

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMALARDA FLUORESAN
İNSİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE C-MYC, PTEN VE
t (14;18) KOEKSPRESYONLARININ YÜKSEK PROLİFERATİF
İNDEKS İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. MERİH TEPEOĞLU

TEZ DANIŞMANI
YRD.DOÇ.DR.NALAN AKYÜREK

ANKARA- 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMALARDA FLUORESAN
İNSİTU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE C-MYC, PTEN VE
t (14;18) KOEKSPRESYONLARININ YÜKSEK PROLİFERATİF
İNDEKS İLE İLİŞKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. MERİH TEPEOĞLU

TEZ DANIŞMANI
YRD.DOÇ.DR.NALAN AKYÜREK

ANKARA- 2007

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi, deneyim ve destekleriyle yetişmemde büyük katkıları bulunan ve her konuda beni yüreklendirerek cesaret veren değerli hocalarım başta Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Gülen Akyol olmak üzere, Prof.Dr.Ömer Uluođlu, özellikle tezimin değerlendirilmesinde çok büyük emekleri olan Prof.Dr.Leyla Memiş, Prof.Dr.Ömür Ataođlu, Prof.Dr. Ayşe Dursun, Doç.Dr.Aylar Poyraz, Yrd.Doç.Dr.Özlem Erdem, Uzm.Dr. İpek Işık Gönül, Uzm.Dr.Özgür Ekinci, Uzm.Dr.Pınar Uyar Göçün ve tez danışmanım Yrd.Doç.Dr.Nalan Akyürek'e, birlikte çalışmaktan zevk duyduğum araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tezimin teknik kısmında yardımcı olan tüm laboratuvar personeline en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Merih Tepeoğlu

ANKARA, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ	1-2
GENEL BİLGİLER	3-31
GEREÇ VE YÖNTEM	32-36
BULGULAR	37-55
TARTIŞMA VE SONUÇ	56-69
ÖZET	70-71
SUMMARY	72-73
KAYNAKLAR	74- 84

GİRİŞ

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma'lar (DBBHL) , tüm non-Hodgkin lenfomalar içerisinde hem en yüksek oranda görülen, hem de klinik, morfolojik, immüfenotipik ve sitogenetik olarak en heterojenöz olan grubu oluşturmaktadır. Bu heterojenitesinden dolayı, DBBHL'lar son derece farklı klinik gidişler gösterir. DBBHL olgularında klinik gidişleri belirlemek için, klinik parametrelere dayanarak yapılan international prognostik indeks (IPI) skoru kullanılır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, DBBHL'larda IPI'dan bağımsız bazı prognostik faktörleri ortaya koymaktadır. Bazı immünhistokimyasal markerları kullanarak DBBHL'ları alt gruplara ayırmak ve bunların prognozlarını karşılaştırmak ya da bu markerların doğrudan prognoz ile ilişkilerini ortaya koymak için çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmada immünhistokimyasal olarak bcl-2, bcl-6, CD 10 ve MUM1 çalışılarak DBBHL'lar alt gruplara ayrılmış ve gruplar arasındaki prognostik fark belirlenmiştir. Ayrıca bcl-2, bcl-6 ve CD 10 ekspresyonlarının DBBHL prognozu üzerinde etkileri olup olmadığı araştırılmıştır. İmmünhistokimyasal çalışmaların yanı sıra, fleurosent in situ hybridisation (FISH) yöntemi ile DBBHL'larda IGH/BCL-2 translokasyonu, C-MYC amplifikasyonu ve PTEN mutasyonu da araştırılmıştır.

Burkitt lenfoma (BL) ise monomorfik görünümde orta boyda B hücrelerinden oluşan, yüksek dereceli agresif bir lenfomadır. Klinik olarak endemik, sporadik ve immünyetmezlik bağlantılı formları bulunmaktadır. Klasik non-Hodgkin lenfoma tedavilerine cevap vermeyen bu grup son derece yüksek doz kemoterapi (KT) rejimleri ile kür olmaktadır. Bu nedenle diğer non-Hodgkin lenfomalardan ayrımı son derece önemlidir. Burkitt lenfomaya morfolojik olarak benzer özellikler taşıyabilen bazı DBBHL grubu ayırıcı tanı zorluğu oluşturur.

Bu iki grubu ayırmak için kombine klinik, morfolojik, immünohistokimyasal ve sitogenetik bulgular birlikte değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, iki antiteyi birbirinden ayırmak için bcl-2, bcl-6, CD 10 ve Ki-67 gibi immünohistokimyasal markerlar (bcl-2, bcl-6, CD 10 ve Ki-67) ve FISH yöntemi ile IGH/BCL-2 translokasyonu, C-MYC amplifikasyonu ve PTEN mutasyonu araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma (DBBHL) batı ülkelerinde tüm non-Hodgkin lenfomaların yaklaşık %30-40'ını oluşturmaktadır. Bu grup tümörler heterojen klinik, morfolojik, immünofenotipik ve sitogenetik özellikler içerdiğinden oldukça değişken klinik gidiş ve belirgin biyolojik heterojenite göstermektedir (16,36,42,58,62)

Rapaport (diffüz histiyositik, diffüz mikst lenfositik+ histiyositik) ve Kiel sınıflamaları (sentroblastik, B-immünoblastik, B- büyük hücreli anaplastik), büyük B hücreli lenfomalarda tümüyle morfolojiye dayanarak yapılan sınıflamalardır. Working Formulation'da ise büyük B hücreli lenfomalar, biyolojik davranışlarına göre intermediate grade (büyük çentikli ve büyük çentiksiz) ve yüksek grade (immünoblastik) olarak gruplandırılmıştır. 1994- "Revised European-American Lymphoma (REAL)" sınıflamasında lenfoblastik, Burkitt ve primer mediastinal B hücreli lenfoma dışındaki tüm agresif B hücreli lenfomalar birden fazla antiteyi içine alan heterojenöz bir grup şeklindeki DBBHL başlığı altında toplanmıştır (32,36,58). Daha sonra geliştirilen WHO-2000 (Dünya Sağlık Örgütü) sınıflaması REAL sınıflamasına adapte edilmiş olup, primer mediastinal büyük B hücreli lenfomaya ek olarak intravasküler büyük B hücreli lenfoma ve primer efüzyon lenfoması da DBBHL başlığı altında yer almıştır (36, 51,58)

Sonuç olarak günümüzde de hala kullanılmakta olan WHO sınıflamasında, DBBHL, pek çok alt tipleri de içinde barındıran, heterojenöz bir matür B hücreli non-Hodgkin lenfoma grubunu oluşturmaktadır. Bu sınıflama Tablo-1'de gösterilmiştir (16,32,42,58)

Tablo-1: WHO-Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması

B HÜCRELİ NEOPLAZİLER
Prekürsör B hücreli neoplaziler
Prekürsör B hücreli lenfoblastik lösemi/lenfoma
Matür B hücreli neoplaziler
Kronik lenfositik lösemi/Küçük lenfositik lenfoma
B hücreli prolenfositik lösemi
Lenfoplazmositik lenfoma
Splenik marjinal zon lenfoma
Tüylü hücreli lösemi (Hairy cell lösemi)
Plazma hücreli neoplaziler
Plazma hücreli myelom, Plazmasitom
Monoklonal Ig depo hastalığı, Ağır zincir hastalığı
Ekstranodal marjinal zon B hücreli lenfoma (MALT lenfoma)
Nodal marjinal zon B hücreli lenfoma
Foliküler lenfoma
Mantle hücreli lenfoma
Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma – alt tipleri:
Mediastinal (timik) büyük B hücreli lenfoma
İntravasküler büyük B hücreli lenfoma
Primer efüzyon lenfoması
Burkitt lenfoma/lösemi

Klinik Özellikler

DBBHL'in ortalama görülme yaşı yedinci dekad olmakla birlikte, çocuklar da dahil olmak üzere her yaş grubunda görülebilir (32,61). Erkeklerde biraz daha sık rastlanır ve E/K görülme oranı 1.2'dir (32,71).

Klinik olarak tümör genellikle hızlı büyüyen kitle lezyonları olarak kendini gösterir. Nodal ya da ektranodal tutulum olabilir(32,71). DBBHL olgularının yaklaşık 1/3'ü ektranodal tutulum oluşturmaktadır. En sık ektranodal tutulum yeri gastrointestinal sistem (mide, ileoçekal bölge) olmakla birlikte, deri, SSS, kemik, testis, yumuşak doku, paranazal sinus, tükrük bezi, kadın genital sistem, akciğer, karaciğer, dalak ve orbita olmak üzere herhangi bir ektranodal alanda da tutulum oluşturabilir (32,36,71). Tanı anında nadiren kemik iliği ve/veya periferik kan tutulumu görülür (32,71).

DBBHL'in çoğu de novo gelişir (primer DBBHL), daha düşük oranda ise önceden var olan düşük dereceli bir lenfomadan (kronik lenfositik lösemi/küçük lenfositik lenfoma, folliküler lenfoma, marjinal zon B hücreli lenfoma, nodüler lenfosit predominant Hodgkin lenfoma gibi) transforme olabilir (32,36,62).

DBBHL'in %20-30'nun folliküler lenfomadan (FL) geliştiği düşünülmektedir. Foliküler lenfoma ile bağlantısı 3 farklı şekilde görülebilir (71);

- 1- DBBHL komponenti, FL tanısından daha sonra saptanabilir (tekrarlayan relapslarda)
- 2- FL ile eş zamanlı olarak DBBHL tanısı konabilir(komposite lenfoma şeklinde yada DBBHL evrelemesi yapılırken saptanan okült foliküler lenfoma şeklinde).
- 3- DBBHL, pür FL olarak relaps edebilir; (muhtemelen daha önce maskelenen FL komponenti, tedavi sonrası high grade DBBHL komponentinin ortadan kalkması ile ortaya çıkmış olabilir.)

DBBHL Patolojisi

Makroskopi:

DBBHL, lenf nodlarında homojen balık eti görünümü oluşturur. Genellikle lenf nodunun tümünde tutulum izlenirken, seyrek olarak parsiyel tutulum da olabilir. Hemoraji yada nekroz görülebilir. Ekstranodal tutulumda ise, DBBHL bazen fibrozis gösteren geniş invaziv tümör kitleleri şeklinde izlenir (32).

Morfoloji:

DBBHL, nükleer boyutları normal makrofaj boyutuyla aynı boyda ya da daha büyük veya normal bir lenfosit boyutunun 2 katından daha fazla büyüklükte olan büyük neoplastik B lenfoid hücrelerin diffüz proliferasyonudur(32).

Tipik olarak büyük lenfoid hücrelerin diffüz infiltrasyonu ile normal lenf nodu yapısını tümüyle ortadan kaldırır. Perinodal infiltrasyon da sıklıkla eşlik eder (32,71). Nodal tutulum komplet/ parsiyel/interfoliküler ya da daha az sıklıkla sinüzoidal patternde olabilir(32,71).

Nadir olarak DBBHL'da tutulum nodüler tarzda olabilir. Bu nodüller, foliküler lenfoma nodüllerinden farklı olarak fokal ve sıklıkla büyük olup, follikül merkez hücrelerinden farklı sitolojik komponent içerir ve foliküler dendritik hücre ağı izlenmez.

Morfolojik olarak DBBHL, büyük transforme lenfoid hücrelerden oluşur, fakat sitolojik olarak birbirinden son derece farklı görünümler oluşturur. Bu morfolojik farklılık nedeniyle DBBHL 4 alt gruba ayrılabilir (16,32,36,51,61,71);

- ❖ **Sentroblastik varyant**
- ❖ **Immünoblastik varyant**
- ❖ **Anaplastik varyant**
- ❖ **T hücre/histiyositden zengin varyant**

Bu morfolojik heterojenitenin olasılıkla farklı patogenetik mekanizmalar ya da daha düşük dereceli lenfomalardan transformasyon yolu ile gelişen DBBHL'daki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (32,71).

1- Sentroblastik varyant DBBHL

DBBHL'nın en sık görülen varyantıdır. Bu morfolojik varyantı oluşturan hücreler, reaktif germinal merkezde bulunan sentroblastların morfolojik özelliklerini gösterir. Bunlar yuvarlak yada oval veziküler nükleuslu, ince kromatinli, 2-4 membrana bağlı nükleolu ve dar bazofilik sitoplazma özelliklerine sahip genellikle orta-büyük boyda hücrelerdir (32,36,51,61,71). Bazı kaynaklara göre, DBBHL'nın bu varyantı, foliküler lenfomanın nodüler formunun diffüz karşılığı ve daha agresif olan formu olarak kabul edilmektedir(61).

Sentroblastik varyant DBBHL'da immünoblast benzeri hücreler de izlenebilir. Bu hücrelerin oranı son derece değişkendir.

2- İmmünoblastik varyant DBBHL

Bu varyantta, tümörü oluşturan hücrelerin %90'dan fazlası immünoblastdır. Bu hücreler veziküler nükleus, santralde lokalize tek nükleol ve kalın nükleer membranları olan oldukça koyu bazofilik sitoplazma içerir (32,36,51,61,71).

Plazmositoid diferansiasyon gösteren hücreler ve matür plazma hücreleri izlenebilir. Bazen bu plazmositoid hücreler tümörün oldukça büyük bir kısmını oluşturabilir ve plazma hücreli myelomun plazmositoid varyantı ile ayırımında sorunlara yol açabilir. Bazı hücreler binükleer ya da multinükleer olabilir, Reed-Sternberg hücrelerine benzer hücreler görülebilir. İmmünoblastik varyant DBBHL, özellikle immünsüprese veya immün yetmezliği olan hastalarda sık görülen DBBHL tipidir (61).

Bu varyant sentroblastik lenfomadan çok daha az oranda görülür, ancak prognozunun daha kötü olduğu ve daha agresif gidiş gösterdiği düşünülmektedir(36).

3-Anaplastik varyant DBBHL

Bu tip çok büyük yuvarlak, oval yada pleomorfik ve Reed-Sternberg hücrelerine benzeyen neoplastik hücrelerin proliferasyonu ile karakterizedir (36).

4- T hücre/histiyosit zengin varyant DBBHL:

Diffüz büyüme paterni gösteren, az sayıda büyük neoplastik B hücrelerinin varlığı (total popülasyonun %10'undan az) ile karakterli DBBHL varyantıdır. Zemindeki reaktif T hücreleri hücrel popülasyonun %90'dan fazlasını oluşturur ve değişken sayıda histiyositler tabloya eşlik eder. Olguların %60'ından fazlası tanı anında Evre 3 ya da 4'dür ve yine sıklıkla tanı anında dalak ve kemik iliği tutulumu görülür.

Morfolojik olarak tanımlanan bu varyantlar dışında DBBHL'in daha nadir görülen varyantları da bulunmaktadır:

a-Plazmablastik varyant:

Plazmablastik varyant DBBHL, morfolojik olarak immünoblast, ancak antijen profili açısından plazmasitomaya benzeyen neoplastik hücrelerden oluşmaktadır. Çoğunlukla HIV (+) hastalarda görülür ve tipik olarak oral kavite yerleşimlidir (32,36).

İmmünohistokimyasal olarak, AIDS ilişkili plazmablastik DBBHL varyantı, hemen çoğu lenfoid antijen markerlarını eksprese etmez (CD 45 yada CD 20 gibi). Olguların yarısından fazlasında IgG'nin monotipik sitoplazmik ekspresyonu görülür. CD 138 pozitifdir. Vakaların yaklaşık %60'unda EBV pozitifdir (32,36).

b - ALK pozitif DBBHL

ALK pozitif DBBHL olguları, tipik olarak özellikle küçük lenf nodlarında belirgin sinüzoidal infiltrasyon oluşturan neoplastik hücrelerle karakterizedir. Masif tümör infiltrasyonu gelişmez. Bu sinüzoidal pattern, yanlışlıkla metastatik bir karsinom ya da melanom ile karışabilir (32,36).

Neoplastik hücreler, monomorfik immünoblast benzeri görünüm oluşturur. Yuvarlak nükleusları, tek, büyük santral yerleşimli nükleoller ve bazofilik sitoplazmaları vardır. Bazen plazmablastik diferansiyasyonu düşündüren paranükleer halolar izlenebilir. Genellikle Reed-Sternberg hücresine benzeyen binükleer hücreler görülür(32,36).

İmmünohistokimyasal olarak, tümör hücrelerinde kuvvetli membranöz EMA ve sitoplazmik ALK ekspresyonu görülür. CD 45 zayıf pozitifdir. CD 30 negatifdir. İntrasitoplazmik Ig A hafif zincir pozitifdir. T ve B hücre markerları negatifdir (CD 4 ve CD 57 hariç) (32,36).

ALK (+) DBBHL, sıklıkla erkeklerde ve ileri yaşta görülür. Tanı anında hastalar çoğunlukla ileri evredir ve agresif gidiş gösterir (32,36).

İmmünohistokimya

DBBHL, pan-B hücre markerlarını eksprese eder (CD 19, CD 20, CD 22, CD 79a).

Yüzey ve sitoplazmik Ig (Ig M>Ig G>Ig A) ekspresyonu %50-75 arasında değişir.

Sitoplazmik Ig sıklıkla plazmositik diferansiyasyon gösteren olgularda pozitifdir.

CD 5 pozitifliği %10 olguda görülür. CD 5 (+) DBBHL'lar çoğunlukla de novo gelişir ve siklin D1 negatifliği ile blastoid varyant mantle hücreli lenfomadan ayrılırlar.

%25-50 oranında CD 10 pozitifliği görülür.

Bcl-2, %30-50 vakada pozitifdir.

Bcl-6 nükleer ekspresyonu olguların büyük kısmında görülür.

P53 (TP 53 mutasyonu ile bağlantılı) az sayıda olguda pozitifdir.

Az sayıda olguda CD 30 pozitif olabilir. CD 138 negatifdir.

Ki-67 proliferasyon indeksi çoğu zaman yüksektir(>%40), bazı olgularda ise %90'ın üzerinde saptanmıştır (32,36,51,61,71).

Prognoz

DBBHL, agresif gidiş gösteren bir lenfoma grubu olmasına karşın, kemoterapiye oldukça duyarlıdır (36,61). Tam remisyon oranı %50'nin üzerinde olup, bu oran %75-80'lere ulaşabilmektedir(36). Bifazik bir yaşam eğrisi izlenir. Bazı hastalar komplet remisyon gösterip, uzun yıllar hastaliksız yaşamla kür kabul edilirken, parsiyel ya da hiç remisyon göstermeyen hastalar ise 1-2 yıl içerisinde kaybedilir (71). Klinik parameterlere dayanarak yapılan international prognostic index (IPI), prognozu belirlemede oldukça yararlıdır (Tablo2).

Tablo-2 (IPI)

IPI (international prognostic index)	Risk skoru
Yaş (>60)	Düşük 0,1
LDH (>nI)	Düşük,orta 2
Performans derecesi (2-4)	Yüksek,orta 3
Ekstranodal tutulum (>1 alan)	Yüksek 4,5

DİFFÜZ BÜYÜK B HÜCRELİ LENFOMALARDA MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

DLBHL'nin klinikopatolojik heterojenitesi, aslında moleküler patogenezideki çeşitliliğini yansıtır. Bugüne kadar DBBHL'in moleküler patogenezi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmış ve DBBHL'da görülen genetik lezyonlar şu şekilde özetlenmiştir:

- 1- Kromozomal translokasyonlar ya da gen amplifikasyonu yolu ile protoonkogenlerin aktivasyonu
- 2- Delesyon, mutasyon ya da promotor hipermetilasyon yolu ile tümör süpresör genlerin inaktivasyonu
- 3- Onkojenik virüslerle enfeksiyon
- 4- Aberan protoonkogen hipermutasyonu

B hücreli lenfomalar, genetik ve fenotipik özellikler olarak B hücre diferansiyasyon evresini yansıtır, genotipik olarak hemen tümünde Ig v (variable region) somatik hipermutasyonu ve bcl-6 gen mutasyonları görülür (62).

DBBHL'lar , germinal hücre bağlantılı B hücrelerinin moleküler ve genotipik özelliklerini gösterir. DBBHL'in yarısından fazlasında iki primer moleküler lezyon olan bcl-2 ya da bcl-6 protoonkogen aktivasyonu görülür, buna bağlı olarak da iki farklı genotipik subgrup tanımlanmıştır:

1. Grup: Bcl-6 rearanjmanı (+) DBBHL

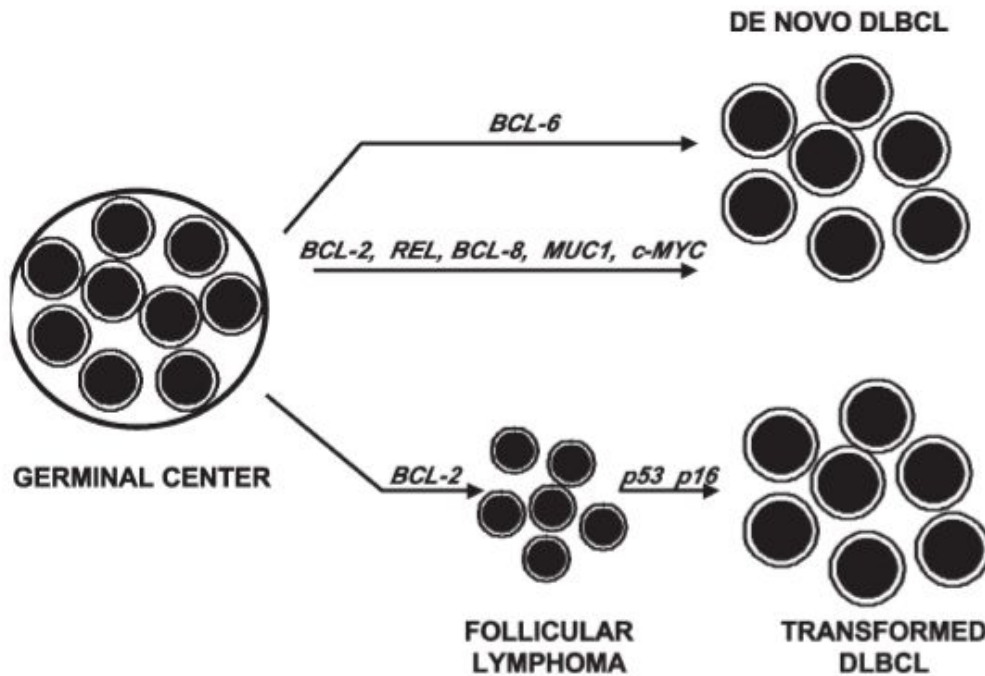
DBBHL olgularının %40'nı oluşturur. Başka genetik lezyonlar olmaksızın yalnızca bcl-6 rearanjmanı gösterirler. Önceden folliküler lenfoma öyküsü olmaksızın de novo gelişirler (62).

