

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**BEYİN LENFOMALARININ MOLEKÜLER GELİŞİMİ VE
SINIFLANDIRILMASI**

Dr. Dilara AKBULUT

**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Işınsu KUZU**

**ANKARA
2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**BEYİN LENFOMALARININ MOLEKÜLER GELİŞİMİ VE
SINIFLANDIRILMASI**

Dr. Dilara AKBULUT

**TIBBİ PATOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Işın KUZU**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 20L0230005 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2020**

KABUL VE ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

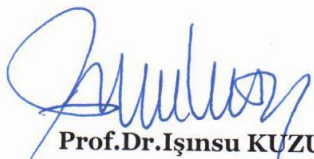
I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Dr.Dilara AKBULUT	Sınav tarihi: 20 / 07 / 2020
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Prof.Dr.İşinsu KUZU	

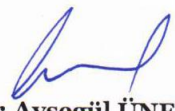
II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Beyin Lenfomalarının Moleküler Gelişimi ve Sınıflandırılması	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	


Prof.Dr.Aylin OKÇU HEPER
Jüri Başkanı
Tıbbi Patoloji Anabilim/Bilim Dalı


Prof.Dr.İşinsu KUZU
Jüri Üyesi
Tıbbi Patoloji Anabilim/Bilim Dalı


Prof.Dr.Ayşegül ÜNER
Jüri Üyesi
Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji
Anabilim/Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanmasından tamamlanmasına kadar geçen her aşamada büyük emeği olan, desteğini, bilgisini ve yardımını esirgemeyen, bana iyi bir patolog olmanın emek gerektirdiğini öğreten, kendime rol modeli aldığım değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Işın KUZU'ya; değerli katkıları ve emeği için Prof. Dr. Ayşegül ÜNER'e, bir iş ortamından çok aile sıcaklığında asistanlık eğitimimi geçirme şansı bulduğum AÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda görevli tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım için kendimi şanslı hissettiğim, her zaman yanımda olan, desteklerini her daim hissettiğim, canım arkadaşlarım, Fatma Altıntaş Güzel, Sonay Kuş, Seda Aktürk, A.Faruk Arman, Aslıhan Yavaş, Elif Öcal, Fadime Gül Salman, Merve Tural, Elif Özgür, Selim Sevim, Zarifakhanım Gahramanlı, Eda Nur Kozan, Ezgi Dicle Kuz, Inga Adanır, Nesrin Reisli ve Elif Kardelen Koltuk'a teşekkür ederim. Problemlerime ortak olan, bana çözümler sunan, dünyanın en iyi uzmanları Seher Yüksel, Hilal Özakıncı ve Hale Karadağ'a teşekkür ederim.

Ayrıca asistanlığım boyunca her konuda yanımda olan Patoloji Anabilim dalı sekreteri Özlem Soyalp ve sorumlu hemşiremiz Tevhide Çoban'a, tez aşamalarımnda bana yardımcı dokunan tüm patoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Asistanlığımın son zamanlarında elimden tutup bana inanılmaz destek olan, düşüncelerimden tez içeriğime her alanda izi olan, yüzümü güldüren Murat Özen'e çok teşekkür ederim.

Son olarak, bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip, her zaman yanımda olduklarını bildiğim, hayattaki en büyük şansım, canım annem Yıldız Özerhan ve canım babam Musa Akbulut'a ve biricik kardeşim Kürşad Kaan'a teşekkür ederim, iyi ki varsınız.

Dilara Akbulut-Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar LİSTESİ	v
RESİMLER LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. PRİMER SANTRAL SİNİR SİSTEMİ LENFOMASI	3
2.1.1. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler	3
2.1.2. Etyopatogenez	5
2.1.2.1. B Hücre Farklılaşması	6
2.1.2.2. SSS'nin Mikroanatomisi	7
2.1.2.3. PSSSL Gelişiminde Moleküler Değişiklikler	9
2.1.2.4. Mikroçevre ve Rolü	13
2.1.3. Histopatoloji	16
2.1.4. İmmünofenotip	16
2.1.5. Genetik Profil	17
2.2. İMMÜN KONTROL NOKTALARI VE İMMÜNOTERAPİ	18
2.2.1. Tümör Mikroçevresi	18
2.2.2. T Hücre Dışlanması (T Cell Exclusion)	19
2.2.3. İmmün Kaçış	21
2.2.4. PD-1/PD-L1 Yolağı	23
2.3. PSSSL'DA İMMÜNOTERAPİ	25
3. MATERYAL VE METOD	31
3.1. OLGU SEÇİMİ	31
3.2. DOKU MİKRO-ARRAY YÖNTEMİ	32
3.3. İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA	33
3.4. İMMÜNHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	34

3.5. İN-SİTU HİBRİDİZASYON.....	35
3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	38
4. BULGULAR	39
4.1. KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR.....	39
4.2. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ	43
4.3. EBV.....	48
4.4. PD-1 ve PD-L1 İFADESİ	57
4.5. MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLER.....	67
5. TARTIŞMA.....	73
5.1. KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLER	73
5.2. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ	74
5.3. EBV.....	76
5.4. PD-1 ve PD-L1 İFADESİ	79
5.5. MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLER.....	88
6. SONUÇLAR	94
ÖZET.....	101
SUMMARY	104
KAYNAKLAR	107

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1. Kullanılan antikorlara ait bilgiler ve boyama teknikleri.....	33
Tablo 3.2. Kullanılan antikorların normal dokudaki ifade özellikleri	34
Tablo 3.3. FISH Protokolleri	37
Tablo 4.1. Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı	39
Tablo 4.2. PSSSL olgularında tümör yerleşim yeri	40
Tablo 4.3. PSSSL olgularına ait klinikopatolojik özellikler	42
Tablo 4.4. CD3 İmmünohistokimyası ile mm ² 'de pozitif T lenfosit sayısı	43
Tablo 4.5. CD8 İmmünohistokimyası ile mm ² 'de pozitif T lenfosit sayısı	44
Tablo 4.6. CD8/CD3 oranı	46
Tablo 4.7. CD68 İmmünohistokimyası ile mm ² 'de pozitif histiyosit sayısı.....	46
Tablo 4.8. PSSSL'de preoperatif steroid tedavisi ile CD3+ TIL ilişkisi	48
Tablo 4.9. PSSSL'de preoperatif steroid tedavisi ile CD8+ TIL ilişkisi	48
Tablo 4.10. PSSSL'de preoperatif steroid tedavisi ile CD68+ histiyosit ilişkisi.....	48
Tablo 4.11. EBER ve CD8/CD3 lenfositlerin oranı.....	51
Tablo 4.12. PSSSL'de EBV ve mikroçevre ilişkisi	51
Tablo 4.13. Nodal DBBHL'de EBV ve mikroçevre ilişkisi	52
Tablo 4.14. PSSSL'de EBV ve PD-1 ifade ilişkisi	53
Tablo 4.15. Nodal DBBHL'de EBV ve PD-1 ifade ilişkisi	54
Tablo 4.16. PSSSL'de EBV ve PD-L1 ifade ilişkisi	55
Tablo 4.17. Nodal DBBHL'de EBV ve PD-L1 ifade ilişkisi.....	56
Tablo 4.18. TIL'de PD-1 ifadesi (mm ² 'deki + hücre sayısı) (Tüm hasta grubu).....	62
Tablo 4.19. TIL'de PD-1 ifadesi (PD-1+ TIL/CD3 oranı) (Tüm hasta grubu).....	62
Tablo 4.20. Tümörde PD-L1 ifadesi (Tüm hasta grubu)	62
Tablo 4.21. Mikroçevrede PD-L1 ifadesi (mm ² 'de + hücrelerin oranı) (Tüm hasta grubu).....	63
Tablo 4.22. Tümörde PD-L1 ifadesi (EBV negatif olgular)	63

Tablo 4.23. Mikroçevrede PD-L1 ifadesi (mm ² 'de + hücrelerin oranı) (EBV negatif olgular)	64
Tablo 4.24. TIL'de PD-1 ifadesi (mm ² 'deki + hücre sayısı) (EBV negatif olgular).....	64
Tablo 4.25. TIL'de PD-1 ifadesi (PD-1+ TIL/CD3 oranı) (EBV negatif olgular).....	64
Tablo 5.1. Literatürde PSSSL'de PD-1 ve PD-L1 ifade oranları.....	80
Tablo 5.2. Literatürde PSSSL'de PD-1 değerlendirmeleri	86
Tablo 5.3. Literatürde PSSSL'de PD-L1 değerlendirmeleri.....	87
Tablo 5.4. Literatürde PSSSL'de FISH değerlendirmeleri	92

RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 3.1. Beecher Instruments Manuel Mikroarray cihazı ve hazırlanan doku blokları.....	32
Resim 4.1. Diffüz, perivasküler ve “scattered” büyüme paternleri (Dijital görüntü x30).....	41
Resim 4.2. CD3 değerlendirmelerine ait, QuantCenter programı sayımları (Dijital görüntü x35).....	44
Resim 4.3. CD8 değerlendirmelerine ait, QuantCenter programı sayımları (Dijital görüntü x35).....	45
Resim 4.4. CD68 değerlendirmelerine ait, CaseViewer programı sayımları (Dijital görüntü x35).....	47
Resim 4.5. EBER pozitif olgu (Dijital görüntü x45.8, inset x7).....	49
Resim 4.6. EBER pozitif olgu (Dijital görüntü x23.2, inset x7).....	50
Resim 4.7. TIL’de PD-1 pozitifliği, CaseViewer Programları ile (Dijital görüntü x60).....	59
Resim 4.8. Mikroçevrede PD-L1 pozitifliği, CaseViewer Programları ile (Dijital görüntü x60).....	60
Resim 4.9. Tümörde PD-L1 pozitifliği, CaseViewer Programları ile (Dijital görüntü x60).....	61
Resim 4.10. PD-L1/PD-L2 amplifikasyon probe’u ile normal sinyal varlığı (Dijital görüntü x236).....	68
Resim 4.11. PD-L1/PD-L2 amplifikasyon probe’u ile polizomi (Dijital görüntü x236).....	68
Resim 4.12. PD-L1/PD-L2 amplifikasyon probe’u ile amplifikasyon (Dijital görüntü x236).....	69
Resim 4.13. PD-L1/PD-L2 amplifikasyon probe’u ile kopya sayısı artışı (Dijital görüntü x236).....	69
Resim 4.14. PD-L1/PD-L2 break-apart probe’u ile normal füzyon sinyali (Dijital görüntü x100).....	70
Resim 4.15. PD-L1/PD-L2 break-apart probe’u ile translokasyon varlığı (Dijital görüntü x100).....	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Hedefe yönelik ajanlar.....	5
Şekil 2.2. B hücre farklılaşması.....	7
Şekil 2.3. B hücre sinyal yolları.....	12
Şekil 2.4. Moleküler patogeneze	13
Şekil 2.5. İmmün kaçış	23
Şekil 3.1. Zytovision amplifikasyon probe'unun hedef aldığı bölgeler	36
Şekil 4.1. Hasta gruplarında EBER pozitifliği	49
Şekil 4.2. PSSSL olgularında EBV ifadesi ve ortalama sağkalım.....	57
Şekil 4.3. Hasta gruplarında PD-1 pozitifliği (%)	57
Şekil 4.4. Hasta gruplarında PD-L1 pozitifliği (%).....	58
Şekil 4.5. Tümörde PD-L1 ifadesi ve sağkalım süreleri (ay)	66
Şekil 4.6. TIL'de PD-1 ifadesi ve sağkalım süreleri (ay).....	67
Şekil 4.7. PD-1/PD-L1 gen değişikliği ve ortalama PD-L1 ifade düzeyleri	71
Şekil 4.8. PD-L1/PD-L2 gen değişikliği ve ortalama sağkalım (ay).....	72

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Primer santral sinir sistemi lenfoması (PSSSL), santral sinir sisteminde gelişip burada sınırlı kalan, agresif gidişli, sıklıkla DBBHL morfolojisinde bir tümördür ve tüm SSS neoplazilerinin %2-3'ünü oluşturur. Sık relapslarla seyreden kötü prognoza sahiptir ve bu duruma kendisine özgü moleküler değişikliklerin neden olduğu düşünülmektedir.

Kanser gelişimi ve ilerlemesinde immün sistem anahtar rol oynamaktadır ve kanser hücrelerinin bu sistemi alt edecek stratejiler geliştirebildiği bilinmektedir. Bu mekanizmalardan biri, PD-1/PD-L1 yolağıdır. PD-L1 ifade eden tümör hücreleri, T hücre yanıtını baskılayarak immün sistemden kaçış sağlarlar. Farklı solid kanserlerde tümör mikroçevresindeki lenfositlerde PD-1 ve kanser hücrelerinde PD-L1 ifadesinin varlığı, kötü prognoz ile ilişkili olarak gösterilmiştir. Tanımlanan bu ilişki, PD-1/PD-L1 yolağının farklı kanser çeşitlerinde tedavi seçeneği olarak hedeflenmesine neden olmuştur.

Santral sinir sistemi lenfomalarında PD-1 ve PD-L1 ifadesini immünhistokimyasal olarak inceleyen bir çalışmada, 32 hastada, tümör infiltrate eden lenfositlerde PD-1 ifadesi ile sağ kalım arasında negatif ilişki gözlenmiş; tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi ile kemoterapiye daha iyi yanıt varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. EBV ilişkisiz PSSSL tanılı 63 hastadan oluşan bir grupta, 9p24.1 gen bölgesinde RT-PCR yöntemi ile kopya sayısı kazanımı yanında (%52), floresan in-situ hibridizasyon yöntemi ile translokasyon varlığı da ilk defa gösterilmiştir (%6). Bu olgularda immünhistokimyasal PD-1, PD-L1 ve PD-L2 antikorları ile yapılan karşılaştırmada kopya sayısı kazanımı ve translokasyon varlığının, dokuda protein ifade düzeyiyle korele olduğu gözlenmiştir. Bu tedavi seçeneğini araştırmayı amaçlayan yeni bir çalışma 4 nüks/refrakter primer santral sinir sistemi lenfoması hastasında anti-PD-1 tedavi ile tüm hastalarda tam ya da parsiyel klinik ve radyolojik yanıt ile, 13-17 ay arasında değişen progresyonsuz sağ kalım ortaya koymuştur. Çok merkezli bir faz 2 çalışma ile PSSSL hastalarını kapsayan tek merkezli bir çalışma da anti-PD-1 tedavi etkinliğini hali hazırda araştırmaktadır.

Tedavi seçeneklerinin sınırlı, tedavi yan etkilerinin yüksek, kür oranının düşük olduğu bu lenfoma tipinde, immünoterapi hedefi olan belirteçlerin hastalık gelişimindeki rolü net olarak ortaya konmamıştır. Bu konuda yürütülmekte olan çalışmalar, sınırlı sayıda hasta grubunu içermekte ve doğrulamaya ihtiyaç duymaktadır. Yeni tedavi seçeneklerinin ve tedavide başarı için hastaların buna göre sınıflandırılmasının yerini araştıracağımız bu çalışmamızda Ankara Üniversitesi ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim dallarında PSSSL tanısı almış geniş bir hasta serisi incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda olguların retrospektif klinik analizi ile, tümör dokusunda PD-1, PD-L1 ve PD-L2 ifadesi ile bunların moleküler karşılığının in-situ hibridizasyon yöntemi ile araştırılması ve histopatolojik, prognostik parametrelerle ilişkilendirilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada çok agresif seyirli ve konvansiyonel tedaviye yanıtı düşük olan primer santral sinir sistemi lenfomalarında mikroçevre özelliklerinin, tedavi alternatifleri olarak “kontrol noktası (check point) inhibitörü” ilaçların etki mekanizmaları göz önüne alındığında, tedavinin yönlendirilmesinde rutin olarak tanı sürecinde kullanımının önemi olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede kısa sürede ölümcül sonlanan bu hastalıkta yaşam süresinin arttırılmasında alternatif tedavilerin belirlenmesi ve tanı anında yapılması gereken güvenilir testlerin neler olması gerektiğinin de ortaya konması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PRİMER SANTRAL SİNİR SİSTEMİ LENFOMASI

2.1.1. Epidemiyoloji ve Klinik Özellikler

Primer santral sinir sistemi lenfoması (PSSSL), santral sinir sisteminde gelişip burada sınırlı kalan, non-Hodgkin lenfomanın nadir ve agresif bir formudur. Tüm SSS neoplazilerinin %2-3'ünü oluşturur (1). Günümüzde özellikle 65 yaş ve üzerinde görülme sıklığının arttığı gözlenmektedir; hafif bir erkek predominansı mevcuttur (1.2:1-1.7:1) (1).

Bu agresif lenfomanın sistemik tutulum olmaksızın, beyin, kranial sinirler, leptomeninksler, serebrospinal sıvı, intraokuler yapılar ve spinal kord boyunca yayılım göstermesi, kendine özgü patobiyojisini oluşturmaktadır. Hastalar hızlı büyüyen, tek ya da birden fazla kitle ile tanı alırlar. Radyolojik incelemede gadolinyumlu MR görüntüleme esastır ve kitlede patolojik kontrastlanma saptanır. Klinik semptomlar, lezyonun anatomik yerleşimini yansıtır. En sık tutulan bölge, hemisferlerdir (%38). Hastaların büyük kısmında kognitif ya da motor semptomlar izlenirken, bir kısmı nöbet ile prezente olur. Bulanık görme, göz ağrısı, fotofobi gibi görsel semptomlar olguların %30'unda bildirilmektedir ve intraokuler yayılımın göstergesidir. Olgularda immün yetmezlik zemini (HIV, transplantasyon sonrası gibi) bulunabilir ve kazanılmış ya da konjenital immün yetmezlik varlığı, PSSSL için tanımlanmış bir risk faktörüdür (2). Yüksek aktif antiretroviral tedavinin (HAART) AIDS hastalarında bir tedavi seçeneği haline gelmesinden sonra, bu hastalarda PSSSL insidansının azalmaya başladığı gözlenmiştir (3).

Bu hastalıkta tedavi yanıt oranları yüksek olsa da, relapslar sıktır; 5 ve 10 yıllık ortalama sağ kalım sırasıyla %29.9 ve %22.2'dir. İmmün yetmezlikli hastalarda sağ kalım daha da kötüleşmektedir (1).

Primer SSS lenfomasında tanıda halen altın standart olan sterotaktik biyopsi materyallerinde dokuların azlığı ve bu tümörlerin oldukça nadir görülmesi nedeniyle, bu lezyonların patogenezi ve gelişim mekanizmaları henüz tümüyle aydınlatılamamıştır (1). Hızlı bir semptomatik ve radyolojik yanıt oluştursa da,

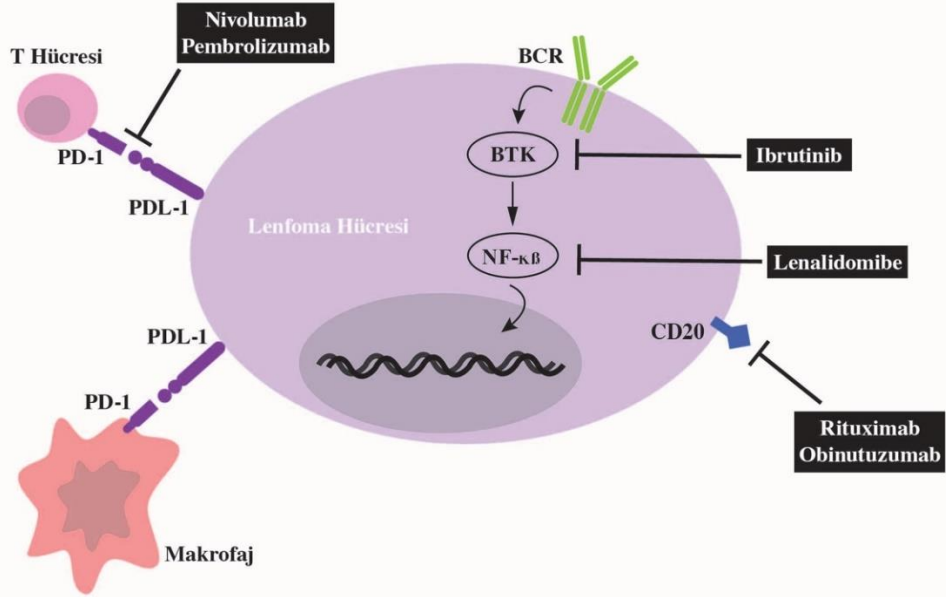
empirik glukokortikoid uygulaması, yapılacak biyopsinin non-diagnostik olma olasılığını oldukça artırmaktadır (2).

Tanı sonrası evreleme amaçlı yapılan oftalmolojik muayene, tüm vücut BT görüntüleme, kemik iliği biyopsisi, serolojik HIV, hepatit B ve C varlığı ile serum LDH düzeyi standart incelemelerdir. Uluslararası Ekstranodal Lenfoma Çalışma Grubu'nun (IELSG) belirlediği 5 parametre, klinik prognostik belirteç olarak kullanılmaktadır. Yüksek serum LDH düzeyi, 60 ve üzeri yaş ile Eastern Cooperative Group performans durumunun 1'den büyük olması, sistemik non-Hodgkin lenfomalar ile ortak parametrelerdir. PSSSL'a spesifik olanlar ise, serebrospinal sıvıda artmış protein düzeyi ile derin beyinde (periventriküler, bazal ganglia, beyin sapı, serebellum) tümör lokalizasyonudur. Bu risk faktörlerinin varlığı, azalmış sağ kalım ile koreledir. (2)

Geleneksel tedavi seçenekleri, kan-beyin ve kan-BOS bariyeri nedeniyle bu tümörlerde çok etkili değildir (1). Küratif rezeksiyon, bu tümörlerde bir tedavi seçeneği değildir ancak, lezyonun güvenli rezeksiyonunun kitle etkisini azalttığı ve nörolojik defisit oluşturmada ilaca dirençli tümör klonlarını ortadan kaldırdığı belirtilmektedir (2). Güncel standart tedavi seçenekleri yüksek doz metotreksat temelli kemoterapi, radyoterapi ve kök hücre naklini içermektedir (4, 5). Potansiyel nefrotoksitesite nedeniyle metotreksat tedavisinin kontrolü önemlidir. Sağ kalımda artış göstermesi, metotreksat ile kombine prokarbazin ve vinkristin tedavi rejimlerini gündeme getirmiştir. Kan-beyin bariyeri, Rituksimab'ın PSSSL'da intravenöz kullanımını sınırlamaktadır. Ancak yapılan çalışmalar, intraventriküler Rituksimab'ın etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Nörotoksitesite, radyoterapinin sık görülen bir yan etkisidir; geç dönemde inkontinans, yürüyüş ve hafıza bozuklukları şeklinde prezente olur (2).

Genomik alanda yaşanan gelişmeler, bu tümörlerin de moleküler düzeyde incelenerek potansiyel hedeflenmiş tedavi seçeneklerinin gündeme gelmesini sağlamıştır (Şekil 2.1).

PSSSL'da Terapötik Ajanlar ve Hedefleri



Şekil 2.1. Hedefe yönelik ajanlar

2.1.2. Etyopatogenez

PSSSL, uzun yıllar boyunca gizemini koruyan bir antite olmuştur. İlk olarak Bailey, bu hastalık için “peritelyal sarkoma” ismini kullanırken; “adventisyal sarkoma”, “retikulum hücreli sarkoma”yı da içeren çeşitli isimlendirmeler verilmiştir. Bu tanımlar, tümör hücrelerinin özgün anjiotropizmi nedeniyle sarkom benzeri bir görüntü oluşturmaları ile ortaya çıkmıştır (6).

Modern morfolojik, immünolojik ve genetik gelişmeler ışığında, artık bu tümörler Dünya Sağlık Örgütü tarafından ayrı bir antite olarak sınıflandırılmaktadır (2016 DSÖ sınıflaması). Sistemik DBBHL ile benzerlikler taşısa da, klasik lenfatik drenajdan yoksun santral sinir sistemi içerisinde gelişip, immün ayrıcalıklı bu bölgede sınırlı kalması; PSSSL’lerinin gelişim mekanizmaları ile ilgili merakı ortaya çıkarmıştır.

Tümör hücrelerinin orijini, malignite gelişimine yol açan ve proliferasyonu sürdüren değişiklikler ile bu tümörlerin neden yalnızca santral sinir sisteminde sınırlı kaldığı, yanıt aranan ve patogeneze ışık tutacak sorular olmuştur. Bunlardan

sonuncusu halen kesin yanıtı ulaşamamıştır. PSSSL'lerinin özgün moleküler, biyolojik ve immün özelliklerinin tanımlanması, son yıllarda insidanstaki artış nedeni ile de klinik ve terapötik açıdan anlam kazanmıştır.

