li ve arkadaşlarının yapmış olduğu yakın tarihli araştırmada, 414 DBBHL olgusunda otomatik kantitatif immunfloresan analiz yöntemiyle CD3, PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları incelenmiştir. Düşük T hücre sellülaritesinin, DBBHL'de olumsuz prognostik etkisinin olduğu saptanmıştır. Ayrıca PD-L1 ekspresyonu ve T hücresi türevli PD-1 ekspresyonunun yalnızca yüksek T hücre infiltrasyonu olan hastalarda önemli olumsuz etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmada dokudaki PD-1/PD-L1 etkileşiminin esas olduğu belirtilmektedir (209).

Ayrıca Kwon ve arkadaşlarının çalışmasında iki olguda tümör hücrelerinde de PD-1 pozitifliği saptanmıştır (182). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da olgulardan ikisinde TİL'lere ek olarak tümör hücrelerinde odaksal boyanmalar saptanmıştır. İlginç olarak PD-1 ile boyanan iki olgu da anaplastik varyant

morfolojisinde olmakla birlikte anaplastik varyant morfolojisindeki diğer 6 olguda tümör hücrelerinde PD-1 boyanması görülmemiştir.

Literatürde, PD-L1 boyanmasının prognostik önemi ve pozitiflik için belirlenen kesme değerleri yanı sıra boyama yöntemleri konusunda da farklı bilgiler bulunmaktadır. Çalışmalarda genel olarak PD-L1 boyanması için tümör hücrelerindeki pozitiflik ve mikroçevredeki pozitiflik olarak birbirinden ayrı şekilde yüzdeler verilerek analizler yapılmıştır. Bu çalışmaların bir bölümünde, tümör hücrelerinin pozitifliğini belirlemek için PD-L1 ile birlikte bir B hücre belirteci olan PAX5 immunohistokimyasal boyasını da kullanarak ikili boyama yapılmıştır (7). Buna karşın bir grup çalışmada (182, 204-207, 212) ise bizim çalışmamızda da olduğu gibi ikili boyama yapmadan, yalnızca PD-L1 immunohistokimyasal boyası uygulanarak değerlendirme yapılmıştır. Olgu grubumuzda PD-L1 boyanmaları değerlendirildiğinde, PD-L1 ile bazı olgularda sadece tümör mikroçevresinde boyanma saptanırken bazı olgularda mikroçevredeki boyanmalara ek olarak seyrek tümör hücrelerinin de PD-L1 pozitif olduğu gözlenmiştir. İkili boyama yapılmadığı için büyük hücre boyanmalarının histiosit mi yoksa tümör hücresi mi olduğu çoğu olguda net ayırt edilemediğinden ve seyrek tümör hücresi boyandığından, diğer çalışmalardan farklı olarak, boyanan hücrelerin hangi hücre olduğuna dikkat edilmeksizin değerlendirme pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranı verilerek yapılmıştır.

Kwon ve arkadaşlarının 126 olguluk serilerinde, tümör hücreleri ve/veya tümörü infiltrate eden immun hücrelerde PD-L1 ekspresyonu değerlendirilmiştir. PD-L1 ile %10'dan fazla hücrede boyanma olan olgular boyanma şiddetine göre 1: zayıf, 2: orta, 3: güçlü olarak gruplanmıştır. Olguların %91,3'ünde tümör hücresi ve/veya makrofajlarda değişen skorlarda (skor 1-3) PD-L1 boyanması saptanmıştır. PD-L1 pozitifliği (tümör hücrelerinde ya da tümör hücreleri/makrofajlarda) ile prognoz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (182). Bizim çalışmamızda da PD-L1 pozitifliğinin sağ kalımla ilişkili olmadığı saptanmıştır.

PD-L1 pozitifliğinin sağ kalımla ilişkili olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur. Kiyasu ve arkadaşlarına ait çalışmada 273 DBBHL olgusunda

tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği için %30 kesme değeri olarak belirlenmiş, tümör hücrelerinin %30 veya fazlasındaki pozitiflik PD-L1 (+) olarak kabul edilmiştir. Bu çalışmada tümör hücrelerindeki boyanmayı saptamak için PD-L1 ve PAX5 ile ikili boyama yapılmıştır. PD-L1 (-) (tümör hücrelerinde %30'dan az boyanma) olgular ise mikroçevredeki boyanma oranına göre mikroçevrede PD-L1 pozitif ($\geq$ %20) ya da negatif ($<$ %20) olarak iki gruba ayrılmıştır. Tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu, PD-L1'in DBBHL'de bağımsız prognostik faktör olduğu bildirilmiştir. Mikroçevrede PD-L1 pozitifliği ile negatifliği arasında ise anlamlı bir fark saptanmamıştır. (7). Bizim çalışmamızda ikili boyama yapılmamış olması nedeniyle, tümör hücre boyanması az olsa da histiositlerdeki boyanma ile karışıklık olabileceğinden tümör ve mikroçevredeki pozitiflik oranları ayrı ayrı belirlenememiş ve sağ kalımla ilişki saptanmamıştır. Ancak Kiyasu ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi ikili boyama yönteminin başka çalışmalarla desteklenebileceği öngörülmüştür.

Shi ve arkadaşlarının DBBHL tanılı 125 olguluk serilerinde, %30'un üzerinde tümör hücresinde orta (2+) ve güçlü (3+) yoğunlukta PD-L1 boyanması olan olgular, tümörde PD-L1 pozitifliği olarak kabul edilmiştir. Mikroçevrede PD-L1 pozitifliği için ise %20 kesme değeri belirlenmiştir. Sonuçta, tümörde PD-L1 pozitifliği uzun progresyonsuz sağ kalım ile ilişkili bulunmuş ancak PD-L1 pozitifliği ile genel sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (207). Bu çalışmada da bizim çalışmamızdaki gibi ikili boyama yöntemi kullanılmamış ve genel sağ kalımla PD-L1 pozitifliği arasında ilişki saptanmamıştır.

Dong ve arkadaşlarına ait, 100 DBBHL olgusunun ele alındığı çalışmada tümör hücrelerinin %5 ya da daha fazlasında (2+) ve (3+) yoğunlukta boyanmanın olduğu olgular tümör PD-L1 pozitifliği olarak kabul edilirken tümör ve/veya mikroçevrede %20 ve üstünde (2+) ve (3+) yoğunlukta boyanmalar mikroçevre PD-L1 pozitifliği olarak kabul edilmiştir. Bu çalışma sonucunda tümörde PD-L1 pozitifliği olan olguların daha kötü prognoza sahip oldukları saptanmıştır (204). Xing ve arkadaşları da DBBHL, NOS tanılı olgularda tümör hücrelerinde %30'un üstünde (2+) ve (3+) membranöz

boyanma olan olguları PD-L1 pozitif olarak değerlendirmiş ve yine PD-L1 pozitif grubun daha kötü gidişle ilişkili olduğunu saptamışlardır (205).