2.grup: bcl-2 rearanjmanı+P 53 mutasyonları (+) DBBHL

Bu grubun daha önceden varolan foliküler lenfomadan histolojik transformasyon yolu ile geliştiği düşünülmektedir (sekonder DBBHL) (62).

Bu iki grup dışında bcl-2 yada bcl-6 aktivasyonu göstermeyen 3. bir grup DBBHL daha vardır, bu olgularda çok sayıda farklı protoonkogenlerin aktivasyonu (REL, MUC-1, bcl-8, c-myc gibi) ya da tümör süpresör genlerin inaktivasyonu (P53 yada P16 gibi) görülür (62).

Sonuçta, protoonkogenlerin aberan somatik hipermutasyonları, DBBHL'nın temel patogenetik mekanizmasını oluşturur (62).



DNA mikroarray çalışmaları, DBBHL'yı gen ekspresyon profillerine göre , prognostik olarak birbirinden farklı iki alt gruba ayırmıştır:

- 1- GCB like DLBCL (germinal merkez B hücre benzeri DBBHL): Normal germinal merkez B hücreleri ile ortak gen ekspresyon profili gösterir, GCB hücre belirleyicilerini eksprese ederler (CD 10, bcl-6, CD 38).
- 2- ABC like DLBCL (aktive B hücre benzeri DBBHL): Periferik B hücreleri ile ortak gen ekspresyon profili gösterir (42,58,62,65).

Bu ayırım özellikle prognostik öneme sahiptir. GCB benzeri DBBHL'm, ABC benzeri DBBHL'ya göre daha iyi prognozlu olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (42,58,62). Bu iki grup dışında ne GCB ne de ABC benzeri subgrupların karakteristik gen ekspresyon profillerini göstermeyen 3. bir grup DBBHL vardır ve prognozlarının ABC benzeri subgruba yakın olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (58).

Gen ekspresyon profillerine göre gruplanan DBBHL'lar farklı genomik alterasyon patternleri gösterir. Bu alterasyonlar da farklı biyolojik özellikler ve sonuçta farklı klinik gidişlere yol açar. Sonuç olarak gen ekspresyon profillerine göre 3 alt gruba ayrılan DBBHL'lar aslında köken aldıkları hücreler/ klinik gidiş ve onkojenik mekanizmalar açısından birbirinden tamamen farklı 3 ayrı antidedir (5,58).

- a- Hücresel farklılık: GCB benzeri DBBHL, germinal merkez B hücrelerinden köken alırken, ABC benzeri DBBHL, post-germinal merkez B hücrelerinden köken alır.
- b- Prognostik farklılık: 5 yıllık yaşam oranı, GCB benzeri DBBHL'da %59 iken, ABC benzeri DBBHL'da %30 oranındadır. 3.grup için bu oran %38'dir.

c- Onkojenik farklılık: GCB benzeri DBBHL'da , REL amplifikasyonları, bcl-2 translokasyonu ve Ig gen somatik hipermutasyonu görülürken, ABC benzeri DBBHL ve 3. grup DBBHL'da ise çoğunlukla NF-kB yolu (nükleer faktör- kB) aktivasyonu görülür (5,47,58,72).

	GCB-DLBCL	ABC-DLBCL
Köken	Germinal merkez B hücresi	Post-germinal merkez B hc
Klinik gidiş	%59	%30
Onkojenik mekanizma	REL amplifikasyonu BCL2 translokasyonu	NF-kB aktivasyonu
Kromozomal alterasyonlar	12q12 gain t (14,18)	3q gain 18q21-q22 gain (bcl-2) 6q21-q22 delesyon(BLIMP1)

* bcl-2 ekspresyonu, düşük oranda da olsa ABC benzeri DBBHL'da saptanır, ancak GCB ve ABC benzeri DBBHL'da görülen bcl-2 ekspresyon mekanizmaları farklıdır. GCB benzeri DBBHL'da t (14;18)(q32;q21) sonucu bcl-2 ekspresyonu görülürken, ABC benzeri DBBHL'da bcl-2 gen amplifikasyonuna bağlı bcl-2 ekspresyonu görülür (58).

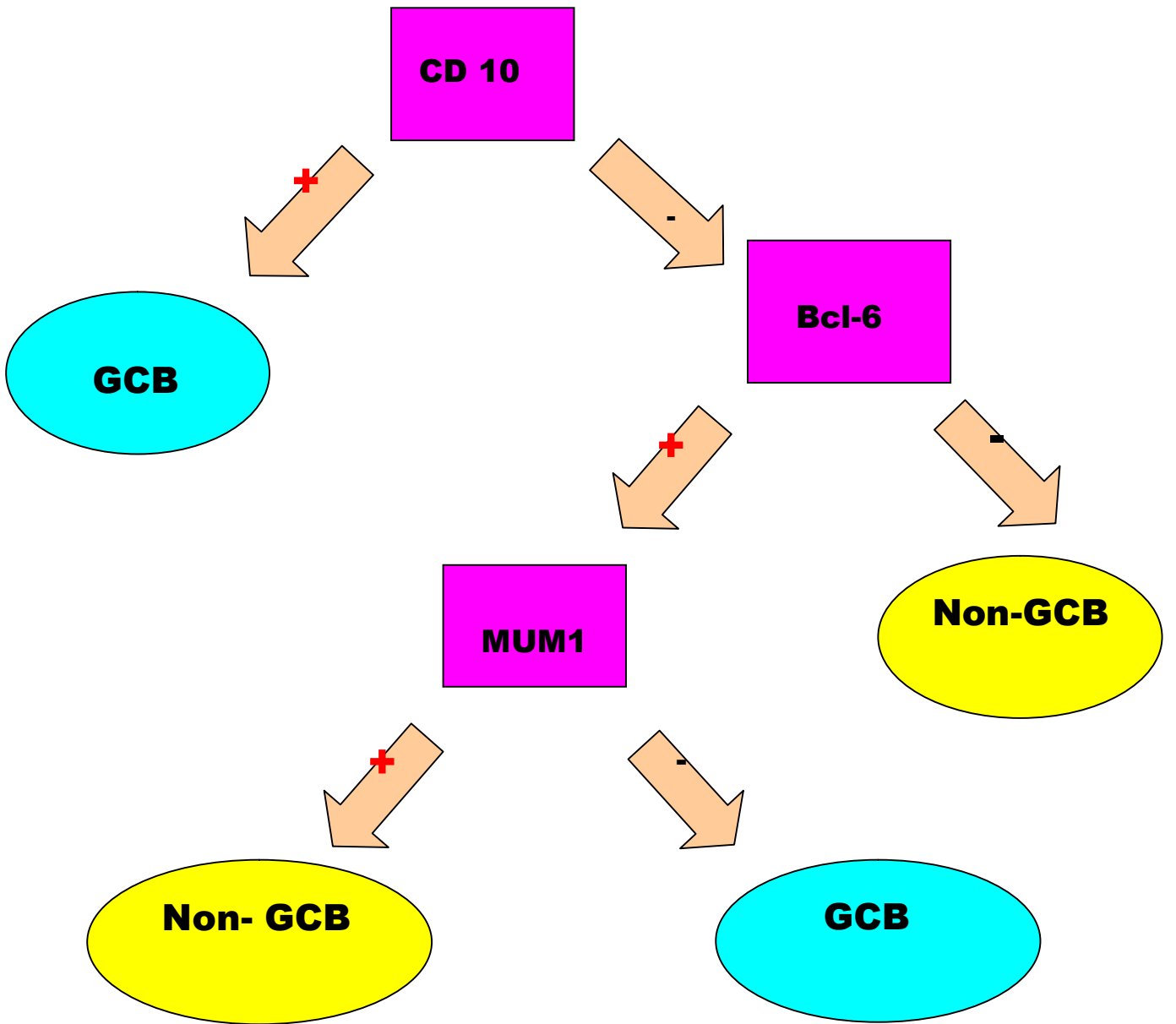
Günlük rutin uygulamalarda mikroarray çalışma yapmak oldukça pahalı ve zor olduğundan, GCB ile ABC tip DBBHL'ın ayırımında kullanılabilecek bazı immünohistokimyasal belirleyiciler saptanmıştır.

GCB belirleyicileri olarak; CD 10 ve bcl-6

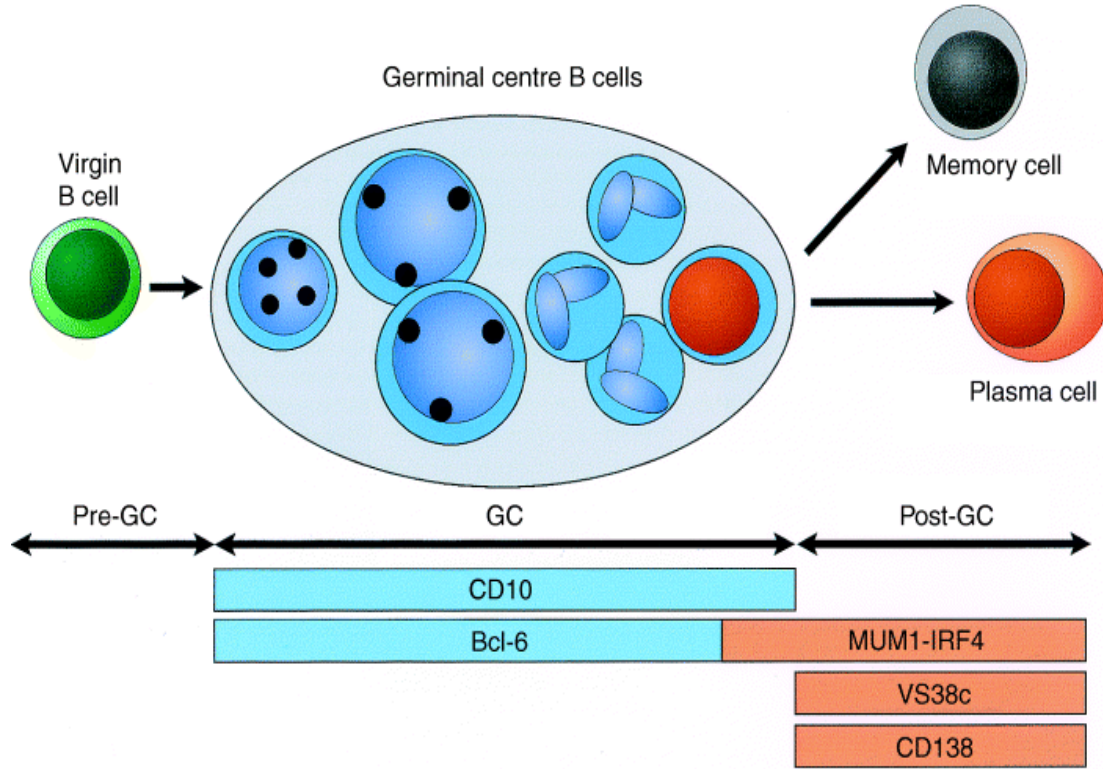
Non-GCB belirleyicileri olarak; MUM-1/IRF 4

GCB belirleyicileri olarak; CD 10 ve bcl-6

Non-GCB belirleyicileri olarak; MUM-1/IRF 4



Gen ekspresyon profilleri ile WHO sınıflamasında belirtilen DBBHL morfolojik varyantları arasında bir korelasyon saptanmamıştır, ancak GCB benzeri DBBHL daha sık sentroblastik monomorfik varyantda, ABC benzeri DBBHL'lar ise daha çok immünoblastik ve sentroblastik polimorfik varyantda görülmektedir (58).



CD 10

Çok çeşitli epitelyal ve nonepitelyal dokularda eksprese olan, 100-kd ağırlığında tip II hücre yüzey metalloproteinazıdır. Human membran ilişkili nötral endopeptidaz/ enkefalinaz olarak da bilinir (15,17,49).

CD 10, lenfoid germinal merkezlerde, renal tübüllerde, glomerüllerde, sınıtyotrofoblastlarda, hepatik parankimal kanaliküllerde ve en önemlisi bazı spesifik lenfoma tiplerinde eksprese olur (49).

Germinal merkez B hücrelerinin yüzeyinde eksprese olur ve B hücre gelişiminin düzenlenmesinde ve periferik B hücre diferansiyasyonunda rol oynar. Germinal merkez belirleyicisi olarak kabul edilir (15,17,36,42).

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) olgularında çok yüksek oranda eksprese olur (%90'ın üzerinde). ALL dışında, değişen oranlarda foliküler lenfoma (%59), Burkitt lenfoma (%90) ve DBBHL (%20-30) olgularında da ekspresyon gösterir (4,49).

bcl-6

İmmün sistemde rol oynayan önemli bir transkripsiyonel regülatör proteindir. Germinal merkez oluşumu ve T hücre bağımlı antijen yanıtında önemli rol oynar (44,56,62).

bcl-6 geni, 3 numaralı kromozom üzerinde yer alır (3q27) ve bazı kromozomal alterasyonlar (özellikle resiprokal translokasyon) sonucu eksprese olur. En sık görülen translokasyon Ig H lokusu ile olan t (3;14)(q27;q32)'dur, fakat farklı mekanizmalarla da (aberran somatik mutasyonlar, non-Ig lokus ile olan translokasyonlar) bcl-6 ekspresyonu görülebilir (15,36,42,56).

bcl-6, germinal merkezdeki B hücreleri tarafından (sentroblast+sentrosit) eksprese edilir, fakat immatür B hücre prekürsörleri yada diferansiye plazma hücreleri tarafından eksprese edilmez. Germinal merkez hücreleri yanı sıra düşük oranda interfoliküler ve intrafoliküler CD 4+ T hücreleri ve interfoliküler alanlardaki CD 30+ hücreleri tarafından da eksprese edilirler. Dolayısı ile bcl-6, germinal merkez kaynaklı B hücreli non-Hodgkin lenfomalarda (Burkitt lenfoma, foliküler lenfoma ve DBBHL) oldukça yüksek oranda eksprese olur (15,36,39,56,70).

DBBHL'da bcl-6 gen rearanjmanı %10-20 oranında görülürken, gen rearanjmanı olmaksızın bcl-6 ekspresyonu, değişik kaynaklarda %30-90 arasında bildirilmektedir (36,56).

Özellikle sentroblastik morfolojili DBBHL'da, immünoblastik morfolojiye göre daha yüksek oranda bir ekspresyon beklenmektedir. Bu, bcl-6'nın lenfoid dokudaki ekspresyonu ile koreledir. Nodal ya da ekstranodal DBBHL arasında bcl-6 ekspresyonu açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bcl-6 ekspresyonunun prognoz üzerine pozitif etkileri olduğunu gösteren araştırmaların yanı sıra, çoğu araştırmada da ekspresyon gösteren ya da göstermeyen olgular arasında belirgin bir prognostik fark olmadığı belirtilmiştir (36,44,56,76).

MUM1/IRF4 (multiple myeloma-1/interferon regulatory factor-4)

Myeloma bağlantılı t (6;14)(p25;q32) gen ürünüdür(42). IRF transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesidir. Bazı interferon ve sitokin sinyallerine yanıt olarak gen ekspresyon regülasyonunun düzenlenmesinde rol oynar (58).

MUM1, germinal merkezdeki B hücre diferansiasyonunun son basamağında görülür. Normal B hücreleri germinal merkezden çıktığında, MUM1 ekspresyonu gösterir. Bir ileri aşamada ise (plazma hücre/memory hücrelerine dönüş) CD 138 ekspresyonu görülür(42,58). DBBHL'da MUM1 ekspresyonu %50-75 oranındadır. MUM1 ekspresyonu, DBBHL'nın, B hücre diferansiasyonunun geç germinal merkez yada post-germinal merkez evresinden kaynaklandığını gösterir (42).

t(14,18) translokasyonu ve bcl-2 protoonkogeni

t (14,18) (q32,q21) , VDJ rekombinasyon sürecinde oluşan bir hatanın sonucudur ve bu translokasyon sonucu kromozom 18 üzerindeki q21 kolunda yer alan bcl-2 geni, kromozom 14 üzerinde yer alan Ig H ağır zincir üzerine binerek bcl-2'nin aşırı ekspresyonuna yol açar (4,8,10 11,13). Olguların %70'inde kromozom 18 üzerindeki kırılma noktaları, son bcl-2 exonunun 3' ucunda toplanmıştır (majör breakpoint region, MBR). Geri kalan az sayıda ki olguda ise, kırılma noktası daha uzaktır (minör cluster region, MCR) (36,62).

bcl-2 proteini, mitokondri iç membranında yer alır ve anti-apoptotik protein olarak programlı hücre ölümünü inhibe eder (29,30,36,42,73).

Normal lenfoid hücrelerde bcl-2 proteini, pregerminal merkez B hücre evresinde ekspresyon gösterir, ancak ekspresyonu B hücreleri germinal merkeze doğru göçtüğünde oldukça azalır (36). bcl-2'nin antiapoptotik özelliği, bir başka bcl-2 aile üyesi olan bax'ın etkisini (apoptozisi uyarır) heterodimerize etmesiyle ortaya çıkar. Yani apoptotik bir uyarı sonucu hücrenin yaşaması ya da ölmesi, bcl-2/bax oranına bağlıdır (36).

t (14,18) (q32,q21) sonucu bcl-2 ekspresyonunun artması, folliküler lenfoma veya folliküler hiperplazi yönünde bir gelişim gösterir, bu da t (14,18)'in folikül oluşumu ve folliküler lenfoma patogenezinde kritik bir rol oynadığını ortaya koyar (73). Folliküler lenfoma olgularının yaklaşık %80-95'inde bu translokasyon saptanır. Bcl-2 overekspresyonu, hem malign B hücrelerine yaşam şansı sağlar, hem de kemoterapiye dirençte kritik bir rol oynar (29). Bu biyolojik fonksiyonlar sonucunda da bcl-2 overekspresyonunun prognostik öneme sahip olduğu düşünülmektedir (29).

t (14,18) ve bcl-2 overekspresyonu, folliküler lenfoma dışındaki lenfoid ve nonlenfoid tümörlerde de görülebilir. Diffüz büyük B hücreli lenfomada t (14,18) görülme oranı, farklı kaynaklarda %12-40 arasında değişmektedir (36,42,73). Nodal DBBHL 'larda , ektranodal tümörlerle karşılaştırıldığında daha yüksek oranda bcl-2 ekspresyonu görülür (36). Bu konuda farklı yönde çalışmalar olsa da bcl-2 ekspresyonunun DBBHL olgularında prognoz üzerine etkisi olduğu görülmektedir (29,42,76). Bazı çalışmalarda ise t (14,18) pozitif olan DBBHL'ların folliküler lenfomadan geliştikleri (sekonder DBBHL) ileri sürülmektedir (36).

PTEN delesyonu

İlk defa 1997 yılında Cowden Sendromunda tanımlanan PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) geni kromozom 10q23 bölgesinde lokalize olan, tümör baskılayıcı bir gendir (18). Bu genin kodladığı 403 aa.lik bir protein olan PTEN, fosfotidilinozitol 3,4,5-trifosfatın D3 pozisyonundaki fosfatı ortadan kaldıran bir lipid fosfatazdır ve direk olarak fosfotidilinozitol 3-kinazın (PI3K) etkisini antagonize eder (53,54,64).

PTEN yokluğunda hücrelerde PIP3 birikimi AKT/PKB sinyal onkoproteinini aktive eder. Aktive AKT kaskad şeklinde apoptozis ve hücre siklus regülasyonunda önemli olan BAD, CASP3, CASP9, MDM2, p27 ve FOXO transkripsiyon faktörlerini de bulunduran pekçok hedefi uyarır ve mammalian target of rapamycin (mTOR) ve WNT/CTNNB1 gibi diğer AKT substratları; sellüler proliferasyon, diferansiasyon ve invazyona neden olurlar. Yani tümör oluşumunda PTEN inaktivasyonunun asıl sonucu, PI3K/AKT yolağı üzerine negatif düzenleyici etkisinin ortadan kalkmasıdır (53,64).

PTEN gen delesyonu veya mutasyonu özellikle glioblastoma multiforme ve prostat kanserlerinde tanımlanmıştır ama endometrium, meme, akciğer, böbrek, mesane, testis, baş-boyun kanserleri, malign melanom ve lenfomada da görülebilir. Ayrıca Cowden Sendromu ve Bannayan-Zonana Sendromu gibi bazı genetik hastalıklarda da olabilir (53,54,64).

Çalışmalar PTEN'in hücre büyümesi, apoptozis, ekstrasellüler matriks ile ilişkiler, hücre migrasyonu ve invazyonun düzenlenmesinde rolü olduğunu göstermiştir. PTEN geninin birçok dokuda onkogeneziste kritik rol oynadığı ileri sürülmektedir (64).

BURKİTT LENFOMA

Burkitt lenfoma (BL), monomorfik görünümde orta boyda B hücrelerinden oluşan, sıklıkla ekstrasnodal tutulum ya da akut lösemi tablosu ile ortaya çıkan, yüksek dereceli agresif bir lenfomadır. Non-Hodgkin lenfomalar içerisinde, matür B hücreli neoplaziler grubu içerisinde yer almaktadır (32).

Günümüzde kullanılan WHO klasifikasyonunda ise, Klasik Burkitt lenfoma ve BL varyantları (plazmasitoid diferansiasyon gösteren BL, atipik Burkitt/Burkitt like lenfoma) olarak sınıflandırılmaktadır (32).

BL'nın birbirinden farklı 3 klinik varyantı tanımlanmıştır (32,36,51,61,71);

1- Endemik BL

2- Sporadik BL

3- İmmünyetmezlik bağlantılı BL

1- Endemik BL

Endemik BL, ekvatoryal Afrika'da en sık görülen çocukluk çağı tümörüdür (71). 4-7 yaş arası çocuklarda pik yapar. Erkek/kız oranı: 2/1'dir. Sıklıkla çene ve diğer yüz kemiklerini tutar (%50), fakat böbrek, gastrointestinal sistem, over ve meme gibi dokularda da görülebilir (7,18,24,32,36,51,61,71).

Multipl bakteriyel, viral (EBV, HIV) ve parazitik enfeksiyonlara (malarya) bağlı olarak oluşan poliklonal B hücre aktivasyonunun patogeneizde etkili olduğu düşünülmektedir (32).

Endemik BL olgularının yaklaşık %95'nde EBV pozitifdir (18,71).

Tanı anında kemik iliği tutulumu %8 oranındadır (71).

2- Sporadik BL

Spesifik coğrafik yada iklimsel özellik göstermeyen, dünyanın herhangi bir yerinde görülebilen BL'dır.