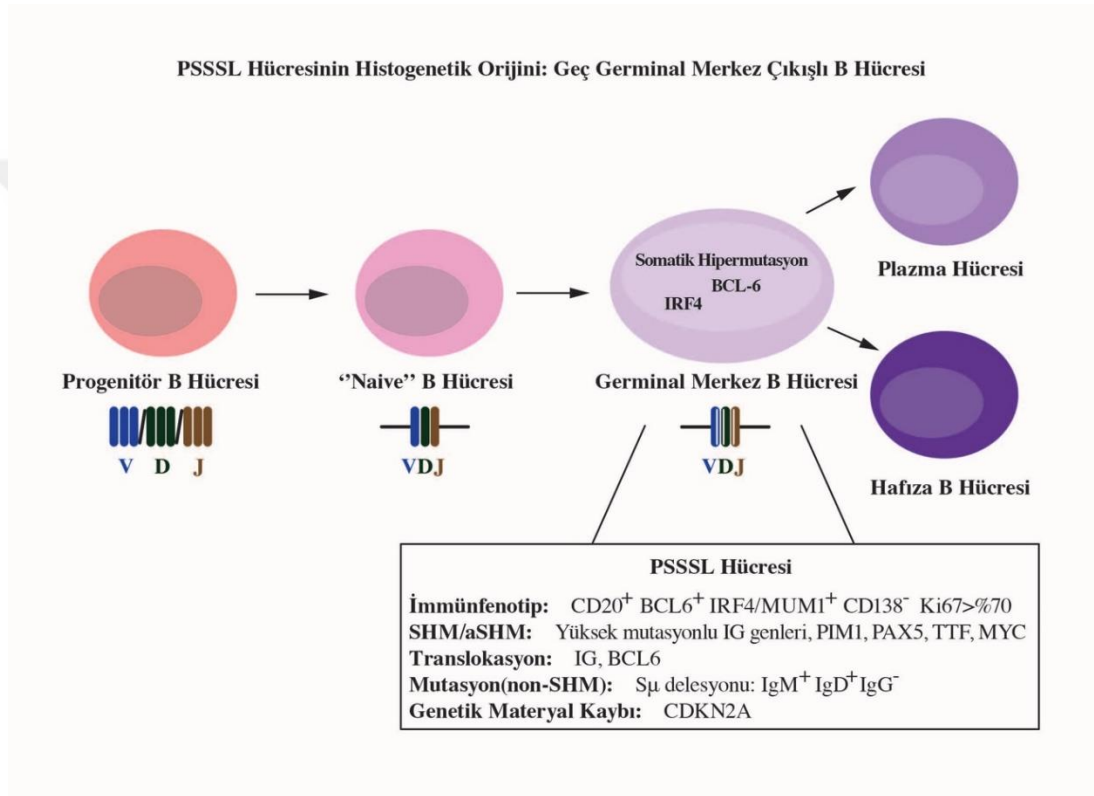
2.1.2.1. B Hücre Farklılaşması

B hücre farklılaşması, kemik iliğinde başlayıp, antijenlerin özgün spesifite ve yüksek afinite ile tanınmasıyla sonlanır. Kök hücrelerde antijen reseptör kodlayan genler germline dizilimindeyken, immünglobulin (Ig) genlerinin hafif ve ağır zincirlerinin V, D, J segmentleri düzenlenerek kemik iliğini terk etmeye hazır *naive* B hücreleri oluşur. Sekonder lenfoid organların (dalak ve lenf nodu) germinal merkezlerinde antijen maruziyeti, matürasyon basamaklarını ilerletir ve bu sayede B hücre reseptörünün (BCR) antijen afinitesi artar. Bu süreç, moleküler düzeyde B hücre reseptörünün hafif ve ağır zincirlerinde V bölgesinin ilk 1.5-2 kb'lık kısmında meydana gelen somatik mutasyonlarla oluşur. Bu somatik hipermutasyon (SHM) için gerekenler, spesifik antijen, antijen prezente eden hücreler, T hücre yardımı, aktivasyon indüklü deaminaz (AID) enzimi ve BCL6'dır. BCL6, germinal merkez reaksiyonunun asıl düzenleyicisi olarak, kompleks bir gen program ifadesini uyarırken, B hücrelerinin germinal merkezden çıkışını uyaran genleri baskılar. V bölgesindeki somatik mutasyonlar, B hücrelerinin antijen afinitesini artırabilir ya da azaltabilir ve sonuçta B hücresi ya germinal merkezden çıkar ya da apoptoza gider (6).

SHM'u takiben, B hücreleri Ig class switch rekombinasyona (CSR) gidebilir. CSR, B hücre reseptörünün sabit μ bölgesini değiştirerek, çok çeşitli antikor sınıflarının oluşmasını sağlar. Sonunda hafıza (memory) hücrelerinin ya da plazma hücrelerinin oluşmasıyla B hücre farklılaşması tamamlanır. Bu farklılaşma sürecinin bütün aşamaları, özellikle de genetik materyalin yüksek hızla değişime uğradığı germinal merkez reaksiyonu, DNA zincir kırıklarına gereksinim duymaktadır. Bu basamaklarda meydana gelecek hatalar, malign hücrelerin oluşumu ile sonuçlanabilir (Şekil 2.2).

PSSSL hücreleri ise, B hücre farklılaşmasının germinal merkez aşamasına ulaşan matür hücrelerdir. Morfolojik olarak sentroblastlara benzerler ve rearanje Ig gen segmentleri bulundurlar (6). PSSSL hücreleri %60-80 oranında BCL6 ifadesi

gösterirler. Tümör hücrelerinde, germinal merkez hücrelerinin bir kısmında ve plazma hücrelerinde gözlenen IRF4 ifadesi, bu hücrelerin germinal merkezi terk etmeye hazırlandığının göstergesidir. Bu hipotez, tümör hücrelerinde daha çok hafıza B hücrelerinde bulunan genlerin ifadesinin gösterilmesiyle desteklenmektedir (6). Ancak matürasyonun bu aşamada bozulduğu anlaşılmaktadır; CD38 ve CD138 gibi plazma hücre belirteçleri hiçbir zaman tümör hücrelerinde ifade edilmezler.



Şekil 2.2. B hücre farklılaşması

2.1.2.2. SSS'nin Mikroanatomisi

SSS, immün ayrıcalıklı bölge (immune privilege) olarak tanımlanmasına yol açan özel bir mikroanatomiyeye sahiptir. İmmün ayrıcalık kavramı, deneysel olarak tanımlanmış bir fenomen olup, SSS'e yerleştirilen greftlerin, çok daha uzun süre canlı kaldığının gözlenmesi ile ortaya çıkmıştır. Diğer bölgelere kıyasla, SSS parankimi içerisinde yıkıcı bir T lenfosit yanıtı oluşturmanın çok daha zor olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, ventriküller, meninksler ve subaraknoid boşluklar, periferik

immün yanıtla benzer yanıtların elde edilebilmesi nedeniyle immün ayrıcalıklı bölge dışında değerlendirilmektedir (7).

SSS'nin bu özel immünolojik durumu, lenfatikten yoksun oluşu, kan-beyin bariyeri ile immün sistemden izole olması, mikrogial hücrelerin immünkompetan olmayışı gibi sebeplere bağlanmaktaydı. Ancak yapılan yeni çalışmalarla bu bakış açısı tümüyle değişti. SSS'nin, immün sistemden izole olmadığı, aksine immün sistemi aktif şekilde düzenlediği anlaşıldı. Periferik immün sistem hücrelerinin intakt kan-beyin bariyerini geçebildiği gösterildi. Nöronlar ve glial hücrelerin makrofaj ve lenfosit yanıtlarını aktif olarak düzenlediği; mikrogial hücrelerin, diğer dendritik hücrelerden farklı yollar kullansa da immünkompetan özelliğe sahip olduğu anlaşıldı (7, 8).

SSS'de immün hücrelerin geçişini sınırlayan fiziksel bariyerler mevcuttur. Bunlar, yüzeyde dura-araknoid-pia mater, parankim içerisinde kan-beyin bariyeri, serebrospinal boşluklarda ise kan-serebrospinal sıvı bariyeridir. İmmün hücrelerin ekstrasvazasyonu, postkapiller venüller düzeyinde gerçekleşir. Kan-serebrospinal sıvı bariyerini koroid pleksus epitel hücreleri oluşturmaktadır. İmmün yanıtın afferent kolunda, antijenlerin perifere çıkışı gerekmektedir. Bu çıkış, serebrospinal sıvının subaraknoid boşlukta araknoid villuslar sayesinde venöz sinüslere direne olması ve spinal sinir kökleri boyunca ilerleyerek lumbal lenf nodlarına direne olması ile sağlanır. Bir diğer yolak, perivasküler boşlukta biriken interstisyel sıvının, kribriform plate'den geçerek servikal lenf nodlarına direne olması ile gerçekleşir (8).

Antijenler perifere ulaştıktan sonra aktive olan T hücrelerinin SSS'ne girişi ise bazı noktalarda tanımlanmıştır. Subpial venüllerden çıkış sağlayan T hücreleri, subaraknoid ya da subpial boşluğa geçerler. Ancak glia limitansı aşarak parankime girebilmeleri için makrofajlar üzerindeki antijenleri tanımaları gerektiği gösterilmiştir. Parankim içerisindeki geçiş ise postkapiller venül düzeyinde perivasküler boşlukta biriken T hücreleri ile gerçekleşir. Burada da T hücrelerinin, perivasküler boşluktaki antijen sunan hücreler ile etkileşime girmeleri, glia limitansı aşmaları için şarttır. Koroid pleksus stromasının çok sayıda immün hücre içerdiği bilinmektedir, ancak bunların hangi mekanizmalar ile ekstrasvaze olduğu henüz anlaşılamamıştır (8).

SSS'de immün sistemin afferent ve efferent yolları sıklıkla, rodent modellerinde ve otoimmün/nöroinflamatuvar hastalıklar temel alınarak araştırılmıştır. Bu nedenle yapılan çalışmalar daha çok T lenfositleri ele alırken B lenfositlerin SSS'e girişi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Fizyolojik koşullarda, SSS'de çok az sayıda B lenfositin bulunduğunu bilmekteyiz. Tanımlanabilmiş ve tümör migrasyonunda etkili olabilecek moleküllerden biri $\alpha 4\beta 1$ - integrin'dir (9). PSSSL ile DBBHL'yı gen ifade profilleri açısından karşılaştıran bir çalışmada ise Osteopontin'in (OPN), DBBHL'ya kıyasla en fazla upregüle edilen gen olduğu gösterilmiştir. OPN, ekstrasellüler matriks adhezyonu ve yeniden yapılanması, sitokin aktivitesi, immün regülasyon, stres yanıtı, hücre migrasyonu, angiogenez, proliferasyon gibi çeşitli mekanizmalarda rol alan, B lenfositlerce salınan bir kemokindir. PSSSL'de tümör hücrelerinin proliferasyonunu, tümör büyümesini, beyin invazyonunu uyardığı ve bu etkilerini, NF- κ B yolak aktivasyonu ile gerçekleştirdiği gösterilmiştir (10).

2.1.2.3. PSSSL Gelişiminde Moleküler Değişiklikler

Germinal merkez reaksiyonu, genetik materyal alışverişinde DNA kırıklarına ihtiyaç duyması nedeniyle potansiyel tehlikeli bir süreçtir. Fizyolojik B hücre farklılaşmasında, germinal merkez reaksiyonu genomik instabiliteden korunmak amacıyla sıkı şekilde kontrol edilir.

PSSSL'da, Ig ve BCL6 genlerini etkileyen translokasyonlar sıklıkla görülür. Vakaların 1/3-1/4'ünde BCL6 kırıkları saptanır (6). BCL6 gen promotor bölgesinin değişimi, onkojenik özelliklere sahip, düzensiz BCL6 aktivitesine yol açar. BCL6 ve IRF4'ün resiprokal negatif geri beslemesi, fizyolojik koşullarda germinal merkez reaksiyonunu sonlandırırken, bu aşama PSSSL'da kaybolur ve terminal B hücre farklılaşmasına giden yol kapanmış olur. Normal geç germinal merkez B hücrelerinin bir kısmında ifade edilen bir transkripsiyon faktörü olan IRF4, yine plazma hücre farklılaşmasını uyaran PRDM1'i aktive eder. PSSSL'larının %19'unda PRDM1 aktivitesi hem delesyonel mutasyonlarla hem de upregüle miR-9 ve miR-30b/c'nin epigenetik sessizleştirilmesi ile kaybolur (6, 11).

Germinal merkez reaksiyonunun ana düzenleyicisi, B hücre aktivasyonunun, farklılaşmasının, hücre siklus duraklamasının ve apoptozun belirleyicisi BCL6'nın aralıksız aktivitesi, PSSSL hücrelerini germinal merkez aşamasında tutar.

PSSSL'da somatik hipermutasyon sadece Ig ve BCL6 ile sınırlı kalmayıp, tümörögenizde etkili başka genleri de ilgilendirir. Aberran SHM süreci, onkogenleri aktive edebilir ya da tümör supresör genleri sessizleştirir. Etkilenen genler arasında PAX5 (%60), TTF (%70), CMYC (%60) ve PIM1 (%50) sayılabilir (12, 13).

Translokasyonların yanı sıra, genetik materyalde kazanım ve kayıplar da sık izlenmektedir. Genel olarak kazanımlar, kayıplardan daha sıktır ve 18q21.33-q23 (%43), kromozom 12 (%26) ile 10q23.21 (%21) bölgelerini içerir. Kayıplar ise 6q21 (%52), 6p21 (%37), 8q12.1-q12.2 (%32) ve 10q23.21 (%21) bölgelerinde izlenir (14). Programmed death-ligand 1 (PD-L1) ve programmed death-ligand 2'yi (PD-L2) kodlayan genleri bulunduran 9p24 kromozom bölgesinde kopya sayısı değişiklikleri ve translokasyonlar da bu tümörlerde sık saptanmıştır (3).

PSSSL patogeneğinde epigenetik değişikliklerin de rolü bulunmaktadır. DNA metilasyonu ile epigenetik sessizleşme bunlardan biridir ve DAPK (%84), CDKN2A (%75), MGMT (%52) ve RFC (%30) gibi genler hipermetilasyonun hedefi olarak aynı zamanda potansiyel tedavi seçenekleri de sunmaktadırlar (6). MGMT promotor dizilerinde hipermetilasyon bulunduran olguların, yüksek doz kemoterapi ile daha iyi sağ kalım gösterdikleri izlenmiştir (3). Ancak, PSSSL'da belirlenen metilasyon profili, DBBHL ile büyük bir farklılık göstermemektedir (15).

PSSSL'da miRNA ifadesi ile ilişkili bilgiler henüz sınırlıdır. Bir çalışmada terminal B hücre farklılaşması ilişkili miR-9 ve miR-30b/c'nin upregülasyonu gösterilmiş, bir diğerinde proapoptotik E2F1 genini hedef alan miR-17-5p'nin nodal DBBHL'ya kıyasla yüksek ifadesi gözlenmiş, bir başka çalışmada ise inflamatuvar SSS hastalıkları ile karşılaştırıldığında neoplastik olgularda serebrospinal sıvıda miR-21, miR-19 ve miR-92'nin yüksek ifadesi tespit edilmiştir (16-18).

Nükleer faktör- κ B (NF- κ B) yolağı, tümör gelişimi, çoğalması, farklılaşması, invazyon ve metastazında önemli bir mekanizma olarak tanımlanmıştır (4). NF- κ B yolağının aktivasyonu ve bu yolaktaki genlerin (BAX, BCLXL, BCL2, MALT1,

CARD9, CARD10, CARD11, CARD14, CCND2, CFLIP, RELA, RELB, NFKB1, NFKB2, IRF4) belirgin ifadesi PSSSL'da gösterilmiştir (4, 19, 20). NF-κB yolağının düzenleyicilerinden olan toll-like reseptör (TLR), B hücre reseptör sinyal yolağı (BCR) ve BCR yolağının hedefi olan BCM kompleksi de mutasyonlardan etkilenmektedir (Şekil 2.3).

B hücre reseptör (BCR) kompleksi, Ig ağır ve hafif zincirleri ile CD79A ve CD79B alt ünitelerinden oluşmaktadır ve ifadesi, B hücre sağkalımı için elzemdir. BCR sinyalizasyonu, B hücre farklılaşmasını, proliferasyonunu ve apoptozunu uyarır. PSSSL'da BCR sinyal kaskadının bazı kritik genlerinde %44 oranında somatik mutasyon saptanmıştır (21). Bu mutasyonlardan bazıları tümör supresor SHIP (%25), BLNK (%4), CBL (%4) ile CD79B (%20) genlerini etkilemektedir (21).

BCR'den sinyaller, BCL10, MALT1 ve CARD11'den oluşan BCM kompleksine iletilir. PSSSL'da hem BCL10 hem de MALT1 ifadeleri gözlenirken bu, amplifikasyonu yansıtır olabilir. PSSSL'da %16 oranında CARD11 aktive edici mutasyonları da saptanmıştır (22, 23). Hem BCR'de hem de BCR'nin hedefindeki moleküllerde meydana gelen bu mutasyonlar NF-κB aktivasyonunu daha da artırır.

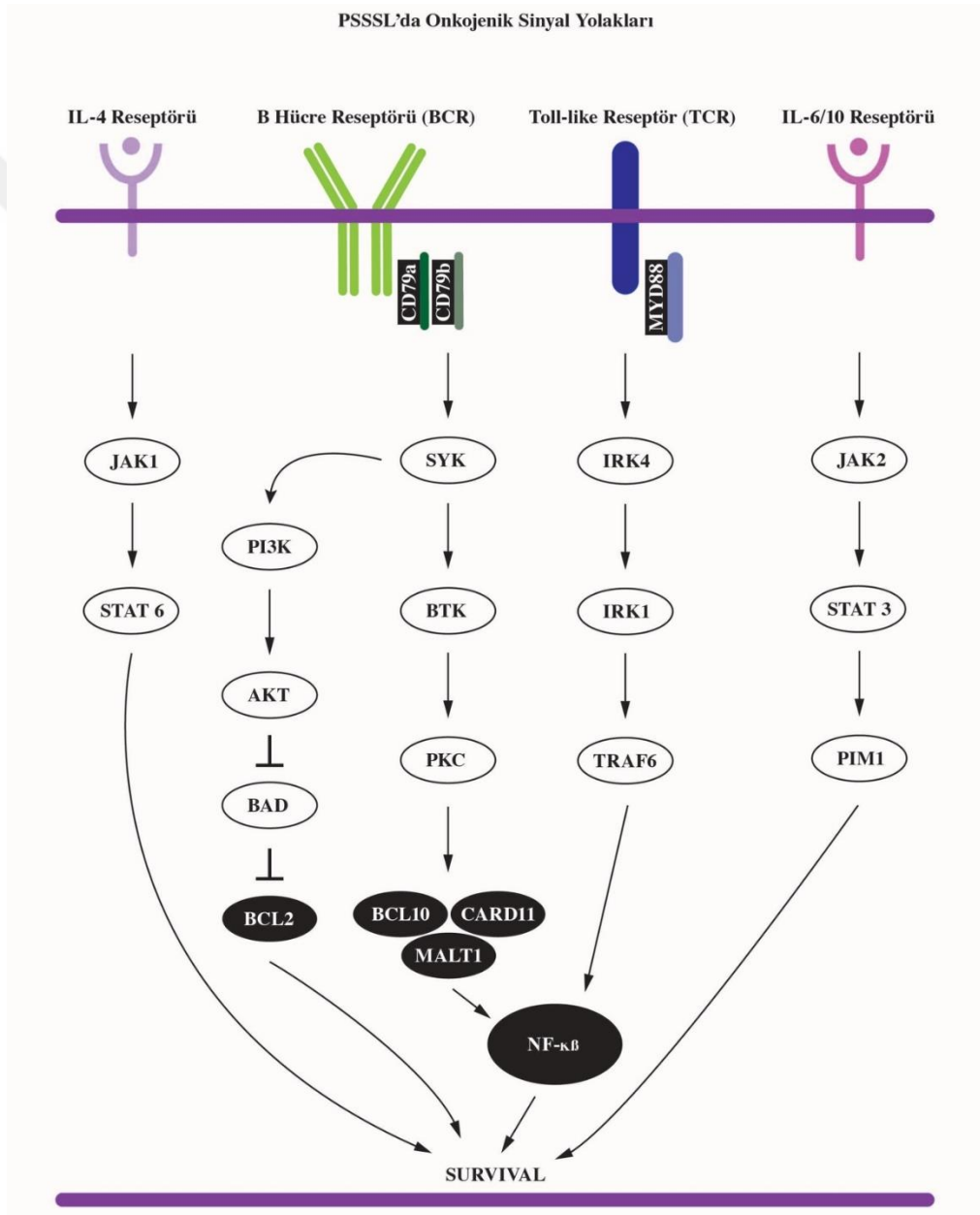
Toll-like reseptör'ü (TLR) uyararak NF-κB yolağı aktivasyonunu sağlayan MYD88 geninde, PSSSL'da %50-80 oranında mutasyon varlığı saptanmıştır (24-26). Vakaların %36'sında 265. Pozisyondaki lösinin prolin ile değişimi saptanmıştır (L265P) ve bu mutasyon onkogenik olarak aktive edicidir. L265P mutasyonunu taşıyan vakaların %40'ında eş zamanlı CARD11 mutasyonu izlenmiştir (25).

NF-κB kompleksini etkileyebilecek pek çok farklı molekül tek başına ya da sinerjik olarak bu hastalıkta mutasyona uğramaktadır. PSSSL'daki yüksek NF-κB aktivasyonu, IRF4 translokasyonu bulundurmeyen olgularda bile izlenen IRF4 ifadesini açıklayabilir; çünkü IRF4, NF-κB'nin hedef genlerinden biridir.

JAK/STAT sinyal yolağının da PSSSL patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir. JAK/STAT intrasellüler sinyal yolağı ile B hücre proliferasyonunun düzenleyicileri olan IL-4 ve IL-10'un hem transkript hem de

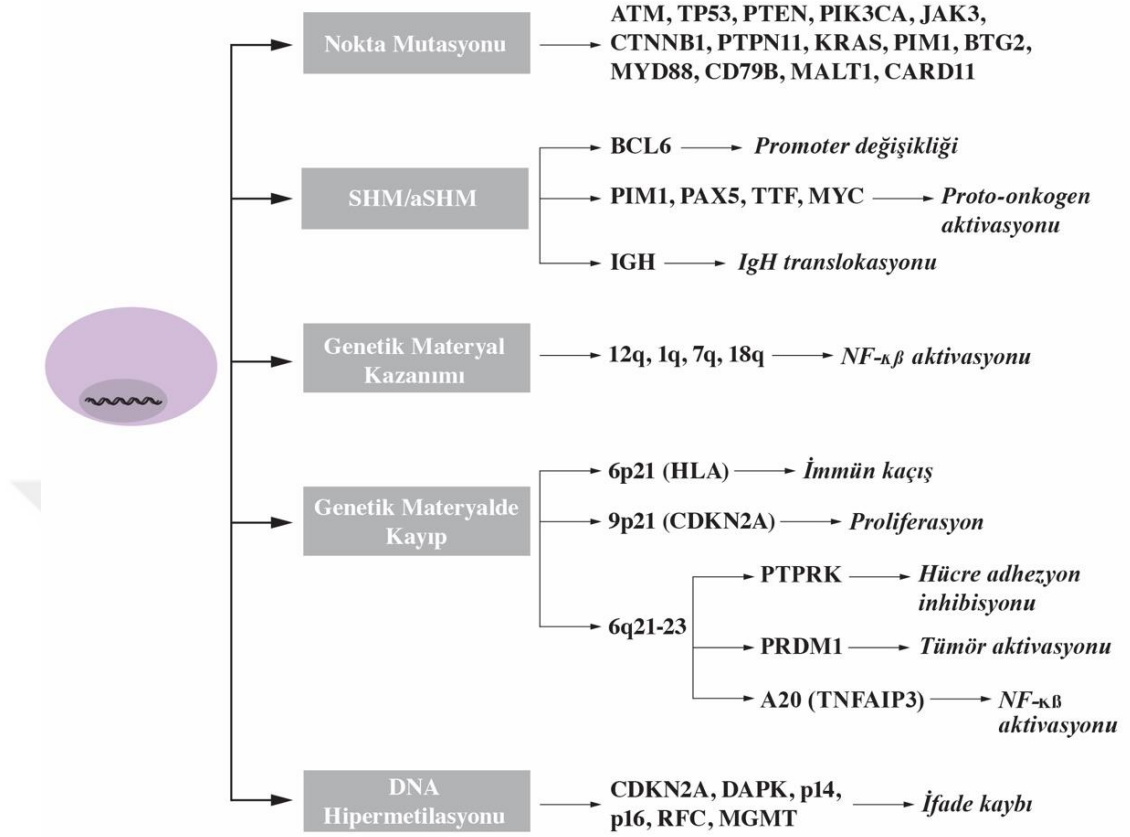
protein düzeyleri, tümör mikroçevresinde upregüledir. IL-4, IL-10 ve JAK/STAT sinyal yolağının aktivasyonu, MYD88'in de aberran aktivasyonu ile koreledir (3).