Yetmiş altı DBBHL olgusunun incelendiği Fang ve arkadaşlarının çalışmasında, tümör hücrelerinde PD-L1 ile %10'un altında boyanma olan olgular negatif, %10 üzerinde boyanma gözlenen olgular ise pozitif olarak kabul edilmiştir. Boyanma şiddeti de ayrıca önceki çalışmalara benzer şekilde (skor 1-3) skorlanmıştır. Çalışmada mikroçevredeki PD-L1 pozitiflik oranları da değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda tümör hücrelerindeki PD-L1 pozitifliği kötü klinik seyir ile ilişkili bulunmuştur (212).

Hu ve arkadaşları DBBHL tanılı 204 hastada yaptıkları araştırmalarında tümör hücrelerinde PD-L1 pozitifliği için %5, mikroçevrede PD-L1 pozitifliği için ise %20 kesme değeri kullanılmıştır. Bu çalışmada da tümör hücrelerindeki PD-L1 pozitifliğinin daha kısa genel sağ kalımla ilişkili olduğu ve tümör hücrelerindeki PD-L1 ekspresyonunun bağımsız prognostik faktör olduğu saptanmıştır (206).

Kiyasu ve arkadaşlarının çalışmasında PD-1 (+) TİL sayısı ile tümörde ve tümörü infiltre eden non-malign stromal hücrelerdeki PD-L1 pozitifliği ters yönde korele bulunmuştur (7). Bizim çalışmamızda PD-1 ile PD-L1 arasında ilişki saptanmamıştır.

Makrofajlar ve özellikle de M2 makrofajların prognostik etkileri nedeniyle, çalışmamızda, tümör mikroçevresindeki monosit-makrofajları araştırmak ve bunların prognostik etkilerini ortaya koymak bir diğer amaç olarak belirlenmiştir. Bu amaçla CD14 ve TAM profiline yakın olan M2 makrofajlarda eksprese edilen CD163 belirteçleri olgulara uygulanmıştır. DBBHL olgularında CD163 pozitifliği için farklı kesme değerleri kullanılmış olsa da yüksek pozitiflik oranlarına sahip olguların kötü klinik seyir ve sağ kalım verilerine sahip olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda ise farklı kesme değerleri ile analiz yapılmasına rağmen CD163 ile sağ kalım arasında ilişki saptanmamıştır.

Wang ve arkadaşları 355 DBBHL olgusunda, CD163 (+) M2 TAM oranı $\geq$ %9,5 saptanan olguların kötü prognoza sahip olduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca periferik kan monosit sayısı ile tümör dokusundaki CD163

(+) hücre skorları arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır. (2). Çalışmamızda CD163 ile periferik kan monosit sayısı arasında korelasyon saptanmamış olmakla birlikte CD163 ile CD14 boyanmalarının korele olduğu görülmüştür.

Wada ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 101 DBBHL olgusu incelenmiş, bu tümörlere M1 TAM'lar için HLA-DR/CD68, M2 TAM'lar için ise CD163/CD68 ikili boyaları çalışılmıştır. Her olguda 0,146 mm²'lik 4 alan seçilerek ikili pozitif hücre sayıları hesaplanmış, M1 ve M2 makrofajlar için ortalama değerler olan 30,7 ve 27,0 sayıları kesme değerleri olarak belirlenmiştir. Total TAM'lar için ise 90. persantile denk gelen 132,3 kesme değeri olarak belirlenmiştir. Olgular M1, M2 ve total TAM sayılarına göre yüksek ve düşük olarak gruplara ayrıldığında, M2 ve total TAM sayısı yüksek olan olguların daha kötü prognozlu olduğu saptanmıştır. M1 TAM sayısı ile prognoz arasında ise ilişki bulunmamıştır. Bu sonuçlarla M2 makrofajların bağımsız kötü prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (165).

Marchesi ve arkadaşlarının 61 DBBHL olgusunda immunfloresan inceleme yöntemi ile yaptıkları araştırma sonucunda tanı anında CD68/CD163 pozitif M2 makrofajların yüksek yoğunlukta bulunmasının kötü prognostik faktör olduğu saptanmıştır (213).

Matsuki ve arkadaşları 142 DBBHL tanılı hastada yaptıkları çalışmada, CD163 pozitif hücre sayısının fazla olması, sadece rituksimab içermeyen rejimlerle tedavi edilen hastalarda düşük genel sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur. Ancak bu ilişki rituksimab ile tedavi edilen hastalarda gözlenmemiştir (214). Farklı olarak Nam ve arkadaşlarının çalışmasında, hem R-CHOP ile tedavi edilen 109 DBBHL olgusunda, hem de CHOP rejimi ile tedavi edilen 51 DBBHL olgusunda yüksek CD163 pozitifliğinin düşük sağ kalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (168). Bizim çalışmamızda ise CHOP ya da R-CHOP tedavisi alan hastalar kendi aralarında değerlendirildiğinde de CD163 ile sağ kalım arasında ilişki saptanmamıştır.

Shen ve arkadaşlarının 139 DBBHL olgusunu dahil ettikleri çalışmalarında, CD163 pozitif M2 TAM oranı ile DBBHL için bilinen prognostik faktörler arasındaki korelasyonlar değerlendirilmiştir. CD163

pozitif M2 TAM'ların oranlarının evre ve IPI ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Sonuçta, DBBHL'de CD163 pozitif M2 TAM'ların yoğunluğunun potansiyel bir prognostik indeks olduğu bildirilmektedir (215). Buna karşın bizim çalışmamıza göre, bilinen klinik ve laboratuvar prognostik verilerle de CD163 arasında korelasyon bulunmamıştır.