Görülme sıklığı, endemik BL'ya göre daha düşüktür, Amerika ve Batı Avrupada erişkinlerde %1-2, çocuklarda ise %40 oranında görülür.

Erişkinlerde ortalama görülme yaşı 30'dur.

Erkek/kadın oranı: 2-3/1'dir.

Abdominal bölge-ince barsak sıklıkla tutulur, ancak over, böbrekler, mide, pankreas, omentum, Waldeyer halkası, SSS, testis gibi bölgelerde de tutulum olabilir (7,18,24,32). Klinik olarak hastalar, abdominal ağrı, bulantı, kusma, barsak obstrüksiyonu, GIS kanama yada akut apandisit düşündürülen bulgularla başvurabilir (7). Puberte yada laktasyon zamanında bilateral meme tutulumu görülebilir (18,32).

Tanı anında kemik iliği tutulumu %10-30 arasındadır (7,18,24,32).

Sporadik BL olgularının EBV ile ilişkisi, endemik olanlara göre daha düşüktür (%30'un altında) (18,71).

3- İmmünyetmezlik bağlantılı BL (immunodeficiency associated BL)

Çoğunlukla HIV pozitif hastalarda görülür, ancak allograft alıcıları ya da konjenital immünyetmezlikli hastalarda da görülebilir (7,18,24,32,51,61,71). Diğer non-Hodgkin lenfomalarla (DBBHL) birliktelik gösteren HIV(+)'lara göre, HIV (+) Burkitt lenfomalar, daha genç hastalardan oluşur, çoğunlukla AİDS tanısını yeni almışlardır ve CD 4 oranı oldukça yüksektir (>200) (7,18).

HIV'in direk lenfomagenezde etkili olmadığı ancak indirek olarak sitokin regülasyonu, kronik antijenik uyarı ve azalmış immün yanıt ile lenfoma patogenezinde etkili olduğu düşünülmektedir (18).

%25-40 olguda EBV pozitifdir (32).

Sıklıkla lenf nodu, kemik iliği ve ektranodal alanları (abdomen) tutar (18).

Transplant alıcılarında ise BL, çoğunlukla transplant sonrası uzun bir zaman (yaklaşık 4.5 yıl) sonra görülür (18).

Klinik varyantlarından bağımsız olarak, hemen tüm BL'lar çok büyük kitleler şeklinde ortaya çıkar ve tümörün büyüme hızı (doubling time) çok yüksektir. Bununla bağlantılı olarak, tedavi sonrasında çok hızlı bir şekilde tümör hücrelerinin ölmesiyle ortaya çıkan intraselüler komponentler (pürin, ksantin, hipoksantin, ürik asit, fosfataz, potasyum) tümör lizis sendromuna neden olur (hiperkalemi-kardiak arrest, hiperfosfatemi-sekonder hipokalemi, renal tübüllerde ksantin, ürik asit, fosfat birikimi- böbrek yetmezliği). Bu sendrom, Burkitt lenfoma için son derece karakteristiktir, ancak büyüme fraksiyonu yüksek olan başka lenfoma tiplerinde de görülebilir (32).

Patoloji:

Makroskopi

BL, gros olarak büyük solid kitleler şeklindedir. Çoğunlukla tutulan organ kitle tarafından tümüyle infiltre edilmiştir. Sıklıkla hemoraji ve nekroz eşlik eder. Eğer tümör çok büyükse, hangi organ ya da dokudan köken aldığını gros olarak saptamak mümkün değildir. Komşu organ ya da dokular da çoğunlukla tutulmuştur. Endemik ve sporadik BL vakalarında nodal tutulum nadirdir, genellikle tümör tarafından çevrelenmiş, fakat tutulum olmayan lenf nodları izlenir (32,36).

Morfolojik olarak BL, WHO klasifikasyonuna göre, Klasik BL ve ve BL varyantları (plazmasitoid diferansiasyon gösteren BL, atipik Burkitt/Burkitt like lenfoma) olarak ayrılmıştır.

Klasik BL

Endemik ve yüksek oranda sporadik BL olgularında görülür (32).

BL, hemen daima diffüz bir büyüme patterni gösteren transforme lenfoid hücrelerin homojenöz proliferasyonudur. Nadiren erken dönem BL olgularında lenf nodunun yalnızca germinal merkezi tutulur. Neoplastik hücreler uniform boyut ve şekildedir. Hücreler orta boydadır. Yuvarlak ya da oval nükleusları vardır, bazen nükleusta girintiler oluşabilir. Kaba kromatin, şeffaf parakromatin yapıları ve sayıları 2-5 arası değişebilen bazofilik nükleoller vardır. Sitoplazmaları belirgin bazofilik görünümde olup, sıklıkla bir ucunda lipid vakuolleri içerir. Bu vakuoller taze dokuda nötral yağ boyaları ile saptanabilir (32,36,51,61,71).

Tümör çok yüksek bir proliferasyon oranına sahiptir (Ki-67 oranı:%100). Çok sayıda mitotik figür, tümörün büyüme hızı ile orantılı olarak çok yüksek oranda da spontan hücre ölümü görülür. Hücre ölümü sonucu oluşan nükleer artıkları içeren çok sayıdaki makrofaj (tingibl body makrofaj) neoplastik hücrelerin arasında yıldızlı gökyüzü görünümü (starry-sky pattern) oluşturarak BL'ya son derece karakteristik bir görünüm kazandırır. Yıldızlı gökyüzü görünümü, BL'ya patognomonik değildir, hızlı büyüyen, yüksek oranda hücre yıkımı içeren tümörlerde de görülebilir (32,36,51,61,71).

BL varyantları:

- a- Plazmasitoid diferansiyasyon gösteren BL: Bu varyantta tümör hücreleri, ekzantrik bazofilik sitoplazmalı ve sıklıkla tek santral nükleollüdür. Klasik BL'dan farklı olarak, tümör hücreleri daha pleomorfik görünümündedir. İmmünyetmezlikli hastalarda en sık görülen BL tipidir. Monotipik intrasitoplazmik Ig pozitifdir (32).
- b- Atipik Burkitt/Burkitt like lenfoma: WHO klasifikasyonunda tanımlanan özellikleri:
- 1- Morfolojik olarak Burkitt lenfoma ile benzer özellikleri yanısıra (yüksek mitotik oran, belirgin sitoplazmik bazofili, yıldızlı gökyüzü görünümü), farklı olarak daha belirgin nükleer pleomorfizm ve nükleol varlığı ile karakterlidir.
 - 2- Büyüme fraksiyonu yaklaşık olarak %100 civarındadır.
 - 3- tr (8;14)(q24;q32) hemen tüm olgularda saptanır (Ig/MYC) (48).

Myc ekspresyonu ile sonuçlanan tr (8;14)'in hem morfolojik, hemde tümörün agresif klinik gidişinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ancak morfolojiye dayanarak Atipik BL tanısı konan hastaların tümünde bu translokasyonun saptanması oldukça zor olacağından, myc rearanjmanı yerine kullanılacak daha pratik bir yöntem olarak tümörün proliferasyon fraksiyonu düşünülmüştür. Sitogenetik analizin yapılamadığı durumlarda Ki-67 proliferasyon oranı %100'e yakın olmadıkça Atipik BL/BLL tanısı vermekten kaçınılmalıdır (2,48).

Sonuçta BLL, DBBHL ile BL arası borderline sitolojik özellikler gösteren yüksek dereceli matür B hücreli bir neoplazidir. BLL'yı DBBHL veya BL kategorisinde değerlendirme konusunda çok sayıda çalışma ve yayın mevcuttur. BLL, BL'dan morfolojik özellikleri ile ayrılırken, DBBHL'dan onkogen ekspresyon profili ve proliferatif oran ile ayrılmaktadır.

BLL'da Ki-67 oranı %90-100 iken, DBBHL'da Ki-67 oranı %53'dür. tr (8;14), BLL olgularının %85'inde saptanırken, DBBHL'da yaklaşık olarak %16 oranında görülür. Öte yandan DBBHL'ların yaklaşık %20-40'nda görülen tr (14;18), BLL olgularının hemen hiçbirinde görülmez. Klinik gidişlerine bakıldığında, bu lenfomaların Burkitt lenfomaya benzer bir gidiş gösterdiği görülmüş ve onkologlar tarafından da Burkitt lenfoma gibi tedavi edilmeleri gerektiği fikrine varılmıştır. Tüm bu bulguların değerlendirilmesi sonucunda, BLL'nın BL kategorisi altında değerlendirilmesinin daha doğru olacağı düşünülmüş ve WHO klasifikasyonunda Atipik BL/BLL, Burkitt lenfomanın bir morfolojik varyantı olarak tanımlanmıştır (2,9,48).

İmmünohistokimya

Burkitt lenfoma, B lenfoid hücre neoplazisidir ve immünohistokimyasal olarak da germinal merkez hücrelerinin fenotipik özelliklerini gösterir; Pan B hücre markerları (CD 19, CD 20, CD 22, CD 79a) ve germinal merkez B hücrelerinde bulunan proteinleri (CD 10, bcl-6, CD 38, CD 40) eksprese ederler. CD 10 ve bcl-6 pozitifliği, tümörün germinal merkez orijinini gösterir. Yüzey Ig hafif zincir (Ig M>Ig G>Ig A) ekspresyonu görülür. T hücre markerları (CD5, CD 23) negatiftir. Tdt negatiftir. EBV ile bağlantılı olan BL olgularında (çoğunlukla endemik form) CD 21 proteini pozitifdir. CD 21, EBV ve C3d'ye bağlanan bölümler içerir. Ki-67 oranı %100'e yakındır (7,18,24,32,36).

Prognoz ve tedavi

Burkitt lenfoma, ikiye katlanma süresi çok kısa olan, oldukça hızlı büyüyen agresif bir tümördür. Tümör boyutu çok kısa sürede korkutucu boyutlara ulaşabilir. Hastaların bir kısmı tümördeki bu saatler veya günler içindeki hızlı büyümeye bağlı olarak daha tedaviye başlanmadan organ yetmezliği nedeniyle kaybedilir. Progresif tümör büyümesi sonucu üreterik kompresyon ya da diffüz böbrek tutulumu/intestinal obstrüksiyon/seröz efüzyon veya hava yolu obstrüksiyonu ölüm nedenidir.

Dolayısıyla BL'lı hastalarda tedavideki ana prensip; mümkün olan en kısa sürede evreleme yapıp tedaviye başlamaktır (18,32,36). Murphy ve Hutsu tarafından yapılan evreleme günümüzde hala kullanılmaktadır, tablo-3'de özetlenmiştir (7,32). BL vakalarının %30'u erken evre (Evre I,II) iken %70'i ileri evredir(Evre III, IV)(18,32).

BL'da esas tedavi kemoterapidir. Kullanılan kombine kemoteropatik ajanlarla oldukça yüksek oranlarda kür sağlanmaktadır. Erken evre BL'da 5 yıllık yaşam oranı %90 iken ileri evre BL'da bu oran %60-80 arasındadır. Endemik olgularda prognoz, sporadik olgulara göre daha iyidir. Çocuklarda kemoterapiye yanıt daha yüksektir. Kemik iliği ve SSS tutulumu, ileri yaş, 10 cm'in üzerinde rezeke edilemeyen tümörler ve serum LDH düzey yüksekliği kötü prognostik faktörlerdir (32,36).

BL'lı hastalarda cerrahi tedavi, histolojik tanıyı koymak ya da acil cerrahi gerektiren durumlar (GIS kanama, ince barsak perforasyon) dışında pek uygulanmaz. Relaps, tanıdan sonra ilk 1 yıl içerisinde görülebilir. 2 yıl relaps göstermeyen hastalar kür kabul edilirler (36).

Tablo-3 : Burkitt lenfoma evrelemesi (Murphy)

Evre	Tanımlama
I	tek tümör (ekstranodal) ya da tek anatomik alan (lenf nodu),mediasten ya da abdomen yayılımı yok
II	tek tümör (ekstranodal)+bölgesel lenf nodu tutulumu 2 ya da daha fazla nodal alan, diyaframın tek tarafında 2 tek ekstranodal tümör, diyaframın tek tarafında bölgesel lenf nodu tutulumu var ya da yok Primer GIS tümör, ileoçekal alanda, mezenterik lenf nodu tutulumu var ya da yok
IIIR	Tümüyle rezeke edilen abdominal kitle
III	2 tek tümör (ekstranodal), diyaframın farklı alanlarında 2 ya da daha fazla nodal alan, diyaframın üst ve altında Tüm primer intratorasik tümörler (mediastinal, plevral, timik) Tüm paraspinal ve epidural tümörler Tüm yaygın primer intrabdominal kitleler
IIIA	Lokalize fakat rezeke edilemeyen abdominal kitleler
IIIB	Yaygın multiorgan abdominal kitle
IV	Kemik iliği ve/veya SSS tutulumu gösteren tümörler

BURKİTT LENFOMADA MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

BL vakalarının yaklaşık %85'inde tr (8;14) saptanır, bu translokasyon sonucu 8. kromozom üzerindeki c- myc protoonkogeni 14.kromozom üzerindeki Ig ağır zincir bölgesine transloke olur, bu translokasyon sonucu da c-myc ekspresyonu artar. C-myc ekspresyonunun artması sonunda malign süreç oluşumuna götüren çok sayıda hücresel olayı tetikler (7,75).

c- myc amplifikasyonu:

Myc genleri, DNA'ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlar. Bu proteinler hücre proliferasyon ve diferansiyasyonunda etkilidir ve DNA sentezinin başlamasında rol alırlar. Klonlandıkları kültürlerle ve elde edilme şartlarına göre bu genler, c-myc, N-myc ve L-myc den oluşur (33,43,70).

c-myc 64 kd ağırlığında bir protoonkogenidir ve hücre proliferasyon, diferansiyasyon, matürasyon ve sinyal transdüksiyonunda görev alan bir proteini kodlar (basic helix-loop-helix). Malign transformasyon ve devam eden ekspresyonuna bağlı olarak da tümör büyümesinde etkilidir. Translokasyon (8;14)(q24;q32) sonucu, kromozom 8 üzerindeki myc onkogeni, kromozom 14 üzerindeki Ig H lokusu üzerine binerek, c-myc amplifikasyonuna yol açar. Daha az sayıda olguda bu translokasyon kromozom 2 ile 8 ya da 8 ile 22 arasında olur (8,36,37,43,55,70).

c-myc'in tümör patogenezi üzerindeki etkileri çok çeşitlidir (7,8,24);

1- Hücre siklus progresyonu	Siklin D1 ve Siklin D2 ↑ CDK2 ve CDK 4 yolunu aktive eder. P21 VE P27 ↓
2- Apoptozis	P19'u uyarır. P 53 ↑ Fas/FasL aktive eder. Bax
3-Hücre büyümesi ve diferansiasyonu	gas 1'i süprese eder. Gadd45'i süprese eder.
4- Hücre metabolizması	LDHA üretimini stimüle eder. GLUT-1 (glukoz transfer) ↑ Fosfofruktokinazı aktive eder.
5- Hücre adezyonu	LFA-1 ↓ Kollajen üretimi ↓ Fibronektin ↓

c-myc translokasyonu, Burkitt lenfoma olgularının yaklaşık %90'ında saptanırken, DBBHL'da bu oran %16 civarındadır (36,37,70). Ekstranodal DBBHL olgularında, nodal olanlara göre bu oran daha yüksektir. Bunların dışında nadirde olsa c-myc translokasyonu görülebilen lenfomalar; transforme foliküler lenfoma, blastoid varyant mantle hücreli lenfoma, kronik lenfositik lösemidir (1,34,36,40).

c-myc ekspresyonu, Ig lokusuna translokasyon, somatik hipermutasyon ya da gen amplifikasyonu yolu ile olur. DBBHL'da sırası ile c-myc ekspresyonuna sebep olan bu kromozomal alterasyonların oranı %10, %32, %16'dır, yani DBBHL olgularının büyük kısmında c-myc ekspresyonu translokasyon bağımsızdır, bu da DBBHL/Burkitt lenfoma ayırımında oldukça değerlidir (70).

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar:

2000-2007 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim dalında tanı alan 45 Diffüz büyük B hücreli lenfoma, 11 Burkitt lenfomadan (8 klasik ve 3 Atipik Burkitt lenfoma) oluşan toplam 56 olgu incelendi. Tüm olguların Hematoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyalı preparatları retrospektif olarak WHO kriterlerine göre değerlendirildi. Hastaların prognoz bilgilerin, klinik izlem dosyalarından veya hastalara ulaşılarak büyük oranda ulaşıldı.

İMMÜNHİSTOKİMYASAL YÖNTEM:

Formalin ile tespit edilen dokulara ait parafin bloklardan 4 mikrometre kalınlıkta kesitler polilizinli lamlara alındı. bcl-2, bcl-6, CD 10, MUM-1 ve Ki-67 ekspresyonunu belirlemek için streptavidin-biyotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı. Kullanılan antikorlar Ki-67, CD 10, bcl-2 ve bcl-6 ve MUM-1 (mouse monoklonal Ig G) olup, 1:25 oranında PBS ile dilüe edildi. Kullanılan biyotinlenmiş bağlayıcı (sekonder) antikor, streptavidin-biyotin kompleksi ve kromojen olarak kullanılan 3-Amino 9-Ethylcarbazole (AEC) ticari olarak kullanıma hazır kitler şeklinde idi. Tüm antikorlar için pozitif kontrol olarak tonsil dokusu kullanıldı.

Hazırlanan parafin doku kesitleri Ki-67, CD 10, bcl-2, bcl-6 ve MUM-1 antikoruna ile aşağıdaki prosedüre göre boyandı:

- 1- Polilizinli lam üzerine alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler, 56°C'lik etüvde 12 saat bekletilerek deparafinize edildi.
- 2- Kesitler 30 dakika ksilolde bekletildi.
- 3- Her birinde beşer dakika bekletilerek sırasıyla %100, %95 ve %90'lık alkolden geçirilerek dokuların hidrasyonu sağlandı.

- 4- Çeşme suyu ile yıkandı.
- 5- Endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildi.
- 6- PBS buffer (pH 7.6) ile 5 dakika süresince yıkandı.
- 7- 0,01 M. Sodyum tris-EDTA buffer (pH 9.0) içinde toplam 30 dakika mikrodalga fırında işleminden geçirildi.
- 8- 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 9- Distile su ile 3 kez yıkandı.
- 10- Kesitler 10 dakika süre ile non-immün protein bloklama serumunda bekletildi.
- 11- Primer antikor olan Ki-67 (clone: L428, DakoCytomation), bcl-2 (klon:100, Santacruz), bcl-6 (klon: D-8, Santacruz), CD 10 (klon: 97C5, Santacruz) ve MUM-1 (DakoCytomation) lam üzerindeki doku kesitlerini kapatacak şekilde damlatıldı ve oda sıcaklığında 2 saat süre ile bekletildi.
- 12- 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı ve kurulandı.
- 13- Bağlayıcı (sekonder) antikor (Multi-species ultra streptavidin detection system-HRP; Zymed, Massachusetts, USA) ile oda sıcaklığında 20 dakika süre ile inkübasyon yapıldı.
- 14- 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı.
- 15- Streptavidin-biyotin kompleksi uygulanarak 30 dakika bekletildi (Zymed).
- 16- 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı.
- 17- Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla AEC (3-Amino 9-Ethylcarbazole; Lab-Vision, Neomarkers, USA) ile 10 dakika süre ile inkübasyon yapıldı.
- 18- 5 dakika distile su ile yıkandı.
- 19- Hızlı boyama yöntemi Mayers Hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı.

20- Dehidrasyon için kesitler sırayla %90, %95 ve %100'lük alkollerde 5'er dakika tutuldu.

21- Ksilolde şeffalaştırıldı.

22- Doku kesitleri entellan kullanılarak kapatıldı.

Boyanma derecelerinin değerlendirilmesi:

Boyanma derecesi yarı kantitatif bir yöntemle farklı zamanlarda iki kez değerlendirildi. Pozitif boyanan tümör hücrelerinin tüm tümör dokusuna oranı belirlendi. Tümör hücrelerinin %30'dan fazlası boyanmışsa pozitif olarak kabul edildi (54). Boyanan tümör hücreleri oranı %30'dan az ise negatif olarak kabul edildi. Bcl-2, bcl-6, MUM-1 ve Ki-67 için nükleer boyanma, CD 10 için ise membranöz boyanma pozitif kabul edildi.

FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH) YÖNTEMİ:

Pozitif şarjlı lam üzerine alınan 2 mikron kalınlığındaki kesitler 56°C'lik etüvde 12 saat bekletilerek deparafinize edildi.

- 1- 3 kez 10'ar dakika süre ile %100 ksilol içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 2- 2 kez 5'er dakika süre ile %100 etanol içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 3- 45-50 derecelik hotplate üzerinde 2-5 dk. kurutuldu.
- 4- 20 dk. süre ile 2 N HCL içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 5- 3 dk. süre ile distile su içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 6- 3 dk. süre ile wash buffer içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 7- 30 dk. süre ile 80 derecelik su banyosunda önceden bu ısıya getirilmiş pretreatment solüsyonu (Paraffin Pretreatment Kit, Vysis) içeren şalede inkübe edildi.
- 8- Lamlar 1 dakika süre ile distile su içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 9- 2 kez 5'er dakika süre ile wash buffer içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 10- 10 dk. süre ile 37 derecelik etüvde önceden bu ısıya getirilmiş protease solution içeren şalede bekletildi.

- 11- 2 kez 5'er dakika süre ile wash buffer içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 12- 45-50 derecelik hotplate üzerinde 2-5 dk. kurutuldu.
- 13- 10 dk. süre ile %10 tamponlanmış formalin içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 14- 2 kez 5'er dakika süre ile wash buffer içeren şalede oda sıcaklığında bekletildi.
- 15- 45-50 derecelik hotplate üzerinde 2-5 dk. kurutuldu.
- 16- Her birinde 3'er dakika bekletilerek sırasıyla %70, %85 ve %100'lük etanolden geçirildi.
- 17- 45-50 derecelik hotplate üzerinde 2-5 dk. kurutuldu.
- 18- Bundan sonraki aşamalar karanlıkta gerçekleştirildi.
- 19- Önceden oda ısısına getirilmiş prob tüpü vortekslendi, mikrosantrifüjde spin atıldı ve tekrar vortekslendi.
- 20- Herbir lamın hedef alanına 10 µl prob (LSI[®] IGH (14q32) Spectrum Green/BCL2 (18q21) Spectrum Orange Dual Color, DNA Probe, Vysis; LSI C-MYC (8q24.12-q24.13) Spectrum Orange Probe, Vysis; LSI[®] PTEN (10q23) / CEP[®] 10 Dual Color Probe, Vysis) damlatıldı ve hemen uygun boyutta bir lamelle hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı.
- 21- Lamellerin etrafı rubber cement ile çevrelendi.
- 22- Lamalar Hybrite cihazına yerleştirilip kapağı kapatıldı ve önceden programlanan prosedür başlatıldı. (denatürasyon 73°C → 5 dk., Hibridizasyon 37°C → 16 saat)
- 23- Bir gece hibridizasyondan sonra lamaların üzerinden rubber cement ayrıldı ve oda ısısındaki yıkama solüsyonu içerisinde çalkalanarak lamellerin ayrılması sağlandı.
- 24- 2 dk. süre ile su banyosunda önceden 73°C a getirilmiş olan yıkama solüsyonu içerisinde bekletildi.
- 25- Lamalar oda ısısında distile su içeren şaleye batırılıp çıkarıldıktan sonra karanlıkta kurumaya bırakıldı.