Sonuç olarak bu çok çeşitli genetik değişiklikler, %70-90'lara varan yüksek Ki67 indeksine sahip, proliferatif, non-apoptotik bir B hücre fenotipini uyarır ve devamlılığını sağlarken, bu tümörlerin kötü prognozunu kısmen açıklayabilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.3. B hücre sinyal yolakları

PSSSL'da Moleküler Patogenez



Şekil 2.4. Moleküler patogenez

2.1.2.4. Mikroçevre ve Rolü

Malign B hücreleri, santral sinir sistemi hücreleri ve immün hücreler arasındaki etkileşim, hastalık patogenezini aydınlatmaya adaydır. Günümüzde bu kompleks etkileşim, özellikle de immün ayrıcalıklı bir bölge olan beyinde gerçekleşmesi nedeniyle, halen net yanıtlara kavuşamamıştır.

B hücrelerinin SSS'e benign mi yoksa malign formda mı geldiği sorusu tartışılmaya devam etmektedir. İmmün bir reaksiyon sonucu SSS'e gelen ve burada uzun süre kalan B hücreleri, malign transformasyona uğruyor olabilirler. Öte yandan, B hücrelerinin periferde malign dönüşüme uğrayıp daha sonra SSS'e gelmesi de ihtimal dahilindedir. Şimdiye kadar, bir B hücresinin selektif olarak SSS'e yerleşmesini sağlayacak ne bir hücre adhezyon molekülü ne de kemokin tespit edilememiştir.

PSSSL hücreleri, nodal DBBHL ile aynı hücre adhezyon moleküllerini bulundurlar ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1-1$, ICAM-1) (6). Beyin dokusuna kompakt hücre toplulukları yerine daha gevşek paternde invazyon gösteren tümör hücrelerinde düşük $\alpha L\beta 2$ integrin ifadesi gözlenmiş, bu molekülün beyin parankim invazyonu ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (9). CD44, astrositler, mikrogliyal hücreler, serebral endotelyal hücreler ile T hücrelerinde ifade edilmektedir ve Osteopontin ifade eden tümör hücreleri ile etkileşimi lenfoma hücrelerinin migrasyonunu ve beyin invazyonunu artırıyor olabilir (10).

Fizyolojik koşullarda, SSS immünolojik olarak down-regüledir ve inflamatuvar ya da tümöral süreç varlığında nöroimmün sistem aktive olur. PSSSL'da da CD4 ve CD8 pozitif lenfositler, reaktif B hücreleri, makrofajlar ortama gelerek malign lenfoma hücreleri ile etkileşirler. Astrositler, serebral endotelyal hücreler ve mikrogliyal hücreler de aktive olarak tümöral hücrelere yanıt gösterirler. Tümöral hücreler CXCR4, CXCR5 ve CXCL12 ifadesi gösterirken, astrositlerle mikrogliyal hücreler CXCL12, CXCR5, CCR6; endotel CXCL12, CXCL13; T hücreleri CCR5 ve CCR6 ifadesi gösterirler (27).

Beyin dokusunu diffüz olarak infiltre etmelerinin yanı sıra, CD8 pozitif T lenfositler perivasküler alanlarda yoğunlaşırlar ve bu durum, perivasküler makrofajlarla perisitlerin CXCL9 ifadeleriyle korele bulunmuştur (28). CXCL9'un CXCL12'ye bağlanması CXCR4+ CXCR3+ CD8 pozitif T lenfositlerin ve CXCR4+ tümöral hücrelerin migrasyonunu sağlar (27). Kemokinlerin bu ifade paterni, tümör hücrelerinin anjiotropizmine katkı sağlayabilir. Serebral endotelyal hücrelerin IL-4 ifadesinin de anjiotropizme katkı sağladığı öne sürülmüştür (29).

SSS'nin nörovasküler ünitesi 3 bileşenden oluşur: vasküler duvar, perivasküler Virchow-Robin boşluğu ve jukstavasküler parankim (nöropil). Şimdiye kadar SSS'de lenfositlerin gelişi ve dağılımı ile ilgili bilgiler otoimmün ve enfeksiyöz hastalıklarda T lenfositlerle çalışılmış; malign B hücrelerle fonksiyonel çalışmalar yapılmamıştır. Makrofajlar perivasküler boşlukta bulunurlar ve lenfositler burada antijen sunan hücrelerle etkileşirler. Serebral endotelin bazal membranını geçtikten sonra, perivasküler boşluğa geçen lenfositler makrofajlar ile etkileşime geçerler. SSS inflamasyonunda, T lenfositler spesifik bir antijen arayışındadırlar.

SSS'de parankim invazyonu için antijen tanınması gereklidir. Antijen yokluğunda, T lenfositler perivasküler boşlukta kalmaya devam ederler. Malign B hücreleri için de benzer bir hipotez ortaya atılacak olursa, antijen spesifik etkileşimlerin yokluğu nedeniyle tümör hücrelerinin perivasküler boşlukta birikimi ve yoğunlaşması açıklanabilir (6, 30). Öte yandan, perivasküler antijen sunan hücrelerin, PSSSL hücreleri için uygun bir mikroçevre yaratarak aktivasyonlarını ve proliferasyonlarını sağlıyor olabileceği de bir ihtimaldir.

Tümör hücrelerinin santral sinir sisteminde sınırlı kalmalarının spesifik bazı antijenler nedeni ile olabileceği tezini araştıran bir çalışmada, 23 PSSSL olgusuna ait B-hücre reseptörünün (BCR) IgH ve IgK/L bölgelerinin çeşitli kısımları ile aynı sekanslara sahip in-vitro rekombinant antikorlar klonlanmıştır. Rekombinant antikorların 1547 proteini tanıdığı, sıklıkla da SSS'de nöronlarda fizyolojik olarak ifade edilen proteinleri tanıdıkları tespit edilmiştir. Ayrıca, tümör dokusunda mikrogial hücreler, astrositler, serebral endotelyal hücreler tarafından ifade artışı gösteren galektin-3 molekülü de rekombinant antikorlar tarafından tanınmıştır. Bu çalışma sonucunda, SSS proteinlerinin, tümör hücrelerindeki B hücre reseptörlerini uyuracak potansiyel antijenler taşıyor olabileceği, bu sayede tümör hücrelerinin SSS'de sağ kalım ve proliferasyonunu kolaylaştırıyor olabileceği tezi öne sürülmüştür (31).

PSSSL olgularının %73'ünde, HLA-DRB, HLA-DQA ve HLA-DQB genlerini kodlayan MHC sınıf II'yi bulunduran 6p21.32 kromozom bölgesinin heterozigot hatta homozigot kayıpları ile parsiyel uniparental dizomileri saptanmıştır (14). Olguların %55'inde HLA-A kaybı görülürken, %46'sında HLA sınıf II ifade kaybı tespit edilmiştir. PSSSL'na benzer şekilde, yine immün ayrıcalıklı bir bölgede gelişen testis lenfomalarında da HLA sınıf I ve II ifade kaybı görülmektedir. Testis lenfomalarında düşük HLA-DR mikroRNA düzeylerinin tümör içerisinde daha düşük CD3 pozitif T lenfositlerle korele olduğu saptanmıştır (32). MHC sınıf II negatif DBBHL'nın kötü prognoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu durum PSSSL için de geçerli olabilir. Yapılan bir çalışmada, reaktif perivasküler infiltrasyona sahip hastaların, belirgin olarak daha iyi sağkalım gösterdiği gözlenmiştir (28). Bu veriler, MHC molekülünün kaybı sayesinde tümör hücrelerinin immün yanıtı kaçarak sağkalım avantajı sağladığını desteklemektedir.

2.1.3. Histopatoloji

Otopsi incelemelerinde tümörün makroskopik olarak normal yapıları ortadan kaldıran ya da iten, düzensiz sınırlı tek ya da multipl kitle özelliğinde olduğu gözlenmiştir. Tümör genellikle supratentoryal yerleşimlidir; en sık serebral hemisferlerde (frontal, parietal, temporal), derin lokalizasyonlu, ventriküler boşluklara komşu olarak saptanır. Tümör içerisinde sıklıkla nekroz ya da hemoraji alanları izlenir. Bazı hastalarda, menenjit akla getirir şekilde diffüz menenjial tutulum saptanabilir (33).

Karakteristik mikroskopik görüntü, perivasküler büyüme paterninde, oldukça sellüler, atipik hücrelerin diffüz proliferasyonudur. Geniş jeografik nekroz alanları saptanır. Perivasküler infiltrasyon paterni özellikle periferde sıktır. Küçük hücre toplulukları ile iyi sınırlı şekilde ya da tek tek hücreler şeklinde diffüz olarak beyin parankimine invazyon gösteren neoplastik hücrelere karşı, astrositik ve mikrogliyal aktivasyon, matür T ve B hücreleri ile histiyositlerden oluşan reaktif inflamatuvar bir yanıt gelişir. Sitolojik olarak, neoplastik hücreler orta-büyük boyutlu, oval, düzensiz ya da pleomorfik nükleuslu, belirgin nükleol bulunduran, immunoblast ya da sentroblast görünümünde atipik hücreler özelliğindedir. Biyopsi öncesinde steroid tedavisi uygulanmış ise, tümöral hücreleri hızlı şekilde apoptoza giderek tanıyı oldukça güçleştirebilir (33).

Vakaların %80'den fazlası diffüz büyük B hücreli lenfoma tanısı alırken, T hücreli lenfoma, Burkitt lenfoma ve düşük dereceli lenfomalar da seyrek olarak görülebilir (34).

2.1.4. İmmünofenotip

Tümör hücreleri PAX5, CD19, CD20, CD22 ve CD79a ifadesi gösteren matür B hücrelerdir. Yüzey IgM ve IgD ifadesi bulunurken, IgG negatiftir. Olguların büyük kısmı BCL6 (%60-80) ve MUM1/IRF4 (%90) pozitifdir. Plazma hücre belirteçleri olan CD38 ve CD138 ise negatiftir. CD10, vakaların %10'undan azında ifade edilir. DBBHL'da CD10 pozitifliği çok daha sık beklendiği için, bir santral sinir sistemi lenfomasında CD10 pozitifliği izlendiğinde, sistemik bir lenfoma tutulum olasılığı araştırılmalıdır.

Olguların %50'si MHC sınıf I ve/veya sınıf II ifadesini kaybetmiştir. BCL2 ifadesi yaygındır ancak t(14;18)(q32;q21) ilişkili değildir. Olguların %82'si BCL2 ve MYC yüksek ifadesi gösterirler. Mitotik aktivite dikkat çekicidir; Ki67 proliferasyon indeksi genellikle %70'in üzerindedir. İmmünkompetan hastalarda EBV varlığına yönelik EBV-LMP1 ya da EBER pozitifliği beklenmez ve pozitif durumlarda olası bir immün yetmezlik zemini sorgulanmalıdır. (33)

Bu immünohistotipik özelliklerle, vakaların çoğu DBBHL için tanımlanan Hans algoritması ile sınıflamaya göre, germinal merkez dışı fenotipe sahip olarak değerlendirilebilir. Ancak SSS'de bu sınıflamanın geçerli olup olmadığı tartışmalıdır.

Bu tartışmalı konuyu ele alan, 32 PSSSL hastası ile yapılan bir çalışmada, CD10, BCL6 ve MUM1 belirteçleri ile vakalar immünohistokimyasal olarak sınıflandırılmaya çalışılmıştır. Buna göre A (CD10+, BCL6+, MUM1+), B (CD10-, BCL6+, MUM1+) ve C (CD10-, BCL6-, MUM1+) grupları oluşturulmuştur (%37,5, %37,5, %25). Buna göre C grubundaki hastalar, A ve B grubuna kıyasla belirgin daha uzun genel sağ kalım göstermişlerdir. Tedavi yanıtının A grubunda anlamlı şekilde daha düşük olduğu da saptanmıştır. Sağ kalım analizi, Hans algoritması ile yapıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır; bu da Hans algoritmasının PSSSL olgularını sınıflamada yetersiz kaldığı hipotezini desteklemektedir (35).

2.1.5. Genetik Profil

Tümör hücreleri, geç germinal merkez kökenli B hücrelerinden geliştikleri için, rearanje ve somatik mutasyona uğramış IG genlerini taşırlar. Tümör hücrelerinin sabit IgM/IgD fenotipi, S-mu bölgesinin delesyona uğradığı IG class-switch rearanjmanları sırasında meydana gelen hataların sonucudur.

BCL6 (%17-47) ve IG (%38) translokasyonları sık saptanırken, MYC translokasyonları nadirdir; BCL2 translokasyonları ise görülmez. Genetik materyalde kazanımların en çok BCL2 ve MALT1 genlerini içeren 18q21.33-23 (%43) bölgesinde olduğu saptanmıştır. Kayıplar ise 6q21 (%52), 6p21 (%37), 8q12.1-12.2 (%32) bölgelerinde tespit edilmiştir (33). 6p21 bölgesi, HLA-DRB, HLA-DQA ve HLA-DQB genlerini kodlayan MHC sınıf II'yi içermesi açısından dikkat çekicidir.

Vakaların yarısından çoğunda MYD88 L265P mutasyonu bulunmaktadır. B hücre reseptör yolağı, toll-like reseptör yolağı ve NF-kappaB yolağı, CD79B (%20), SHIP (%25), CBL (%4), BLNK (%4), CARD11 (%16), MALT1 (%43) ve BCL2 (%43) genlerindeki mutasyonlarla da aktive olabilir (33).

Hipermetilasyon, DAPK1 (%84), CDKN2A (%75), MGMT (%52) ve RFC (%30) gen bölgelerini etkilemekte ve bu değişiklikler potansiyel tedavi seçeneklerini gündeme getirmektedir (33).

2.2. İMMÜN KONTROL NOKTALARI VE İMMÜNOTERAPİ

İmmün sistem yalnızca enfeksiyöz ajanlara karşı koruma sağlamaz; aynı zamanda non-self ya da neo-antijen taşıyan otolog hücreleri tanır ve bunları ortadan kaldırır. Kanser gelişimi ve ilerlemesinde immün sistemin anahtar rol oynadığı ve kanser hücrelerinin tümör mikroçevresi eşliğinde bu sistemi alt edecek stratejiler geliştirebildiği bilinmektedir. Tümör biyolojisinde bu konseptin tanınması, “immün kaçış” (immune evasion) ve “tümör destekleyici inflamasyon” (tumor promoting inflammation) kavramlarını gündeme getirmiştir.

Şimdiye dek, lenfomalarda mikroçevre ilişkili çalışmalar daha çok klasik Hodgkin lenfoma, primer mediastinal B hücreli lenfoma, MALToma ve foliküler lenfoma antitelerinde sınırlı kalmıştır. Tümör mikroçevresi, immün hücrelerin kompozisyonu ve tümör içerisindeki dağılımları; malign hücre popülasyonundaki genetik değişikliklerin, sitokin ve kemokinler arasındaki ilişkinin ve host-spesifik faktörlerin sonucu olarak ortaya çıkar.

2.2.1. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi, kanser hücrelerinin yanı sıra, kemik iliği kaynaklı inflamatuvar hücreler, lenfositler, vasküler yapılar, fibroblastlar ve ekstrasellüler matriksten oluşan bir ortamdır. Stromal mikroçevrenin önemi, neredeyse bir yüzyıldır bilinmektedir ancak kanser hücrelerine karşı gelişen immün yanıtta azalma üzerindeki rolünün fark edilmesi, adaptif hücresel immünitinin keşfi ile gerçekleşmiştir. 1960 yılında Klein ve arkadaşlarının çalışmasında, primer

metilkolantren ilişkili sarkom geliştirilen fare modelinde, anti-tümöral bir immün yanıt da oluşturulmuştur. Ancak bu anti-kanser immün yanıtın, sekonder bir tümör gelişimini önlese de, primer tümör ilerlemesini durduramadığı fark edilmiştir. Yani primer tümör, immün korunaklı bir mikroçevre yaratarak, immün sistemden kaçmayı başarmıştır (36).

Daha sonra yürütülen bir çalışmada, bir melanom hastasına ait klonlanan CD8 pozitif T hücrelerinin, MAGE-A1 isimli tümör antijenini tanımları sağlanmıştır. Ancak, hastada melanom spesifik T hücrelerinin varlığı yanında melanomun progresyon göstermesi, T hücrelerinin neden kanser büyümesini kontrol edemediği sorusunu gündeme getirmiştir (37).

Melanom spesifik T hücrelerinin keşfi, hastalarda kanser-spesifik hücrelerin sayısını artırmaya yönelik stratejiler geliştirilmesine yol açmıştır. İn vitro çoğaltılan ve transfer edilen çok sayıda T hücresinin kullanıldığı bu yöntem, bir miktar etkinlik sağlamıştır ancak, immünyetmezlikli kemik iliği alıcılarında CMV enfeksiyonunda ya da EBV ilişkili lenfoproliferatif hastalıkta elde edilen başarıyı yakalayamamıştır (37). Viral enfekte dokularla, kanser dokusunun mikroçevresi arasındaki farkların bu sonuçlara neden olduğu düşünülmektedir.

T hücre bağımlı immün yanıt, antijen prezente eden hücreler ve T hücreleri arasındaki, çok sayıda uyarıcı ve inhibe edici sinyal molekülünün rol aldığı kompleks ilişkileri içerir ve aşırı doku hasarı ya da otoimmüniteden kaçınmak için bu mekanizma sıkı şekilde regüle edilmelidir. Kanser hücrelerinin aktif şekilde anti-tümör immünitesi geliştirdiği ve immün hücrelerin disfonksiyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bu ilişkilerin ve mekanizmaların tanınması, klinik ve morfolojik parametrelerle ilişkilendirilmesi, hedeflenmiş potansiyel tedaviler açısından önem taşımaktadır.

2.2.2. T Hücre Dışlanması (T Cell Exclusion)

Efektör T hücrelerinin fonksiyonunu artırmayı amaçlayan, immün düzenleyici membran reseptörlerini hedef alan yeni çalışmalar, melanom, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu, ürotelyal mesane kanseri ve renal hücreli kanser hastalarının bir kısmında etkili olmuştur. Ancak bu umut vaad eden stratejilerle,

mikrosatellit stabil kolon kanseri, over kanseri, prostat kanseri ve pankreatik duktal adenokarsinomada nadiren objektif yanıt alınabilmesi, tümör mikroçevresinde başka immün supresif mekanizmaların varlığını ortaya koymuştur. Yapılan gözlemler ve çalışmalar, tümör mikroçevresinin, T hücrelerin tümör stromasında birikimini önleyerek immün kaçış sağladığını göstermiştir (37).

Myeloid kaynaklı supresör hücrelerin ürettiği reaktif nitrojen, tümör mikroçevresinde CCL2'nin nitrasyonuna yol açarak T hücrelerin stroma içerisinde sıkışıp kalmasına, tümör hücreleri ile temas edememesine neden olur. CCL2 nitrasyonunu inhibe eden ajanların, hayvan modellerinde, tümör infiltre eden lenfositlerin sayısını ve adaptif hücresel tedavinin etkinliğini artırdığı gözlenmiştir (37).

Çeşitli tümör tiplerinde, vasküler komponentte apoptoz indükleyici Fas ligandın (FasL) ifadesi saptanmış; yüksek endotelial FasL'a sahip tümörlerde az miktarda CD8 + T lenfosit izlenirken, regülatuar T lenfositlerin daha fazla bulunduğu gözlenmiştir. Preklinik modellerde FasL inhibisyonu, regülatuar T hücrelere karşı sitotoksik T hücrelerde artış sağlamıştır. VEGF, Prostaglandin E2 ve IL-10'un FasL ifadesini indüklediği gösterilmiştir.

Anti-anjiyogenik tedavi stratejisi olarak kullanılan VEGF ve VEGFR inhibisyonunun da vasküler normalizasyon sağlayarak, tümör infiltre eden lenfosit sayısını, adaptif hücresel tedavinin ve kanser aşılarının etkinliğini artırdığı gösterilmiştir.

Kanser spesifik T hücrelerin ekstrasvazasyonunun yanında, bu hücrelerin tümör mikroçevresinde replike olarak sayılarını artırmaları gerekmektedir. Tümör mikroçevresinde T hücrelerin klonal çoğalmasının CD103 pozitif dendritik hücrelerle düzenlendiği bilinmektedir. CD103 pozitif dendritik hücrelerin sayısını artırmaya yönelik terapötik stratejilerde, IL-10 reseptör inhibisyonu bulunmaktadır. IL-10, tümör asosiye makrofajlardan salınıp, CD103 + dendritik hücreleri inhibe eden bir kemokindir. Bu inhibisyondan kurtulan dendritik hücreler, IL-12 aracılığı ile T hücre proliferasyonunu uyarmaktadır (37). Dendritik hücrelerin, ortam hipoksisinden de negatif etkilendikleri, hipoksinin dendritik hücrelerde PD-L1 ifadesine neden olduğu bilinmektedir.

Tümör mikroçevresinde dendritik hücreler, myeloid kaynaklı supresör hücreler ve kanser hücrelerinin ifade edebildiği IDO (Indole 2,3-deoksijenaz), triptofanı katabolize eder ve bundan kinurenin üretir. Hem triptofanın tükenmesi hem de açığa çıkan metabolik ürünü, T hücre proliferasyonunu engeller. Ayrıca IDO, naive T hücrelerinin regülatuar T hücrelere dönüşümünü uyarır. IDO inhibisyonunun, B16 melanom modelinde etkinliği gösterilmiştir (37).

Tümör mikroçevresi, T hücrelerinin hayatta kalışını da etkiler. Hem IDO hem de PD-L1, T hücrelerin intratümöral proliferasyonunu inhibe etmelerinin yanında, apoptozu da indüklerler. T hücre apoptozunu indükleyen diğer kemokinler FasL, TNF-alfa, TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligandır (TRAIL).

T hücrelerini immün mikroçevreden dışlayan tüm bu mekanizmaların tanımlanması, bunları hedef alan potansiyel tedavi stratejilerini ortaya koyması açısından ve potansiyel tedavi ajanlarının, immün kontrol nokta blokörleri ile eş zamanlı kullanılarak bu tedavilerin etkinliğini artırması açısından önem taşımaktadır.

2.2.3. İmmün Kaçış

Tümör hücrelerinde immün kaçış, yüzey moleküllerinde kayıp ya da aşağı regülasyon ile immünojenitenin azaltılması, immün fonksiyonu baskılayan yüzey moleküllerinin ifadesinde artış ve düzenleyici bir hücrel mikroçevrenin oluşturulması ana başlıkları ile özetlenebilir.

T lenfositlerin antitümöral immünitede rol alabilmesi için T hücre reseptör (TCR) aracılı sinyale ve antijen bağımsız eş zamanlı uyarıcı ya inhibitör sinyale ihtiyacı vardır. TCR uyarısı ise, antijen prezente eden hücreler üzerindeki “major histocompatibility complex (MHC)” molekülleri ile sağlanır.

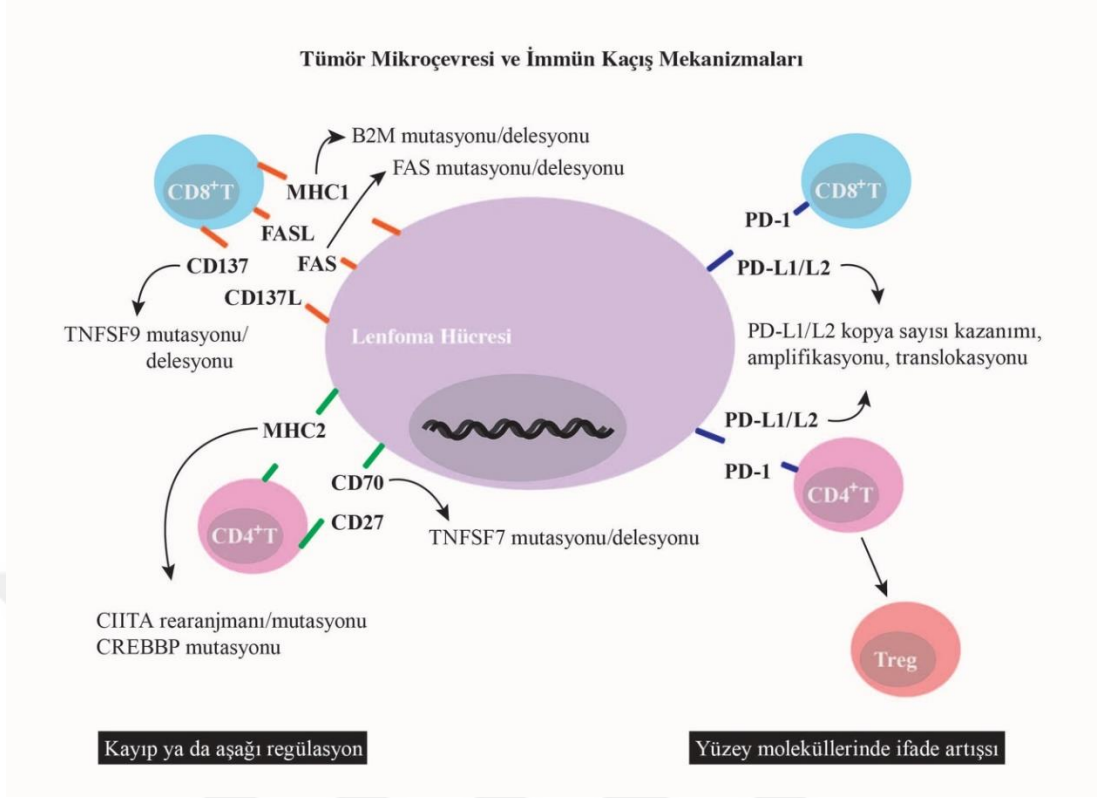
Sitotoksik T hücrelerden kaçışı sağlayan, MHC sınıf I ifadesinde anormallikler, çeşitli tümör tiplerinde sık izlenmektedir. Özellikle kromozom 6’nın kısa kolunda yer alan HLA bölgesinin, farklı lenfomalarda etkilendiği tanımlanmıştır. MHC sınıf I kompleksinin yapısında yer alan B2 mikroglobulin (B2M), tüm kompleksin stabilizasyonunda ve aktivasyonunda rol almaktadır. B2M geninde mutasyonlar, farklı solid tümörlerde ve lenfomalarda tanımlanmıştır.