CD14, monositler, makrofajların bir kısmı ve Langerhans hücrelerinin de dahil olduğu myelomonositik seri hücrelerinde eksprese edilir (216). DBBHL ve splenik marjinal zon lenfomalarda yoğun CD14 (+) hücrelerinin bulunabildiği bildirilmektedir. Ayrıca çeşitli araştırmalar sonucunda monositlerin/CD14 (+) hücrelerin ya da dendritik hücrelerin, B hücresi farklılaşması, B hücresi çoğalması ve malign B hücrelerinin hayatta kalması için yararlı etkileri gösterilmiştir (217). Mueller ve arkadaşlarının çalışmasında, B hücreleri ile birlikte monositlerin periferik kandan veya DBBHL'den kültürlenmesinin B hücrelerinin uzun süre hayatta kalımına olanak sağladığı bildirilmiştir (217).

Marmey ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 15 reaktif lenf nodu ve dalak dokusu yanı sıra 56 B hücreli lenfoma incelenmiştir. Bu lenfomalardan 12'sinin DBBHL olduğu bildirilmektedir. Çalışmada CD14(+)/CD169(-) monosit kökenli hücrelerin diğer lenfomalara göre DBBHL'lerde belirgin şekilde fazla bulunduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, DBBHL olguları arasında CD14 popülasyonunda belirgin bir heterojenite olduğu belirtilmiştir. Olgulardan 6'sında CD68 (+) hücrelerinin çoğu CD14'ü eksprese etse de diğer 6 olguda, CD68 (+) hücrelerin çoğu CD14 (-) olarak bulunmuştur. Daha az sayıda CD14 (+) hücre bulunan 3 olguda Ki-67 proliferasyon indeksi %80 ve üzerinde iken, yüksek sayıda CD14 (+) hücre içeren olgularda, Ki-67 proliferasyon indeksi %50 dolayında ve daha düşük olarak saptanmıştır. CD14/CD68 profili ile GCB ya da non-GCB subtipleri arasında ilişki bulunamamıştır (193). Bizim çalışmamızda ise Ki67 ile CD14 arasında ilişki saptanmamıştır. CD14 pozitifliğinin non-GCB subtipinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek oranlarda bulunduğu gözlenmiştir.

Khalifa ve arkadaşlarının çalışmasında, 42 B hücreli NHL olgusu ile 20 sağlıklı gönüllüde akım sitometrisi yöntemi ile periferik kandaki monositler karşılaştırılmıştır. HLA-DR ekspresyonunu kaybeden, CD14 (+) monositlerin, yüksek evre hastalığı olan, daha agresif seyirli ve tedaviye yanıtızsız hastalarda artmış olduğu saptanmıştır (218).

Lin ve arkadaşları, 40 NHL ve 27 sağlıklı gönüllüde yaptıkları araştırmaları sonucunda NHL olgularında monositlerin HLA-DR ekspresyonunun azaldığı ve CD14(+)/HLA-DR(-/düşük) monosit sayısının artmış olduğu olguların daha agresif hastalıkla ve immunsupresyonla karakterize olduğu saptanmıştır. Bu çalışmadaki NHL olgularından 18'i DBBHL tanılı olgular olarak belirtilmiştir. NHL olguları ile sağlıklı kontrol grubu arasında periferik kan monositlerinin sayısında anlamlı bir farklılık olmamasına karşın NHL olgularındaki CD14 (+) monositlerin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış HLA-DR ekspresyonu ile karakterize olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada DBBHL'lerdeki CD14(+)/HLA-DR(-/düşük) monositlerin oranı, diğer indolent lenfomalara göre daha yüksek olarak bulunmuştur (219). Çalışmamızda ise CD14 pozitifliği için farklı kesme değerleriyle yapılan sağ kalım analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç saptanmamıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

DBBHL'lerde yeni prognostik faktörler belirlemeye ve hedef tedavi yöntemleri geliştirmeye yönelik yapılan çalışmalar son yıllarda oldukça artmıştır. Bu çalışmalar arasında kontrol noktası ilişkili moleküller ve tümör mikroçevresini konu alanlar önemli bir yere sahiptir. Kontrol noktası ilişkili moleküllerden olan PD-1, PD-L1 ve CTLA-4'ün DBBHL'lerde prognostik önemi yanı sıra tümör mikroçevresindeki TAM'ların prognoza etkisi de araştırmalara konu olmaktadır. Hastaların klinik seyrini öngörmek dışında, pek çok tümörde, özellikle de tedaviye dirençli olgularda, bu moleküllerin inhibisyonu yeni tedavi hedeflerinde öne çıkmaktadır.

Çalışmamızda toplam 52 nodal DBBHL, NOS olgusunda PD-1, PD-L1, CD163 ve CD14 ekspresyonları immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmiştir. Bu belirteçlerin birbirleri ile korelasyonu yanı sıra klinik ve laboratuvar prognostik verilerine ve sağ kalım bilgilerine ulaşılabilen 44 olguda, elde edilen bu verilerle immunohistokimyasal belirteçler arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Çalışmamızın başında planlanan, ancak çok sayıda deneme sonucunda sağlıklı boyanma elde edilemeyen CTLA-4 immunohistokimyasal boyası ise değerlendirilememiş ve çalışma dışı bırakılmıştır.

Çalışmamız sonucunda tümör dokusu içerisinde PD-1 pozitif TİL sayısı <5/BBA olan olguların istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha düşük genel sağ kalıma sahip oldukları gözlenmiştir. PD-L1, CD163 ve CD14 ile sağ kalım arasında ise anlamlı ilişki saptanmamıştır. PD-L1 ve CD14 boyanma oranlarının non-GCB subtipinde GCB subtipine göre daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca, >60 yaş, ECOG performans skoru ≥ 2 , evre IV hastalık, yüksek IPI skoru (3-4-5), LDH yüksekliği, albumin $\leq 3,95$ g/dL, hemoglobin <12 g/dL, periferik kan lenfosit sayısı <1470/ μ L, periferik kan NL oranı >2,31,

periferik kan PL oranı >180 , MYC ≥ 40 olan olguların genel sağ kalımlarının da anlamlı şekilde daha düşük olduğu saptanmıştır.

PD-1 ve CD3 ile PD-L1, CD163 ve CD14 boyanmaları arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Bu belirteçlerin boyadıkları hücreler göz önüne alındığında bu korelasyonlar şaşırtıcı değildir. Ancak ilginç olarak PD-1 ve PD-L1 boyanmaları arasında korelasyon saptanmamıştır.