26- Herbir hibridizasyon alanına 10 µl. 4'6-diamidino-2-phenylinodole (DAPI II Counterstain, Abbott Laboratories) damlatılarak uygun boyutta lamelle kapatıldı.

27- Lamalar analiz öncesi en az 15 dakika buzdolabında bekletildi.

FISH değerlendirilmesi:

LSI® IGH (14q32) ve LSI® PTEN (10q23) / CEP® probeları için her bir preparatta 200 tümör hücresi sayıldı ve bu 200 hücre içinde pozitif hücrelerin yüzdeleri hesaplandı. (LSI® IGH (14q32) Spectrum Green/BCL2 (18q21) Spectrum Orange Dual Color, DNA Probe için %20 ve üzerindeki hücrede bir füzyon, bir kırmızı ve bir yeşil sinyalin varlığı, LSI® PTEN (10q23) / CEP® 10 Dual Color Probe için %30 ve üzerindeki hücrede bir kırmızı ve iki yeşil sinyalin bulunması pozitif kabul edildi. LSI C-MYC (8q24.12-q24.13) Spectrum Orange Probe için ise 40 hücre sayıldı ve bu tümör hücrelerinde C-myc gen/ CEP2 oranı 2 ve üzerinde ise amplifikasyon var olarak kabul edildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 10.0 paket programı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar ortalama ± std. sapma olarak ifade edildi. Gruplar arasında farklılık olup olmadığı Mann-Whitney testi ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ alındı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 56 hastanın 30'u (%53.6) erkek, 26'sı (%46.4) kadındı. Ortalama yaş 48.73 ± 22.59 (3-84) idi.

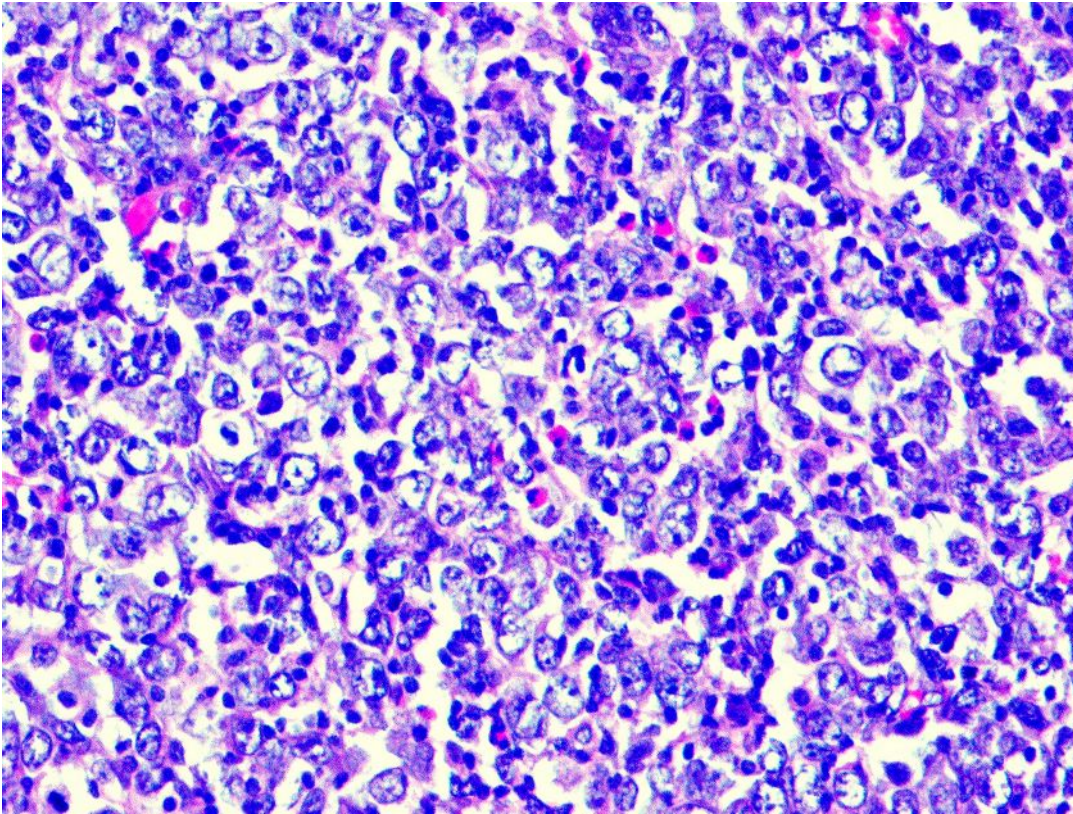
Toplam 42 hastanın klinik izlem verilerine ulaşıldı. Hastaların ortalama sağ kalım süreleri 13.30 ± 13.166 (1-65) aydı. Takip edilen 42 hastanın 29'u (%51.8) takip süresi sonunda hayatta idi. Buna karşılık 13 hasta (%23.2) takip sonunda kaybedildi. Kemik iliği tutulumu açısından değerlendirilen 40 hastadan 8'inde (%14.3) tutulum görülürken, 32'sinde (%57.1) kemik iliği tutulumu saptanmadı.

56 vakanın 45'i (%80.4) Diffüz Büyük B hücreli Lenfoma (DBBHL), 11 tanesi ise (%19.6) Burkitt lenfoma (BL) olarak tanı almıştı. Retrospektif olarak incelenen preparatlar, WHO kriterlerine göre tekrar değerlendirildiğinde ilk tanıları ile aralarında bir fark olmadığı görüldü.

DBBHL

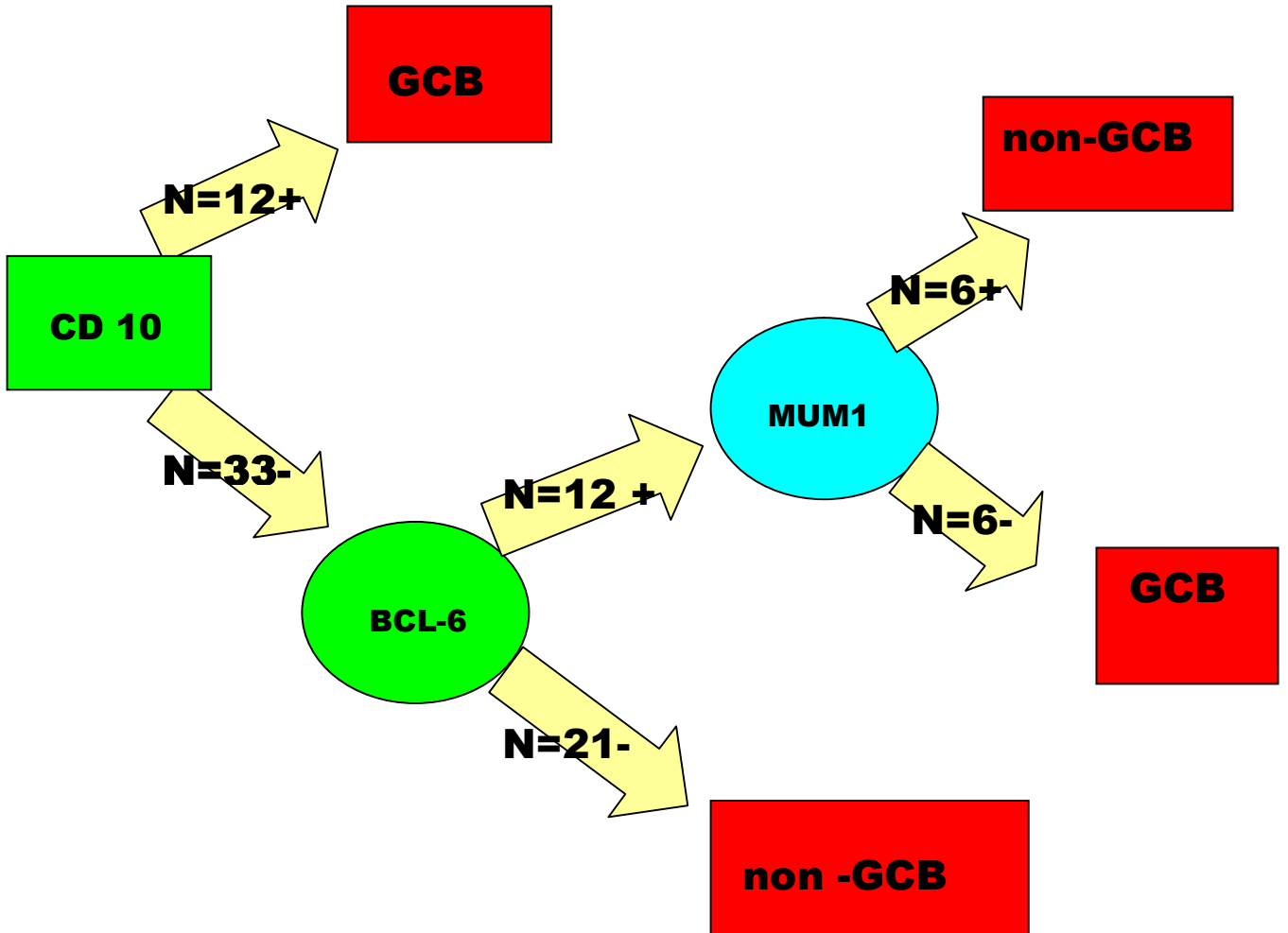
DBBHL tanısı alan 45 olgunun 22'si (%48.9) kadın, 23'ü (%51.1)'i erkek idi. Ortalama yaşları 54 ± 19.684 (3-84). Toplam 34 hastanın klinik izlem verilerine ulaşıldı. Hastaların ortalama sağ kalım süreleri 14.15 ± 13.264 (4-65) aydı. Takip edilen 23 hasta (%67.6) takip sonunda hayatta idi. 11 hasta (%32.4) takip sonunda kaybedildi. Kemik iliği tutulumu, takip edilen 33 hastanın 5'inde (%15.2) pozitif iken, 28'inde (%84.8) negatif idi.

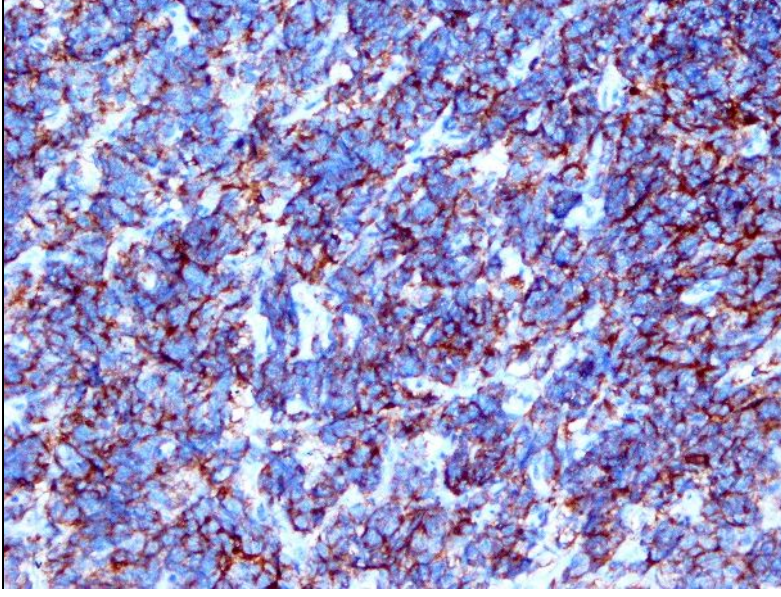
WHO kriterlerine göre morfolojik olarak değerlendirilen tüm DBBHL olgularına ortak bir immünohistokimyasal panel uygulandı. Tümüne bcl-2, bcl-6, CD 10 (mouse monoklonal Ig G) yapıldı. Bcl-2, 45 olgunun 25'inde (%55.6) pozitif iken, 20'sinde (%44.4) negatif idi. Bcl-6, 16 olguda (%35.6) pozitif iken, 29'unda (%64.4) negatif idi. CD 10 ise, 12 olguda (%25,8) pozitif, 33'ünde (%74,3) negatif saptandı. Yapılan bu immünohistokimyasal panele göre DBBHL olguları, GCB- like (germinal merkez B hücre benzeri) DBBHL ve ABC- like (aktive B hücre benzeri) DBBHL olarak ayrıldı.



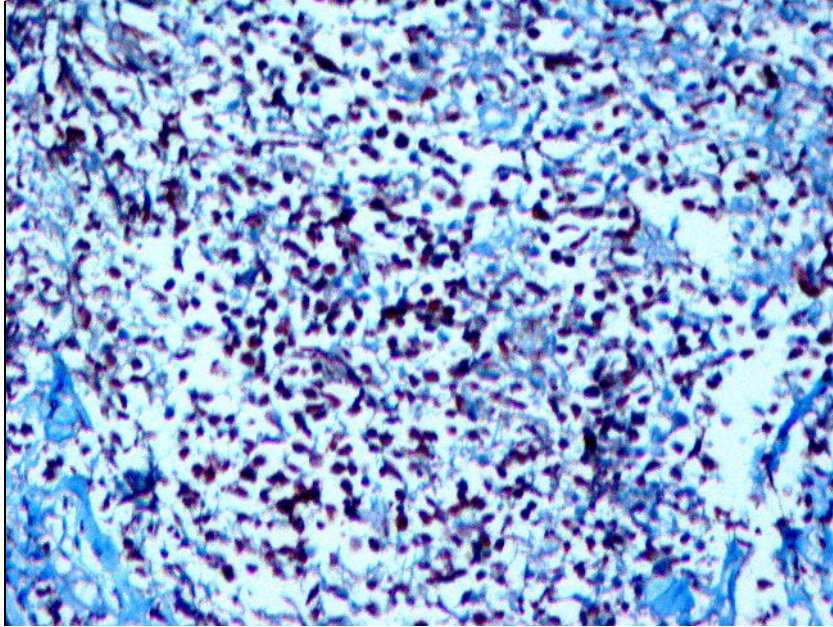
Resim-1: DBBHL. Yuvarlak, veziküler nükleuslu, belirgin 1-2 nükleollü ve dar sitoplazmalı, büyük boyda hücrelerden oluşan malign lenfoid tümör (HEX400)

GCB benzeri DBBHL'lar germinal merkez B hücrelerinden köken alırken, ABC benzeri DBBHL'lar post-germinal merkez B hücrelerinden köken alırlar. Buna dayanarak GCB markerı olarak CD 10 ve bcl-6 kullanıldı. CD 10 pozitif olan 12 olgu doğrudan GCB alt tip olarak değerlendirildi. Buna karşılık CD 10 negatif olan 33 olguda bcl-6'ya bakıldı, bcl-6'sı da negatif olan 21 olgu non-GCB ya da ABC tipi DBBHL olarak değerlendirildi. CD 10 negatif olup, bcl-6 pozitif olan 12 olguda ise post-germinal merkez B hücre markerı olarak ortaya atılan MUM1/IRF 4 bakıldı ve bunun sonucuna göre 6'sı MUM1 negatif olup, GCB alt tipi, 6'sı MUM1 pozitif olup, non-GCB alt tipi olarak değerlendirildi. Sonuç olarak 45 DBBHL olgusunun 18'i (%32.1) GCB, 27'si (%48.2) ABC alt tipi olarak değerlendirildi.

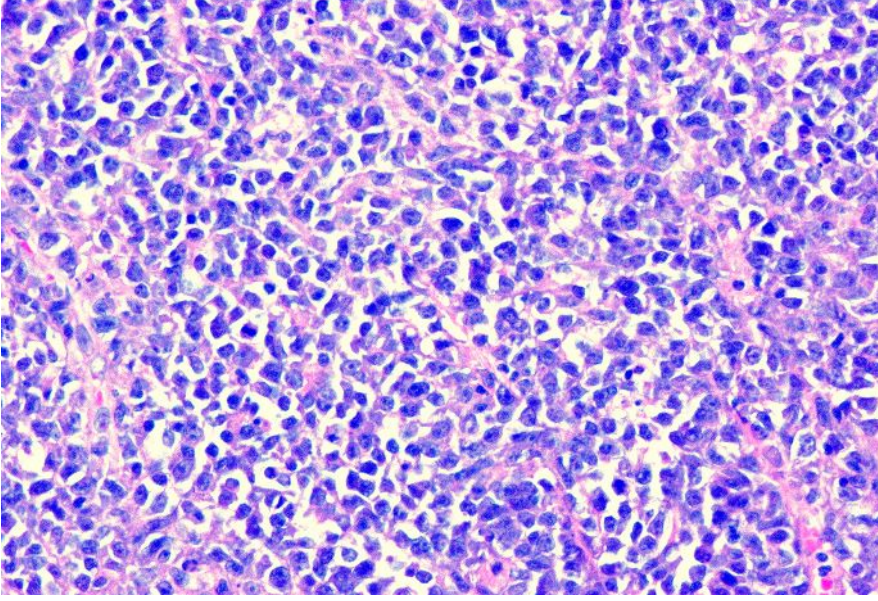




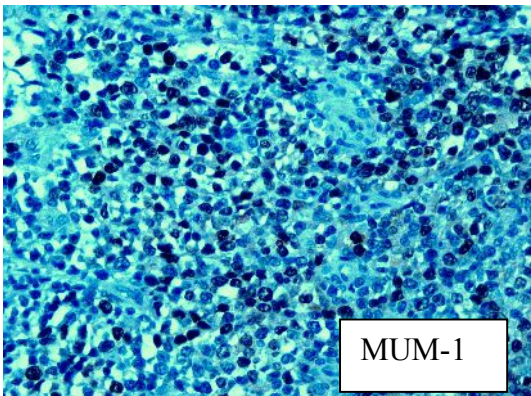
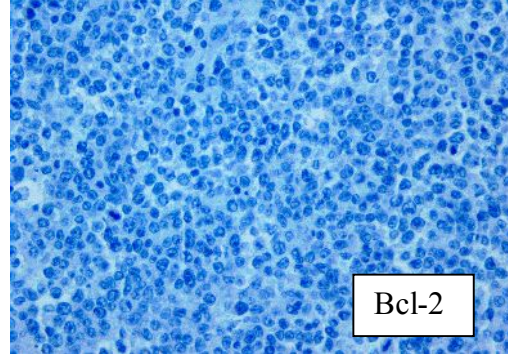
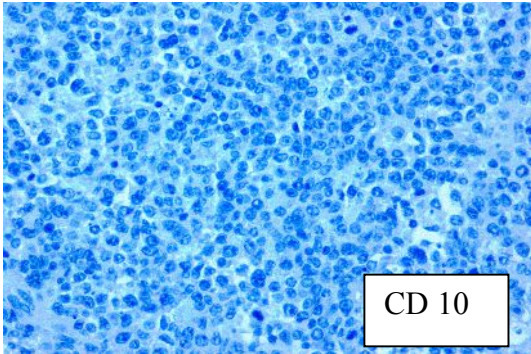
Resim 2: DBBHL'da (GCB alt tipi) immünohistokimyasal olarak CD 10 boyası ile tümör hücrelerinde membranöz boyanma (CD 10x 200)



Resim 3: DBBHL'da (GCB alt tip) immünohistokimyasal olarak bcl-6 boyası ile tümör hücrelerinde nükleer boyanma (bcl-6x 400)



Resim 4: DBBHL. Koyu hiperkromatik nükleuslu, belirgin nükleollü, dar sitoplazmalı orta boyda hücrelerden oluşan malign lenfoid tümör



Resim 5: DBBHL, ABC alt tipinde immünohistokimyasal panel (CD 10x200, bcl-6x200, MUM1x200)

Diffüz Büyük B hücreli lenfomalarda C-Myc amplifikasyonu, PTEN delesyonu, t (14;18) translokasyonu

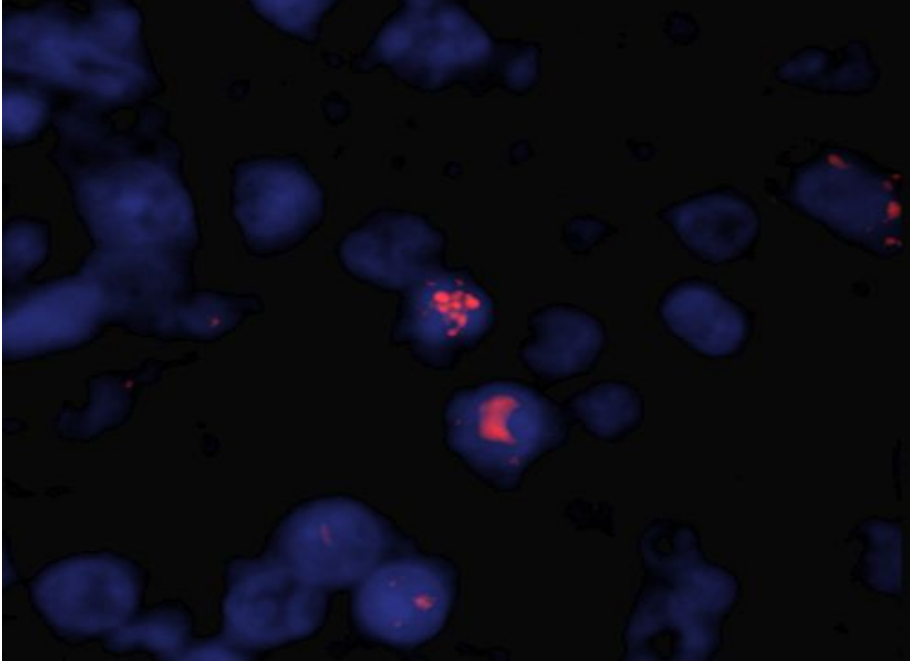
GCB ile ABC subtipleri arasında sitogenetik olarak bir fark olup olmadığı, FISH yöntemi ile c-myc amplifikasyonu, PTEN delesyonu, t (14,18) translokasyonu bakılarak değerlendirildi.