PSSSL'da sıklığı kesin bilinmemekle birlikte, diffüz büyük B hücreli lenfomalarda %25 oranında bildirilmiştir (38).

B hücreleri, ifade ettikleri MHC sınıf II kompleksi ile, CD4+ T lenfositlerle etkileşirler. MHC sınıf II kaybı, DBBHL, primer mediastinal B hücreli lenfoma ve klasik Hodgkin lenfomada azalmış sağkalımla ilişkili bulunmuştur. Özellikle immün ayrıcalıklı bölgede gelişen PSSSL ve testis lenfomalarında kromozom 6p'de MHC sınıf I ve II'nin homozigot ve heterozigot delesyonu sık gözlenmektedir (%50 vs %78, sırasıyla) (38).

TNFRSF14, TNFSF7, TNFSF9 gibi ko-stimulatuar molekülleri kodlayan gen bölgelerinde mutasyonlar DBBHL hastalarında tanımlanmış olmakla birlikte, bunların PSSSL'daki sıklığı bilinmemektedir (38) (Şekil 2.5).

Normal doku yapısını bozarak, çözünebilir büyüme faktörleri ve bunların reseptörlerinin yardımı ile tümör büyümesini uyaran bir mikroçevre oluşturulması da immün kaçış yöntemlerindendir. Bu nişin oluşumunda, IL-4, IL-10, IL-13, kemokin ligand 17, kemokin ligand 22 ve TGF-beta gibi immün düzenleyici sitokinler etkili olmaktadır. B hücreli lenfomalarda tanımlanmış NF- κ B ve JAK-STAT aktivasyonunu uyaran mutasyonların, mikroçevre düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Direkt ilişki gösterilememiş olsa da, IL-6, IL1 β , TNF α gibi inflamasyon uyarımında anahtar rol oynayan moleküllerin, JAK-STAT ve NF- κ B yolağının hedefinde oldukları saptanmıştır (38).



Şekil 2.5. İmmün kaçış

2.2.4. PD-1/PD-L1 Yolağı

T hücre aracılı immün yanıtta, antijen bağımsız ligand-reseptör ilişkisi ile de ko-stimulatuar ya da ko-inhibitör olabilen sinyaller gereklidir. Bu sinyal yollarından biri, periferik toleransın sağlandığı, inhibitör sinyalleri transfer ederek otoimmüniteyi önleyen PD-1/PD-L1 yolağıdır. Bu yolaktaki anormallikler, tümörler, otoimmün hastalıklar, gebelik komplikasyonları ve transplant rejeksiyonunun patogeneğinde yer almaktadır (39).

İmmün ayrıcalık, yabancı greft varlığını reddetmeyen, yabancı antijenlerin aşırı immün yanıt oluşturulmadan tolere edilebildiği özel bir immünolojik durumdur. İmmün ayrıcalığın, hassas dokuları korumaya katkı sağladığı bilinmektedir. Gözün ön kamarası, santral sinir sistemi, testis ve gebelikte uterus fizyolojik immün ayrıcalıklı bölgelerdir. Bu mekanizmanın ayrıntıları netleşmemiş olmakla birlikte, PD-L1'in immün ayrıcalıklı bölgelerde ifade edildiği gösterilmiştir (39).

PD-1, T hücreleri dahil çeşitli immün hücrelerde (B hücreleri, myeloid dendritik hücreler, aktive monosit/makrofajlar, NK/T hücreleri) ifade edilen, immünglobulin süper ailesine ait monomerik bir transmembran reseptörüdür. Antijen bağımsız reseptör-ligand etkileşimi ile T hücre yanıtını baskılayan PD-1/PD-L1 aksı, sürekli antijenik uyarıya maruz kalan T hücrelerinin immün fonksiyonunu kontrol altında tutmak için kritiktir. T hücre aktivasyon/proliferasyonunun SHP-1/2 aracılığı ile hücre içi inhibisyonunu sağlar ve ligandı ile etkileşime girdiğinde T hücre anerjisine ve tükenmesine yol açarak T hücre ilişkili immün yanıtı inhibe eder (40). Ayrıca T hücre apoptozunu uyardığı, küçük GTPaz Rap1 düzenlenmesi ile T hücre adhezyonunu etkileyerek T hücre motilitesini artırdığı, T hücreleri ile antijen sunan hücreler arasındaki bağlantıyı zayıflattığı ve T hücre efektör yanıtını azalttığı gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesinin, tümör infiltre eden lenfositlerden salınan IFN-gama'ya bağlı adaptif bir yanıt şeklinde olabileceği, kromozom 9p24.1'de gen bölgesindeki aberrasyonlar ile intrinsik bir uyarı sonucu ortaya çıkabileceği ya da latent EBV enfeksiyonuna bağlı indüklenebileceği gösterilmiştir (41). PD-L1 ifade eden tümör hücreleri bu sayede T hücre yanıtını baskılayarak immün sistemden kaçış sağlarlar (38). Farklı solid kanserlerde tümör mikroçevresindeki lenfositlerde PD-1 ve kanser hücrelerinde PD-L1 ifadesinin varlığı, kötü prognoz ile ilişkili gösterilmiştir (40). Tanımlanan bu ilişki, PD-1/PD-L1 yolağının farklı kanser çeşitlerinde tedavi seçeneği olarak hedeflenmesine neden olmuştur.

İkinci kromozomun PDCD1 geni ile kodlanan PD-1, PD-L1 ve PD-L2 ligandlarına (sırasıyla, CD274 ve PDCD1LG2 tarafından kodlanan) sahiptir. PD-L1 tüm hücrelerde yaygın olarak ifade edilebilirken, PD-L2 ifadesi immün sistem hücrelerinde sınırlıdır. Her iki ligandın ifadesi, IFN β , IFN γ gibi çeşitli sitokinlerin uyarısı ile artırılabilir (38). PD-L1, PD-1'e ihtiyaç duymadan, CD80'e bağlanarak da T hücre fonksiyonunu inhibe edebilir (42).

Santral sinir sistemi, immün ayrıcalıklı bölge olarak kabul edilmektedir ancak aslında bu durum yalnızca parankim için geçerlidir. Ventriküller, meninksler ve subaraknoid boşluklar, konvansiyonel dokular ile benzer immün reaktiviteye sahiptir (8). Lökosit migrasyonunun bir kısmının kan beyin bariyerini bozmadan gerçekleşmesi, nöronların ve mikroglial hücrelerin immün yanıtı aktif olarak

düzenlemesi, mikrogliyal hücrelerin nöronların korunmasında rol oynaması, dural sinüslerdeki lenfatik damarlar ile serebrospinal sıvıdan boyun lenf nodlarına akış gerçekleşmesi gibi özelliklerle, santral sinir sisteminin immün ayrıcalıklı konumu, SSS'nin homestazını sağlayan bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır. İmmün ayrıcalığın bozulması, multiple skleroz, inme, Alzheimer gibi hastalıkların patogeneğinde etkili olabilir (39).

Yapılan çalışmalarda PD-1/PD-L1 aksının SSS'nin yapısal düzenlenmesinde etkili olduğu, potansiyel tedavi hedefi olarak kullanılabileceği gösterilmektedir (39). Fare modellerinde yapılan çalışmalarda inflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda önemi ortaya konan PD-1/PD-L1 yolağının, PSSSL'da da etkili bir tedavi stratejisi olabileceği ortaya konmaktadır.

2.3. PSSSL'DA İMMÜNÖTERAPİ

Sıklıkla IgH bölgesini ilgilendiren translokasyonların DBBHL'nın karakteristik özelliklerinden biri olduğu bilinmektedir. Tüm-genom sekanslama yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, PD-L1, IgH için yeni bir translokasyon partneri olarak gösterilmiştir (43). Aynı çalışmada FISH ile PD-L1/PD-L2 gen bölgesinde amplifikasyon/kopya sayısı kazanımı/translokasyon varlığı da gösterilmiş; bu aberrasyonların dokuda protein ifade düzeyleri ile korele olduğu ve sıklıkla aktive immünfenotipe sahip vakalarda bulunduğu belirtilmiştir.

414 DBBHL hastasında kantitatif immünfloresan yöntemi ile dokuda PD-1 ve PD-L1 ifadesini araştıran bir çalışmada, düşük tümör infiltre eden T lenfosit (TIL) varlığının kötü sağkalımla; yüksek TIL varlığının artmış PD-1/PD-L1 ifadesiyle; hem PD-1 hem de PD-L1 ifadesinin ise kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (44).

Santral sinir sistemi lenfomalarında PD-1 ve PD-L1 ifadesini immünhistokimyasal olarak inceleyen bir çalışmada, 32 immün kompetan hasta çalışmaya dahil edilmiş, tümör infiltre eden lenfositlerde PD-1 ifadesi ile sağ kalım arasında negatif ilişki gözlenmiş; tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi ile kemoterapiye daha iyi yanıt varlığı arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. Aynı

çalışmada lenfositlerde PD-1 ifadesi ile tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi korele bulunmuştur (40).

53 PSSSL olgusunun dahil edildiği bir çalışmada, immünhistokimya ile tümör hücrelerinde %15 PD-L1 ifadesi (hepsi EBV pozitif), T hücrelerinde %98 PD-1 ifadesi saptanmıştır. 9p24.1/PD-L1 gen bölgesinin FISH tekniği ile incelendiği 48 hastanın birinde kopya sayısı değişikliği, birinde ise amplifikasyon tespit edilmiştir. Dokuda PD-L1 ifadesinin FISH sonuçları ile korele olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada tümör hücrelerinde PD-1/PD-L1 ifadesi, mikroçevrede PD-L1 ifadesi progresyonsuz sağ kalım ya da genel sağ kalım açısından prediktif bulunmamıştır (45).

Kromozom 9p24.1'de yer alan PD-L1/L2 gen bölgesinin amplifikasyonu, primer mediastinal büyük hücreli lenfoma (PMBHL), klasik Hodgkin lenfoma (HL) ve immün korunaklı bölgelerde gelişen DBBHL'da tanımlanmış; ve amplifikasyon varlığı, dokuda protein ifadesinde artış ile ilişkili olarak gösterilmiştir (46).

105 DBBHL olgusu ile yapılan FISH incelemede, PD-L1 geninde %27 oranında mutasyon saptanmış (polizomi/kopya sayısı artışı/amplifikasyon/translokasyon); mutasyonun protein ifade düzeyinde artışla ilişkili olduğu gösterilmiş ve mutant olguların kemoterapi ile kötü sağ kalım göstermelerine rağmen nüks durumunda anti PD-1 tedavisine yanıt verdikleri gözlenmiştir. Bu sonuçlarla, PD-L1 gen değişikliklerine sahip vakaların, DBBHL'nın özel bir biyolojik alt tipini oluşturduğu öne sürülmüş, PD-1 blokaj tedavisinden, gen değişikliğine sahip olguların maksimum fayda göreceği tezi ortaya konulmuştur (47).

Yapılan öncü bir çalışmada, EBV ilişkisiz PSSSL tanılı 63 hastadan oluşan bir grupta, 9p24.1 gen bölgesinde RT-PCR yöntemi ile kopya sayısı kazanımı yanında (%52), floresan in-situ hibridizasyon yöntemi ile translokasyon varlığı da ilk defa gösterilmiştir (%6). Bu olgularda immünhistokimyasal PD-1, PD-L1 ve PD-L2 antikolları ile yapılan karşılaştırmada, kopya sayısı kazanımı ve translokasyon varlığının, dokuda protein ifade düzeyiyle korele olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada EBV pozitif hastalarda ise kopya sayısı değişikliğinden bağımsız olarak, dokuda yüksek PD-1 ve PD-L1 protein ifadesi saptanmıştır. Bu durum, EBV pozitif PSSSL olgularında PD-L1 ifade artışının, farklı viral mekanizmalarla geliştiğini

düşündürmüştür. PD-L2 gen bölgesinde az olmayan genetik değişikliklerin ortaya konması nedeniyle, hedefe yönelik tedavi seçeneklerinde sadece PD-L1'in hedef alınmayıp, PD-1 reseptör inhibisyonu ile hem PD-L1 hem de PD-L2 blokajının sağlanacağı ve daha etkili sonuç alınabileceği öne sürülmektedir (48).

Toplam 67 DBBHL hastasını dahil eden bir çalışmada, 4 PSSSL olgusunun yalnızca birinde 9p24.1 gen bölgesinde translokasyon saptanmıştır (49).

115 primer santral sinir sistemi lenfoma tanılı olguyu kapsayan bir çalışmada, doku mikroyarray yöntemi ile hazırlanan bloklarda immünohistokimyasal olarak tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi ve FISH yöntemi ile PD-L1/2 gen bölgesinde kazanım ya da amplifikasyon varlığı araştırılmıştır. PD-L1 ifadesi %29 oranında saptanırken, yalnızca bir olguda PD-L1/2 translokasyonu, 3 olguda amplifikasyon varlığı, 13 olguda kopya sayısı kazanımı saptanmış ancak dokuda protein ifade düzeyinin genetik değişiklikler ile ilişkisiz olduğu gözlenmiştir. FISH sonuçları, çok nadir pozitif saptanması nedeniyle, progresyonsuz ve genel sağ kalım ile ilişkisiz bulunmuştur. (50)

57 PSSSL olgusunu dahil eden bir çalışmada, tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi (10/57) ile PD1/PD-L1 gen bölgesinde rearanjman varlığı (8/57) ilişkili saptanmıştır ($p=0.0001$). Ancak 3 hastada saptanan polizomi, dokuda protein ifadesi ile ilişkisiz saptanmıştır. PD-L1 ifadesi herhangi bir klinik parametre ile ilişkili bulunmamış, yalnızca bu hastaların başvuru sırasındaki MSKCC skorlarının daha kötü olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada tümör mikroçevresi de değerlendirilmiş, TIL'in büyük oranda CD8 + lenfositlerden oluştuğu gözlenirken, vakaların büyük kısmında TIL'de PD1 ifadesi saptanmıştır (%69.6). Tümör asosiye makrofajlarda (TAM) ise PD1 ifadesi daha nadir gözlenirken (%6.4), PD-L1 ifadesine daha yüksek oranda rastlanmıştır (%57.1). TIL'de PD1 ifadesi ile tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi korele bulunmamış, tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesinin daha yüksek TIL ve TAM varlığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ($p=0.015$ vs. $p=0.06$). İlginç olarak, TIL ya da TAM yoğunluğu klinik parametrelerle ilişkisiz bulunurken, TIL'de PD-1 ifadesi ve TAM'da PD-L1 ifadesi belirgin daha iyi prognozla ilişkili olarak gösterilmiştir (41).

48 PSSSL olgusunu ele alan bir çalışmada, tümör hücrelerinde PD-L1 ve TIL'de PD-1 ifadesi immünohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Buna göre vakaların %37.5'inde yüksek PD-L1 ifadesi (>%5 boyanma) saptanırken; %29.2'sinde orta düzeyde ifade (%1-4 boyanma) saptanmış, %33.3'ünde PD-L1 ile boyanma izlenmemiştir. TIL'de PD-1 ifadesi ise değerlendirilen 14 vakanın 12'sinde saptanmıştır (>1 hücre/BBA). Ancak PD-1 ve PD-L1 ifadeleri arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir (51).

Serumda çözünebilir PD-L1 düzeyi ile dokudaki ifade düzeylerini karşılaştıran bir başka çalışmada 68 PSSSL hastasında değerlendirme yapılmıştır. Serum PD-L1 düzeyi yüksek grubun, daha düşük genel sağ kalım ve progresyonsuz sağ kalıma sahip olduğu saptanmıştır. Vakaların %67'sinde tümör dokusunda PD-L1 pozitifliği gösterilmiş ve ifade düzeylerinin serum PD-L1 düzeyleri ile korele olduğu saptanmıştır. İmmün hücrelerdeki PD-L1 ifadesi, serum PD-L1 düzeyleri ile ilişkili bulunmamıştır (52).

20 PSSSL olgusu ile yapılan bir çalışmada ise, dokuda PD-1 ve PD-L1 ifadeleri incelenmiş, vakaların %60'ında TIL'de PD-1 pozitifliği, %20'sinde ise tümör hücrelerinde PD-L1 ile kuvvetli pozitiflik saptanmıştır. Tümör mikroçevresine CD8+ T lenfositler sayılmış, bu değerler PD-L1 ya da PD-1 ifadesi ile ilişki bulunmamıştır (53).

PD-L1 ifadesini immünohistokimyasal olarak ve m-RNA düzeyleri ile karşılaştıran bir çalışmada 64 PSSSL olgusunun 2'sinde tümör hücrelerinde, 25'inde ise TAM'da PD-L1 ifadesi saptanmıştır. Tümörde PD-L1 ifadesi, hem genel sağ kalım ile ilişkili bulunmuş hem de iyi prognostik bir faktör olduğu gösterilmiştir. Tümör mikroçevresinde PD-L1 ifadesi ise genel sağ kalımla negatif ilişkili bulunmuştur (54).

PD-1, PD-L1 ve PD-L2 ifadelerinin hepsinin birden değerlendirildiği 76 olguluk bir çalışmada, belirteçler için yüksek ifade açısından cut-off değerler belirlenmiş; buna göre olguların %7.9'unun PD-1, %13.2'sinin PD-L1 ve %42.1'inin PD-L2'yi yüksek düzeyde ifade ettikleri gösterilmiştir. Bu çalışmada yüksek PD-1 ifadesinin kötü progresyonsuz sağ kalım ve genel sağ kalımla ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca PD-1'i yüksek ifade eden hastaların hiçbirinin MSKCC ve

IELSG prognostik skorlama modellerine göre kötü prognostik grupta yer almaması, bu hastaların ancak PD-1 ifade düzeyleri ile prognozları hakkında bilgi edinilebileceğini ortaya koymaktadır. PD-L1 ve PD-L2 ifadeleri ise prognostik anlamlı bulunmamıştır (55).

17'si EBV ilişkili toplam 309 PSSSL hastasının dahil edildiği bir çalışmada, PD-1 ve PD-L1 ifadeleri immünohistokimyasal olarak araştırılmış, EBV pozitif olguların 12'sinde hem tümörde hem TAM'da, 4'ünde ise sadece TAM'da PD-L1 ifadesi saptanmıştır. EBV negatif olguların 11'inde hem tümörde hem TAM'da, 4'ünde ise sadece TAM'da PD-L1 ifadesi saptanmıştır. İki grup arasında PD-L1 ifadesi açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak EBV pozitif vakaların, daha fazla PD-1 pozitif TIL bulundurduğu gösterilmiştir. EBV negatif vakalar ise belirgin şekilde daha az sayıda PD-1 pozitif lenfosit içermektedir (56).

PMBHL ve klasik HL'da PD-L1 ve PD-L2 protein ifadesindeki kantitatif farklılıklar ile olguların immün kontrol noktası blokaj tedavisine verecekleri yanıtlar arasında ilişki olabileceğinin ortaya konmuş olması, bu ligandların ifadelerinin, hedeflenmiş tedavide potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (38, 47). Malign melanoma hastalarında immün kontrol noktası blokaj tedavisine yanıtı öngörmeye genetik temelin önemi yakın zamanda ortaya konmuştur (57). 9p24.1 gen bölgesinde mutasyonların açıkça tanımlandığı klasik HL'da PD-1 blokaj tedavisinin başarısı, aynı mutasyonların ortaya konduğu PSSSL hastalarında da bu yeni ve hedefe yönelik tedavi seçeneğini araştırma yolunu açmıştır (58).

İmmün kompetan murin santral sinir sistemi lenfoma modeli ile yapılan pre-klinik bir çalışmada anti-PD-1 tedavi, farelerde tümör büyümesinde azalma ve sağ kalımda uzama sağlamıştır. Tedavi verilen farelerin %50'sinde komplet remisyon izlenirken, CD8 + T lenfosit sayısında da belirgin artış gözlenmiştir (59).

Bu tedavi seçeneğini araştırmayı amaçlayan yeni bir çalışma 4 nüks/refrakter primer santral sinir sistemi lenfoması hastasında anti-PD-1 tedavi (nivolumab) ile tüm hastalarda radyolojik yanıt elde edilirken; 4'ünde komplet, 1'inde parsiyel yanıt bildirilmiştir. Ayrıca olgularda 13-17 ay arasında değişen progresyonsuz sağ kalım saptanmıştır (58).

Anti-PD-1 tedavi etkinliğinin araştırıldığı (pembroluzimab) faz 1b çalışmasına (NCT01953692) dahil edilen nüks DBBHL olgularının 29'una ait parafin bloklarda PD-L1 gen değişikliği araştırılmış; 3'ünde mutasyon saptanmıştır. İlginç olarak, çalışmaya dahil edilen kohortta yalnızca 4 olguda ilaca yanıt elde edilmiş ve bunların 2'sinin PD-L1 gen değişikliği bulundurduğu gözlenmiştir (47). Bu gözleme dayanarak, yazarlar daha önce uygulanan beş tedavi rejimi sonrası nüks gelişen ve PD-L1 amplifikasyonu bulunduran bir olguya pembrolizumab monoterapisi vermişler, ilaç ile komplet yanıt elde etmişler ve tedavinin 10. Ayında hastanın halen komplet yanıtta olduğunu bildirmişlerdir (47).

Yine bu gözlemler sonucu, PSSSL ve primer testis lenfoması hastalarını kapsayan çok merkezli bir faz 2 alışma (NCT02857426) ile PSSSL hastalarını kapsayan tek merkezli bir çalışma da (NCT02779101) anti-PD-1 tedavi etkinliğini araştırmaktadır. Ayrıca immün kontrol noktası blokörleri ile diğer hedefe yönelik ajanların (ibrutinib, immün-modülatör ilaçlar gibi) kombine kullanılacağı klinik çalışmalar planlanmaktadır (60).

Tüm bu gözlemler ve alışmalar, PD-L1 gen değişikliklerinin saptanmasının, hastalarda PD-1 blokaj tedavisine yanıtı öngörmede prediktif belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. PD-1 blokaj tedavisinin, diğer anti-lenfoma tedavilerine kıyasla daha uzun süreli yanıt sağlıyor olması, bu tedavi seçeneğini ne çıkarmaktadır. Bu tedaviden en yüksek klinik yanıtın alınabileceği hastaları belirlemek en kritik nokta olarak gözükmektedir. Doku düzeyinde araştırılan PD-1 ve PD-L1 ifadelerinin, gen alterasyonları ile sıklıkla ilişkili bulunmuş olması, immünhistokimyasal bir prediktif biyobelirteç için umut vaad etmektedir. PD-1'in sadece PD-L1 değil, PD-L2'yi de hedef olarak kullandığının gösterilmesi, bu belirtecin düzeylerinin de araştırılmasını önemli kılmaktadır.

Planladığımız alışma, literatürde PSSSL hastalarında oldukça geniş bir hasta serisinde, tümör dokusunda PD-1, PD-L1 ve PD-L2 ifadelerinin üçünün birden değerlendirildiği ve bunların moleküler karşılığının in-situ hibridizasyon yöntemi ile karşılaştırıldığı ve histopatolojik, prognostik parametrelerle ilişkilendirildiği ilk çalışma olacaktır.

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. OLGU SEÇİMİ

İncelenen materyaller primer beyin lenfomalarını ve kontrol grubu olarak aktive immünofenotipli DBBHL'ları içermektedir. Hasta seçimi iki ayrı merkezin arşivlerinden gerçekleştirilmiştir.