Literatürde, PD-L1, CD163 ve CD14 ekspresyonları için çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Bu sonuçlara, çalışmalarda kullanılan farklı yöntemlerin ve farklı kesme değerlerinin belirlenmesinin neden olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızın sonuçları, özellikle de PD-L1, CD163 ve CD14 ekspresyonları literatürdeki yayınlarla karşılaştırıldığında, farklı sonuçların gözlenmesi nedeniyle ortak görüşlerin oluşabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızdaki olgu sayısı düşük olsa da klinik verilerine ulaşılabilen yaşayan olgularda ortalama takip süresi 54,7 aydır. Buna karşın gerek bizim çalışmamızda gerekse diğer yayınlarda, DBBHL'nin heterojen bir lenfoma grubu olması nedeniyle olgu grupları da birçok prognostik faktör açısından heterojen yapıdadır. Çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmasının bir sebebinin de bu heterojenite olabileceği düşünülmektedir.

Özetle, DBBHL'lerde özellikle PD-1 pozitif TİL sayısının hastaların prognozunu öngörmeye yararlı bir parametre olabileceği sonucuna varılmıştır. Olguların agresif seyri ve tedaviye direnç durumunun sıklığı da düşünüldüğünde, bu bulgu aynı zamanda PD-1 blokajı gibi yeni tedavi protokollerinin geliştirilebilmesi açısından umut verici olarak görülmektedir.

ÖZET

Amaç: Diffüz büyük B hücreli lenfomalarda (DBBHL) tümör mikroçevresi ve kontrol noktası blokajı ilişkili moleküllerden olan programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1), programlanmış hücre ölümü ligand 1 (PD-L1), sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4), CD163 ve CD14'ün ekspresyonunun saptanması, bu verilerle hastaların prognostik verilerinin karşılaştırılarak bu belirteçlerin DBBHL olgularında prognozu öngörüp göremeyeceğinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: 1998-2017 yılları arasında tanı alan, tanı anında bilinen ektranodal tutulumu bulunmayan toplam 52 nodal DBBHL, başka türlü sınıflandırılmayan (DBBHL, NOS) olgusu değerlendirilmiştir. Bu olgulardan 44'ünde klinik prognostik verilere ulaşılmıştır. İmmunohistokimyasal yöntemle PD-1, PD-L1, CD163, CD14 ve CTLA-4 çalışılmış, CTLA-4 ile sağlıklı boyanma elde edilememesi nedeniyle bu belirteç çalışmadan çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçların birbirleriyle ve klinik ve laboratuvar prognostik belirteçlerle ilişkisi araştırılmıştır.

Bulgular: PD-1 ekspresyonu <5 pozitif hücre/BBA olan olguların daha düşük genel sağ kalıma sahip oldukları gözlenmiştir ($p=0,005$). PD-L1, CD163 ve CD14 ile sağ kalım arasında ise anlamlı ilişki saptanmamıştır. PD-L1 ve CD14 boyanma oranlarının non-GCB subtipinde GCB subtipine göre daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca, >60 yaş, ECOG performans skoru ≥ 2 , evre IV hastalık, yüksek IPI skoru (3-5), LDH yüksekliği, düşük albumin düzeyi, düşük hemoglobin düzeyi, düşük periferik kan lenfosit sayısı, yüksek periferik kan nötrofil/lenfosit oranı, yüksek periferik kan platelet/lenfosit oranı, MYC ≥ 40 olan olguların genel sağ kalımlarının daha kötü olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Son yıllarda kontrol noktası ilişkili moleküller ve tümör mikroçevresinin DBBHL, NOS'larda prognoza etkisi araştırmalara konu olmaktadır. Çalışmamızda DBBHL, NOS'larda tümörü infiltrate eden PD-1 pozitif lenfosit (T L) sayısı düşük olan olguların düşük sağ kalım oranlarına sahip oldukları ve PD-1 pozitif T L sayısının prognozu öngörmede yararlı bir gösterge olabileceği sonucuna varılmıştır. Buna karşın PD-L1, CD163 ve CD14 ile sağ kalım arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. DBBHL, NOS'un heterojen bir lenfoma grubu olduğu göz önüne alındığında, daha kesin sonuçlar elde edilebilmesi için geniş serilerde yapılacak yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Diffüz büyük B hücreli lenfoma, tümör mikroçevresi, PD-1, PD-L1, CD163, CD14

ABSTRACT

THE PROGNOSTIC IMPACT OF TUMOR MICROENVIRONMENT AND CHECKPOINT BLOCKADE-ASSOCIATED MOLECULES (PD-1, PD-L1, CTLA-4, CD163 AND CD14) IN NODAL DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA, NOS

Aim: It is aimed to determine expression of programmed cell death-1 (PD-1), programmed cell death ligand-1 (PD-L1), cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), CD163 and CD14 which are the molecules related to tumor microenvironment and checkpoint blockade in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL), and also to determine whether these markers, comparing their expressions with prognostic data, may predict prognosis in DBBHL cases.

Material and Methods: A total of 52 nodal DLBCL, not otherwise specified (DLBCL, NOS) cases diagnosed between 1998 and 2017 with no known extranodal involvement at the time of diagnosis were evaluated. Clinical prognostic data were obtained in 44 of these cases. PD-1, PD-L1, CD163, CD14 and CTLA-4 were studied by immunohistochemical methods and CTLA-4 marker was excluded from the study due to inability of obtaining proper staining. The relationships between the results and clinical and laboratory prognostic markers were investigated.

Results: It was observed that patients with PD-1 expression <5 positive cells/HPF had worse overall survival ($p=0.005$). No significant relationship was found between survival and PD-L1, CD163 and CD14 expressions. PD-L1 and CD14 staining scores were found to be higher in non-GCB subtype than in GCB subtype. In addition, cases that are >60 years of age, that have

ECOG performance score ≥ 2 , stage IV disease, high IPI score (3-5), elevation of LDH, low albumin level, low hemoglobin level, low peripheral blood lymphocyte count, high peripheral blood neutrophil/lymphocyte ratio, high peripheral blood platelet/lymphocyte ratio, MYC $\geq 40\%$ were found to have worse overall survival.

Conclusion: In recent years, the effects of checkpoint and tumor microenvironment related molecules in prognosis of DLBCL, NOS have been extensively investigated. In our study, it was concluded that in patients with low number of PD-1 positive tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) have low survival rates and therefore the number of PD-1 positive TILs may be useful in indicating prognosis. On the other hand, there was no significant relationship between survival and PD-L1, CD163 and CD14 expressions. Considering that DLBCL, NOS is a heterogeneous lymphoma group, new studies with large series are needed to obtain more accurate results.