			c-myc		Toplam
			Negatif	pozitif	
Tanı	GCB	Sayı	9	6	15
		Yüzde	%60	%40	%100
	ABC	Sayı	9	8	17
		Yüzde	%52.9	%47.1	%100
Toplam		Sayı	18	14	32
		Yüzde	%56.3	%43.8	%100

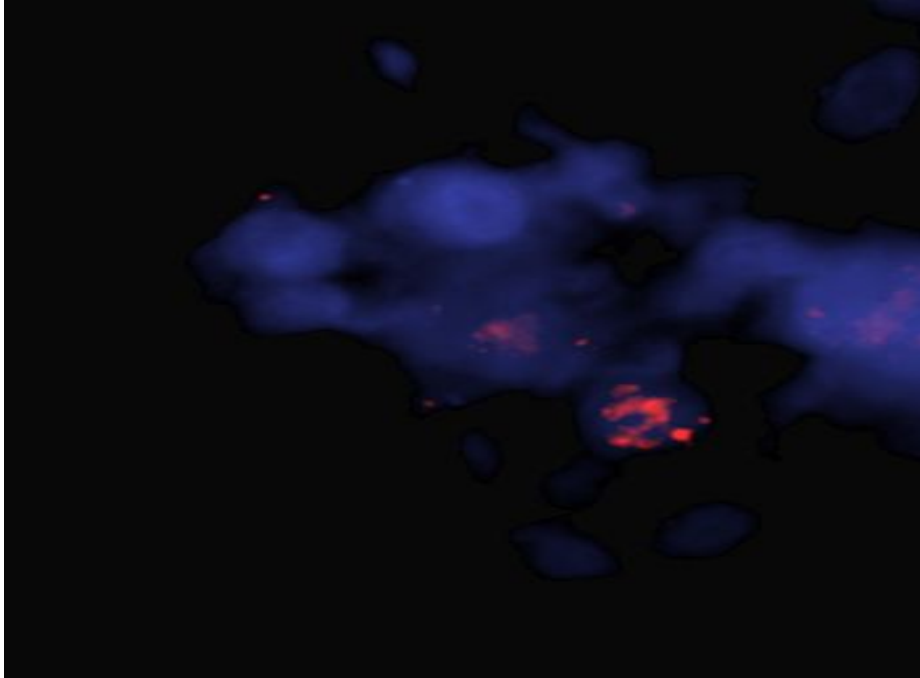
			PTEN		Toplam
			Negatif	pozitif	
Tanı	GCB	Sayı	12	2	14
		Yüzde	%85.7	%14.3	%100
	ABC	Sayı	10	6	16
		Yüzde	%62.5	%37.5	%100
Toplam		Sayı	22	8	30
		Yüzde	%73.3	%26.7	%100

			t(14,18)		Toplam
			Negatif	pozitif	
Tanı	GCB	Sayı	10	1	11
		Yüzde	%90.9	%9.1	%100
	ABC	Sayı	14	1	15
		Yüzde	%93.3	%6.7	%100
Toplam		Sayı	24	2	26
		Yüzde	%92.3	%7.7	%100

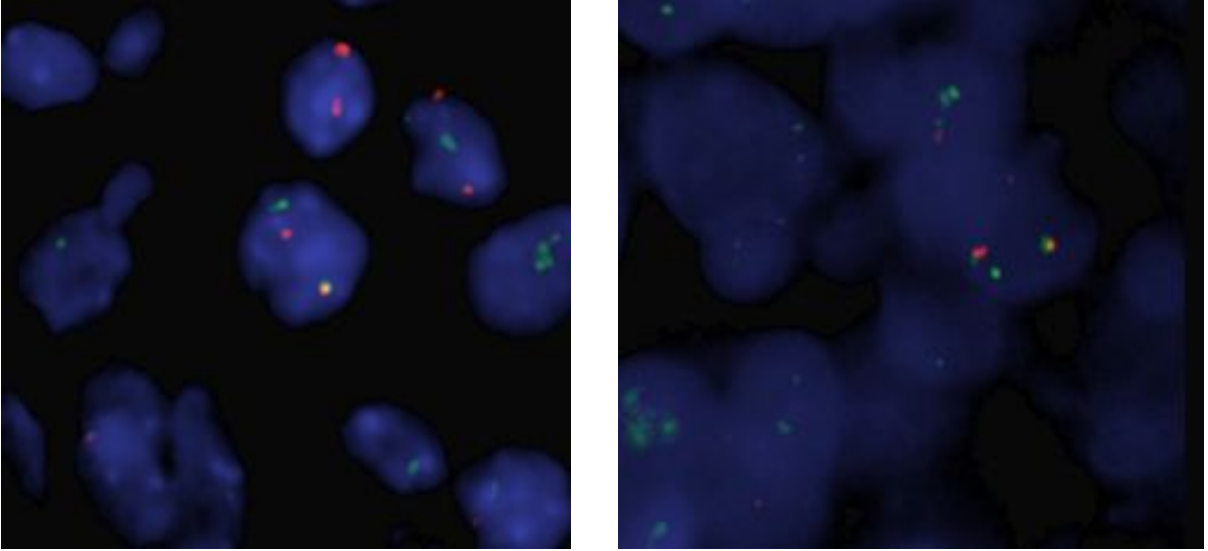
Her iki grup arasında c-myc, PTEN ve t (14,18) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (P= 0.735, 0.226, 1.000).



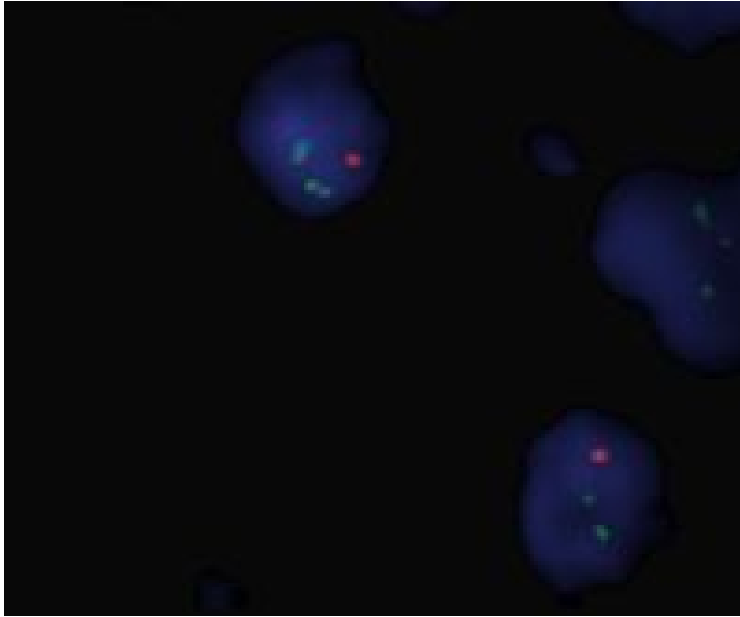
Resim 7 : DBBHL, GCB alt tipinde LSI C-MYC (8q24.12-q24.13) Spectrum Orange Probe kullanılarak saptanan C-myc aşırı amplifikasyonu



Resim 8 : DBBHL, ABC alt tipinde LSI C-MYC (8q24.12-q24.13) Spectrum Orange Probe kullanılarak saptanan C-myc overamplifikasyonu



Resim 9 : DBBHL'da GCB ve ABC subtiplerinde LSI® IGH (14q32) Spectrum Green/BCL2 (18q21) Spectrum Orange Dual Color, DNA Probe kullanılarak saptanan t (14;18) translokasyonu

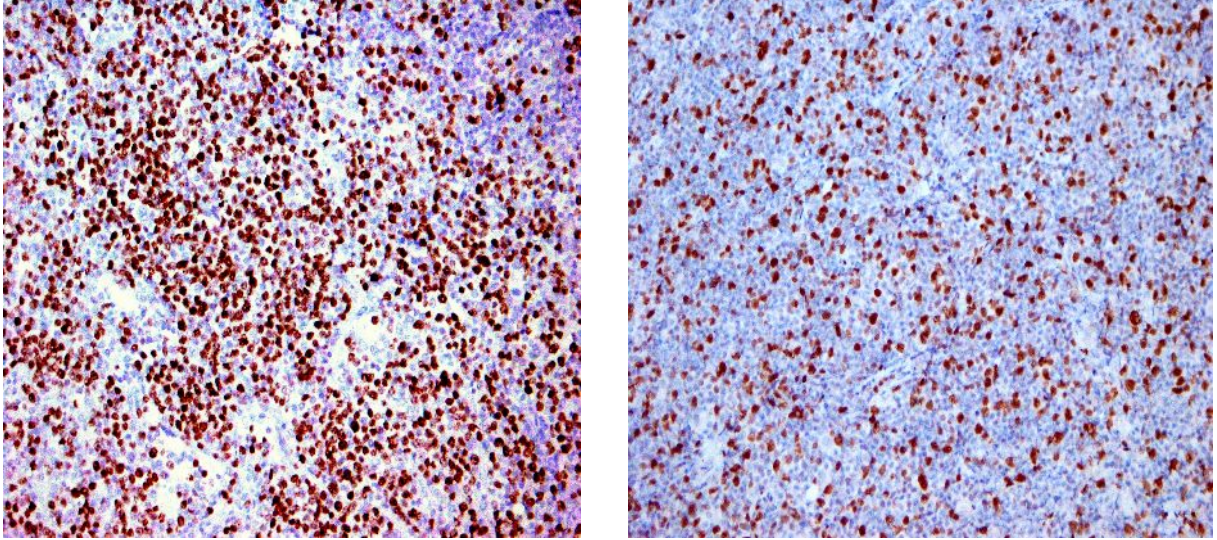


Resim 10 : DBBHL'da LSI® PTEN (10q23) / CEP® 10 Dual Color Probe kullanılarak saptanan PTEN delesyonu

Bcl-2, Bcl-6 ve CD 10 ekspresyonunun DBBHL prognozu üzerine etkisi :

- Bcl-2 (+) olguların ortalama yaşam süresi: 16.72 ± 16.559 , bcl-2 (-) olguların ortalama yaşam süresi; 10.50 ± 9.038
- Bcl-6 (+) olguların ortalama yaşam süresi: 10.53 ± 8.720 , bcl-6 (-) olguların ortalama yaşam süresi; 15.81 ± 3.489
- CD 10 (+) olguların ortalama yaşam süresi: 16.38 ± 16.625 , CD 10 (-) olguların ortalama yaşam süresi; 11.22 ± 10.361

Ki-67 oranlarına bakıldığında, GCB tip DBBHL'da ortalama Ki-67 oranı; 66.666 ± 18.629 (30-90), ABC tip DBBHL'da ise Ki-67 oranı; 60 ± 16.813 (30-85)



Resim 6: DBBHL'da GCB ve ABC alt tiplerinde immünohistokimyasal olarak Ki-67 indeksi (Ki-67x200)

GCB ve ABC alt tiplerinin prognoz ile ilişkisi

DBBHL'lar GCB ve ABC alt tipleri olarak ayrıldıktan sonra, bu iki grup arasında hastaların ortalama sağ kalım süreleri ve kemik iliği tutulumları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığı değerlendirildi.

GCB ve ABC alt tiplerinin prognozlarına bakıldığında, GCB alt tipinin ortalama yaşam süresi 17.36 ± 15.55 , ABC alt tipinin ise 11.79 ± 11.13 ay idi.

		Sağkalım		Toplam	
		Ölü	yaşıyor		
Alt tip	GCB	Sayı	3	12	15
		Yüzde	%20	%80	%100
	ABC	Sayı	8	11	19
		Yüzde	%42.1	%57.9	%100
Total		Sayı	11	23	34
		Yüzde	%32.4	%67.6	%100

GCB alt tipinde ölüm/sağ kalım oranı: 20/80 iken, ABC alt tipinde bu oran 42/52'dir, ancak bu iki grup arasında sağ kalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (P=0.271).

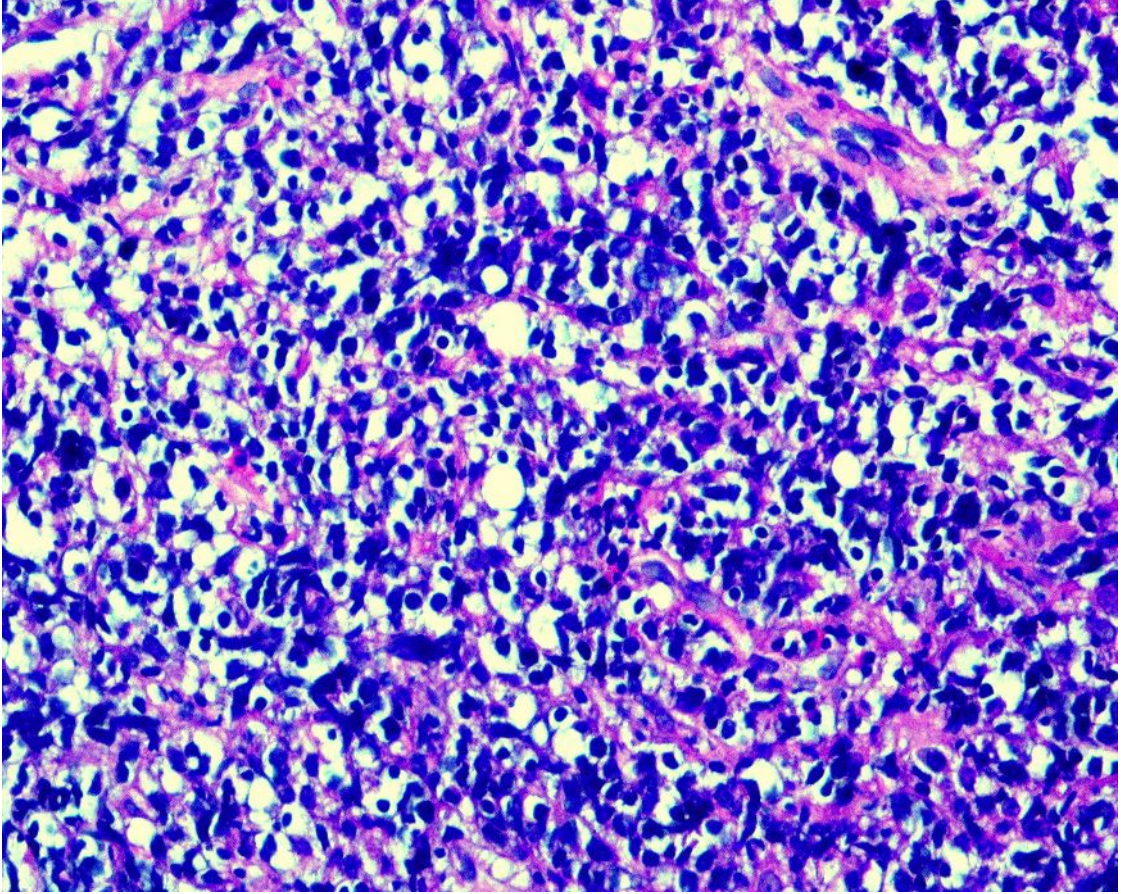
		Kemik iliği		Toplam	
		negatif	pozitif		
Alt tip	GCB	Sayı	12	2	14
		Yüzde	%85.7	%14.3	%100
	ABC	Sayı	16	3	19
		Yüzde	%84.2	%15.8	%100
Total		Sayı	28	5	34
		Yüzde	%84.8	%15.2	%100

- GCB ve ABC alt tipleri arasında kemik iliği tutulumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (P=1,000).

Burkitt lenfoma

BL tanısı alan 11 olgunun 4'ü (%36.4) kadın, 7'si (%63.6) erkek idi. Ortalama yaşları 27.18 ± 21.614 (4-60) idi. Toplam 8 hastanın klinik izlem verilerine ulaşıldı. Hastaların ortalama sağ kalım süreleri 9.29 ± 12.867 (1-37) aydı. İzlenen 6 hasta (%54.5) takip sonunda hayatta idi. 2 hasta (%18.2) takip sonunda kaybedildi. Kemik iliği tutulumu, izlenen 7 hastanın 3'ünde (%27.3) pozitif iken, 4'ünde (%36.4) negatif idi.

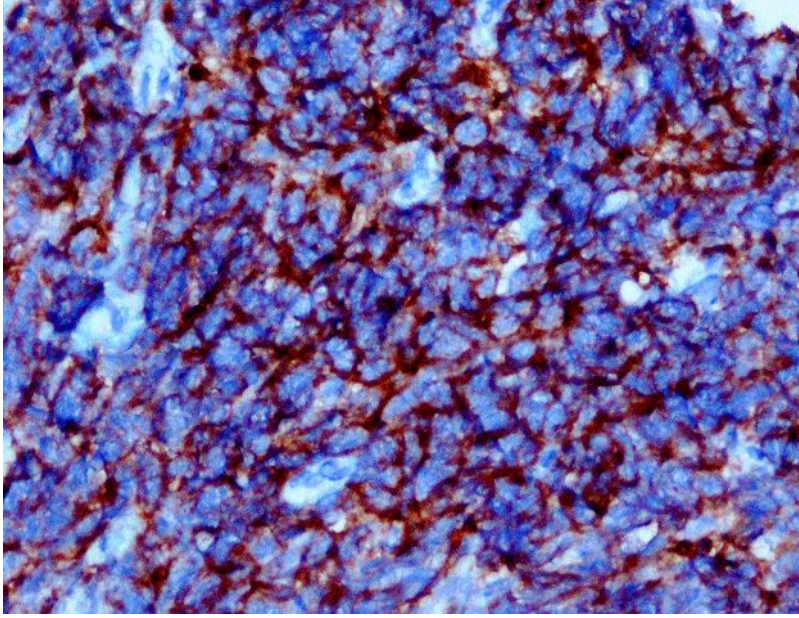
WHO morfolojik kriterlerine göre tekrar değerlendirilen 11 olgunun 7'si klasik BL, 4'ü ise atipik/Burkitt like lenfoma idi. Vakaların tümü tdt negatif idi.



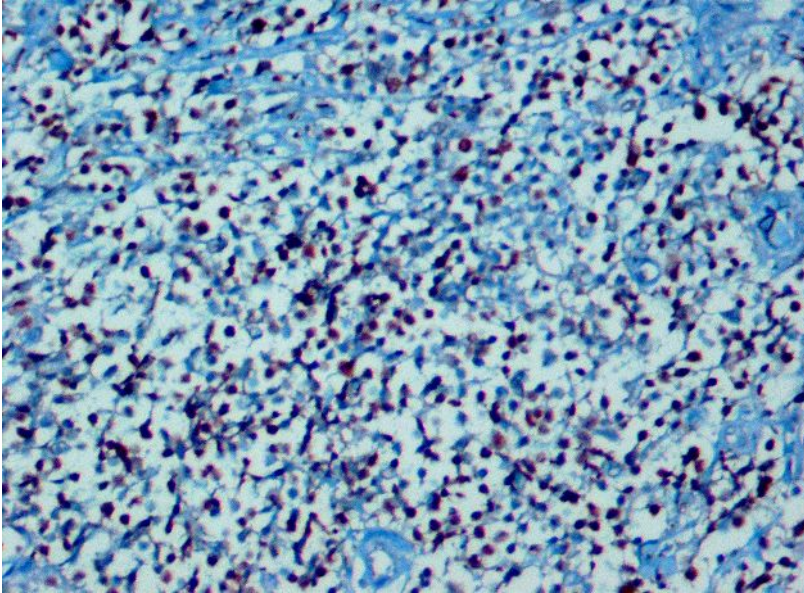
Resim 11: Burkitt lenfoma. Yuvarlak, hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalı, orta boyda hücrelerden oluşan malign lenfoid tümör. (HEX 400)

Olguların tümüne ortak bir immünohistokimyasal panel uygulandı (bcl-2, bcl-6, CD 10, Ki-67).

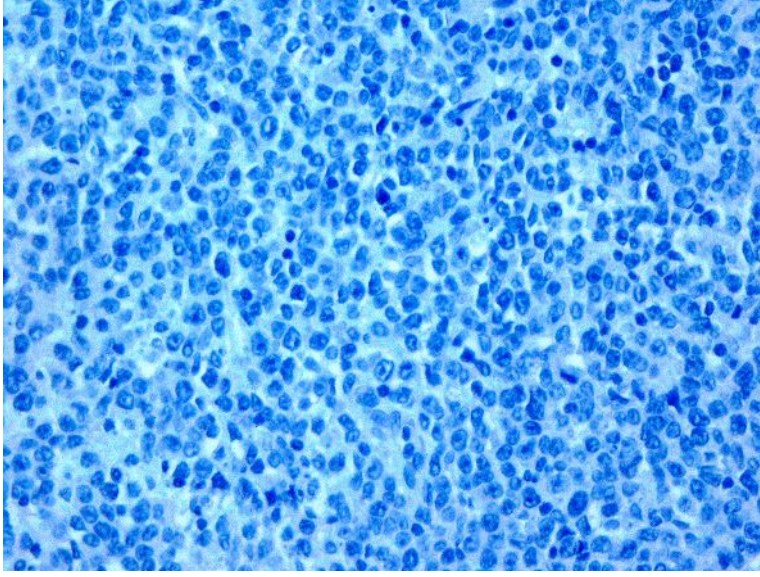
Onbir olgunun tümünde (%100) bcl-2 negatif, bcl-6 ve CD 10 pozitif saptandı.