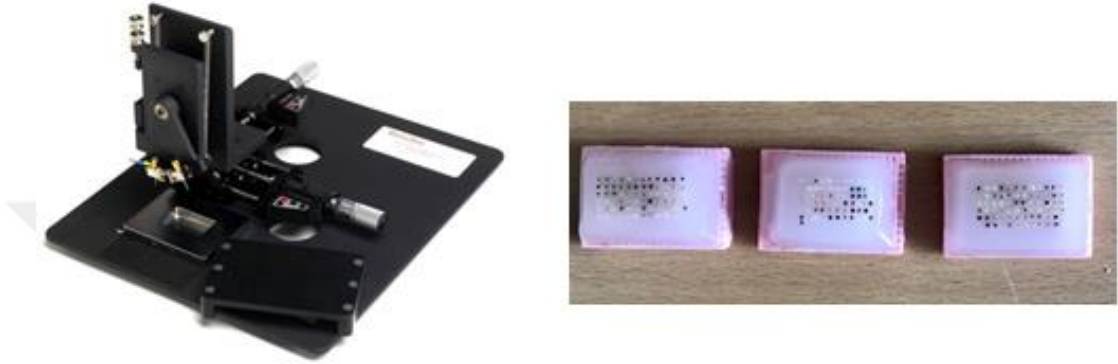
1. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda Ocak 2006-Mart 2019 tarihleri arasında biyopsileri incelenmiş ve primer santral sinir sistemi lenfoması tanısı almış olgular "Avicenna" bilgisayar kayıtlı arşiv sistemi ile taranmıştır. Bu vakalar içerisinde, primer kitlesi santral sinir sistemi yerleşimli olan, anamnez bilgilerine ulaşılabilen 50 vaka tespit edilmiştir.

Kontrol grubu olarak santral sinir sistemi lenfomalarına benzer fenotipik özelliklere sahip aktive immünofenotip DBBHL kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda Ocak 2006-Mart 2019 tarihleri arasında biyopsileri incelenmiş, nodal aktive immünofenotip DBBHL tanısı almış olgular "Avicenna" bilgisayar kayıtlı arşiv sistemi ile taranarak 45 hastanın tanı sırasındaki doku örnekleri seçilmiş, bunlarda da tümör temsiliyeti uygun alanlar belirlenmiştir.

2. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda Ocak 2000-Aralık 2015 tarihleri arasında primer santral sinir sistemi lenfoması tanısı almış olgular bilgisayar kayıtlı arşiv sistemi ile taranmıştır. Bu vakalar içerisinde, primer kitlesi santral sinir sistemi yerleşimli olan, anamnez bilgilerine ulaşılabilen 32 vaka tespit edilmiştir.

Tüm olguların Hematoksilen-Eozin ve tanı amaçlı yapılan immünohistokimya preparatları Dr. Dilara Akbulut, Dr. Ayşegül Üner ve Dr. Işınso Kuzu tarafından yeniden değerlendirilerek tümörü temsil edecek, tümör mikroçevresinde T hücrelerinden zengin alanlar bulunan bloklar saptanmıştır. H-E kesitlerde belirlenen alanlar, parafin bloklarla eşleştirilerek doku mikro-array bloğu için örnekleme yapılacak bölgeler işaretlenmiştir. Bloklarında yeterince dokusu bulunan, örnekleme

sonrası da arşivde tümör dokusu kalacak olan, toplam 57 hasta (37 AÜTF, 20 HÜTF) çalışmaya dahil edilmiştir. Tümör dokularında Beecher Instruments Manuel mikro-array cihazı (Estigen, Estonia) ile seçilen alanlardan 1 mm çaplı, her hastadan 2 kor şeklinde temsil edilen örnekleme ile 3 adet doku mikro-array bloğu hazırlanmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1. Beecher Instruments Manuel Mikroarray cihazı ve hazırlanan doku blokları

Olgulara ait klinik veriler (yaş, cinsiyet, tümör yerleşimi, birden fazla kitle varlığı, tanı anındaki semptomlar, serum LDH düzeyi, genel sağkalım süresi, ilk tedaviye yanıt oranı, ECOG performans skoru) hastane bilgi sistemleri aracılığı ile taranarak kayıt altına alınmıştır.

3.2. DOKU MİKRO-ARRAY YÖNTEMİ

Doku mikro-array yöntemi; bir blokta onlarca dokunun yer almasına ve bunların aynı cam üzerinde incelenmesine imkan veren, maliyet etkin bir uygulamadır. Buna göre verici bloktan biyopsi iğneleri ile elde edilen dokular alıcı blokta haritalanarak sıralanır. Biyopsi iğnesinin çapına bağlı olarak alıcı blokta incelenebilecek kor sayısı değişmektedir. Doku mikro-array blokları özellikle kanser hasta kohortlarında tanısal, prognostik ve tedavi açısından prediktif biyobelirteçlerin araştırılmasında, immünohistokimya ve floresan in-situ hibridizasyon yöntemleri ile

birlikte kullanılmaktadır. Çalışmamızda olduğu gibi manuel bloklar hazırlanabildiği gibi, tümüyle otomatize sistemler de bulunmaktadır.

3.3. İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Hazırlanan bloklardan 4 mikrometre kalınlığında pozitif yüklü lama alınan kesitlerde PD-1, CD3, CD8, CD68 antikorları ile bütün olgulara immünhistokimya uygulanmıştır. PD-L1 ve PAX5 değerlendirmesi için çiftli boyama (double staining) (PD-L1 (kahverengi) + PAX5 (kırmızı)) yapılarak neoplastik B hücrelerinde PD-L1 ifadesi eş zamanlı değerlendirilmiştir. Boyamalar tüm antikorlar için Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle otomatik immünhistokimya boyama cihazında (Ventana Medical Systems-Roche, ABD) OptiView ve UltraView DAB ve red kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Antikorların özelliklerine göre **Tablo 3.1**'de belirtilen yöntemler uygulanmıştır. Değerlendirme için **Tablo 3.2**'de belirtilen pozitif kontroller ve ifade paterni dikkate alınmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan antikorlara ait bilgiler ve boyama teknikleri

Antijen	Antijen açığa çıkartma süresi	Antikor inkübasyon süresi	Klon	Tedarikçi
PD-1	EDTA/36'	32'	Nat105	Ventana
PD-L1	EDTA/60'	120'	SP263	Ventana
CD68	EDTA/36'	28'	KP1	Ventana
CD8	EDTA/64'	32'	SP57	Ventana
CD3	EDTA/60'	60'	Polyclonal	Cell Marque

Tablo 3.2. Kullanılan antikorların normal dokudaki ifade özellikleri

Antikor	Dış kontrol	Boyama paterni
PD-1	Lenf nodu	Membranöz
PD-L1	Plasenta	Membranöz
CD68	Tonsil	Sitoplazmik
CD8	Tonsil	Sitoplazmik
CD3	Tonsil	Sitoplazmik

3.4. İMMÜNHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

İmmünhistokimyasal kesitler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD’nda bulunan ve daha önce BAP altyapı proje (proje no: 14A0230003) kapsamında kurulmuş olan “3DHistech Pannoramic 250 Flash” dijital görüntü tarama sistemi kullanılarak taranan dijital görüntülerin CaseViewer ve QuantCenter görüntüleme programları ile değerlendirilmiştir. Sayılan hücrelerin bulunduğu kor alanı ve hücre sayısı parametreleri kaydedilmiştir.

Her vaka için temsil eden ikişer kordan en çok hücre içeren, daha az artefaktlı kor seçilmiş, değerlendirmeler aynı kor üzerinden yapılmıştır.

Antikorların immünhistokimyasal değerlendirilmesinde Tablo 3.2’de özetlenen, antikorun dış kontroldeki ifadesi ve neoplastik hücrelerde boyanmanın beklendiği hücresel lokalizasyon göz önünde bulundurulmuştur.

PD-1 Değerlendirmesi: PD-1 ile herhangi şiddetteki membranöz boyama spesifik kabul edilmiş, tümör infiltre eden lenfositler dijital görüntülerde işaretlenerek sayılmış, PD-1 pozitif TIL’in CD3 pozitif hücreler içerisindeki oranı ve mm²’deki hücre sayıları hesaplanarak belirlenmiştir.

PD-L1 Değerlendirmesi: Çiftli boyama ile dijital görüntülerde değerlendirilen PD-L1 ifadesi (PAX5: kırmızı, PD-L1: kahverengi), tümör hücrelerinde ve mikroçevre hücrelerinde ayrı ayrı işaretlenerek değerlendirilmiştir. Membranöz, herhangi şiddetteki boyanmalar spesifik kabul edilmiş, pozitif tümör hücrelerinin tüm tümör hücrelerine oranı ve pozitif immün hücrelerin tüm immün hücrelere oranı saptanmıştır.

CD68 Değerlendirmesi: CD68 ile korlara ait dijital görüntülerde pozitif makrofajlar işaretlenerek sayılmış, mm²'deki pozitif hücre sayısı hesaplanmıştır.

CD3 ve CD8 Değerlendirmesi: CD3 ve CD8 boyalı kesitler, QuantCenter otomatik sayım programı kullanılarak değerlendirilmiş, toplam pozitif hücre ve mm²'deki pozitif hücre sayısı hesaplanmış, CD3 ile CD8 pozitif lenfositlerin birbirine oranı belirlenmiştir.

3.5. İN-SİTU HİBRİDİZASYON

Moleküler değerlendirmeler için alınan kesitler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD'nda bulunan 3DHistech Panoramic P250 Flash 3 dijital görüntü tarama sistemi kullanılarak, floresan (DAPI: 387-440, FITC: 485-521, TRITC: 559-607) aracılığıyla karanlık alanda taranarak Caseviewer V.2.1 görüntüleme programı ile değerlendirilmiştir.

EBER değerlendirme: EBER boyamaları, otomatik boyama cihazında (Ventana Medical Systems-Roche, ABD) Epstein Barr virüs erken RNA transkripti içeren probe kokteyli kullanılarak yapılmış, pozitif dış kontrol olarak bir Burkitt lenfoma olgusuna ait doku kullanılmıştır.

9p24.1/PD-L1/PD-L2 gen bölgesinin değerlendirilmesi: Çalışmada kullanılan ZytoLight SPEC CD274, PDCD1LG2/CEN 9 Dual Color Probe'da CD274 (PD-L1) ve CD273 (PD-L2) yeşil ile; 9q12'de, kromozom 9'un klasik satellit III bölgesine karşılık gelen CEN 9 kırmızı ile işaretlidir. Normal interfaz nükleusunda iki yeşil ve iki kırmızı sinyal beklenmektedir (**Şekil 3.1**). Amplifikasyon ya da kopya sayısı artışında, yeşil sinyal sayısında artma, büyük yeşil sinyal kümeleri gözlenmesi beklenir. Polizomi için sentromerik ve hedef bölgenin birlikte artışı kabul edilmiştir. Hedef gen bölgesinin sentromerik bölgeye oranı 2 ve üzerinde ise amplifikasyon, 1'in üzerinde ancak 2'nin altında ise kopya sayısı artışı olarak kaydedilmiştir. Değerlendirmelerde her hasta için 200 hücre sayılmış, ve %20 eşik değer üzerinde veri pozitif kabul edilmiştir.

Tablo 3.3. FISH Protokolleri

	Zytovision Amplifikasyon Probe'u	Diagen Break-apart Probe'u
Deparafinizasyon ve Pretreatment	Parafin kesitler 70°C ısıdaki etüvde 2 saat bekletildi.	
	Kesitler iki farklı ksilende 5'er dk tutularak deparafinize edildi.	Kesitler iki farklı ksilende 10'ar dk tutularak deparafinize edildi.
	Sırasıyla %100, %80 ve %70 etanolde 3'er dk tutularak kesitler rehidrate edildi.	Sırasıyla %100, %85 ve %70 etanolde 2'şer dk tutularak kesitler rehidrate edildi.
	İki farklı distile suda 2'şer dk yıkandı.	
	Kesitler 95°C ısıdaki Pretreatment B (LK-100B) solüsyonunda 40 dk tutuldu. Sonrasında oda ısısındaki 2xSSC (LK-104B) solüsyonunda 3 dk yıkandı.	Kesitler 96-98°C ısıdaki Pretreatment solüsyonunda 20 dk tutuldu. Ardından oda ısısındaki dH2O'da 2 dk yıkandı.
	Dokuların etrafı havlu kağıtla kurulandıktan sonra dokuların üzeri Pepsin solüsyonu (LK-101B) ile tamamen kapatıldıktan sonra 37°C ısıdaki etüvde 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kesitler sırasıyla 1dk distile suda ve oda ısısındaki 2xSSC (LK-104B) solüsyonunda 5 dk yıkandı.	Dokuların etrafı havlu kağıtla kurulandıktan sonra dokuların üzeri Pepsin solüsyonu ile tamamen kapatıldıktan sonra 37°C ısıdaki etüvde 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kesitler sırasıyla 1dk distile suda ve oda ısısındaki 2xSSC (LK-104B) solüsyonunda 5 dk yıkandı.
Denatürasyon ve Hibridizasyon	Kesitler sırasıyla %70, %80 ve %100 etanolde 1'er dk tutularak dehidrate edildi.	
	Dokulara hedef bölgelere yönelik problr (Zyto LIGHT ZytoLight SPEC CD274, PDCD1LG2/CEN 9 Dual Color Probe) damlatıldı. Doku yüzeyi lameller ile kapatıldıktan sonra kenarları Fixogum (Maraba) ile kapatıldı. FISH inkübatöründe (Thermo Electron Corporation, USA) 80 °C'de 8 dk denatürasyon sonrası 37 °C'de gece boyu olacak şekilde yaklaşık 21 saat inkübe edildi.	Dokulara hedef bölgelere yönelik problr (DIAGEN break-apart probe) damlatıldı. Doku yüzeyi lameller ile kapatıldıktan sonra kenarları Fixogum (Maraba) ile kapatıldı. 80 °C'de 10 dk denatürasyon sonrası 37 °C'de gece boyu olacak şekilde yaklaşık 21 saat inkübe edildi.
Posthibridizasyon Yıkama	Preparatlardan fixogum uzaklaştırıldı.	
	Oda ısısındaki Wash II (LK-103B) yıkama solüsyonunda lameller kendiliğinden düşene kadar bekletildi.	
	Preparatlar 70 °C'deki Wash I (LK-102B) yıkama solüsyonunda 2 dk ajite edilerek yıkandı.	Preparatlar 70 °C'deki SSC'de 10-15 saniye ajite edilerek yıkandı.
	Oda ısısındaki Wash II (LK-103B) yıkama solüsyonunda 2 dk ajite edilerek yıkandı.	Oda ısısındaki SSC (%0.05 Tween20)'de 30-35 saniye ajite edilerek yıkandı.
	Kesitler sırasıyla %70, %80 ve %100 etanolde 1'er dk tutularak dehidrate edildi.	
	Havada kurutulduktan sonra DAPI Counterstain (LK-096B) damlatılarak lamel ile kapatıldı.	

Bu veriler eşliğinde tümör hücrelerinde polizomi, kopya sayısı artışı, translokasyonu destekleyen ayrılma (break-apart) sinyalleri değerlendirilerek kaydedilmiştir.

3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerin analizi SPSS for Windows ver.20 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler, dağılımı normal olan değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için ortanca (min-max), nominal değişkenler ise kişi sayısı (n) ve (%) olarak gösterilmiştir.

İki hasta grubu arasındaki değişkenlerde farkın önemliliği, Mann-Whitney U testi ile araştırılmıştır. Nominal değişkenler Pearson Ki-Kare/Fischer exact testi ile değerlendirilmiştir.

Sağkalım verilerinin analizinde, Mann Whitney testi ile sağkalım süreleri göz önünde bulundurulmadan, Cox Regresyon testi ile de sağkalım süreleri göz önüne alınarak analizler yapılmıştır.

$P < 0.05$ varlığında sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR

Çalışmamıza dahil ettiğimiz, toplam 57 santral sinir sistemi lenfoması hastasının 32'si erkektir (E/K: 1.28) ve bu veri literatürde PSSSL'da genellikle gözlenen hafif erkek predominansı ile uyumludur. Nodal DBBHL hasta grubunda E/K oranı 1.25'dir ve iki grup arasında cinsiyet dağılımı açısından fark saptanmamıştır (p=0.953). PSSSL grubunda ortalama yaş 56.2, ortanca yaş 59 olarak hesaplanmıştır (min: 17, max: 80). Nodal DBBHL grubunda ise ortalama yaş 59.4, ortanca yaş 59'dur (min:32, max:89) ve iki grup arasında yaş dağılımı açısından fark saptanmamıştır (p=0.247) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı

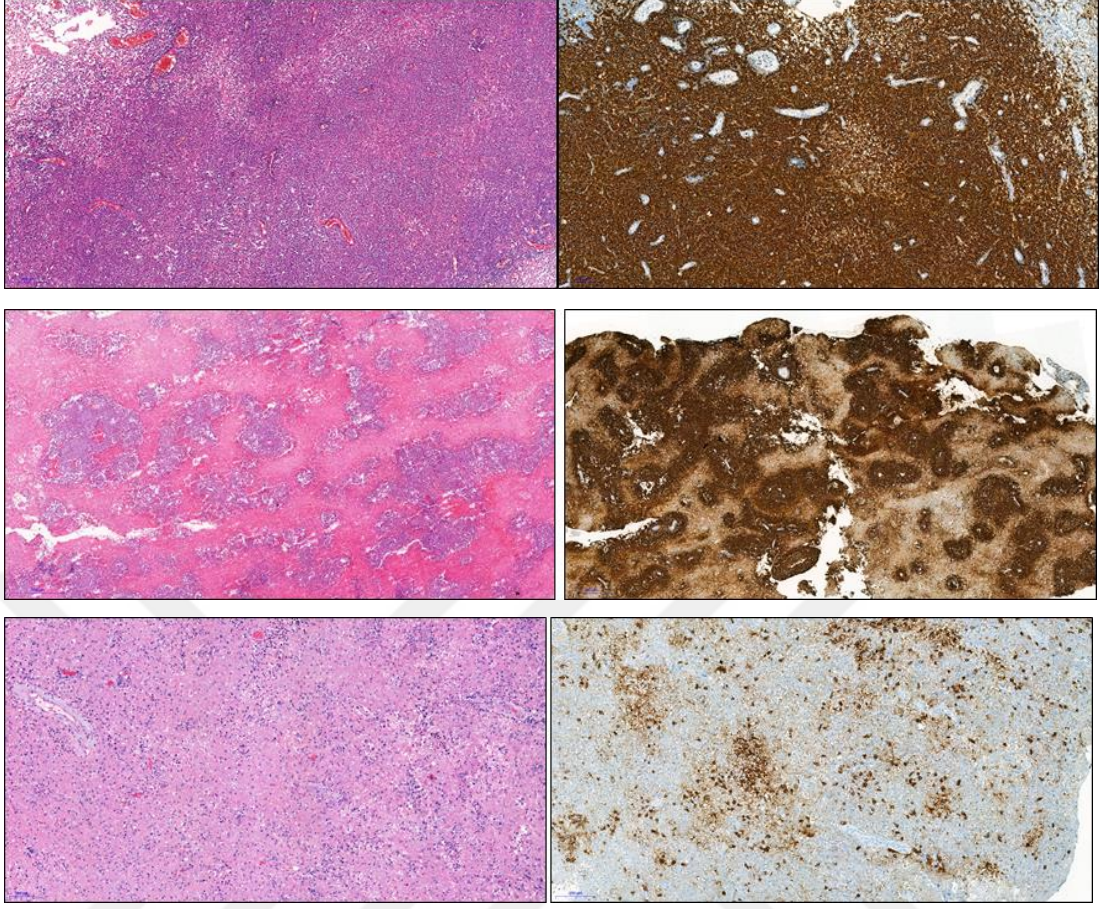
	Yaş			p	Cinsiyet		p
	Ortanca (Min-Max)	Ortalama	Standart sapma		Kadın	Erkek	
PSSSL	59 (17-80)	56,26	±14,345	,247	25 (%43,9)	32 (%56,1)	,953
Nodal DBBHL	59 (32-89)	59,44	±12,844		20 (%44,4)	25 (%55,6)	
Total	59 (17-89)	57,67	±13,729		45 (%44,1)	57 (%55,9)	

Radyolojik bilgilerine ulaşılabilen hastaların tümör yerleşim yerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir ve yine literatürle uyumlu olarak en sık yerleşim yerinin frontal lob olduğu izlenmektedir.

Tablo 4.2. PSSSL olgularında tümör yerleşim yeri

	Unifokal (n)	Multifokal (n)
Frontal	9	6
Talamus/Bazal ganglia	3	6
Frontoparietal	6	1
Serebellum	6	
Parietal	3	1
Spinal kord	3	
Frontotemporal	1	2
Periventriküler		2
Temporoparietal	2	
Temporal	1	

PSSSL olgularının 16'sında (%30.8) derin tümör yerleşimi (serebellum, bazal ganglia, periventriküler, beyin sapı), 19'unda ise (%42.2) multifokal tümör gelişimi saptanmıştır. Kötü prognostik faktörlerden olan serum LDH yüksekliği olguların 24'ünde (%63.2) tanı anında saptanmıştır. Hastaların 24'ünün (%42.1) 60 yaş üzerinde olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.3). Olguların 32'sinde (%57) diffüz gelişim paterni saptanırken, 21'inde (%38) perivasküler büyüme paterni, 3'ünde ise (%5) "scattered" patern izlenmiştir (Resim 4.1). Olguların %74'ü operasyon öncesi steroid tedavisi almıştır. ECOG performans skoru durumları Tablo 4.3'de gösterilmiştir. 45 hastanın sağkalım bilgilerine ulaşılabilmektedir.



Resim 4.1. Diffüz, perivasküler ve “scattered” büyüme paternleri (Dijital görüntü x30)

Tablo 4.3. PSSSL olgularına ait klinikopatolojik özellikler

Klinikopatolojik özellikler	% (n)
Derin tümör yerleşimi (52/57)	
Var	30,8 (16)
Yok	69,2 (36)
Multifokal kitle varlığı (45/57)	
Var	42,2 (19)
Yok	57,8 (26)
Serum LDH düzeyi (38/57)	
Normal	36,9 (14)
Yüksek	63,2 (24)
>60 yaş	42,1 (24)
≤60 yaş	57,9 (33)
Büyüme paterni	
Diffüz	57 (32)
Perivasküler	38 (21)
“Scattered”	5 (3)
Preoperatif steroid tedavisi (43/57)	
Var	32 (74)
Yok	11 (26)
ECOG performans skoru (46/57)	
0	7 (15)
1	19 (42)
2	12 (26)
3	8 (17)

Nodal DBBHL olgularının 27'sinde (%80) tanı anında serum LDH yüksekliği saptanmıştır. ECOG performans skoru, olguların %52'sinde 1, %30'unda 0, %9'unda 2, %9'unda 3 olarak saptanmıştır. Hastaların %49'u 60 yaş üzerindedir. 30 hastanın sağkalım bilgilerine ulaşılabilmektedir.

Yaş ile kötü klinik prognostik faktörlerin birbirleri ile ilişkisi (Derin yerleşim, multifokalite, serum LDH yüksekliği) incelendiğinde, herhangi anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.640$, $p=0.345$, $p=0.137$).

PSSSL olgularında büyüme paterninin yaş dağılımı, multifokalite, derin yerleşim, PD-1 ve PD-L1 ifade düzeyleri ve genel sağkalım üzerinde etkisi incelenmiş, hiçbirinde anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p>0.05$).

EBV pozitif PSSSL olgularında, büyüme paternlerinin dağılımı incelendiğinde, 2 olgunun “scattered”, 1 olgunun perivasküler, 1 olgunun ise diffüz patern gösterdiği saptanmıştır.

4.2. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ

Çalışmamızda hem PSSSL hem de nodal DBBHL olgularında tümör mikroçevresi, dijital görüntülerde, kantitatif yöntemlerle detaylı olarak incelenmiştir.

CD3 ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda değerlendirebilen 55 PSSSL ve 44 nodal DBBHL olgusu CD3+ T lenfosit sayıları açısından karşılaştırıldığında, PSSSL olgularının tümör mikroçevresinde anlamlı şekilde daha az CD3+ T lenfosit bulunduğu tespit edilmiştir ($p=0.000$) (Tablo 4.4).