Keywords: Diffuse large B-cell lymphoma, tumor microenvironment, PD-1, PD-L1, CD163, CD14

KAYNAKLAR

1. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *New England Journal of Medicine* 2010; 362:1417-29.
2. Wang J, Gao K, Lei W et al. Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma: correlation with CD163 positive M2 type tumor-associated macrophages, not PD-1 positive tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncotarget* 2017; 8:5414-25.
3. Stein H, Warnke R, Chan W et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (eds): *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France:IARC Press 2008; 233-7.
4. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* 2015; 125:22-32.
5. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:3121-7.
6. Friedberg JW. New strategies in diffuse large B-cell lymphoma: translating findings from gene expression analyses into clinical practice. *Clin Cancer Res* 2011; 17:6112-7.
7. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2015; 126:2193-201.
8. Hude I, Sasse S, Engert A et al. The emerging role of immune checkpoint inhibition in malignant lymphoma. *Haematologica* 2017; 102:30-42.

9. D'Errico G, Machado HL, Sainz B, Jr. A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet. *Clin Transl Med* 2017; 6:3.
10. Gascoyne RD, Campo E, Jaffe ES et al. Diffuse large B-cell lymphoma, NOS. In Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. (eds): *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon:IARC Press 2017; 291-7.
11. Berard CW, Hutchison RE. The problem of classifying lymphomas: an orderly prescription for progress. *Ann Oncol* 1997; 8 Suppl 2:3-9.
12. Gluzman DF. WHO classification of lymphoid malignancies. *Exp Oncol* 2012; 34:377-8.
13. Garvin AJ, Simon R, Young RC et al. The Rappaport classification of non-Hodgkin's lymphomas: a closer look using other proposed classifications. *Semin Oncol* 1980; 7:234-43.
14. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127:2375-90.
15. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2012; 380:848-57.
16. Moller MB, Pedersen NT, Christensen BE. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation--a population-based study of 1575 cases. *Br J Haematol* 2004; 124:151-9.
17. Armitage JO. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 89:3909-18.
18. 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; 16:2780-95.
19. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C et al. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 87:146-71.

20. Hartge P, Wang S. Overview of the etiology and epidemiology of lymphoma. In Mauch PM, Dalla-Favera R, Harris NL (eds): *Non-Hodgkin's lymphomas*. New York: Lippincott, Williams and Wilkins 2004; 711-27.
21. de Sanjose S, Benavente Y, Vajdic CM et al. Hepatitis C and non-Hodgkin lymphoma among 4784 cases and 6269 controls from the International Lymphoma Epidemiology Consortium. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6:451-8.
22. Visco C, Finotto S. Hepatitis C virus and diffuse large B-cell lymphoma: Pathogenesis, behavior and treatment. *World J Gastroenterol* 2014; 20:11054-61.
23. Oyama T, Ichimura K, Suzuki R et al. Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:16-26.
24. Gibson SE, Swerdlow SH, Craig FE et al. EBV-positive extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in the posttransplant setting: a distinct type of posttransplant lymphoproliferative disorder? *Am J Surg Pathol* 2011; 35:807-15.
25. Hoeller S, Tzankov A, Pileri SA et al. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations. *Hum Pathol* 2010; 41:352-7.
26. Ok CY, Li L, Xu-Monette ZY et al. Prevalence and clinical implications of Epstein-Barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Clin Cancer Res* 2014; 20:2338-49.
27. Slack GW, Steidl C, Sehn LH et al. CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia. *Br J Haematol* 2014; 167:608-17.
28. Montes-Moreno S, Odqvist L, Diaz-Perez JA et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor- κ B activation. *Mod Pathol* 2012; 25:968-82.

29. Gibson SE, Hsi ED. Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphoma of the elderly at a United States tertiary medical center: an uncommon aggressive lymphoma with a nongerminal center B-cell phenotype. *Hum Pathol* 2009; 40:653-61.
30. Dojcinov SD, Venkataraman G, Pittaluga S et al. Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma. *Blood* 2011; 117:4726-35.
31. Beltran BE, Castillo JJ, Morales D et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a case series from Peru. *Am J Hematol* 2011; 86:663-7.
32. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 1998; 9:717-20.
33. Hunt KE, Reichard KK. Diffuse large B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132:118-24.
34. 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; 89:310-4.
35. Chung R, Lai R, Wei P et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood* 2007; 110:1278-82.
36. Campbell J, Seymour JF, Matthews J et al. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur J Haematol* 2006; 76:473-80.
37. Brudno J, Tadmor T, Pittaluga S et al. Discordant bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2016; 127:965-70.

38. Arber DA, George TI. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:1549-57.
39. Park MJ, Park SH, Park PW et al. Prognostic impact of concordant and discordant bone marrow involvement and cell-of-origin in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Pathol* 2015; 68:733-8.
40. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol* 2011; 29:1452-7.
41. Talaulikar D, Dahlstrom JE, Shadbolt B et al. Occult bone marrow involvement in patients with diffuse large B-cell lymphoma: results of a pilot study. *Pathology* 2007; 39:580-5.
42. Talaulikar D, Shadbolt B, Dahlstrom JE et al. Routine use of ancillary investigations in staging diffuse large B-cell lymphoma improves the International Prognostic Index (IPI). *J Hematol Oncol* 2009; 2:49.
43. Adams HJ, Kwee TC, de Keizer B et al. FDG PET/CT for the detection of bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 41:565-74.
44. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol* 2014; 32:3048-58.
45. Khan AB, Barrington SF, Mikhaeel NG et al. PET-CT staging of DLBCL accurately identifies and provides new insight into the clinical significance of bone marrow involvement. *Blood* 2013; 122:61-7.
46. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* 2014; 32:3059-68.

47. Rosenwald A, Wright G, Chan WC et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346:1937-47.
48. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D 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; 89:2291-7.
49. Ott G, Ziepert M, Klapper 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; 116:4916-25.
50. Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L et al. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol* 2000; 109:584-91.
51. Kennedy GA, Tey SK, Cobcroft R et al. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *Br J Haematol* 2002; 119:412-6.
52. Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M et al. Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol* 2004; 202:60-9.
53. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2013; 121:2715-24.
54. Xu-Monette ZY, Tu M, Jabbar KJ et al. Clinical and biological significance of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Oncotarget* 2015; 6:5615-33.

55. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood* 2002; 99:815-21.
56. Zeng W, Fu K, Quintanilla-Fend L et al. Cyclin D1-negative blastoid mantle cell lymphoma identified by SOX11 expression. *Am J Surg Pathol* 2012; 36:214-9.
57. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ 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; 30:3452-9.
58. Scott DW, Mottok A, Ennishi D 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; 33:2848-56.
59. Berglund M, Thunberg U, Amini RM et al. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol* 2005; 18:1113-20.
60. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 101:78-84.
61. de Leval L, Harris NL. Variability in immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology* 2003; 43:509-28.
62. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* 2006; 208:714-23.
63. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 2000; 95:2084-92.

64. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103:275-82.
65. Barrans SL, Fenton JA, Banham A et al. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood* 2004; 104:2933-5.
66. Montes-Moreno S, Roncador G, Maestre L et al. Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas. *Blood* 2008; 111:351-8.
67. Natkunam Y, Zhao S, Mason DY et al. The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood* 2007; 109:1636-42.
68. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90:244-51.
69. Hermine O, Haioun C, Lepage E et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Blood* 1996; 87:265-72.
70. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:961-8.
71. Grogan TM, Lippman SM, Spier CM et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 1988; 71:1157-60.
72. Hasselblom S, Ridell B, Sigurdardottir M et al. Low rather than high Ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2008; 49:1501-9.
73. Koh YW, Hwang HS, Park CS et al. Prognostic effect of Ki-67 expression in rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone-treated diffuse large B-cell lymphoma is limited to

- non-germinal center B-cell-like subtype in late-elderly patients. Leuk Lymphoma 2015; 56:2630-6.*
74. *Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. Blood 1994; 83:1460-6.*
 75. *Yoon DH, Choi DR, Ahn HJ 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; 85:149-57.*
 76. *Davis RE, Ngo VN, Lenz G et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. Nature 2010; 463:88-92.*
 77. *Morin RD, Johnson NA, Severson TM et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nat Genet 2010; 42:181-5.*
 78. *Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. Nature 2011; 476:298-303.*
 79. *Ngo VN, Young RM, Schmitz R et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. Nature 2011; 470:115-9.*
 80. *Lenz G, Wright GW, Emre NC et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:13520-5.*
 81. *Monti S, Chapuy B, Takeyama K et al. Integrative analysis reveals an outcome-associated and targetable pattern of p53 and cell cycle deregulation in diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell 2012; 22:359-72.*
 82. *Lu TX, Fan L, Wang L et al. MYC or BCL2 copy number aberration is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Oncotarget 2015; 6:18374-88.*
 83. *Yoon SO, Jeon YK, Paik JH et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell*

lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology* 2008; 53:205-17.

84. Akasaka T, Ueda C, Kurata M et al. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood* 2000; 96:2907-9.
85. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2002; 117:322-32.
86. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP et al. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 1994; 83:2423-7.
87. Iqbal J, Greiner TC, Patel K et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21:2332-43.
88. Lossos IS, Jones CD, Warnke R et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2001; 98:945-51.
89. Offit K, Lo Coco F, Louie DC et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 331:74-80.
90. Shustik J, Han G, Farinha P et al. Correlations between BCL6 rearrangement and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP. *Haematologica* 2010; 95:96-101.
91. Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ et al. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2133-9.
92. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002; 99:2285-90.

93. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM et al. *BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. Clin Cancer Res* 2011; 17:7785-95.
94. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE et al. *BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. Am J Pathol* 2004; 165:159-66.
95. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY 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; 98:255-63.
96. Aukema SM, Theil L, Rohde M et al. *Sequential karyotyping in Burkitt lymphoma reveals a linear clonal evolution with increase in karyotype complexity and a high frequency of recurrent secondary aberrations. Br J Haematol* 2015; 170:814-25.
97. Copie-Bergman C, Cuilliere-Dartigues P, Baia M et al. *MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. Blood* 2015; 126:2466-74.
98. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O et al. *Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. Blood* 2009; 114:2273-9.
99. Karube K, Campo E. *MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. Semin Hematol* 2015; 52:97-106.
100. Niitsu N, Okamoto M, Miura I et al. *Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. Leukemia* 2009; 23:777-83.
101. Pedersen MO, Gang AO, Poulsen TS et al. *Double-hit BCL2/MYC translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma - a single centre's experience. Eur J Haematol* 2012; 89:63-71.

102. Xu-Monette ZY, Dabaja BS, Wang X et al. Clinical features, tumor biology, and prognosis associated with MYC rearrangement and Myc overexpression in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol* 2015; 28:1555-73.
103. Green TM, Young KH, Visco C 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; 30:3460-7.
104. Scott DW, Mungall KL, Ben-Neriah S et al. TBL1XR1/TP63: a novel recurrent gene fusion in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012; 119:4949-52.
105. Twa DD, Mottok A, Chan FC et al. Recurrent genomic rearrangements in primary testicular lymphoma. *J Pathol* 2015; 236:136-41.
106. Pham LV, Pogue E, Ford RJ. The Role of Macrophage/B-Cell Interactions in the Pathophysiology of B-Cell Lymphomas. *Front Oncol* 2018; 8:147.
107. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology* 2018; 50:74-87.
108. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M 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; 109:1857-61.
109. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood* 2014; 123:837-42.
110. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A pretlctive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329:987-94.
111. Carson KR, Bartlett NL, McDonald JR et al. Increased body mass index is associated with improved survival in United States veterans with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2012; 30:3217-22.

112. Cox MC, Nofroni I, Ruco L et al. Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic factor in diffuse-large-B-cell-lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2008; 49:1745-51.
113. Drake MT, Maurer MJ, Link BK et al. Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2010; 28:4191-8.
114. Hong F, Habermann TM, Gordon LI et al. The role of body mass index in survival outcome for lymphoma patients: US intergroup experience. *Ann Oncol* 2014; 25:669-74.
115. Maurer MJ, Micallef IN, Cerhan JR et al. Elevated serum free light chains are associated with event-free and overall survival in two independent cohorts of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2011; 29:1620-6.
116. Muller C, Murawski N, Wiesen MH et al. The role of sex and weight on rituximab clearance and serum elimination half-life in elderly patients with DLBCL. *Blood* 2012; 119:3276-84.
117. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E et al. Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MInT) study. *Lancet Oncol* 2008; 9:435-44.
118. Porrata LF, Ristow KM, Habermann TM et al. Peripheral blood absolute lymphocyte/monocyte ratio during rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone treatment cycles predicts clinical outcomes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2014; 55:2728-38.
119. Wilcox RA, Ristow K, Habermann TM et al. The absolute monocyte and lymphocyte prognostic score predicts survival and identifies high-risk patients in diffuse large-B-cell lymphoma. *Leukemia* 2011; 25:1502-9.
120. Bachy E, Salles G. Treatment approach to newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol* 2015; 52:107-18.

121. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:995-1007.
122. O'Malley DP, Auerbach A, Weiss LM. Practical Applications in Immunohistochemistry: Evaluation of Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Related Large B-Cell Lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139:1094-107.
123. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 2003; 101:4279-84.
124. Winter JN, Weller EA, Horning SJ et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood* 2006; 107:4207-13.
125. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ et al. 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; 14:460-7.e2.
126. Sarkozy C, Traverse-Glehen A, Coiffier B. Double-hit and double-protein-expression lymphomas: aggressive and refractory lymphomas. *Lancet Oncol* 2015; 16:e555-e67.
127. Molina TJ, Canioni D, Copie-Bergman 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. *J Clin Oncol* 2014; 32:3996-4003.
128. Ye Q, Xu-Monette ZY, Tzankov A et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2016; 7:2401-16.
129. Horn H, Ziepert M, Becher C et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013; 121:2253-63.

130. Jiang C, Shi X, Fan C. A cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma of germinal center B-cell-like subtype in the right tonsil: A rare case report. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96:e6311.
131. Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S et al. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *J Clin Pathol* 2009; 62:754-6.
132. Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol* 2014; 27:958-71.
133. Barrans S, Crouch S, Smith A 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; 28:3360-5.
134. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009; 114:3533-7.
135. Aukema SM, Siebert R, Schuuring E et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011; 117:2319-31.
136. Li S, Desai P, Lin P et al. MYC/BCL6 double-hit lymphoma (DHL): a tumour associated with an aggressive clinical course and poor prognosis. *Histopathology* 2016; 68:1090-8.
137. Pillai RK, Sathanoori M, Van Oss SB et al. Double-hit B-cell lymphomas with BCL6 and MYC translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct from BCL2 double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2013; 37:323-32.
138. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2012; 120:3986-96.

139. Young KH, Leroy K, Moller MB et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* 2008; 112:3088-98.
140. Jardin F, Jais JP, Molina TJ et al. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood* 2010; 116:1092-104.
141. Lenz G, Davis RE, Ngo VN et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008; 319:1676-9.
142. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer* 2014; 14:517-34.
143. Lenz G, Wright G, Dave SS et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008; 359:2313-23.
144. Alizadeh AA, Gentles AJ, Alencar AJ et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. *Blood* 2011; 118:1350-8.
145. Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* 2004; 103:4251-8.
146. Lim EL, Trinh DL, Scott DW et al. Comprehensive miRNA sequence analysis reveals survival differences in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Genome Biol* 2015; 16:18.
147. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 2007; 26:3603-13.
148. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2009; 113:6069-76.
149. Mathews Griner LA, Guha R, Shinn P et al. High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to

- kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111:2349-54.*
150. *Nowakowski GS, LaPlant B, Habermann TM et al. Lenalidomide can be safely combined with R-CHOP (R2CHOP) in the initial chemotherapy for aggressive B-cell lymphomas: phase I study. Leukemia 2011; 25:1877-81.*
151. *Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR 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; 33:251-7.*
152. *Offner F, Samoilova O, Osmanov E et al. Frontline rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone with bortezomib (VR-CAP) or vincristine (R-CHOP) for non-GCB DLBCL. Blood 2015; 126:1893-901.*
153. *Wilson WH, Young RM, Schmitz R et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. Nat Med 2015; 21:922-6.*
154. *Yang Y, Shaffer AL, 3rd, Emre NC et al. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. Cancer Cell 2012; 21:723-37.*
155. *Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity 2013; 39:1-10.*
156. *Monti S, Savage KJ, Kutok JL et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. Blood 2005; 105:1851-61.*
157. *Mitteldorf C, Berisha A, Pfaltz MC et al. Tumor Microenvironment and Checkpoint Molecules in Primary Cutaneous Diffuse Large B-Cell Lymphoma-New Therapeutic Targets. Am J Surg Pathol 2017; 41:998-1004.*

158. *Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol 2012; 12:253-68.*
159. *Filipazzi P, Huber V, Rivoltini L. Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2012; 61:255-63.*
160. *Poschke I, Kiessling R. On the armament and appearances of human myeloid-derived suppressor cells. Clin Immunol 2012; 144:250-68.*
161. *Lim HX, Hong HJ, Cho D et al. IL-18 enhances immunosuppressive responses by promoting differentiation into monocytic myeloid-derived suppressor cells. J Immunol 2014; 193:5453-60.*
162. *Chen JJ, Lin YC, Yao PL et al. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. J Clin Oncol 2005; 23:953-64.*
163. *Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. J Pathol 2002; 196:254-65.*
164. *Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. Eur J Cancer 2004; 40:1660-7.*
165. *Wada N, Zaki MA, Hori Y et al. Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. Histopathology 2012; 60:313-9.*
166. *Gordon S. Alternative activation of macrophages. Nat Rev Immunol 2003; 3:23-35.*
167. *Solinas G, Germano G, Mantovani A et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J Leukoc Biol 2009; 86:1065-73.*
168. *Nam SJ, Go H, Paik JH et al. An increase of M2 macrophages predicts poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. Leuk Lymphoma 2014; 55:2466-76.*

169. Solinas G, Schiarea S, Liguori M et al. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. *J Immunol* 2010; 185:642-52.
170. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood* 2005; 106:2169-74.
171. Steidl C, Lee T, Shah SP et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010; 362:875-85.
172. Hasselblom S, Hansson U, Sigurdardottir M et al. Expression of CD68+ tumor-associated macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma and its relation to prognosis. *Pathol Int* 2008; 58:529-32.
173. Cai QC, Liao H, Lin SX et al. High expression of tumor-infiltrating macrophages correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Med Oncol* 2012; 29:2317-22.
174. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:677-704.
175. Armand P. Checkpoint blockade in lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015; 2015:69-73.
176. Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M et al. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol Rev* 2011; 241:180-205.
177. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010; 236:219-42.
178. Dong H, Strome SE, Salomao DR et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8:793-800.

179. Harshman LC, Drake CG, Choueiri TK. PD-1 blockade in renal cell carcinoma: to equilibrium and beyond. *Cancer Immunol Res* 2014; 2:1132-41.
180. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2455-65.
181. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014; 32:1020-30.
182. Kwon D, Kim S, Kim PJ et al. Clinicopathological analysis of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1 expression in the tumour microenvironments of diffuse large B cell lymphomas. *Histopathology* 2016; 68:1079-89.
183. Rocha B, Grandien A, Freitas AA. Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 1995; 181:993-1003.
184. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439:682-7.
185. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-62.
186. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 2007; 110:296-304.
187. Prestipino A, Emhardt AJ, Aumann K et al. Oncogenic JAK2(V617F) causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med* 2018; 10.
188. Inman BA, Frigola X, Dong H et al. Costimulation, coinhibition and cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7:15-30.