Resim 12: BL'da immünohistokimyasal olarak CD 10 ile tümör hücrelerinde membranöz boyanma (CD 10 x 400)

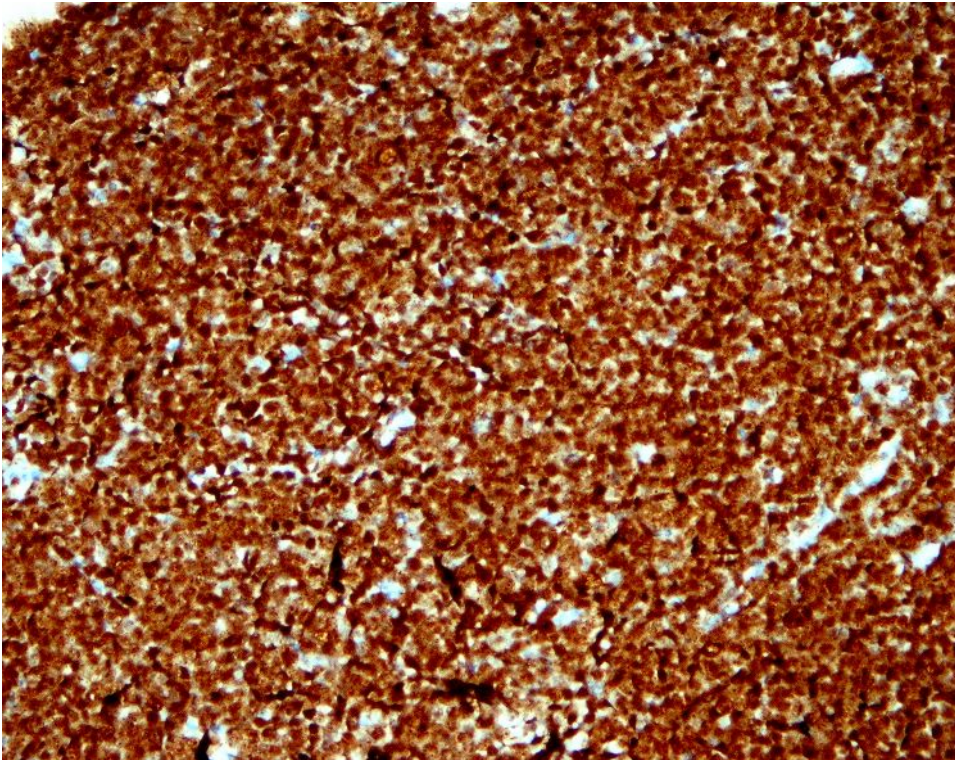


Resim 13: BL'da immünohistokimyasal olarak bcl-6 boyası ile tümör hücrelerinde nükleer boyanma (bcl-6x200)



Resim 14: BL'da immünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde bcl-2 negatifliği (bcl-2x200).

Ki-67 oranlarına bakıldığında, ortalama değer $\%95.2 \pm 17.5$ (90-100) idi. 5 olguda (%45.5) Ki-67 oranı %100, 5'inde (%45.5) oran %95, 1 olguda ise (%9.1) oran %90 idi.



Resim 15: BL'da immünohistokimyasal olarak Ki-67 ile %100'e yakın nükleer boyanma (Ki-67x200)

DBBHL ile BL arasında bcl-2, bcl-6 ve CD 10 ekspresyonları açısından bir fark olup olmadığı araştırıldı. Bu iki grup arasında her 3 marker ekspresyonunda da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı (P= 0.001).

		DBBHL	BL	Toplam
Bcl-2	Negatif	20 (%44.4)	11 (%100)	31 (%55.4)
	Pozitif	25 (%55.6)	0 (%0)	25 (%44.6)
	Toplam	45 (%100)	11 (%100)	56 (%100)
Bcl-6	Negatif	29 (%64.4)	0 (%0)	29 (%51.8)
	Pozitif	16 (%35.6)	11 (%100)	27 (%48.2)
	Toplam	45 (%100)	11 (%100)	56 (%100)
CD 10	Negatif	33 (%74.8)	0 (%0)	33 (%59.6)
	Pozitif	12 (%25.4)	11 (%100)	23 (%40.4)
	Toplam	45 (%100)	11 (%100)	56 (%100)

DBBHL ile BL arasında Ki-67 oranları karşılaştırıldığında, Ki-67 indeksi 60 alınarak hesaplandığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken ($P=0.255$), Ki-67 indeksi 80 ve üzeri olduğunda anlamlı fark saptanmıştır ($p= 0.001$).

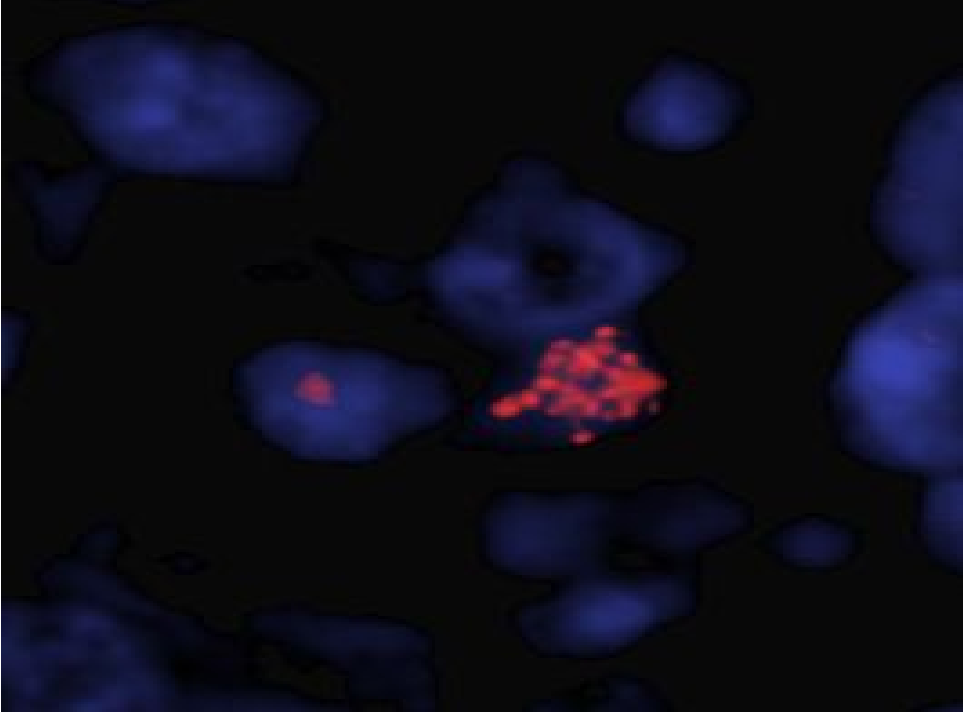
Ki-67		DBBHL	BL	Toplam
İndeks 60	< %60	14 (%31.1)	0 (%0)	14 (%26.8)
	\geq %60	31 (%68.9)	11 (%100)	42 (%73.2)
	Toplam	45 (%100)	0	56 (%100)
İndeks 80	< %80	30 (%66.7)	0 (%0)	30 (%55.4)
	\geq %80	15 (%33.3)	11 (%100)	26 (%44.6)
	Toplam	45 (%100)	11 (%100)	56 (%100)
İndeks 95	< %95	45 (%100)	0	45(%82.1)
	\geq %95	0 (%0)	11 (%100)	11 (%17.9)
	Toplam	45 (%100)	11 (%100)	56 (%100)

DBBHL ile BL arasında sitogenetik olarak bir fark olup olmadığı araştırıldı. İki grup arasında c-myc amplifikasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken ($P < 0.005$), PTEN ve t (14,18) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($P > 0.005$).

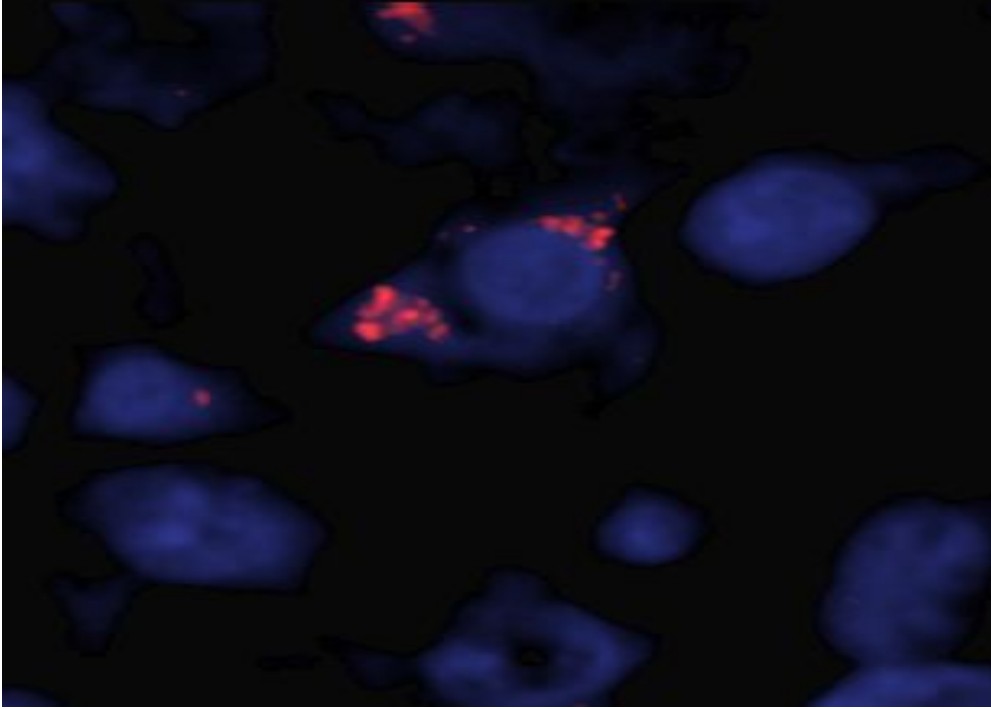
			c-myc		Toplam
			Negatif	pozitif	
Tanı	DBBHL	Sayı	18	8	26
		Yüzde	%68.6	%31.4	%100
	BL	Sayı	2	8	10
		Yüzde	%20	%80	%100
Toplam	Sayı		20	16	36
	Yüzde		%54.5	%45.5	%100

			t (14,18)		Toplam
			Negatif	pozitif	
Tanı	DBBHL	Sayı	24	2	26
		Yüzde	%92.3	%7.7	%100
	BL	Sayı	4	1	5
		Yüzde	%80	%20	%100
Toplam	Sayı		28	3	31
	Yüzde		%90.3	%9.7	%100

			PTEN		Toplam
			Negatif	pozitif	
Tanı	DBBHL	Sayı	22	8	30
		Yüzde	%73.3	%26.7	%100
	BL	Sayı	10	1	11
		Yüzde	%90.9	%9.1	%100
Toplam	Sayı		32	9	41
	Yüzde		%72.7	%27.3	%100

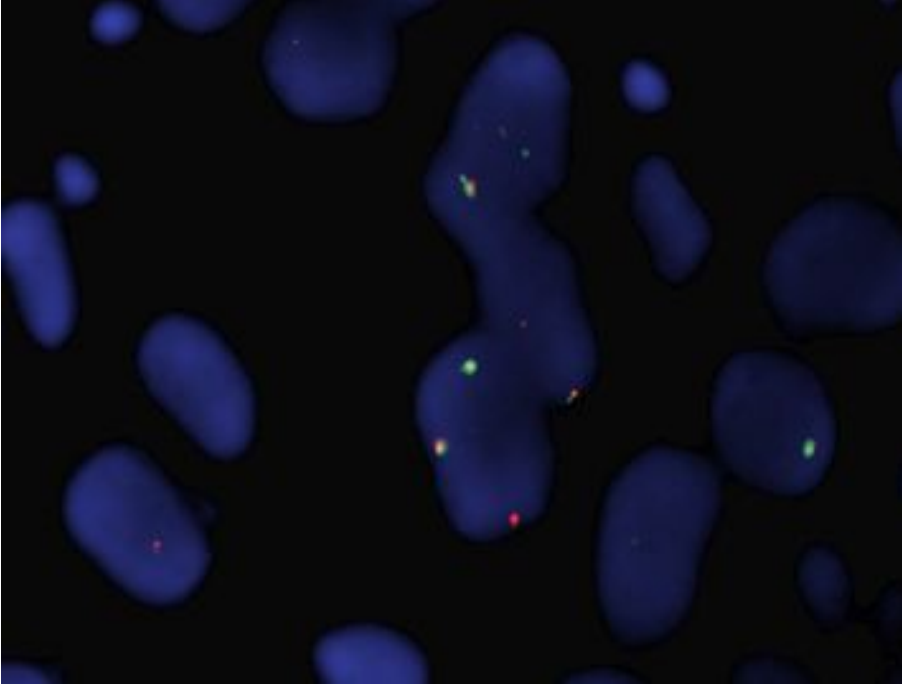


Resim 16

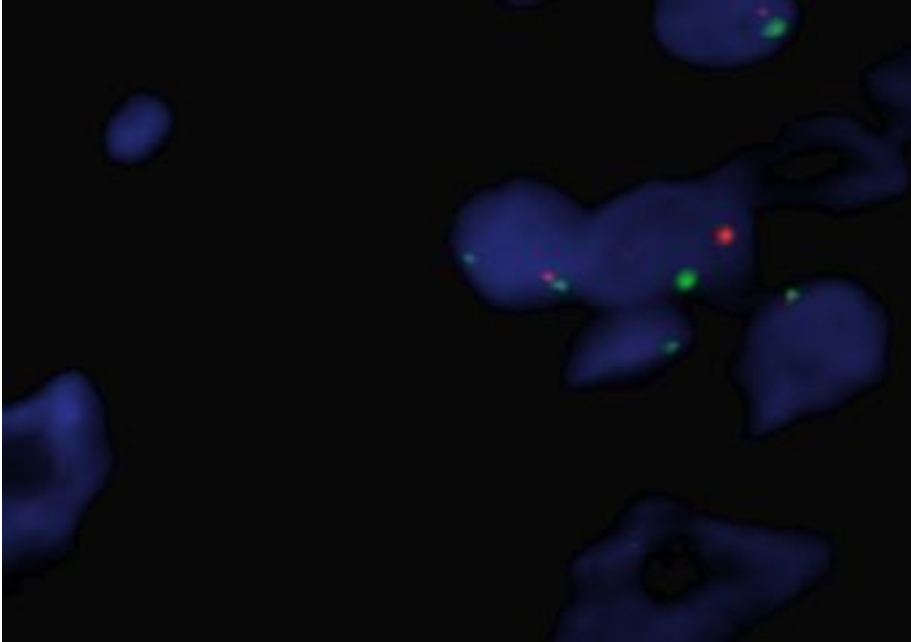


Resim 17

Resim 16 ve 17 : BL'da LSI C-MYC (8q24.12-q24.13) Spectrum Orange Probe kullanılarak saptanan C-myc aşırı amplifikasyonu



Resim 18: BL'da LSI[®] IGH (14q32) Spectrum Green/BCL2 (18q21) Spectrum Orange Dual Color, DNA Probe kullanılarak saptanan t (14;18) translokasyonu



Resim 19: BL'da LSI[®] PTEN (10q23) / CEP[®] 10 Dual Color Probe kullanılarak saptanan PTEN delesyonu

TARTIŞMA

DBBHL, batı ülkelerinde daha belirgin olmak üzere, tüm dünyada en sık görülen non-Hodgkin lenfoma tipidir. Diğer lenfoma tipleri ile kıyaslandığında, klinik, morfolojik ve sitogenetik açıdan oldukça heterojenöz bir grubu temsil etmektedir ve son derece değişken bir klinik seyir göstermektedir. Hastaların bir kısmı (%40) kemoterapiye son derece duyarlı olup, uzun dönem hastaliksız yaşam gösterirken, bir grup hasta ise tedaviye cevap vermeyip, çok kısa sürede kaybedilir. Dolayısıyla DBBHL olgularının klinik gidişlerini belirlemek, tedaviyi planlamak açısından son derece önemlidir.

DBBHL olgularının prognozlarını belirlemek için, günümüzde en sık kullanılan skorlama sistemi, klinik parametrelere dayalı olarak yapılan IPI (international prognostic index) skorudur. DBBHL’da prognozu etkileyebilecek IPI’den bağımsız bir takım faktörlerin olup olmadığı günümüzde üzerinde en çok tartışılan ve araştırma yapılan konulardan biridir.

İlk defa Alizadeh ve arkadaşları , c DNA microarray teknolojisi ile gen ekspresyon profillerine dayanarak DBBHL’ların 2 alt gruba ayrılabilceğini ortaya atmışlar ve bu 2 grubun prognostik olarak birbirinden farklılık gösterdiğini, bununda IPI’den bağımsız bir faktör olarak kullanılabilceğini ileri sürmüşlerdir (2).

Gen ekspresyon profillerine göre ayrılan alt gruplar, germinal merkez B hücreleri ile ortak gen ekspresyon profili gösteren GCB tip ve periferik B hücreleri ile ortak gen ekspresyon profili gösteren ABC alt tipleridir. Alizadeh ve arkadaşları yaptıkları çalışmada GCB alt tipinin ABC alt tipine göre daha iyi prognozlu olduğunu ortaya atmıştır ve arkasından Wright ve arkadaşlarının yaptığı gen ekspresyon profil çalışmalarında bu hipotezi destekler nitelikte sonuçlanmıştır (72). Buna karşılık Shipp ve arkadaşları, Paulsen ve arkadaşları yaptığı gen ekspresyon profil çalışmalarında ise, bu 2 subgrup arasında prognostik olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (59,63).

Ancak günlük rutin uygulamada c DNA microarray teknolojisinin oldukça pahalı olması ve taze dokudan yapılması nedeniyle gen ekspresyon profil çalışmaları yapmak çok da olası değildir. İşte bu noktadan yola çıkarak Hans ve arkadaşları yayınladıkları 142 olgudan oluşan bir seride, GCB tipini non-GCB tipinden ayırmak için kullanılabilecek immünohistokimyasal markerlar ve bu markerlara bağlı olarak geliştirilen bir algoritma oluşturmuşlardır (22). Germinal hücre markerı olarak bcl-6 ve CD 10, post-germinal hücre markerı olarak da MUM1/IRF4 kullanmışlardır. Hans ve arkadaşlarının ardından, pek çok araştırmacı da bu algoritmayı izleyerek, GCB ve non-GCB gruplarını ayırarak prognozlarını karşılaştırmış ve birbirinden farklı sonuçlar elde etmiştir. Bunlar arasında GCB tipinin ABC tipine göre daha iyi prognozlu olduğunu gösteren araştırmalar çoğunluktadır (6,11,28,72). Bunlara karşılık Veelken ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, bu 2 subgrup arasında prognostik olarak anlamlı fark bulunmamıştır (69).

Bizim çalışmamızda, GCB ve ABC alt tipleri arasında sağkalım açısından yüzde olarak belirgin bir fark olmasına karşın, (GCB→ yaşayan/ölü: %80 / %20 , ABC→ %57 / %42) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (P= 0.271). Bunun en önemli nedeni, olasılıkla klinik izlemelerine ulaşılabilen hasta sayısının yetersiz olmasıdır. Ortalama yaşam sürelerine bakıldığında ise, GCB alt tipinin, ABC tipine göre daha uzun yaşam süresi gösterdiği izlenmiştir. Sonuç olarak bizim çalışmamızda da literatürdeki araştırmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çok sayıdaki çalışmada elde edilen bu farklı sonuçların en önemli nedeninin , hasta seçimi olduğu düşünülmektedir. Hastaların tedavi alıp almadıkları, tedavi tipleri ve IPI skorları gibi faktörler muhakkakki sonuçları etkiler, bu anlamda çalışmalara alınan olguları standardize etmek gerekir.

CD 10; membran metaloproteinazıdır. Lenfoid hücrelerin yanısıra bazı stromal ve epitelyal hücrelerde de eksprese olur. Periferik B hücre diferansiasyonunda etkilidir ve normal sentrifoliküler B hücreleri (germinal merkez B hücreleri) için oldukça spesifik bir markerdir. Foliküler lenfoma olgularında %70 oranında eksprese olurken, DBBHL’da ekspresyon oranı çeşitli serilere göre %20-40 arasında değişir (17).

CD 10 ekspresyonunun DBBHL’da prognoz üzerine etkisi olup olmadığı çok sayıdaki çalışma ile araştırılmış ve birbirinden son derece farklı sonuçlar elde edilmiştir. Colomo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada , CD 10 ekspresyonunun survive üzerine etkisi olmadığı görülmüştür (50). Aynı şekilde Fabiani ve arkadaşlarının 98 vakadan oluşan araştırmalarında da benzer şekilde CD 10 ekspresyonu ile survive arasında bir bağlantı saptanmamıştır (17). Buna karşılık CD 10 ekspresyonunun prognoz üzerine negatif etkisi olduğunu gösteren çalışmalar da yapılmıştır. Bunlar arasında Xu ve arkadaşları ile Uherova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar en geniş olanlarıdır (68,73). Öte yandan biraz daha fazla sayıdaki araştırmada ise, CD 10 ekspresyonunun prognozu arttığı yönünde sonuçlar elde edilmiştir (6,11,22,57).

Bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde DBBHL olgularında CD 10 ekspresyonu %25.4 oranında saptanmıştır. CD 10 (+) olan olguların ortalama yaşam süreleri, CD 10 (-) olanlara göre daha uzun olmasına karşın, istatistiksel olarak CD 10 ekspresyonu ile survive arasında doğrudan anlamlandırılabilir bir ilişki saptanmamıştır.

Literatürdeki bu farklılığın en önemli nedenlerinden biri, CD 10 (+) kabul edilen cut-off değerlerinin farklılığı olabilir. CD 10 için kullanılan cut-off değeri, farklı araştırmalarda %10-30 arasında değişmektedir. Çoğunlukla kabul gören ve bizimde çalışmamızda dikkate aldığımız cut-off değeri , Hans ve arkadaşları tarafından da belirlenen %30’dur.

Sonuç olarak, yapılan çok sayıda çalışmaya rağmen, CD 10 ekspresyonunun survive üzerine etkisi hala net olarak bilinmemektedir. Çok daha fazla sayıda, klinik izlemler ve standart tedavi protokollü olgular üzerinden, standart cut-off değerler kullanılarak araştırmalar genişletilmelidir.

Bcl-6; Normal lenfoid dokularda, germinal merkez B hücrelerince eksprese edilen bir transkripsiyonel regülatör proteindir. Hücre siklus kontrolü ve inflamasyonda, lenfosit aktivasyonu ve diferansiasyonunda rol oynar. Foliküler lenfomada kullanılan oldukça sensitif ve spesifik bir markerdir. DBBHL’da bcl-6 ekspresyonu, değişik kaynaklarda %30- %95 arasında değişmektedir.

Bcl-6 ekspresyonunun prognostik öneme sahip olup olmadığını belirlemek için yapılan çok sayıda araştırmada birbirinden son derece farklı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmaların bir kısmında survive üzerine etki saptanmazken (11,13,28), bir kısmında ise bcl-6’nın belirgin bir pozitif prognostik faktör olduğu ortaya konmuştur (6,69). 152 olgudan ve 73 olgudan oluşan 2 ayrı araştırmanın sonuçlarında da bcl-6 (+) olguların , bcl-6(-) olanlara göre daha iyi prognozlu olduğu gösterilmiştir (22,44). Bcl-6 için pozitif kabul edilen cut-off değerinin farklılığı (%10-30) ve hasta seçimi, literatürdeki bu farklılığı açıklamaktadır.

Bizim çalışmamızda ise, DBBHL olgularında bcl-6 ekspresyonu %35.6 oranında saptanmıştır. Bcl-6 ekspresyonunun survive üzerine etkisi saptanmamıştır. Bunun en önemli nedeni, klinik izlemlerine ulaşılabilen hasta sayısının yetersiz olmasıdır.