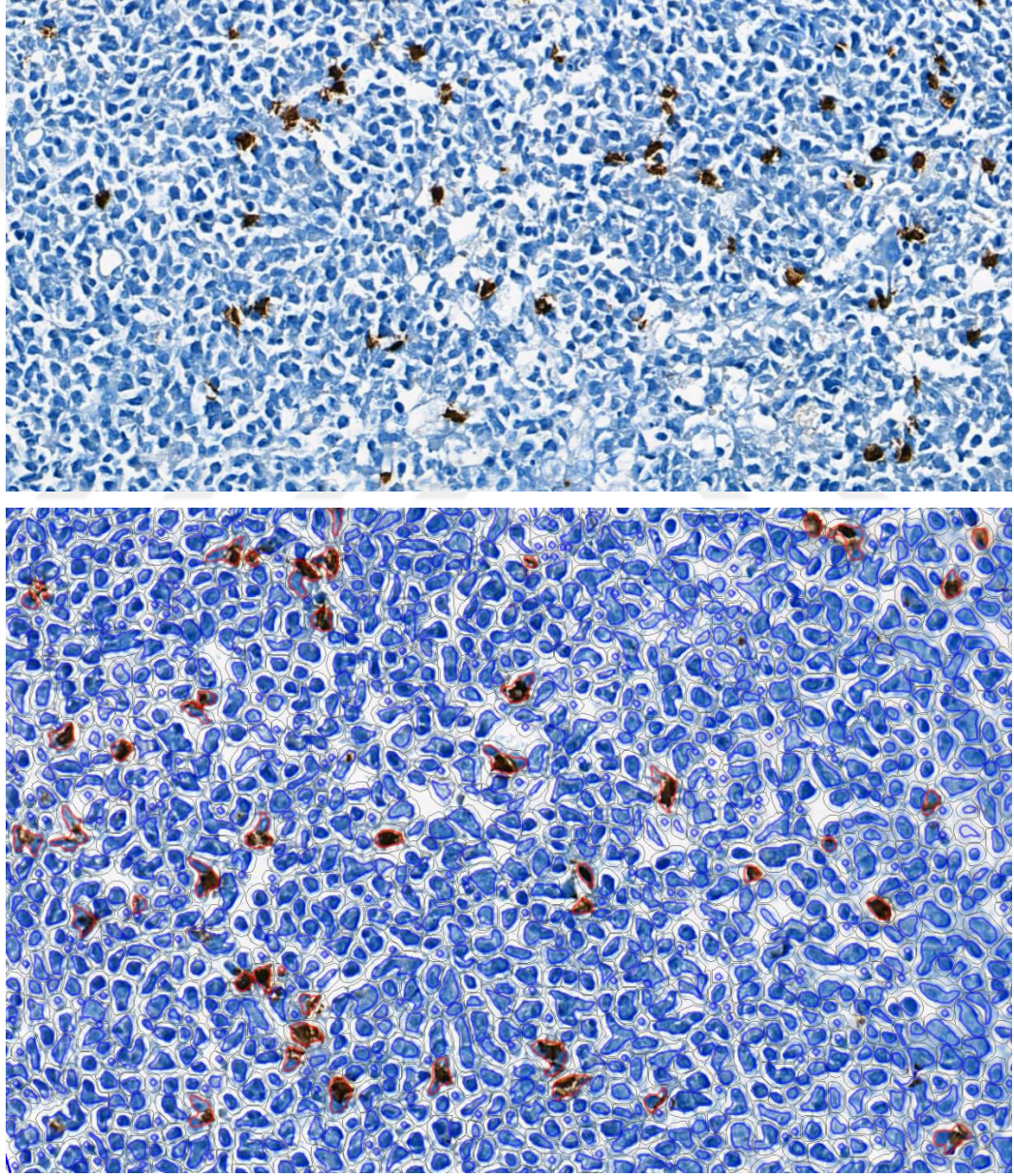
Tablo 4.4. CD3 İmmünohistokimyası ile mm^2 'de pozitif T lenfosit sayısı

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	55	1104,16	$\pm 1229,618$	666	70	7000	,000
Nodal DBBHL	44	3250,25	$\pm 2157,829$	3396	321	7692	
Total	99	2057,98	$\pm 2006,233$	1309	70	7692	

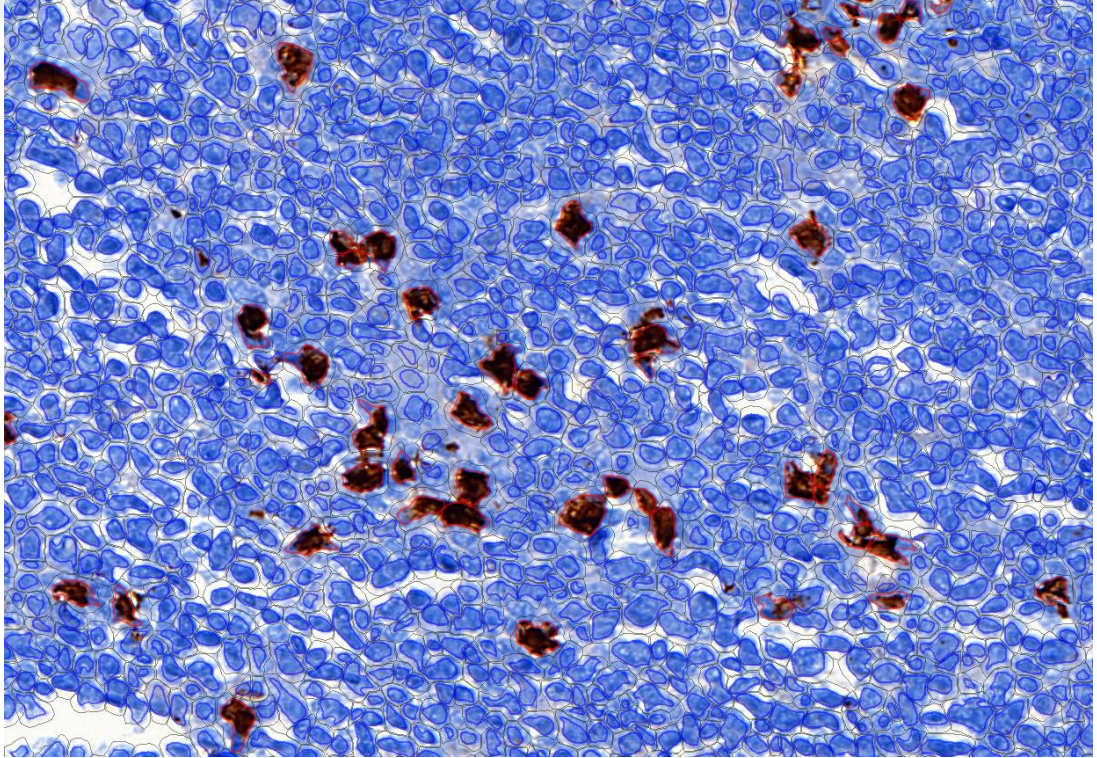
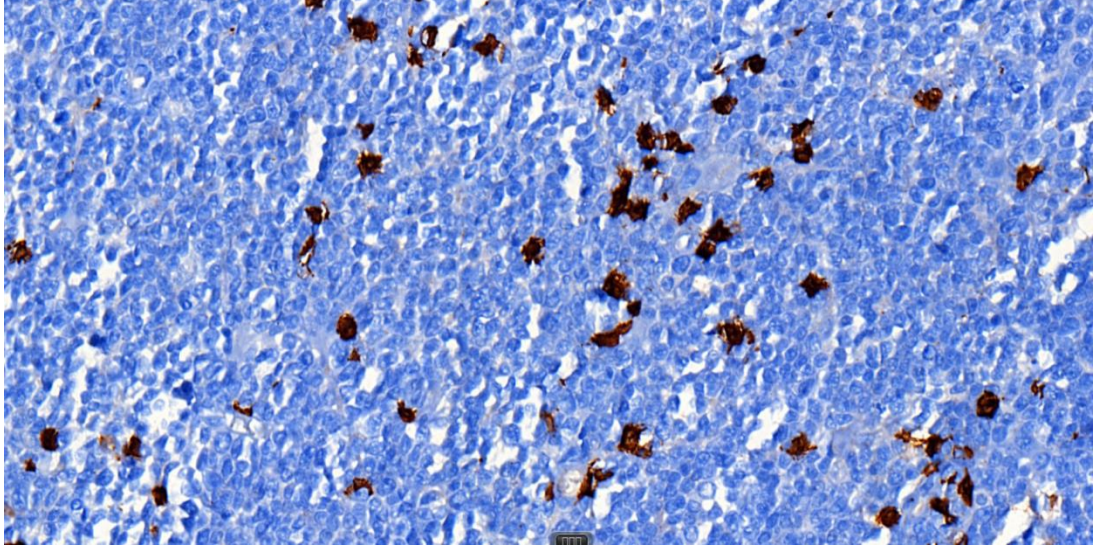
CD8 ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede 55 PSSSL olgusunda mm^2 'de ortalama 852 T lenfosit sayılmış, nodal DBBHL grubunda ise bu değer 1651 olarak saptanmıştır. PSSSL olgularında CD8+ T lenfositlerin, nodal DBBHL grubuna kıyasla anlamlı olarak daha az sayıda bulunduğu saptanmıştır ($p=0.000$) (Tablo 4.5) (Resim 4.2, 4.3).

Tablo 4.5. CD8 İmmünohistokimyası ile mm²'de pozitif T lenfosit sayısı

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	55	852,16	±1121,500	388	55	6540	,000
Nodal	44	1651,25	±1326,640	1270	88	5241	
DBBHL							
Total	99	1207,31	±1274,582	696	55	6540	



Resim 4.2. CD3 değerlendirmelerine ait, QuantCenter programı sayımları (Dijital görüntü x35)



Resim 4.3. CD8 değerlendirmelerine ait, QuantCenter programı sayımları (Dijital görüntü x35)

CD8/CD3 oranı PSSSL ve nodal DBBHL grupları arasında karşılaştırıldığında, PSSSL olgularının anlamlı olarak daha yüksek sitotoksik T lenfosit bulundurduğu saptanmıştır (%76 vs. %48) (p=0.000) (Tablo 4.6).

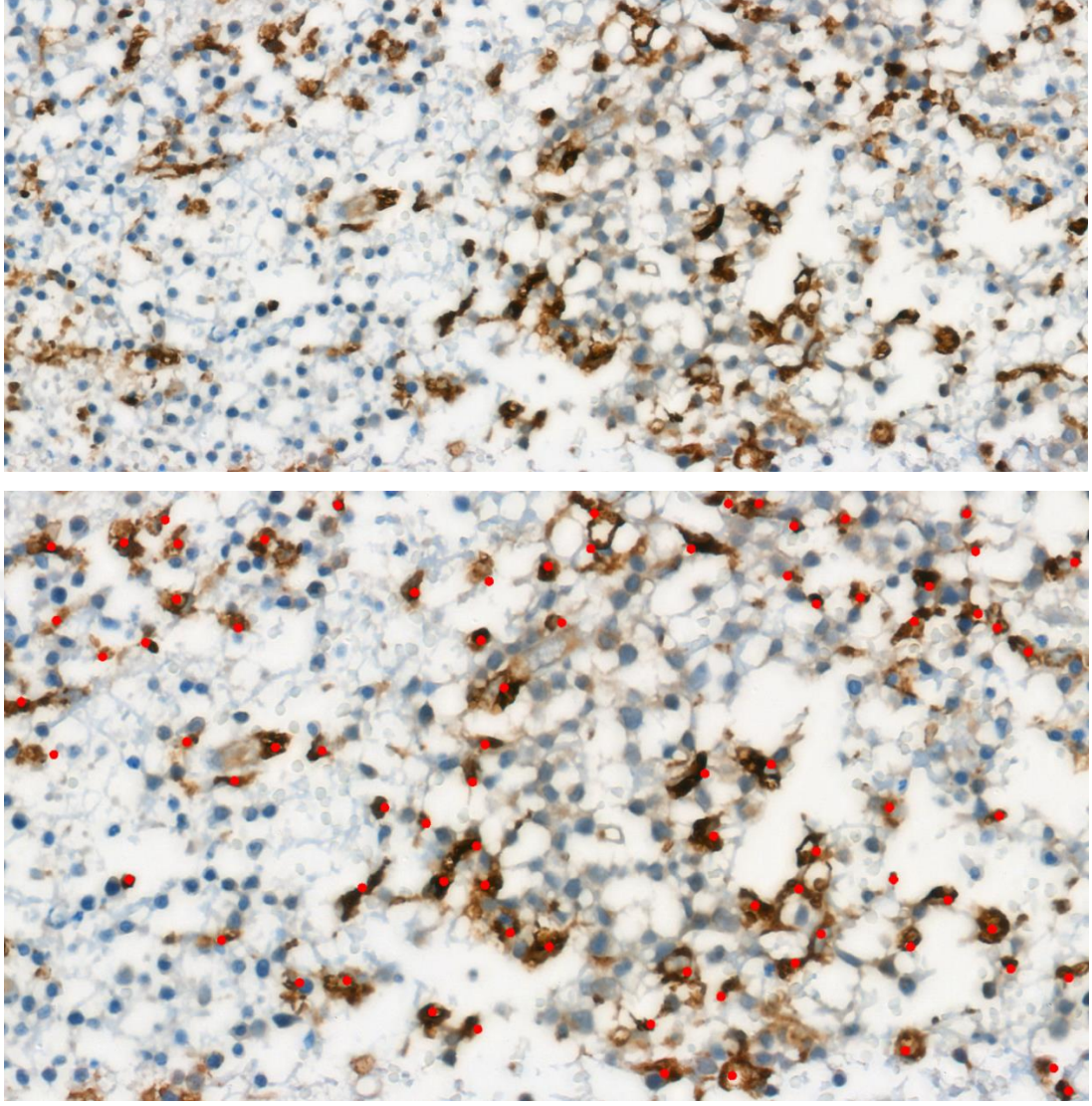
Tablo 4.6. CD8/CD3 oranı

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	55	,7687	,34491	,7317	,04	1.71	,000
Nodal DBBHL	43	,4886	,23781	,4719	,09	,96	
Total	98	,6458	,33201	,6049	,04	1.71	

CD68 ile pozitif histiyosit sayıları karşılaştırıldığında, PSSSL grubunda ortalama değer 835, nodal DBBHL grubunda ise 1143 olarak saptanmış; PSSSL olgularının mikroçevrede anlamlı şekilde daha az CD68+ histiyosit bulundurduğu gösterilmiştir (p=0.001) (Tablo 4.7) (Resim 4.4).

Tablo 4.7. CD68 İmmünohistokimyası ile mm²'de pozitif histiyosit sayısı

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	54	835,70	±444,746	763,50	94	1825	,001
Nodal DBBHL	44	1143,23	±438,752	1186,50	185	2073	
Total	98	973,78	±465,886	915,50	94	2073	



Resim 4.4. CD68 değerlendirmelerine ait, CaseViewer programı sayımları (Dijital görüntü x35)

PSSSL olgularında sıklıkla uygulanan preoperatif steroid tedavisinin mikroçevre üzerinde etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla, preoperatif steroid tedavisi alan PSSSL olguları ile almayanlar arasında CD3, CD8 ve CD68 değerleri karşılaştırılmış, bunlarda anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.632$, $p=0.910$, $p=0.463$) (Tablo 4.8, 4.9, 4.10).

Tablo 4.8. PSSSL’de preoperatif steroid tedavisi ile CD3+ TIL ilişkisi

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
Steroid-	11	994,36	±1029,797	477	91	3004	,632
Steroid+	31	1141,29	±1425,336	608	70	7000	
Total	42	1102,81	±1322,669	603	70	7000	

Tablo 4.9. PSSSL’de preoperatif steroid tedavisi ile CD8+ TIL ilişkisi

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
Steroid-	11	881	±1034,022	512	61	2980	,910
Steroid+	31	841,94	±1262,701	375	55	6540	
Total	42	852,17	±1194,876	380,05	55	6540	

Tablo 4.10. PSSSL’de preoperatif steroid tedavisi ile CD68+ histiyosit ilişkisi

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
Steroid-	11	756,91	±589,595	695	94	1813	,463
Steroid+	31	822,94	±372,532	736	243	1614	
Total	42	805,64	±432,661	707,50	94	1813	

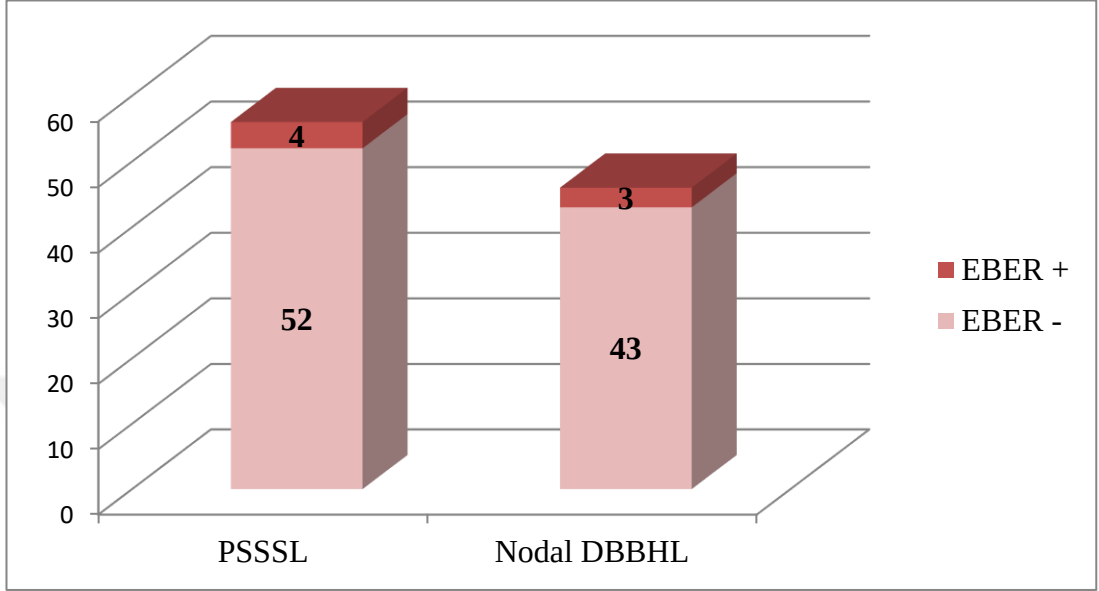
CD8/CD4 oranı ile genel sağkalım arasında, hem PSSSL hem de nodal DBBHL grubunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilememiştir (p=0.701, p=0.823).

Mann-Whitney ve Cox Regression analizleri ile, hem PSSSL hem de nodal DBBHL grubunda, CD3, CD8, CD68 düzeyleri ile genel sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (p=0.153, p=0.394, p=0.912; p=0.393, p=0.980, p=0.237).

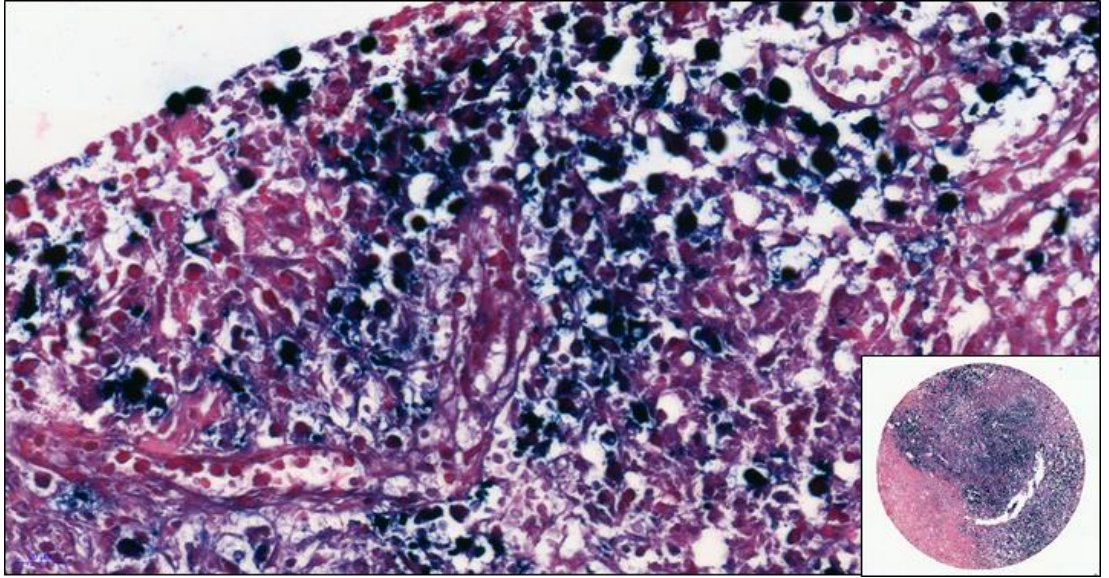
4.3. EBV

Teknik nedenlerle değerlendirmeye alınamayan 1 PSSSL olgusu dışındaki tüm vakaların EBER in-situ hibridizasyon değerlendirmesinde, PSSSL grubunda 4

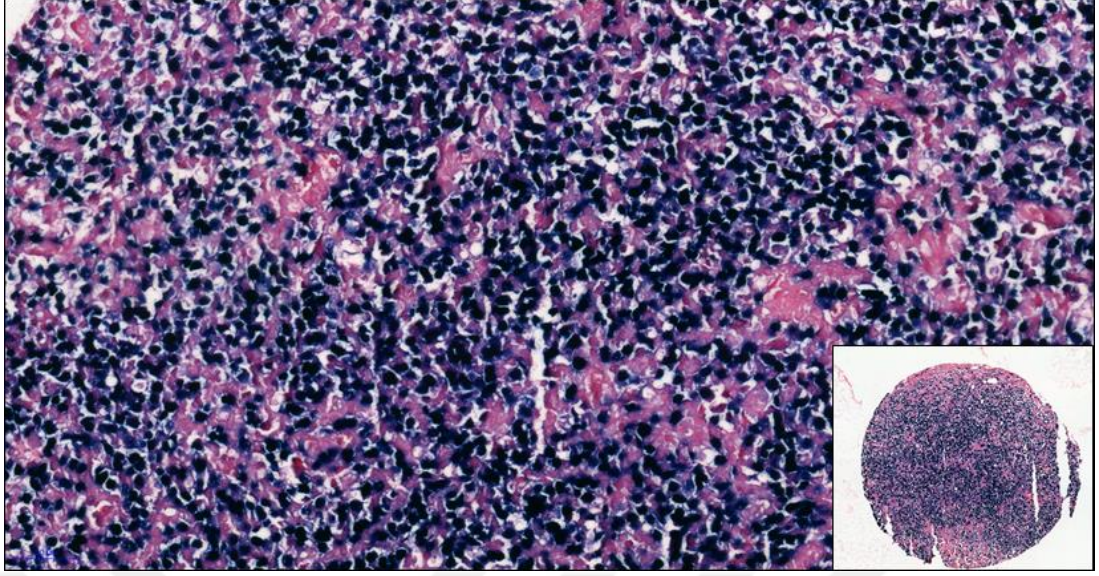
(%7.1), nodal DBBHL grubunda ise 3 (%6.7) olguda EBV pozitifliği saptanmış; iki grup arasında fark izlenmemiştir ($p=1.000$) (Şekil 4.1) (Resim 4.5, 4.6).



Şekil 4.1. Hasta gruplarında EBER pozitifliği



Resim 4.5. EBER pozitif olgu (Dijital görüntü x45.8, inset x7)



Resim 4.6. EBER pozitif olgu (Dijital görüntü x23.2, inset x7)

PSSSL grubunda EBER pozitif olguların yaş ortalamaları negatif olgularla karşılaştırıldığında, EBV pozitif olguların ortalama yaşı 42, negatif olguların ortalama yaşı 57.21 olarak bulunmuş, anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.052$). Nodal DBBHL hastalarında ise EBER pozitif olguların ortalama yaşı 59.33, negatif olguların 59.45 bulunmuş, anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.983$).

Çalışmamızda EBV pozitifliği gösteren olguların klinik özgeçmişleri incelendiğinde, PSSSL tanılı 4 olgudan 2'sinin klinik bilgisine ulaşamamış, 1'inin otoimmün hepatit nedeniyle yaklaşık 5 yıldır immün baskılayıcı tedavi aldığı öğrenilmiş, 1 olguda ise özgeçmişte özellik saptanmamıştır. Nodal DBBHL tanılı ve EBV pozitifliği izlenen 3 olgunun birinin özgeçmişinde özellik bulunmazken, 1 vakanın aktif hepatit B hastası olduğu, 1 vakanın ise 10 sene önce Hodgkin lenfoma öyküsü bulundurduğu saptanmıştır.

Her iki hasta grubunda olgular tümör mikroçevresi ve EBV ilişkisi açısından incelenmiştir. Ortalama CD3, CD8+ lenfosit, CD68+ histiyosit sayıları ve CD8/CD3 oranları EBV pozitif ve negatif olgular arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.743$, $p=0.938$, $p=0.127$, $p=0.412$; $p=0.143$, $p=0.036$, $p=0.107$) (Tablo 4.11, 4.12, 4.13).