189. Yu C, Sonnen AF, George R et al. Rigid-body ligand recognition drives cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) receptor triggering. *J Biol Chem* 2011; 286:6685-96.
190. Wang XB, Giscombe R, Yan Z et al. Expression of CTLA-4 by human monocytes. *Scand J Immunol* 2002; 55:53-60.
191. Kassardjian A, Shintaku PI, Moatamed NA. Expression of immune checkpoint regulators, cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and programmed death-ligand 1 (PD-L1), in female breast carcinomas. *PLoS One* 2018; 13:e0195958.
192. Nguyen TT, Schwartz EJ, West RB et al. Expression of CD163 (hemoglobin scavenger receptor) in normal tissues, lymphomas, carcinomas, and sarcomas is largely restricted to the monocyte/macrophage lineage. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:617-24.
193. Marmey B, Boix C, Barbaroux JB et al. CD14 and CD169 expression in human lymph nodes and spleen: specific expansion of CD14+CD169- monocyte-derived cells in diffuse large B-cell lymphomas. *Hum Pathol* 2006; 37:68-77.
194. Zamani F, Zare Shahneh F, Aghebati-Maleki L et al. Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. *Adv Pharm Bull* 2013; 3:329-32.
195. Feng J, Wang Z, Guo X et al. Prognostic significance of absolute lymphocyte count at diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *Int J Hematol* 2012; 95:143-8.
196. Zhou S, Xu L, Ma Y et al. Peripheral blood lymphocyte to monocyte ratio recovery from low levels at diagnosis after completion of first line therapy predicts good clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2017; 8:19556-65.
197. Li YL, Pan YY, Jiao Y et al. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio predicts outcome for patients with diffuse large B cell lymphoma after standard first-line regimens. *Ann Hematol* 2014; 93:617-26.

198. Tadmor T, Bari A, Sacchi S et al. Monocyte count at diagnosis is a prognostic parameter in diffuse large B-cell lymphoma: results from a large multicenter study involving 1191 patients in the pre- and post-rituximab era. *Haematologica* 2014; 99:125-30.
199. Li ZM, Huang JJ, Xia Y et al. Blood lymphocyte-to-monocyte ratio identifies high-risk patients in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *PLoS One* 2012; 7:e41658.
200. Wang S, Ma Y, Sun L et al. Prognostic Significance of Pretreatment Neutrophil/Lymphocyte Ratio and Platelet/Lymphocyte Ratio in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Biomed Res Int* 2018; 2018:9651254.
201. Nakayama S, Matsuda M, Adachi T et al. Novel prognostic index based on hemoglobin level and platelet count for diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified in the R-CHOP era. *Platelets* 2018; 1-9.
202. Ochi Y, Kazuma Y, Hiramoto N et al. Utility of a simple prognostic stratification based on platelet counts and serum albumin levels in elderly patients with diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol* 2017; 96:1-8.
203. Bairey O, Shacham-Abulafia A, Shpilberg O et al. Serum albumin level at diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma: an important simple prognostic factor. *Hematol Oncol* 2016; 34:184-92.
204. Dong L, Lv H, Li W et al. Co-expression of PD-L1 and p-AKT is associated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma via PD-1/PD-L1 axis activating intracellular AKT/mTOR pathway in tumor cells. *Oncotarget* 2016; 7:33350-62.
205. Xing W, Dresser K, Zhang R et al. PD-L1 expression in EBV-negative diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic features and prognostic implications. *Oncotarget* 2016; 7:59976-86.
206. Hu LY, Xu XL, Rao HL et al. Expression and clinical value of programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) in diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study. *Chin J Cancer* 2017; 36:94.

207. Shi Y, Deng L, Song Y et al. CD3+/CD8+ T-cell density and tumoral PD-L1 predict survival irrespective of rituximab treatment in Chinese diffuse large B-cell lymphoma patients. *Int J Hematol* 2018; 108:254-66.
208. Casey SC, Tong L, Li Y et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science* 2016; 352:227-31.
209. Li L, Sun R, Miao Y et al. PD-1/PD-L1 expression and interaction by automated quantitative immunofluorescent analysis show adverse prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma having T-cell infiltration: a study from the International DLBCL Consortium Program. *Mod Pathol* 2019.
210. Agarwal R, Lade S, Liew D et al. Role of immunohistochemistry in the era of genetic testing in MYC-positive aggressive B-cell lymphomas: a study of 209 cases. *J Clin Pathol* 2016; 69:266-70.
211. Ahearn MJ, Bhuller K, Hew R et al. Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Virchows Arch* 2014; 465:351-8.
212. Fang X, Xiu B, Yang Z et al. The expression and clinical relevance of PD-1, PD-L1, and TP63 in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96:e6398.
213. Marchesi F, Cirillo M, Bianchi A et al. High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM) at diagnosis is significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2015; 33:110-2.
214. Matsuki E, Bohn OL, El Jamal S et al. Lymphocyte-to-Monocyte Ratio May Serve as a Better Prognostic Indicator Than Tumor-associated Macrophages in DLBCL Treated With Rituximab. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2018.
215. Shen L, Li H, Shi Y et al. M2 tumour-associated macrophages contribute to tumour progression via legumain remodelling the

- extracellular matrix in diffuse large B cell lymphoma. Sci Rep 2016; 6:30347.*
- 216.** *Barros MH, Hassan R, Niedobitek G. Tumor-associated macrophages in pediatric classical Hodgkin lymphoma: association with Epstein-Barr virus, lymphocyte subsets, and prognostic impact. Clin Cancer Res 2012; 18:3762-71.*
- 217.** *Mueller CG, Boix C, Kwan WH et al. Critical role of monocytes to support normal B cell and diffuse large B cell lymphoma survival and proliferation. J Leukoc Biol 2007; 82:567-75.*
- 218.** *Khalifa KA, Badawy HM, Radwan WM et al. CD14(+) HLA-DR low/(-) monocytes as indicator of disease aggressiveness in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Int J Lab Hematol 2014; 36:650-5.*
- 219.** *Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA et al. Immunosuppressive CD14+ HLA-DRlow/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Blood 2011; 117:872-81.*