Bcl-2; Antiapoptotik proteindir ve programlı hücre ölüm düzenlenmesinden sorumlu büyük bir protein ailesine üyedir. Normal B hücre gelişimi ve diferansiasyonunda önemli rol oynar. t (14,18)(q32, q21) sonucu, bcl-2 geni, Ig ağır zincir (Ig H) lokusuna transloke olur ve bu da bcl-2’in ekspresyonunun artmasına neden olur. Fakat bcl-2 ekspresyonu, yalnızca bu translokasyon sonucu görülmez, alternatif mekanizmalarla da ortaya çıkabilir. Sonuç olarak bcl-2 ekspresyonunun artması, malign B hücrelerine yaşama avantajı sağlar ve kemoterapiye

dirençte de önemli rol oynar (29). Bcl-2'nin bu biyolojik özelliklerinden dolayı, DBBHL'da ekspresyonunun prognoz üzerine etkisi olduğu düşünülmüş ve bu konuda çok fazla sayıda araştırma yapılmıştır. DBBHL'da bcl-2 ekspresyonu %24-79 arasında değişmektedir (47). Iqbal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bcl-2 ekspresyonunun GCB tip DBBHL'da t (14,18) ile yüksek oranda bağlantılı olduğu, ancak bunun survive üzerine bir etkisi olmadığı, ABC tipinde ise bcl-2 ekspresyonunun translokasyon dışı başka mekanizmalarla ortaya çıkarak (Krm 18q21 amplifikasyonu/ Nükleer faktör-kappa B yolu aktivasyonu) olgulardaki bcl-2 ekspresyonunun survive'ı kötü yönde etkilediği ileri sürülmüştür (29). Bunun aslında beklenen bir sonuç olduğunu, çünkü GCB ile ABC tipleri arasındaki bcl-2 ekspresyon mekanizmalarının farklı genetik yollarla oluşmasının farklı klinik gidişleri açıkladığını belirtmişlerdir.

Paepe ve arkadaşları da, GCB ile ABC tipleri arasında bcl-2 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark olmadığını, sadece bu 2 subgrupdaki bcl-2 ekspresyon mekanizmalarının farklı olduğunu söylemişler ve ilk defa Hans ve arkadaşları tarafından oluşturulan, immünohistokimyasal parametrelere dayalı olarak yapılan algoritmaya, bcl-2'yide katarak, DBBHL'yı prognostik subgruplara ayırabilecek 2. bir algoritma oluşturmuşlardır (58). Yani, bcl-2 ekspresyonunun tek başına prognozu etkilemeyeceğini, ancak diğer bazı immünohistokimyasal markerlerle birlikte değerlendirilerek prognoz yönünde bir yorum yapılması gerektiğini savunmuşlardır.

Literatürdeki araştırmalarda bcl-2 ekspresyonu değerlendirilirken, alınan cut-off değeri, %10-50 arasında değişmektedir. Leval ve arkadaşları, bcl-2 (+) kabul etmek için alınan cut-off değerinin %50'nin üzerinde olması halinde, bcl-2 ekspresyonunun prognozu kötü yönde etkilediğini saptamışlardır (42). Imhoff ve arkadaşları da, buna benzer bir sonuç bularak, bcl-2'nin survive üzerine etkisinin, alınan cut-off değer ile ilgili olduğunu söylemişler, cut-off değer yükseldikçe, prognozun kötüleştiğini ileri sürmüşlerdir (28).

Bizim çalışmamızda, DBBHL'da bcl-2 ekspresyonu %55.6 oranında saptanmıştır. Bcl-2'nin survive üzerine etkisi saptanmamıştır. Kinik izlemine ulaşılabilen hasta sayısının yetersiz olması, bunun en önemli nedenidir.

t (14,18); Foliküler lenfoma patogeneğinde, bcl-2 deregulasyonuna bağlı olarak majör rol oynar. Yaklaşık olarak FL vakalarının %70-95'nde saptanır. DBBHL'da bu oran %30-40 civarındadır. t (14,18)'in DBBHL'daki önemi net olarak bilinmemekle birlikte, t (14,18) (+) olan olguların daha önceden varolan bir foliküler lenfoma zeminini gösterdiği düşünülmektedir. Bilinen bu transforme FL dışında, bu translokasyonun de novo DBBHL'da görülme oranı %18-20'lere düşer.

t (14,18)'in prognostik önemi net olarak bilinmemekte ve bu konuda yapılan araştırmalar birbirinden çelişkili sonuçlar ortaya koymaktadır. Çalışmaların büyük bir kısmı prognostik bir önemi olmadığını söylerken, bazıları ise tedaviye yanıtı azaltıp, relapsları arttırdığını ve survive'ı negatif yönde etkilediğini ileri sürmüşlerdir (20,31,37,66). Bazı çalışmalarda ise, azalmış survive'in yada tedaviye direncin esas nedeninin, translokasyondan çok bcl-2 protein ekspresyonu olduğu ileri sürülmüştür (25,38).

Barrans ve arkadaşlarının 137 hasta üzerinden yaptığı çalışmada ise, t (14,18) insidansı %13 oranında bulunmuştur. t (14;18)'in GCB subtipi ile yakından ilişkili olduğu, fakat non-GCB subtipinde de, düşük oranda da olsa bu translokasyonun görülebileceğini söylemişlerdir.

Prognostik etkisinin ise, büyük oranda bcl-2 ekspresyonu ile bağlantılı olduğu, t (14;18)'in ise, bunun üzerine ilave bir negatif etki oluşturduğunu ifade etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, t (14;18) oranı %7.7 civarında bulunmuştur. Translokasyon, bakılan 26 olgunun yalnızca 2'sinde pozitif olduğundan, bcl-2 ekspresyonu ile bağlantısı ya da survive üzerine etkisi konusunda yorum yapılamamıştır.

Burkitt lenfoma, endemik, sporadik ve immünyetmezlik bağlantılı klinik varyantları bulunan, oldukça hızlı ilerleyen agresif bir B hücreli lenfomadır. Non-Hodgkin lenfomalar için kullanılan standart tedavi protokollerine cevap vermez. Oldukça yüksek doz polikemoterapi rejimleri (SSS profilaksisi de dahil) uygulanır ve bu tedavilerle komplet remisyon oranı %75-90'lara ulaşır (12).

Rutin tanıda klasik BL, DBBHL'dan karakteristik morfolojik özellikleri ile ayrılır. Morfolojik olarak, BL hücreleri, kaba kromatin yapısına sahip yuvarlak nükleuslu, orta boyda, monoton görünümde hücrelerdir. Karakteristik olarak yüksek mitotik indeks ve fagositik histiositlerin oluşturduğu yıldızlı gökyüzü görünümü BL için son derece karakteristiktir. DBBHL'da ise, tümörü oluşturan hücreler, BL'daki hücelere göre çok daha büyük ve pleomorfik görünümündedir. Mitotik indeks oldukça değişken olup, yıldızlı gökyüzü görünümü çok da sık rastlanan bir bulgu değildir. Bu morfolojik özellikler göz önüne alınarak, DBBHL/BL ayrımı büyük oranda yapılır. Fakat morfolojik özellikler bakımından BL ile DBBHL arası olan bazı olgular da vardır, ki bunlar WHO klasifikasyonunda, BL varyantları (plazmositoid diferansiyasyon gösteren BL ve atipik BL/Burkitt-like) olarak tanımlanmıştır. Bu grup lenfomalar ayırıcı tanıda zorluklara neden olur. Jaffe ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, deneyimli hematopatologlar arasında bile, Klasik BL/Atipik BL/DBBHL tanılarını arasındaki uyum oranı %53 oranında bulunmuştur (46). Tedavileri birbirinden farklı olduğundan, BL-DBBHL ayrımı son derece önemlidir, ve morfolojik olarak arada olan bu olgularda kullanılabilecek ekstra tanı yöntemleri üzerinde çalışılmıştır. Bu iki antiteyi ayırmak için immünohistokimyasal, sitogenetik ve moleküler yöntemler kullanılarak çok sayıda araştırma yapılmış ve hala da yapılmaktadır. İlk olarak immünohistokimyasal yöntemler üzerinde çalışılmıştır. Bunun nedeni, immünohistokimyasal yöntemlerin, teknik olarak artık

hemen hemen bütün merkezlerde yapılabilir olması ve diğer yöntemlere göre daha ucuz ve değerlendirilmesinin daha kolay olmasıdır.

CD 10; germinal merkez b hücreleri tarafından eksprese edilen ve özellikle folliküler lenfomada kullanılan bir immünohistokimyasal markerdir. CD 10 ekspresyonunun, BL ile DBBHL ayırımında kullanılabileceği yönünde bazı çalışmalar literatürde yer almaktadır. Doğan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, çalışmaya alınan tüm BL olgularında CD 10 ekspresyonu görülürken, DBBHL olgularının %39'unda CD 10 ekspresyonu saptanmıştır. (özellikle FL zemininden gelişen DBBHL'da CD 10 ekspresyonu görülmüştür.)(15). Yine Kramer ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da benzer sonuçlar vermektedir (37). Buna karşılık Frost ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hem BL, hemde DBBHL olgularının tümünde CD 10 ekspresyonu görülmüş, nedeni, olguların folliküler merkez hücre orijinli olması ile açıklanmıştır (19).

Bizim çalışmamızda ise, BL olgularının tümünde (%100) CD 10 ekspresyonu görülürken, DBBHL olgularında CD 10 ekspresyonu %25.4 oranındadır. Sonuç olarak, literatürdeki çoğu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da CD 10'un BL/DBBHL ayırımında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (P=0.001).

Bcl-6; CD 10'a benzer şekilde, foliküler merkez kökenli lenfoid hücrelerde eksprese olur. Bcl-6 daha ziyade, DBBHL'da 2 alt tipi ayırmak için kullanılır. (GCB ile ABC alt tipleri), ancak BL ile DBBHL ayırımı içinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Doğan ve arkadaşları, bcl-6'yı da aynı CD 10 gibi tüm BL olgularında pozitif bulmuşlar, DBBHL'da ise %83 oranında saptamışlardır. Dolayısıyla CD 10 kadar anlamlı olmasa da, bcl-6'nında bu ayırımı bize yol gösterebileceğini savunmuşlardır (15). Frost ve arkadaşları ise, tam tersi bcl-6'nın ayırımı fayda sağlamadığını, BL olgularının %70'inde, DBBHL olgularının da %75'inde saptayarak, ortaya koymuşlardır.

Bizim çalışmamızda ise, bcl-6 ekspresyonu, BL olgularında %100 oranında, DBBHL olgularında ise %35.6 oranında saptanmıştır. İstatistiksel olarak son derece anlamlı olan bu sonuç ile, bcl-6'nın BL/DBBHL ayırımında kullanılabileceği düşünülmüştür.

Bcl-2; bcl-2 onkoproteini, reaktif ile neoplastik B hücre proliferasyonu ayırımında önemli bir proteindir. Çoğu küçük B hücreli neoplazide bcl-2 ekspresyonu görülür. Bcl-2 ekspresyonu, BL'da beklenen bir bulgu değildir. Buna karşın DBBHL'da değişen oranlarda ekspresyonu görülür. Bu da bu iki antitenin ayırımı için son derece değerli bir bulgudur. Literatüre bakıldığında, bu konuda yapılan araştırmaların hemen tamamı benzer sonuçlar vermektedir. Bunlar arasında Lai ve arkadaşlarının yaptığı oldukça geniş bir çalışmada, 107 DBBHL olgusunun 75'inde (%70) bcl-2 ekspresyonu görülürken, BL olgularının hiçbirinde bcl-2 ekspresyonu görülmemiştir (41). DBBHL'daki bcl-2 ekspresyonu, Hutchinson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %50, Frost ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise %37 oranında saptanmıştır, ancak her ikisinde de hiçbir BL olgusunda ekspresyon görülmemiştir (19,27).

Bizim çalışmamızda da literatürle benzer sonuçlar elde edilmiştir. DBBHL'da bcl-2 ekspresyonumuz %55.6'dır. BL olgularının tümünde ise bcl-2 negatif bulunmuştur.

Dolayısıyla, bcl-2, BL/DBBHL ayırımında kullanılabilecek oldukça değerli bir markerdir.

Ki-67; Prolifere olan hücrelerde eksprese olan nükleer proteindir. G1 fazından mitoz fazına kadar olan dönemlerde nükleusta eksprese olur, mitoz sonrası Ki-67 antijen seviyesi minimal düzeye düşer. Ki-67, MPM-2 antijen ailesine aittir (35).

Ki-67, solid tümörler ve bazı hematolojik malignitelerde hücre proliferasyon markerı olarak kullanılır. Malign hücrelerde kontrolsüz hücre proliferasyonu olduğundan, Ki-67 indeksi oldukça yüksektir (35).

BL'da ikiye katlanma süresi yani proliferasyon hızı en fazla olan malignitelerden biri olduğu için Ki-67 proliferasyon indeksi son derece yüksektir (yaklaşık %99-%100) (7,18,19).

DBBHL'da Ki-67 oranı son derece değişkendir. Olguların büyük kısmında bu oran %40'ın üzerindedir, ancak çok küçük bir kısmı BL'da görüldüğü kadar yüksek olabilir. Ortalama %56-65 arasındadır.

BL'da Ki-67 proliferasyon indeksinin yüksek olması yanında önemli bir özellik de, olgular arasındaki Ki-67 yüzde aralığının da son derece dar olmasıdır (%90-100). Ancak DBBHL'da bu aralık son derece geniştir (%20-95).

Bizim çalışmamızda, BL olgularında Ki-67 proliferasyon oranı ortalama %97.2 iken, DBBHL'da Ki-67 oranı ortalama %63.2'dir. Ki-67 yüzde aralıklarına baktığımız zaman ise, BL'da aralık, %95 ile %100 arasında, DBBHL'da ise %30 ile %90 arasındadır. Dolayısıyla, Ki-67 proliferasyon oranı da BL/DBBHL ayırımında kullanılabilir önemli immünohistokimyasal markerlardan biridir. Biz çalışmamızda ayrıca, Ki-67 indekslerini 60,80 ve 95 olarak BL ile DBBHL'yı karşılaştırdık ve Ki-67 indeksinin 80 ve üzeri alındığında, BL ile DBBHL ayırımında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç sağlandığını ortaya koyduk.

c-myc; c-myc onkogenini kodlayan 8q24 kromozomundaki translokasyonlar, non-Hodgkin lenfomaların onkogenezinde önemli rol oynar. Bu translokasyonlar sonucu c-myc onkogeninin ekspresyonu artar.

C-myc, helix-loop-helix (bHLH) denilen bir transkripsiyon faktörünü kodlar ve pek çok hücreyel olayın (hücre siklus progresyonu, apoptozis..) düzenlenmesinde görev alır.

c.-myc ve Ig geni arasındaki translokasyonlar; t (8;14)(q24;q32) / t (2;8)(p13;q24) / t (8;22)(q24;q11) şeklinde olabilir (55).

c-myc protoonkogen deregulasyonu ile sonuçlanan bu translokasyonlar, hemen tüm BL olgularında saptanır. BL için oldukça karakteristik olmasına rağmen, spesifik değildir. Diğer bazı B hücreli lenfomalarda da değişen oranlarda görülebilir; lenfoblastik lenfoma, foliküler lenfoma, multipl myelom ve DBBHL gibi.

BL, lenfoblastik lenfoma, multipl myelom ve foliküler lenfomadan sitolojik özellikleri ile son derece kolay bir şekilde ayrılırken, ayırıcı tanıda esas sorun yaratabilecek grup DBBHL'dır.

Çünkü, bazı DBBHL olguları, morfolojik olarak BL'dan ayrılamazlar (WHO klasifikasyonunda tanımlanan Atipik BL/Burkitt like lenfoma).

WHO klasifikasyonunda, BL için altın standart olarak kabul edilen bulgu; t (8;14) ve varyantları yada c-myc rearanjmanının saptanmasıdır. Eğer sitogenetik yada Southern-blot analizleri ile c-myc amplifikasyonu saptanamıyorsa, bunun yerine kullanılacak en önemli bulgunun Ki-67 indeksi (~ %100) olduğunu söylemektedir (32). Buna karşılık, her ne kadar BL'daki c-myc ekspresyonunun görülme sıklığı, DBBHL'ya göre yüksek olsa da (DBBHL'da yaklaşık %15 oranında saptanır), tüm non-Hodgkin lenfomalara baktığımızda, BL ancak %1-2'lik yer kaplarken, DBBHL, non-Hodgkin lenfomaların yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Dolayısıyla, c-myc (+) bir yüksek dereceli lenfoma ile karşılaştığımızda, bunun DBBHL olma olasılığı hiç de düşük değildir. Dolayısıyla tek başına c-myc (+)'liği ile DBBHL'yı ekarte etmek son derece yanlıştır. C-myc pozitifliği yanında, klinik, morfolojik ve immünofenotipik bulgular birlikte değerlendirilip bir sonuca varılmalıdır (55).

Kramer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, c-myc (+) DBBHL'ların daha sıklıkla ektranodal yerleşimli oldukları görülmüştür.

Öte yandan, literatüre bakıldığında, c-myc (+) DBBHL'ların sıklıkla t (14;18) yani bcl-2 ekspresyonu ile de birliktelik gösterdiği görülmüştür. Oysa BL'da bu iki translokasyonun birlikteliği ihmal edilebilecek kadar düşüktür. DBBHL'da t (8;14) ve t (14;18) birlikteliğinin, hızlı klinik gidiş ve kötü prognozla korele olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu olguların foliküler lenfomadan transforme olan olgular olduğu ortaya atılmıştır (45).

Haralambieva ve arkadaşları da, 74 olgu içeren çalışmalarında, BL ile DBBHL'yı çeşitli yöntemlere göre ayırmaya çalışmışlardır. İlk olarak çalışmada yer alan patolojlara, konvansiyonel morfolojik ve immünohistokimyasal bulgular verilerek, bir tanı istenilmiştir.

Tanılar, DBBHL, BL ve Atipik BL olarak alınmıştır. İkinci olarak da yalnızca immünofenotipik ve sitogenetik özellikler verilerek tanı istenmiştir. Sonuçta, bu iki uygulama karşılaştırıldığında, her ikisinin de birbirine bir üstünlük göstermediği görülmüş ve bu bulguların tümünün birden değerlendirilerek bir sonuca varılmasının en doğru tanı yöntemi olduğu ileri sürülmüştür (23).

Bir taraftan da, BL ile DBBHL ayrımı için gen ekspresyon çalışmaları devam etmektedir.

Dave ve arkadaşlarının oldukça geniş bir seride yaptıkları çalışmada 4 önemli gen ekspresyon signatürü üzerinde durulmaktadır;

- 1- c-myc proteini ve hedef genleri
- 2- Normal germinal merkez B hücrelerince eksprese edilen genler
- 3- MHC Class I genleri
- 4- Nuclear- factor- K β (NF-K β) hedef genleri

Bunlardan ilk iki bulgunun BL'da yüksek oranda saptandığını, son iki bulgunun ise DBBHL'da daha yüksek oranda görüldüğünü ortaya atmışlar ve konvansiyonel yöntemler ile BL/DBBHL ayırımının bazı olgular için yapılamayacağı, ancak bu gen ekspresyon signatürlerinin bize yol gösterebileceği düşüncesini savunmuşlardır (14).

Bizim çalışmamızda, BL vakalarında c-myc %80 oranında pozitif iken, DBBHL olgularında %31.4 oranında pozitif saptanmıştır. Oran olarak belirgin bir fark olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bunun nedeni olasılıkla FISH yöntemi ile değerlendirilen olgu sayısının yetersiz olmasıdır.

c-myc (+) DBBHL olgularının (8), 5'i ektranodal yerleşimli, 3'ü nodal yerleşimlidir.

t (8;14) ile t (14;18) birlikteliği gösteren olgu saptanmamıştır.

Çalışmamızda yer alan 4 atipik lenfoma olgusu değerlendirildiğinde, tümünde bcl-2 (-)'liği, bcl-6 ve CD 10 (+)'liği ve %95-100 oranında Ki-67 pozitifliği ile karakterli benzer immünohistokimyasal panel saptanmıştır;

Sitogenetik olarak bakıldığında, iki olguda c-myc pozitif, t (14,18) pozitifliği görülmemiştir.

Sonuç olarak, bizim çalışmamızda, morfolojik olarak BL ile DBBHL arasında kalınan olgularda, ilk olarak immünohistokimyasal yöntemler (özellikle Ki-67) daha sonra sitogenetik yöntemler yapıp, birlikte değerlendirilerek bir sonuca varılmıştır.

PTEN;

Non-Hodgkin lenfoma patogenezinde, daha çok protoonkogenlerin ekspresyonu ile sonuçlanan translokasyonlar üzerinde çalışılmıştır. Buna karşılık tümör süpresör genler (TSG) ile ilgili çok az sayıda çalışma yapılmıştır. Bunlar arasında en bilinenleri TP53 genindeki alterasyonlar (DBBHL'da %20 oranında, BL'da %30 oranında görülür) ve P16 genindeki alterasyonlardır (özellikle mantle hücreli lenfomada).

PTEN, 10. kromozom üzerinde lokalize olan (10q23) bir TSG'dir. PIP 3'ün (fosfatidil inositol trifosfat) etkisini antagonize eder. PIP3, tümöröenezde rol oynayan önemli bir 2.mesajcıdır. AKT ve farklı yolları aktive ederek (apoptozisi inhibe eder, hücre büyümesini, proliferasyonu uyarır, hücre motilitesini arttırır, anjiogenezisi arttırır) tümör oluşumuna yol açar. PTEN'de PIP3'ün etkisini ortadan kaldırarak, büyüme sinyallerini azaltır ve tümör oluşumunu engeller (10,67).

PTEN gen delesyonu ilk defa bazı solid tümörlerin patogenezinde (glial, prostat, endometrial, böbrek, testis, meme ca) ve bazı kanser sendromlarında (Cowden / Bannayan-Zonana Sendromu) tanımlanmıştır (10).

İlk defa 1991 yılında Offit ve ardından 1992 yılında Speaks, non-Hodgkin lenfoma patogenezinde 10q23 anomalileri saptamıştır. Offit %5-10 oranında non-Hodgkin lenfomada 10q22-25 delesyonları olduğunu ortaya koymuştur.

Butler ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, PTEN gen mutasyonları, B hücreli lenfomalarda %20 oranında saptanmıştır. Ama PTEN mutasyonlarından çok 10q23 kromozomundaki alterasyonların patogenezde önemli rol oynadığı düşünülmüştür. Yani 10q23 kromozomu üzerindeki başka bir TSG'nin etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (10). Uddin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, DBBHL'da PTEN delesyonunun %37 oranında görüldüğü ve kötü klinik gidişle korele olduğu sonucuna varılmıştır (67).