Tablo 4.11. EBER ve CD8/CD3 lenfositlerin oranı

EBER	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
Negatif	91	,6387	±,32895	,6012	,04	1,71	,412
Pozitif	7	,7375	±,38521	,7795	,14	1,34	
Total	98	,6458	±,33201	,6049	,04	1,71	

Tablo 4.12. PSSSL’de EBV ve mikroçevre ilişkisi

EBER	CD3	CD8	CD68
Negatif	Sayı	51	51
	Ortalama	1093,12	842,14
	Std.	125,881	1130,735
	Sapma		435,800
	Ortanca	608	388
	Min	82	55
	Max	7000	6540
Pozitif	Sayı	4	4
	Ortalama	1245	980
	Std.	1032,807	1143,176
	Sapma		477,511
	Ortanca	1200	656
	Min	70	94
	Max	2510	2514
Toplam	Sayı	55	55
	Ortalama	1104,16	852,16
	Std.	1229,618	1121,500
	Sapma		444,746
	Ortanca	660	388
	Min	70	55
	Max	7000	6540
p	,743	,938	,127

Tablo 4.13. Nodal DBBHL’de EBV ve mikroçevre ilişkisi

EBER		CD3	CD8	CD68
Negatif	Sayı	41	41	41
	Ortalama	3129	1546,34	1117,39
	Std.	2181,685	1302,213	440,853
	Sapma			
	Ortanca	3193	1194	1103
	Min	321	88	185
	Max	7692	5241	2073
Pozitif	Sayı	3	3	3
	Ortalama	4907,33	3085	1496,33
	Std.	702,588	784,351	226,023
	Sapma			
	Ortanca	4587	3432	1582
	Min	4422	2187	1240
	Max	5713	3636	1667
Toplam	Sayı	44	44	44
	Ortalama	3250,25	1651,25	1143,23
	Std.	2157,829	1326,640	438,752
	Sapma			
	Ortanca	3396	1270,50	1186,50
	Min	321	88	185
	Max	7692	5241	2073
p		,143	,036	,107

EBV pozitif olgular, negatif vakalarla PD-1 ifade düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, PSSSL olgularında EBV negatifliği daha yüksek PD-1 ifadesi ile ilişkili bulunmuştur (p=0.036). Nodal DBBHL olgularında ise EBV ile PD-1 ifadesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.589, p=0.747) (Tablo 4.14, 4.15).

Tablo 4.14. PSSSL’de EBV ve PD-1 ifade ilişkisi

EBER		PD-1 (mm ²)	PD-1/CD3 oranı
Negatif	Sayı	51	52
	Ortalama	323,57	18,9731
	Std. Sapma	939,193	23,580
	Ortanca	64	11
	Min	0	0
	Max	5885	100
Pozitif	Sayı	4	4
	Ortalama	11	6,7500
	Std. Sapma	7,394	10,24288
	Ortanca	14	2,5000
	Min	0	0
	Max	16	22
Toplam	Sayı	55	56
	Ortalama	300,84	18,100
	Std. Sapma	907,446	23,05217
	Ortanca	57	11
	Min	0	0
	Max	5885	100
p		,040	,230

Tablo 4.15. Nodal DBBHL’de EBV ve PD-1 ifade ilişkisi

EBER		PD-1 (mm ²)	PD-1/CD3 oranı
Negatif	Sayı	42	42
	Ortalama	305,40	8,1167
	Std. Sapma	789,589	18,62014
	Ortanca	40	2
	Min	0	0
	Max	3770	86
Pozitif	Sayı	3	3
	Ortalama	397,67	8,3333
	Std. Sapma	530,487	11,93035
	Ortanca	193	3
	Min	0	0
	Max	1000	22
Toplam	Sayı	45	45
	Ortalama	311,56	8,1311
	Std. Sapma	770,893	18,15332
	Ortanca	45	2
	Min	0	0
	Max	3770	86
p		,589	,747

EBV pozitif olgularda PD-L1 ifade düzeyleri karşılaştırıldığında, PSSSL grubunda EBV pozitifliği tümörde ve mikroçevrede daha yüksek PD-L1 ifadesi ile ilişkili bulunmuştur (p=0.056, p=0.051) (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. PSSSL’de EBV ve PD-L1 ifade ilişkisi

EBER		Tümörde PD-L1	Mikroçevrede PD-L1
Negatif	Sayı	50	50
	Ortalama	8,96	34,94
	Std. Sapma	27,358	30,734
	Ortanca	0	25
	Min	0	0
	Max	100	100
Pozitif	Sayı	4	4
	Ortalama	42,50	63
	Std. Sapma	43,493	28,213
	Ortanca	35	56
	Min	0	40
	Max	100	100
Toplam	Sayı	54	54
	Ortalama	11,44	37,02
	Std. Sapma	29,626	31,199
	Ortanca	0	26
	Min	0	0
	Max	100	100
p		,056	,051

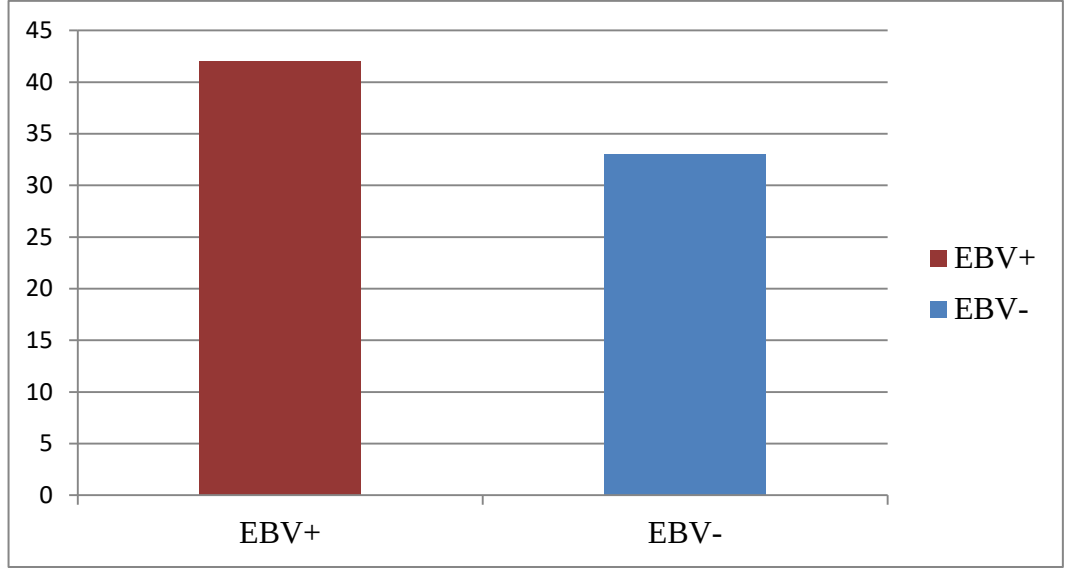
Nodal DBBHL grubunda, tümörde ya da mikroçevrede PD-L1 ifadesi, EBV ile ilişkisiz bulunmuştur ($p=0.702$, $p=0.078$). (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Nodal DBBHL’de EBV ve PD-L1 ifade ilişkisi

EBER		Tümörde PD-L1	Mikroçevrede PD-L1
Negatif	Sayı	40	41
	Ortalama	12,87	37,71
	Std. Sapma	33,405	31,019
	Ortanca	0	28
	Min	0	0
	Max	100	100
Pozitif	Sayı	3	3
	Ortalama	33,33	64,33
	Std. Sapma	57,735	30,925
	Ortanca	0	48
	Min	0	45
	Max	100	100
Toplam	Sayı	43	44
	Ortalama	14,30	39,52
	Std. Sapma	34,968	31,394
	Ortanca	0	30
	Min	0	0
	Max	100	100
p		,702	,078

Çalışmamızda EBV pozitif 7 olgunun 4’ünde FISH ile amplifikasyon varlığı değerlendirilmiş, bunların hiçbirinde amplifikasyon saptanmamıştır.

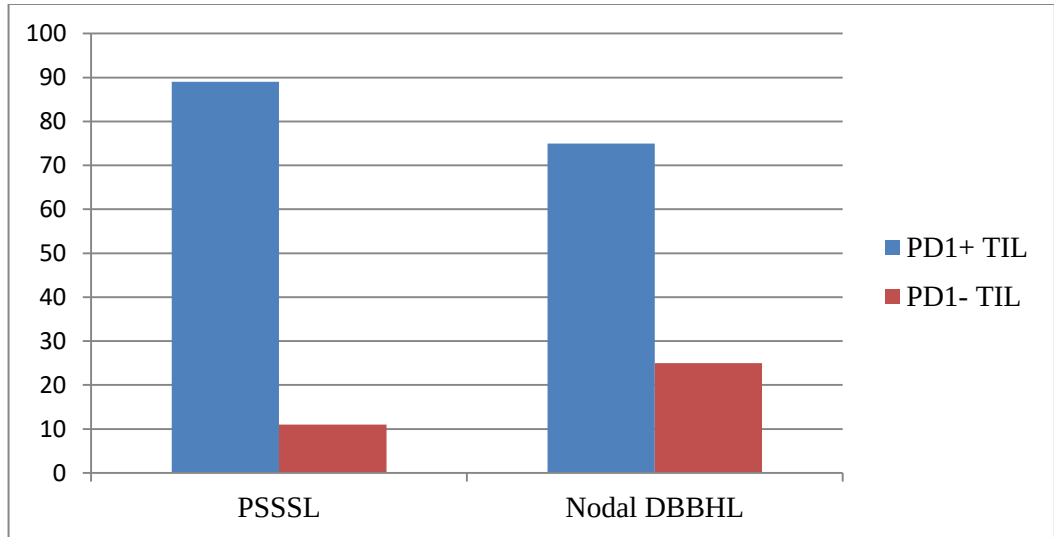
PSSSL olgularında EBV pozitif olguların ortalama sağkalım süresi 42 ay, negatif olguların ise 33 ay olarak bulunmuş; EBV pozitifliği ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.383$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. PSSSL olgularında EBV ifadesi ve ortalama sağkalım

4.4. PD-1 ve PD-L1 İFADESİ

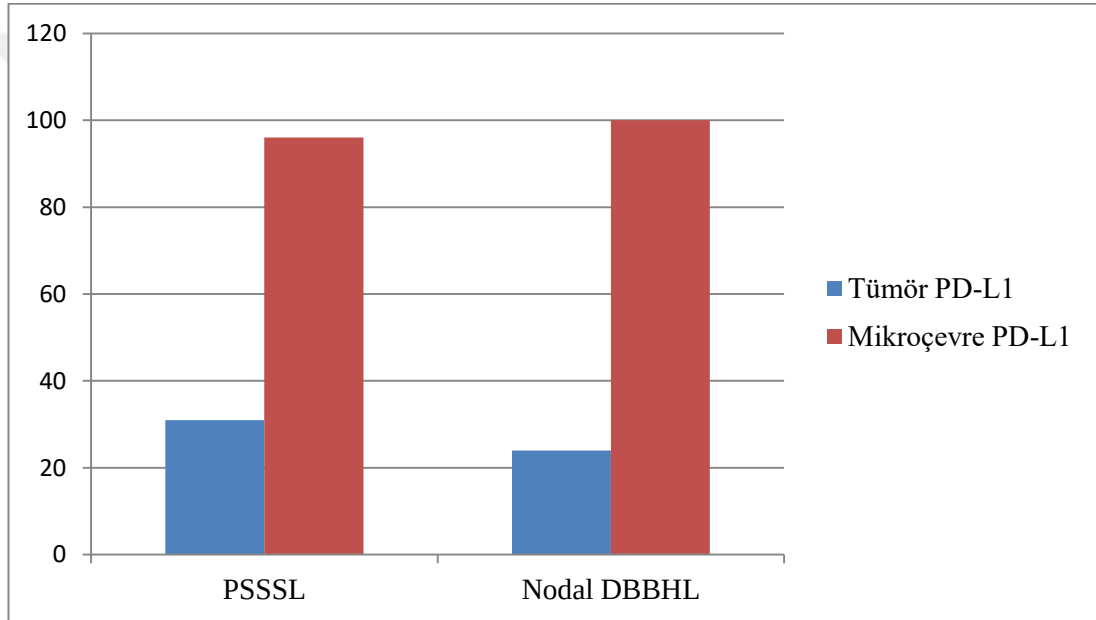
Çalışmamızda PSSSL olgularının sadece 6'sında (%11) PD-1 negatif bulunmuş, olguların %89'unda reaktif T lenfositlerde çeşitli düzeylerde pozitiflik saptanmıştır. Nodal DBBHL hastalarının ise 34'ünde (%75) mikroçevrede PD-1 pozitifliği izlenmiş, %25'i tümüyle negatif bulunmuştur (Şekil 4.3) (Resim 4.7).



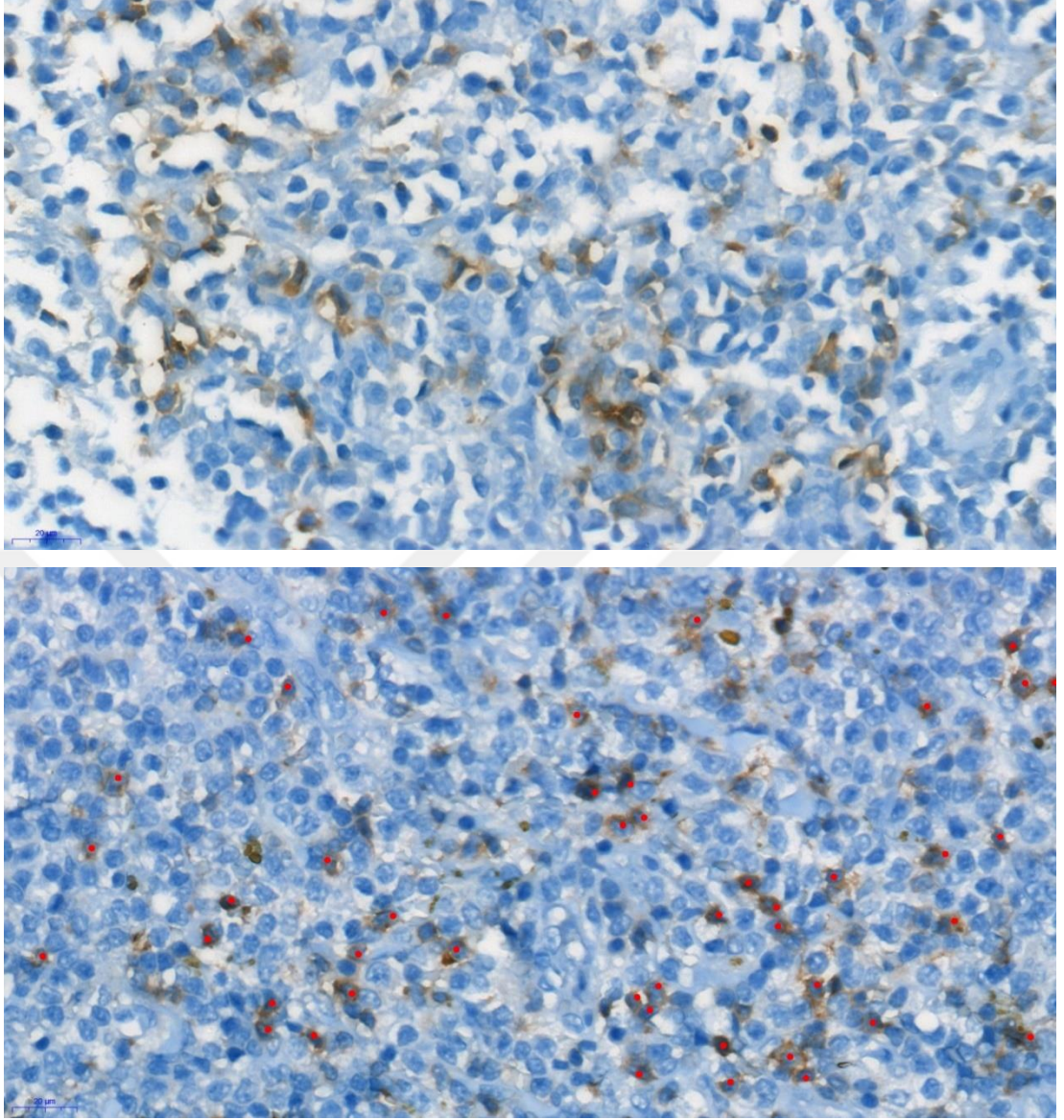
Şekil 4.3. Hasta gruplarında PD-1 pozitifliği (%)

PSSSL olgularının 17'sinde (%31) tümörde çeşitli düzeylerde PD-L1 ifadesi saptanmış, %69'u negatif bulunmuştur. Nodal DBBHL olgularının ise 11'inde (%24) tümörde PD-L1 ifadesi saptanmıştır (Şekil 4.4) (Resim 4.9).

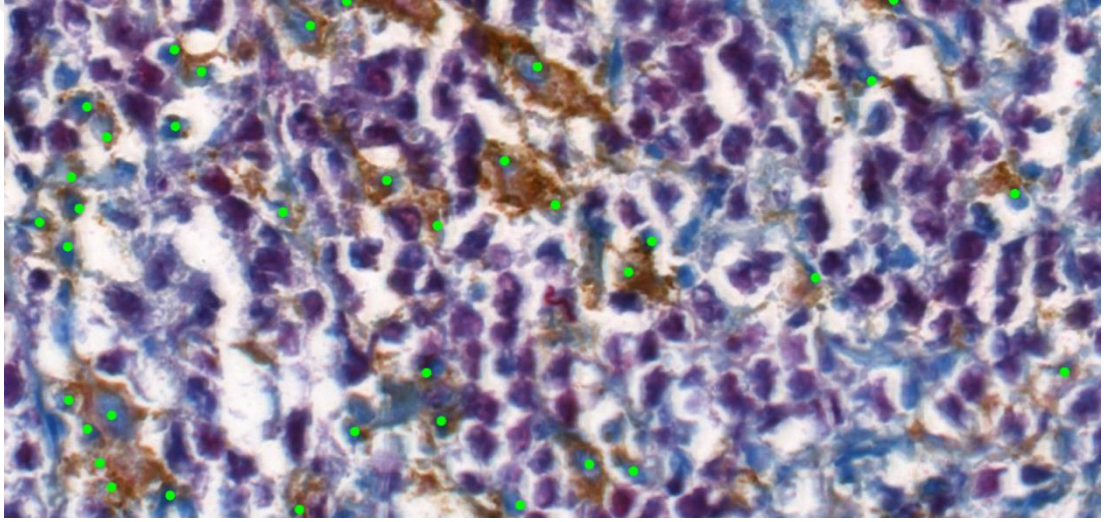
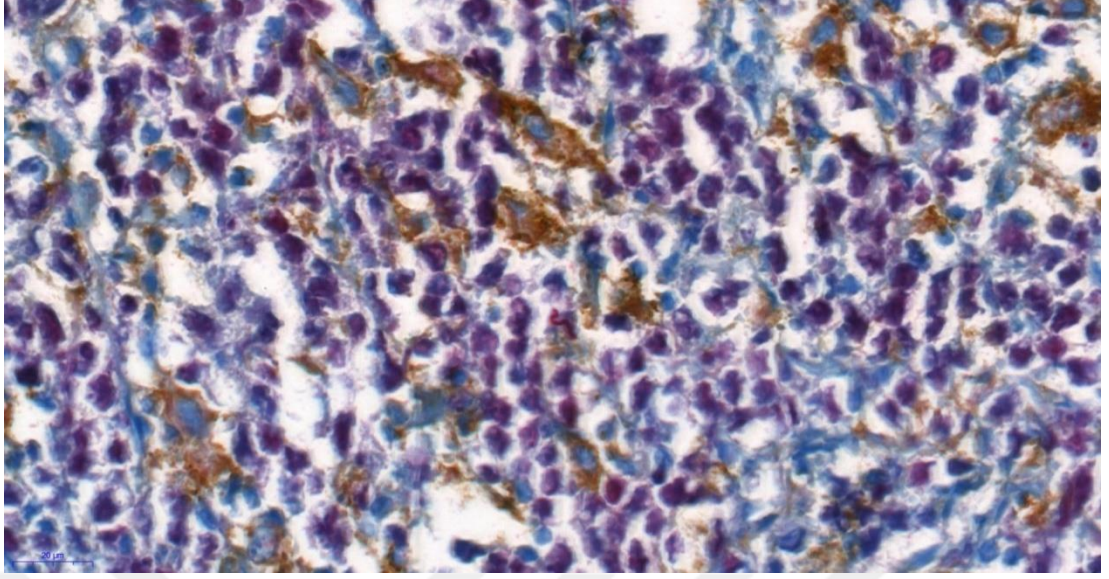
Mikroçevredeki PD-L1 ifadesi her iki grupta daha yüksek olup, PSSSL olgularının sadece 2'si negatif bulunmuş, değerlendirilebilen 54 olgunun 52'sinde (%96) çeşitli düzeylerde pozitiflik saptanmıştır. Nodal DBBHL grubunda ise değerlendirilebilen vakaların tümünde (44/44) mikroçevrede PD-L1 ifadesi saptanmıştır (Şekil 4.4) (Resim 4.8).



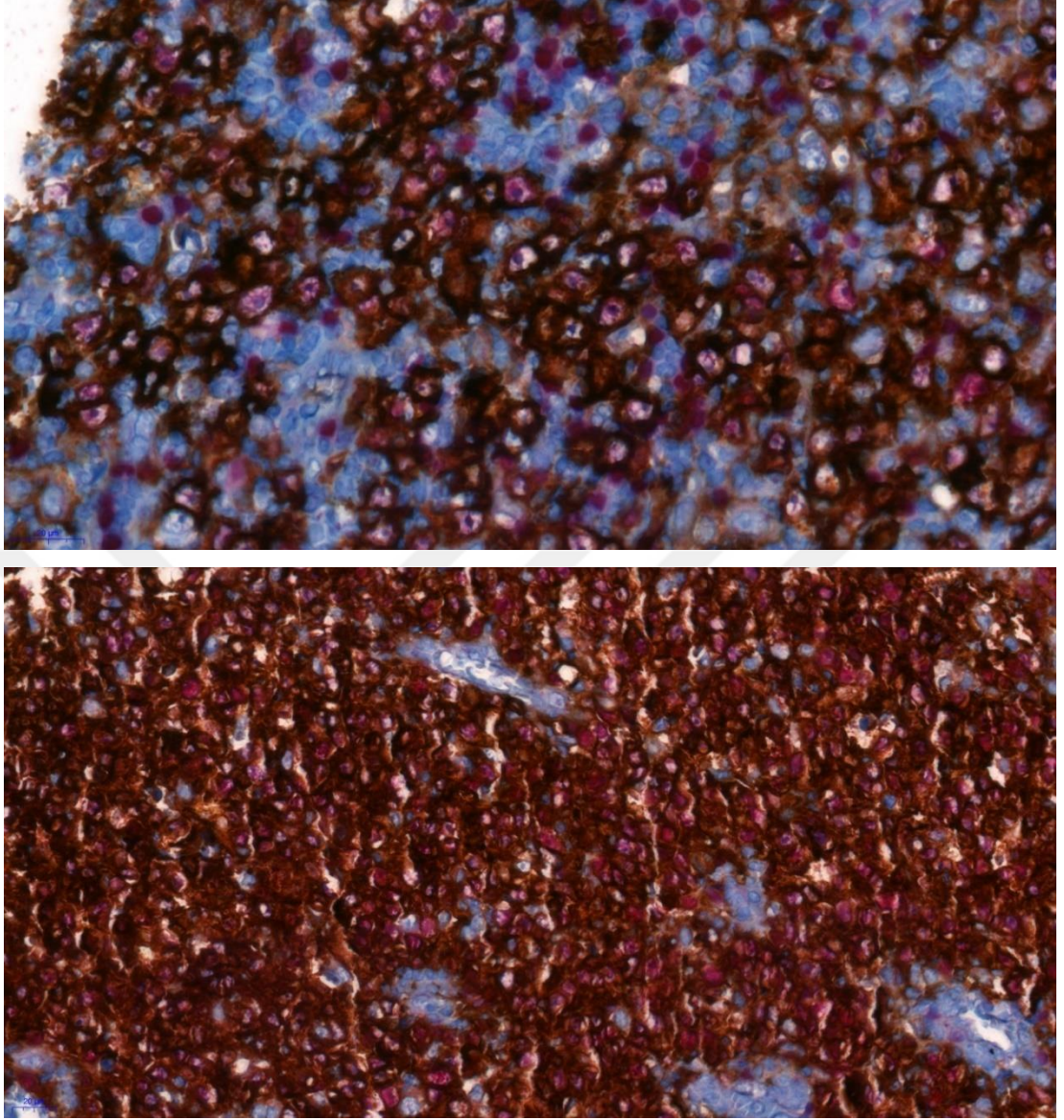
Şekil 4.4. Hasta gruplarında PD-L1 pozitifliği (%)



Resim 4.7. TIL’de PD-1 pozitifliği, CaseViewer Programları ile (Dijital görüntü x60)



Resim 4.8. Mikroçevrede PD-L1 pozitifliği, CaseViewer Programları ile (Dijital görüntü x60)



Resim 4.9. Tümörde PD-L1 pozitifliği, CaseViewer Programları ile (Dijital görüntü x60)

PSSSL ve nodal DBBHL olgularında mm^2 'de ortalama PD-1 pozitif lenfosit sayıları sırası ile 300 ve 311 bulunmuş, iki grup arasında herhangi bir cut-off konulmadan ve literatürde sık kullanılan %1 cut-off'u kullanıldığında anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.602$, $p=0.073$) (Tablo 4.18).