Bizim çalışmamızda, PTEN delesyonu, DBBHL'da %26.7 oranında saptanırken, BL'da %9.1 oranında görülmüştür.

Literatüre bakıldığında, PTEN delesyonunun DBBHL ve BL'daki sıklığı ve prognoz üzerine etkisi konusunda az sayıda araştırma vardır. Çok daha fazla sayıda olgu ve klinik izlemleri göz önüne alınarak araştırma yapılmalıdır.

ÖZET

Diffüz büyük B-hücreli lenfoma (DBBHL) ve Burkitt lenfoma (BL), klinik, morfolojik, immünofenotipik ve sitogenetik özellikleri açısından heterojen matür agresif B- hücreli lenfomalardır ve değişken bir klinik seyir gösterir. Bu çalışmada DBBHL ve BL ayırımında kullanılabilecek morfolojik, immünohistokimyasal ve sitogenetik kriterler ve prognoz ile ilişkileri araştırılmıştır. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD’da 2000-2007 yılları arasında 45 DBBHL ve 11 BL tanısı alan toplam 56 olgu incelenmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmada Bcl-2, Bcl-6, CD10, MUM-1 ve Ki-67 antikoları ile immün boyama ve floresan in situ hibridizasyon yöntemi ile C-MYC, PTEN ve T (14;18) Problemi uygulandı.

Bulgular: DBBHL olgularında CD10 ekspresyonu %25.4, Bcl-6 ekspresyonu %35.6 ve Bcl-2 ekspresyonu %55.6 oranında bulunmuştur. Kırkbeş DBBHL olgusunun 18’inin (%32.1) GCB, 27’sinin (%48.2) ABC alt tipini oluşturduğu saptanmıştır. GCB alt grubundaki hastaların sağkalım oranı ABC alt grubuna göre daha iyi olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p= 0.271$). DBBHL olgularında CD10, Bcl-6 ve Bcl-2 ekspresyonu ile prognoz arasında anlamlı bir ilişki mevcut değildir. BL olgularının tümünde (%100) CD10 ve Bcl-6 ekspresyonu saptanırken Bcl-2 negatif bulunmuştur. BL olgularında Ki-67 proliferasyon indeksi ortalama %97.2 (%95-100) iken, DBBHL’da ortalama %63.2 (%30-90) olarak bulunmuştur. BL olgularında c-myc amplifikasyonu %80 oranında pozitif iken, DBBHL’da %31.4 oranında pozitif saptanmış olup, istatistiksel olarak belirgin bir fark mevcuttur ($p=$ T14;18

PTEN delesyonu, DBBHL’da %26.7 oranında saptanırken, BL’da %9.1 oranında görülmüştür.

Sonuç: DBBHL/BL ayırımında immünohistokimyasal olarak CD10, Bcl-6, Bcl-2 ve Ki-67 panelinin uygulanması oldukça yararlı ve pratik bir yöntemdir. Ki-67 proliferasyon indeksinin %95'in üzerinde olması BL tanısı için önemli bir belirleyicidir. C-myc amplifikasyonu özellikle BL lenfomagenezisinde önemli bir rol oynamakla birlikte DBBHL gibi agresif lenfomalarda da saptanabilmektedir. T ve Pten delesyonu DBBHL ve BL'da nadir olarak görülebilmektedir.

SUMMARY

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) and Burkitt lymphoma (BL) are mature aggressive B-cell lymphomas that are heterogeneous for their clinical, morphological, immunophenotypical and cytogenetic features and each of them follow a variable clinical course. The present study investigates the morphologic, immunohistochemical and cytogenetic criteria, which can differentiate between DLBCL and BL and their relation to prognosis. A total of 56 cases, 45 of which was diagnosed as DLBCL and 11 of which was diagnosed as BL in Gazi University Faculty of Medicine Department of Pathology between the years 2000 and 2007 are examined. Bcl-2, bcl-6, CD 10, MUM-1 and Ki-67 antibodies were applied immunohistochemically and t (14,18), c-myc and PTEN probes were applied by fluorescent in situ hybridization method.

Results: CD 10 expression was found in 25.4%, bcl-6 in 35.6% and bcl-2 in 55.6% of DLBCL cases. It was detected that 18 out of 45 cases of DLBCL (32.1%) were of GCB and 27 (48.2%) were of ABC subtype. Although the survival rates were longer in GCB subtype when compared to ABC subtype, the difference was not statistically significant ($p=0.271$). There exists no significant correlation between prognosis and expressions of CD 10, bcl-6 or bcl-2 in DLBCL cases. All cases of BL (100%) expressed CD 10 and bcl-6 whereas they were all negative for bcl-2. The average Ki-67 proliferation index in BL was 97.2% (95-100%) whereas it was 63.2% (30-90%) in DLBCL. C-myc amplification was found to be positive in 80% of BL cases whereas it was positive in 31.4% of DLBCL cases and the difference was statistically significant ($p=0.003$).

T(14;18) translocation was detected in 7.7% of DLBCL cases and in 20% of BL cases. PTEN deletion was detected in 26.7% and 9.1% of DLBCL and BL cases respectively.

Conclusion: The application of an immunohistochemical panel including CD 10, bcl-6, bcl-2 and Ki-67 is a quite practical and beneficial method to differentiate between DLBCL/BL. A Ki-67 proliferation index above 95% is an important indicator in the diagnosis of BL. Although c-myc amplification plays an important role the lymphomagenesis of BL, it may also be detected in some other aggressive lymphomas such as DLBCL. T(14;18) and PTEN deletion may rarely be observed in DLBCL and BL.

REFERANSLAR

- 1- Akasaka T, Akasaka H, Ueda C, Yonetani N, Maesako Y, Shimizu A, Yamabe H, Fukuhara S, Uchiyama T, Ohno H. Molecular and Clinical Features of Non-Burkitt's, Diffuse Large- Cell Lymphoma of B-cell Type Associated With the c-MYC/Immunoglobulin Heavy-Chain Fusion Gene. *Journal of Clinical Oncology* 18 (3): 510-518, 2000
- 2- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503-511, 2000
- 3- Barrans SL, Evans P, AS, O'Connor S, JM, Kendall SJ, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. The t (14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clinical Cancer Research* 9: 2133-2139, 2003
- 4- Bavikatty N R, Ross C W, Finn W G, Schnitzer B, Singleton T P. Anti- CD 10 Immunoperoxidase Staining of Parafin-embedded acute leukemias: Comparison with flow cytometric immunophenotyping. *Human Pathology* 31 (9): 1051- 1054, 2000
- 5- Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, Guillermo A L, Chan W C, Greiner T C, Weisenburger D D, Armitage J O, Gascoyne R D, Connors J M, Grogan T M, Braziel R, Fisher R I, Smeland E B, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson W H, Jaffe E S, Montserrat E, Hermelink H K M, Staudt L M, Campo E, Rosenwald A. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 106 (9): 3183-3190, 2005

- 6- Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M, Linderöth J, Dictor M, Jerkeman M, Stahl EC, Sundström C, Eriksson SR, Backlin C, Hagberg H, Rosenquist R, Enblad G. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Modern Pathology* 18: 1113-1120, 2005
- 7- Blum K A, Lozanski G, Byrd J C. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 104 (10): 3009- 3020, 2004
- 8- Boxer L, Dang C. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20: 5595-5610, 2001
- 9- Brazier R M, Arber D A, Slovak M L, Gulley M L, Spier C, Kjeldsberg C, Unger J, Miller T P, Tubbs R, Leith C, Fisher R I, Grogan T M. The Burkitt-like lymphomas: a Southwest Oncology Group study delineating phenotypic, genotypic, and clinical features. *Blood* 97(12): 3713-3719, 2001
- 10- Butler MP, Wang SI, Chaganti RSK, Parsons R, Dalla-Favera R. Analysis of PTEN Mutations and Deletions in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphomas. *Genes, Chromosomes&Cancer* 24: 322-327,1999
- 11- Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, Trzpuć T, Vesole DH, Logan B, Balla AK, Perkins SL. Immunohistochemical Expression Patterns of Germinal Center and Activation B-cell Markers Correlate With Prognosis in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *American Journal of Surgical Pathology* 28 (4): 464-470, 2004
- 12- Cogliatti SB, Novak U, Henz S, Schmid U, Möller P, Barth T. Diagnosis of Burkitt lymphoma in due time: a practical approach. *British Journal of Haematology* 134:294-301, 2006
- 13- Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, Colomer D, Falini B, Montserrat E, Campo E. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101:78-84,

2003

- 14- Dave SS, Fu K, Wright G. W, Lam L T, Kluin P, Boerma EJ, Greiner TC, Weisenburger DD, Rosenwald A, Ott G, Müller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Delabie J, Rimsza LM, Braziel RM, Grogan TM, Campo E, Jaffe ES, Dave BJ, Sanger W, Bast M, Vose JM, Armitage JO, Connors JM, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Fisher RI, Miller TM, Montserrat E, Wilson WH, Bahl M, Zhao H, Yang L, Powell J, Simon R, Chan WC, Staudt LM. Molecular Diagnosis of Burkitt's Lymphoma. *The New England Journal of Medicine* 354: 2431-2442,2006
- 15- Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson P G. CD 10 and BCL-6 Expression in Parafin Sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *The American Journal of surgical Pathology* 24 (6): 846-852, 2000
- 16- Dominis M , Dzebro S, Gasparov S, Pesut A, Kusec R. Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Its Variants. *Croatian Medical Journal* 43 (5): 535-540, 2002
- 17- Fabiani B, Delmer A, Lepage E, Guettier C, Petrella T, Briere J, Penny A M, Copin M C, Diebold J, Reyes F, Gaulard P, Molina T J. CD 10 expression in diffuse large B-cell lymphomas does not influence survival. *Virchows Arch* 445:545-551, 2004
- 18- Ferry J A. Burkitt's lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis. *The Oncologist* 11: 375-383, 2006
- 19- Frost M, Newell J, Lones M.A, Tripp S.R, Cairo M.S, Perkins S.L. Comparative Immunohistochemical Analysis of Pediatric Burkitt Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology* 121: 384-392, 2004
- 20- Gascoyne RD, Adomat S.A, Krajewski S, Krajevski M, Horsman D.E, Tolcher A.W, O'Reilly A.W, Hoskins S.E, Coldman A.J, Reed J.C, Connors JM. Prognostic significiance of bcl-2 protein expression and bcl-2 gene rearrangement in diffuse

- aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90: 244-251, 1997
- 21- Haarer C F, Roberts R A, Frutiger Y M, Grogan T M, Rimsza L M. Immunohistochemical Classification of De Novo, Transformed, and Relapsed Diffuse Large B-cell Lymphoma Into Germinal Center B-cell and Nongerminal Center B-cell Subtypes Correlates With Gene Expression Profile and Patient Survival. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 130: 1819-1824, 2006
- 22- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103 (1): 275-282, 2004
- 23- Haralambieva E, Boerma EJ, van Imhoff GW, Rosati S, Schuuring E, Müller-Hermelink HK, Kluin PM, Ott G. Clinical, Immunophenotypic, and Genetic Analysis of Adult Lymphomas With Morphologic Features of Burkitt Lymphoma. *American Journal of Surgical Pathology* 29 (8): 1086-1094, 2005
- 24- Hecth J L, Aster J C. Molecular Biology of Burkitt's Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 18 (21): 3707-3721, 2000
- 25- Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, Di Stefano F, Anderson L, Vaughan Hudson G, Mason D, Selby P, Linch DC. Prognostic significance of bcl-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 88: 1046-1051, 1996

- 26- Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth T, Bernd HW, Cogliatti S, Dierlamm J, Feller A, Hansmann ML, Haralambieva E, Harder L, Hasenclever D, Kühn M, Lenze D, Lichter P, Martin-Subero JI, Möller P, Müller-Hermelink HK, Ott G, Parwaresch RM, Pott C, Rosenwald A, Rosolowski M, Schwaenen C, Stürzenhofecker B, Szczepanowski M, Trautmann H, Wacker HH, Spang R, Loeffler M, Trümper L, Stein H, Siebert R. A Biologic Definition of Burkitt's Lymphoma from Transcriptional and Genomic Profiling. *The New England Journal of Medicine* 354: 2419-2430,2006
- 27- Hutchison RE, Finch C, Kepner J. Burkitt lymphoma is immunophenotypically different from Burkitt-like lymphoma in young persons. *Annals of Oncology*. 11:S35-S38, 2000
- 28- Imhoff GWV, Boerma EJG, Holt B, Schvuring E, Verdanck LF, Kluin-Nelemans HC, Klum PM. Prognostic impact of Germinal Center-Associated Proteins and Chromosomal Breakpoints in Poor-Risk Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 24:4135-4142, 2006
- 29- Iqbal J, Neppali V T, Wright G , Dave B J , Horsman D E, Rosenwald A, Lynch J, Hans C P, Weisenburger D D, Greiner T C, Gascoyne R D, Campo E, Ott G, Müller-Hermelink H K, Delabie J, Jaffe E S, Grogan T M, Connors J M , Vose J M, Armitage J O, Staudt L M, Chan W C. BCL-2 Expression Is a Prognostic Marker for the Activated B-Cell-Like Type of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal Of Clinical Oncology* 24: 961-968, 2006
- 30- Iqbal J, Sanger W G, Horsman D E, Rosenwald A, Pickering D L, Dave B, Dave S, Xiao L, Cao K, Zhu Q, Sherman S, Hans C P, Weisenburger D D, Greiner T C, Gascoyne R D, Ott G, Müller-Hermelink H K, Delabie J, Braziel R M, Jaffe E S, Campo E, Lynch J C, Connors J M, Vose J M, Armitage J O, Grogan T M, Staudt L M, Chan W C. BCL-2 Translocation Defines a Unique Tumor Subset within the Germinal Center B-Cell-Like

- Diffuse Large B-Cell lymphoma. *American Journal of Pathology* 165(1): 159-166, 2004
- 31- Jacobson JO, Wilkes BM, Kwaiatkowski DJ, Medeiros LJ, Aisenberg AC, Haris NL. Bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer* 72: 231-236, 1993
- 32- Jaffe E S, Harris N L, Stein H, Vardiman J W: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, World Health Organization Classification of Tumours, 2001, S: 171-175, 181-185,
- 33- Janz S. Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA repair* 5: 1213-1224, 2006
- 34- Kanungo A, Medeiros L J, Abruzzo L V, Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t (14;18) and 8q24/c-myc translocation generally have a poor prognosis. *Modern Pathology* 19: 25-33, 2006
- 35- Kasch I, Lingnau A, Endl E, Sellmann K, Demert I, Ratliff T L, Jocham D, Sczakiel G, Gerdes J, Böhle A. Antisense Treatment Against Ki-67 mRNA Inhibits Proliferation and Tumor Growth In Vitro and In Vivo. *International Journal of Cancer* 105: 710-716, 2003
- 36- Knowles D M, Diffuse Large Cell Lymphomas, Burkitt lymphoma. In: *Neoplastic Haematopathology*, second edition, 2001
- 37- Kramer M H H, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen , Krieken J H J M, Jong D, Maartense E, Schuurin E, Kluin P M. Clinical Relevance of bcl-2, bcl-6 and myc rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 92 (9): 3152-3162, 1998
- 38- Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, van Groningen K, van Krieken JH, de Jong D, Kluin PM. Clinical significance of bcl-2 and P53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *Journal of Clinical Oncology* 14: 2131-2138, 1996

- 39- Kwon M S, Go J Y, Choi J S, Lee S S, Ko Y H, Rhee J C, Ree H J. Critical Evaluation of bcl-6 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma of the stomach and small intestine. *The American Journal of Surgical Pathology* 27 (6): 790-798, 2003
- 40- Ladanyi M, Offit K, Jhanwar S, Filippa D, Chaganti R:S:K. MYC Rearrangement and Translocations Involving Band 8q24 in Diffuse Large Cell Lymphomas. *Blood* 77 (5): 1057-1063, 1991
- 41- Lai R, Arber DA, Chang KL. Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and mononocytoid B-cell hyperplasia. *Modern Pathology* 11: 864-869, 1998
- 42- Leval L, Haris N L. Variability in immunphenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical relevance. *Histopathology* 43: 509-528, 2003
- 43- Li Z, Calcar S V, Qu C, Cavenee W K, Zhang M Q, Ren B. A global transcriptional regulatory role for c-myc in Burkitt's lymphoma cells. *Biochemistry* 100: 8164-8169, 2003
- 44- Lossos S I, Jones C D, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder J L, Tibshirani R, Levy R. Expression of a single gene, bcl-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 98 (4): 945-951, 2001
- 45- Macpherson N, Lesack D, Klasa R, Horsmann D, Connors JM, Barnett M. Small noncleaved, non-Burkitt's (Burkitt-like) lymphoma: cytogenetics predict outcome and reflect clinical presentation. *Journal of clinical Oncology* 17: 1558-1567, 1999
- 46- Magrath I, Jaffe ES, Bhatra K. Burkitt's lymphoma. In: Knowles DM, ed. *Neoplastic Hematopathology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins. 953-986,2001
- 47- McCluggage W G, Catherwood M, Alexander H D, McBride H A, Smith, Morris T C M. Immunohistochemical expression of CD 10 and t(14;18) chromosomal translocation

may be indicators of follicle centre cell origin in nodal diffuse large B-cell lymphoma.
 Histopathology 41: 414-420, 2002

- 48- McClure R F, Remstein E D, Macon W R, Dewald G W, Habermann T M, Hoering A, Kurtin P J. Adult B-Cell Lymphomas With Burkitt-Like Morphology Are Phenotypically and Genotypically Heterogeneous With Aggressive Clinical Behavior. *American Journal of Surgical Pathology* 29 (12): 1652-1660, 2005
- 49- McIntosh G G, Lodge A J, Watson P, Hall A G, Wood K, Anderson J J, Angus B, Horne C H W, Milton I D. NCL-CD 10-270: A new monoclonal antibody recognizing CD 10 in paraffin-embedded tissue. *American Journal of Pathology* 154 (1): 77-82, 1999
- 50- Miller T P, Grogan T M, Dahlberg S, Spier C M, Brazier R M, Banks P M, Foucar K, Kjeldsberg C R, Levy N, Nathwani B N, Schnitzer B, Tubbs R R, Gaynor E R, Fisher R I. Prognostic Significance of the Ki-67-Associated Proliferative Antigen in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas: A Prospective Southwest Oncology Group Trial . *Blood* 83: 1460-1466, 1994
- 51- Mills S E, Lymph nodes. In: Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, fourth edition, Lippincott Williams&Wilkins, 2004, S: 777-849
- 52- Muris J J F, Meijer W V, Krieken J H J M, Jiwa N M, Ossenkoppele G J, Oudejans J J. Immunohistochemical profiling based on bcl-2, CD 10 and MUM 1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *Journal of Pathology* 208: 714-723, 2006
- 53- Mutter G L. PTEN, a protean tumor suppressor. *American Journal of Pathology* 158 (6): 1895-1898, 2001
- 54- Myers M P, Tonks N K. PTEN: Sometimes Taking it off can be better than putting it on. *American Journal of Human Genetics* 61:1234-1238, 1997

- 55- Nakamura N, Nakamine H, Tamaru J, Nakamura S, Yoshino T, Ohshima K, Abe M. The distinction between Burkitt lymphoma and Diffuse large B-cell Lymphoma with c-myc rearrangement. *Modern Pathology* 15 (7): 771-776, 2002
- 56- Niu H. The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. *Hematological Oncology* 20: 155-166, 2002
- 57- Ohshima K, Kawazaki C, Muta H. CD 10 and bcl-6 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD 10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology* 39: 156-162, 2001
- 58- Paeppe P, Wolf-Peeters C. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia* 21: 37-43, 2007
- 59- Paulsen CB, Borup R, Nielsen FC. Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma. *European Journal of Haematology* 74: 453-465, 2005
- 60- Ree H J, Yang W I, Kim C W, Huh J, Lee S S, Cho E Y, Ko Y H, Charney D. Coexpression of bcl-6 and CD 10 in diffuse large B-cell lymphomas: Significance of bcl-6 expression patterns in identifying germinal center B-cell lymphoma. *Human Pathology* 32 (9): 954-962, 2001
- 61- Rosai J. Lymph nodes. In: Rosai J, ed *Ackerman's Surgical Pathology*, ninth edition, St.Louis: C.V. Mosby, 2004
- 62- Rossi D, Gaidano G. Molecular Heterogeneity of Diffuse Large B-cell Lymphoma: Implications for Disease Management and Prognosis. *Hematology* 7 (4):239-252, 2002
- 63- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 8: 68-74, 2002
- 64- Simpson L, Parsons R. PTEN: Life as a Tumor Suppressor. *Experimental Cell Research* 264: 29-41, 2001

- 65- Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Kaman S, Ohshima K, Masataka O, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 106 (5): 1770-1777, 2005
- 66- Tang SC, Visser L, Hepperle B, Hanson J, Poppema S. Clinical significance of bcl-2 MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 83 cases. *Journal of Clinical Oncology* 12: 149-154, 1994
- 67- Uddin S, Hussain AR, Siraj AK, Manogaran PS, Al-Jomah NA, Moorji A. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* 108: 4178-4186, 2006
- 68- Uherova P, Ross CW, Schnitzer B. The clinical significance of CD 10 antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology* 115: 582-588, 2001
- 69- Veelken H, Dannheim SV, Moenting JS, Martens UM, Graeff AS. Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy. *Annals of Oncology* 18:931-939, 2007
- 70- Wang H, Bossler A, Schaffer A, Tomczak E, DiPatri D, Frank D, Nowell P, Bagg A. A novel t(3;8)(q27;q24.1) simultaneously involving both the BCL6 and MYC genes in a diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 172: 45-53, 2007
- 71- Warnke R A, Weiss L M, Chan J, Cleary M, Dorfman R, Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Lymph nodes and Spleen, AFIP, 1995, S: 153-221
- 72- Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt E H, Wiestner A, Staudt L M. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *PNAS* 100 (17):9991-9996, 2003
- 73- Xu Y, McKenna RW, Kroft SH. Assessment of CD 10 in the diagnosis of small B-cell lymphomas: a multiparameter flow cytometric study. *American Journal of Clinical*

Pathology 117: 291-300, 2002

- 74- Xu Y, McKenna R W, Doolittle J E, Hladik C L , Kroft S H. The t (14;18) in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 13(2) : 116-123, 2005
- 75- Yustein J T, Dang C V. Biology and treatment of Burkitt's lymphoma. *Current Opinion in Hematology* 14: 375-381, 2007
- 76- Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, Suzumiya J, Shimazaki K, Kawasaki C, Kikuchi M. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology International* 49: 1043-1052, 1999