Tablo 4.18. TIL’de PD-1 ifadesi (mm²’deki + hücre sayısı) (Tüm hasta grubu)

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	55	300,84	±907,446	57	0	5885	,602
Nodal DBBHL	45	311,56	±770,893	45	0	3770	
Total	100	305,66	±844,577	51,5	0	5885	

PD-1 pozitif lenfositlerin CD3 pozitif lenfosit sayısına oranlanması ile elde edilen değerler karşılaştırıldığında ise, PSSSL grubunun daha yüksek ifade gösterdiği saptanmış ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (p=0.000) (Tablo 4.19). Bu anlamın, %1 cut-off’u uygulandığında da devam ettiği saptanmıştır (p=0.024).

Tablo 4.19. TIL’de PD-1 ifadesi (PD-1+ TIL/CD3 oranı) (Tüm hasta grubu)

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	56	18,100	±23,05217	11	0	100	,000
Nodal DBBHL	45	8,1311	±18,15332	2	0	86	
Total	101	13,6584	±21,49572	4	0	100	

İki grup, tümörde PD-L1 ifade düzeyleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmamıştır (p=0.487) (Tablo 4.20).

Tablo 4.20. Tümörde PD-L1 ifadesi (Tüm hasta grubu)

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	54	11,44	±29,626	,00	0	100	,487
Nodal DBBHL	43	14,30	±34,968	,00	0	100	
Total	97	12,71	±31,962	,00	0	100	

İki grup, mm²'deki hücreler sayılarak karşılaştırıldığında, nodal DBBHL grubunda mikroçevrede anlamlı şekilde daha yüksek PD-L1 ifadesi saptanmıştır (p=0.10) (Tablo 4.21).

Tablo 4.21. Mikroçevrede PD-L1 ifadesi (mm²'de + hücrelerin oranı) (Tüm hasta grubu)

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	53	536,34	±568,067	395	0	2614	,010
Nodal DBBHL	44	1009,16	±947,738	577,5	83	3477	
Total	97	750,81	±795,678	498	0	3477	

Sadece EBV negatif olgular PD-L1 ifadesi açısından karşılaştırıldığında, benzer sonuçlar elde edilmiş; PSSSL ve nodal DBBHL olgularında tümörde PD-L1 ifadeleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.671) (Tablo 4.22).

Tablo 4.22. Tümörde PD-L1 ifadesi (EBV negatif olgular)

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	5	8,96	±27,358	,00	0	100	,671
Nodal DBBHL	40	12,87	±33,405	,00	0	100	
Total	90	10,70	±30,082	,00	0	100	

EBV negatif olgularda mikroçevrede PD-L1 ifadesi karşılaştırıldığında, milimetrekaredeki pozitif hücre sayıları ile yapılan analizde, nodal DBBHL grubunun daha yüksek değerler bulundurduğu saptanmıştır (p=0.010). (Tablo 4.23).

Tablo 4.23. Mikroçevrede PD-L1 ifadesi (mm²'de + hücrelerin oranı) (EBV negatif olgular)

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	50	508	±549,676	386	0	2614	,010
Nodal DBBHL	41	928,15	±845,124	542	83	3477	
Total	91	697,30	±725,343	485	0	3477	

EBV negatif olgular PD-1 ifade düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, tüm hasta grubu ile yapılan analize benzer şekilde, milimetrekaredeki pozitif hücre sayıları arasında fark izlenmemiş (p=0.330); CD3+ lenfositler içerisindeki oranlar karşılaştırıldığında PSSSL olgularında anlamlı olarak daha yüksek ifade saptanmıştır (p=0.000) (Tablo 4.24, 4.25).

Tablo 4.24. TIL'de PD-1 ifadesi (mm²'deki + hücre sayısı) (EBV negatif olgular)

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	51	323,57	±939,193	64	0	5885	,330
Nodal DBBHL	42	305,40	±789,589	40	0	3770	
Total	93	315,37	±870,240	61	0	5885	

Tablo 4.25. TIL'de PD-1 ifadesi (PD-1+ TIL/CD3 oranı) (EBV negatif olgular)

	Sayı	Ortalama	Std.Sapma	Ortanca	Min	Max	p
PSSSL	52	18,973	±23,58026	11	0	100	,000
Nodal DBBHL	42	8,116	±18,62014	2	0	86	
Total	94	14,1223	±22,072	4,5	0	100	

Tümörde ve mikroçevrede PD-L1 düzeyleri, hastalar 60 yaş eşik değeri konularak gruplandırıldığında, yaş ile ilişki bulunmamıştır ($p=0.253$, $p=0.052$). PD-1 ifadesi de benzer şekilde incelendiğinde yine anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$).

Çalışmamızda tümörde PD-L1 ifadesinin, CD3, CD8+ lenfosit sayıları, CD68+ histiyosit sayıları ve CD8/CD3 oranları ile korele olup olmadığı incelemiş, hem PSSSL hem de nodal DBBHL grubunda korelasyon saptanmamıştır ($p=0.897$, $p=0.429$, $p=0.676$, $p=0.341$; $p=0.812$, $p=0.866$, $p=0.078$, $p=0.833$).

PSSSL olgularında mikroçevrede PD-L1 ifadesi, CD3, CD8+ T lenfositler ve CD68+ histiyosit sayıları ile pozitif korele bulunmuştur ($p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.001$). Ancak CD8/CD3 oranı ile bir korelasyon saptanmamıştır ($p=0.438$). Nodal DBBHL olgularında ise mikroçevrede PD-L1 ifadesi, CD3 ve CD8+ T lenfosit sayıları ile pozitif korele bulunmuştur ($p=0.022$, $p=0.020$).

PSSSL'de PD-1 ifadesi, CD3 ve CD8+ lenfosit sayıları ile korele bulunmuştur ($p=0.000$, $p=0.000$). CD68 pozitif hücrelerle ve CD8/CD3 oranı ile korelasyon izlenmemiştir ($p=0.097$, $p=0.340$). Nodal DBBHL grubunda ise PD-1 ifadesi sadece CD3+ lenfositlerle korele bulunmuş ($p=0.010$), diğer parametrelerle korelasyon izlenmemiştir ($p>0.05$).

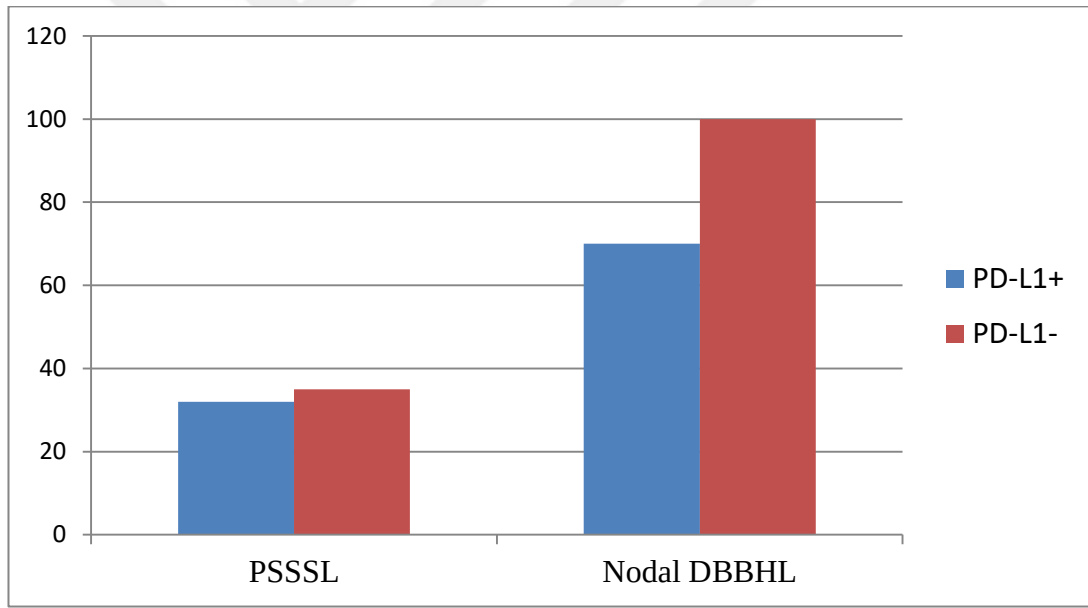
PSSSL'de ilginç olarak PD-1 ifadesi, tümörde ve mikroçevredeki PD-L1 ifadesi (%) ile negatif ilişkili bulunmuştur ($p=0.011$, $p=0.41$). Nodal DBBHL olgularında da PD-1 ile tümördeki PD-L1 ifadeleri negatif ilişkili bulunmuştur ($p=0.029$).

Sağkalım verilerine ulaşılabilen 47 PSSSL olgusunda, PD-1 ifade düzeyleri ile genel sağkalım arasında ilişki varlığı incelenmiş, Mann-Whitney-U ve Cox Regresyon testleri ile anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p=0.983$, $p=0.812$; $p=0.617$, $p=0.416$). Kontrol grubunda 30 olguda yapılan sağkalım analizlerinde de PD-1 ile ilişki bulunmamıştır ($p=0.142$, $p=0.078$; $p=0.665$, $p=0.758$).

PD-L1 ifadesinin genel sağkalımla ilişkisi 47 PSSSL ve 29 nodal DBBHL hastasında incelenebilmiştir. Tümörde ya da mikroçevrede PD-L1 ifadesi, genel sağkalımla ilişkisiz bulunmuştur ($p=0.969$, $p=0.620$, $p=0.749$; $p=0.678$, $p=0.784$, $p=0.181$).

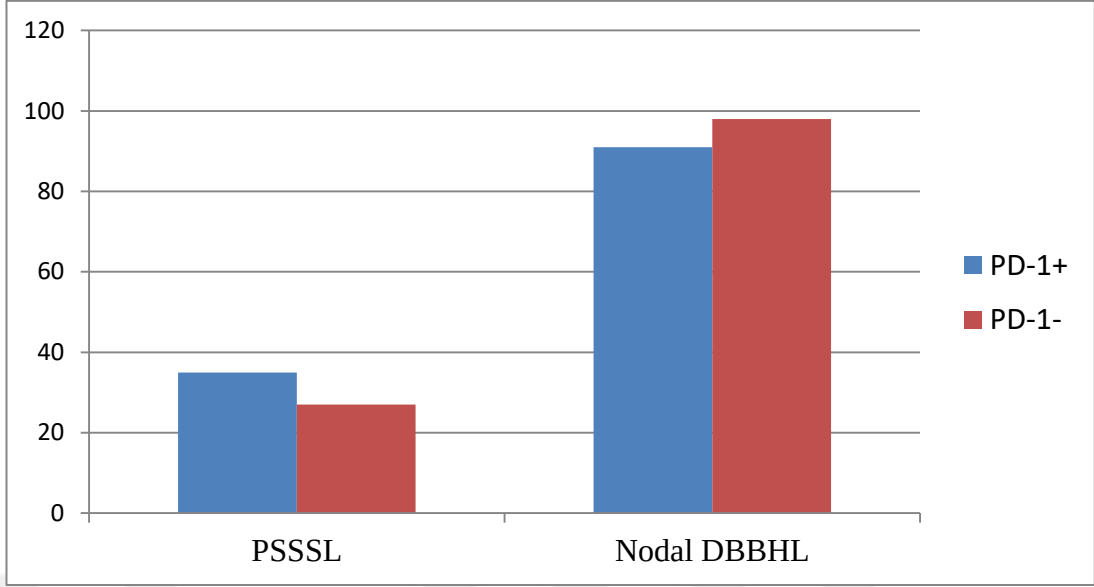
PSSSL grubunda 10 hastada, kontrol grubunda 26 hastada tedavi yanıtı verilerine ulaşılabilmiş, PD-1 ifadesi ile ilişki saptanmamıştır ($p=0.664$, $p=0.233$; $p=0.451$, $p=0.369$). PD-L1 ifadesi de, tedavi yanıtı ile ilişkisiz bulunmuştur ancak klinik verilerine ulaşılabilen hasta sayısının oldukça az olduğu için istatistiksel karşılaştırmanın gücü düşüktür ($p=0.800$, $p=0.293$, $p=0.709$; $p=0.392$, $p=0.398$, $p=0.921$).

Anlamlı fark saptanmamış olmakla birlikte, PSSSL olgularında tümörde PD-L1 ifade eden olguların ortalama sağkalımı 32 ay, PD-L1 negatif olguların ortalama sağkalımı 35 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.690$). Nodal DBBHL grubunda ise PD-L1 pozitif olguların ortalama sağkalımı 70 ay, negatif olguların 100 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.783$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Tümörde PD-L1 ifadesi ve sağkalım süreleri (ay)

PD-1 ifadesi gösteren PSSSL olgularının ortalama genel sağkalımı 35 ay, negatif olanların ise 27 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.813$). Nodal DBBHL olgularında ise PD-1+ olguların ortalama sağkalımı 91 ay, negatif olguların 98 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.213$) (Şekil 4.6).

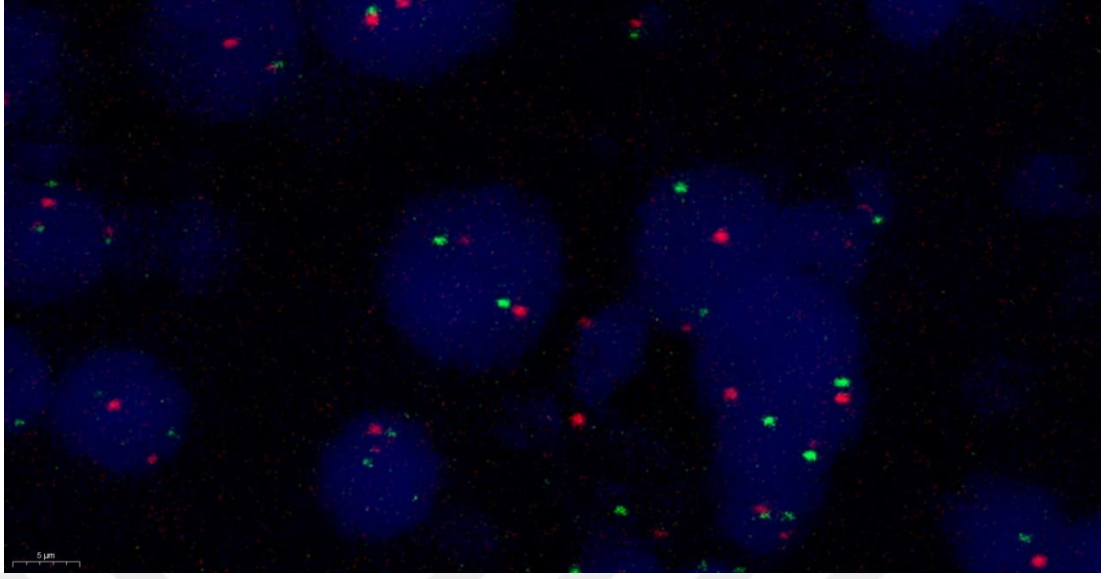


Şekil 4.6. TIL'de PD-1 ifadesi ve sağkalım süreleri (ay)

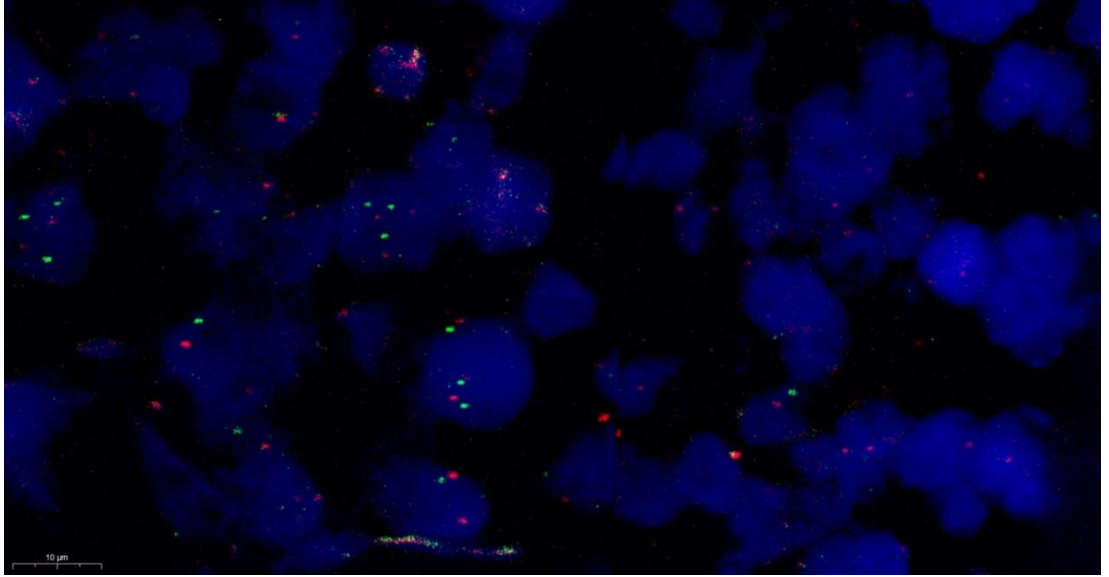
4.5. MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLER

PD-L1/PD-L2 gen bölgesinde amplifikasyon varlığı incelenen PSSSL olgularının 13'ünde, nodal DBBHL olgularının 20'sinde teknik nedenlerle inceleme yapılamamıştır. Değerlendirme yapılan 44 PSSSL olgusunun 5'inde polizomi (%11), 1'inde kopya sayısı artışı (%2.5), 1'inde amplifikasyon varlığı (%2.5) saptanmıştır. 25 nodal DBBHL olgusunun ise 5'inde kopya sayısı artışı (%20), 1'inde amplifikasyon (%4), 1'inde polizomi (%4) saptanmıştır (Resim 4.10, 4.11, 4.12, 4.13).

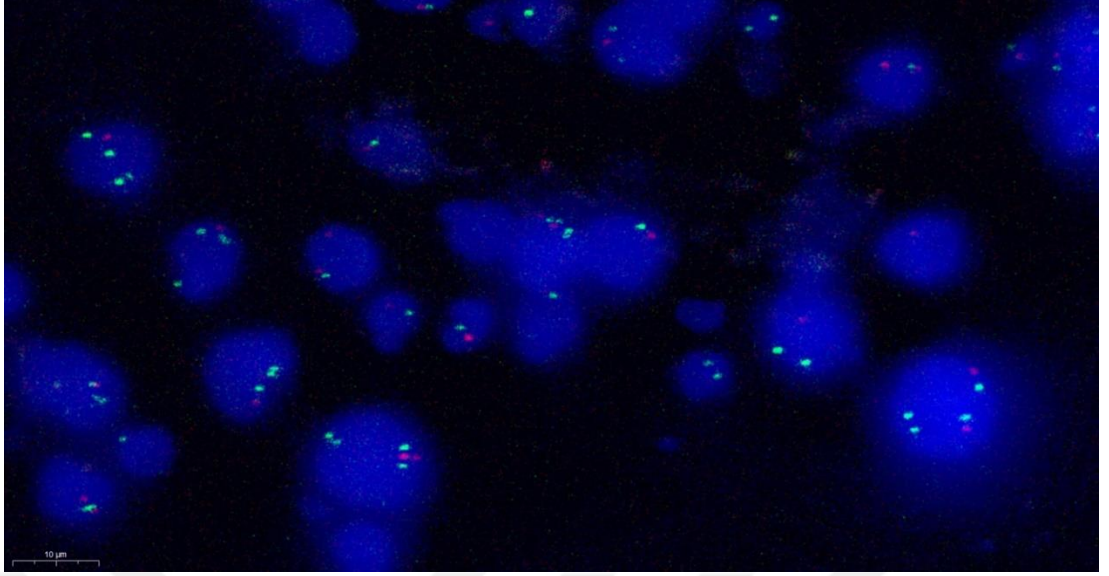
Break-apart probe'u ile translokasyon varlığını araştırmaya yönelik yapılan incelemelerde, teknik olarak değerlendirilebilen 44 PSSSL olgusunun 2'sinde translokasyon saptanmış (%4.5), nodal DBBHL olgularında değerlendirilebilen 30 vakada translokasyon izlenmemiştir (Resim 4.14, 4.15). Translokasyon saptanan olgulardan 1'i dokuda yüksek düzeyde PD-L1 ifadesi gösterirken, diğerinde tümörde PD-L1 negatif izlenmiştir.



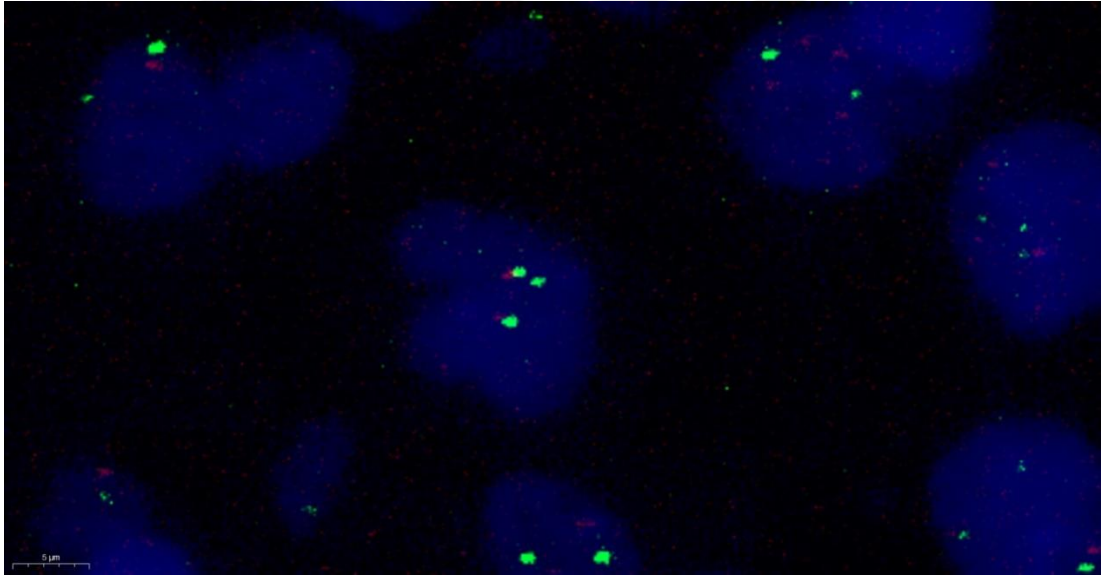
Resim 4.10. PD-L1/PD-L2 amplifikasyon probe'u ile normal sinyal varlığı (Dijital görüntü x236)



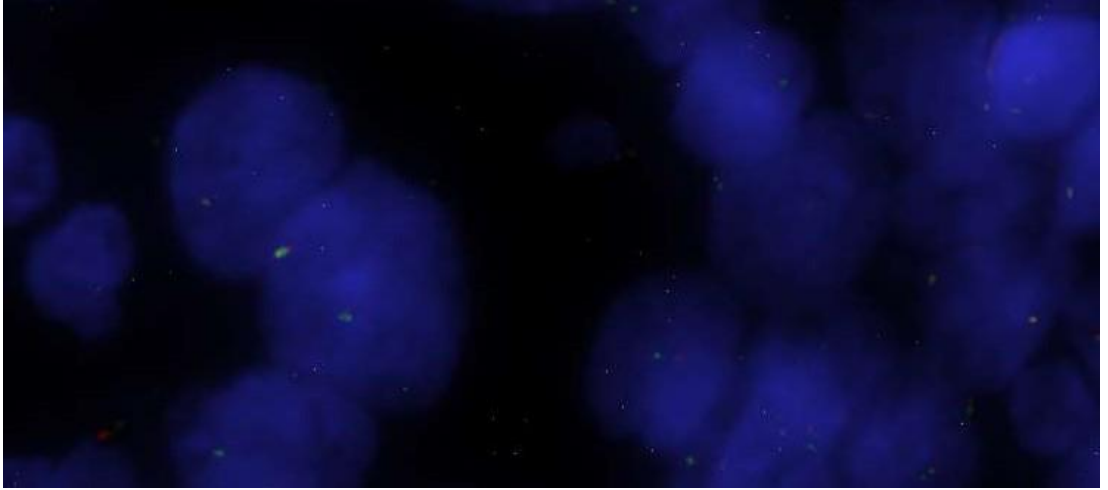
Resim 4.11. PD-L1/PD-L2 amplifikasyon probe'u ile polizomi (Dijital görüntü x236)



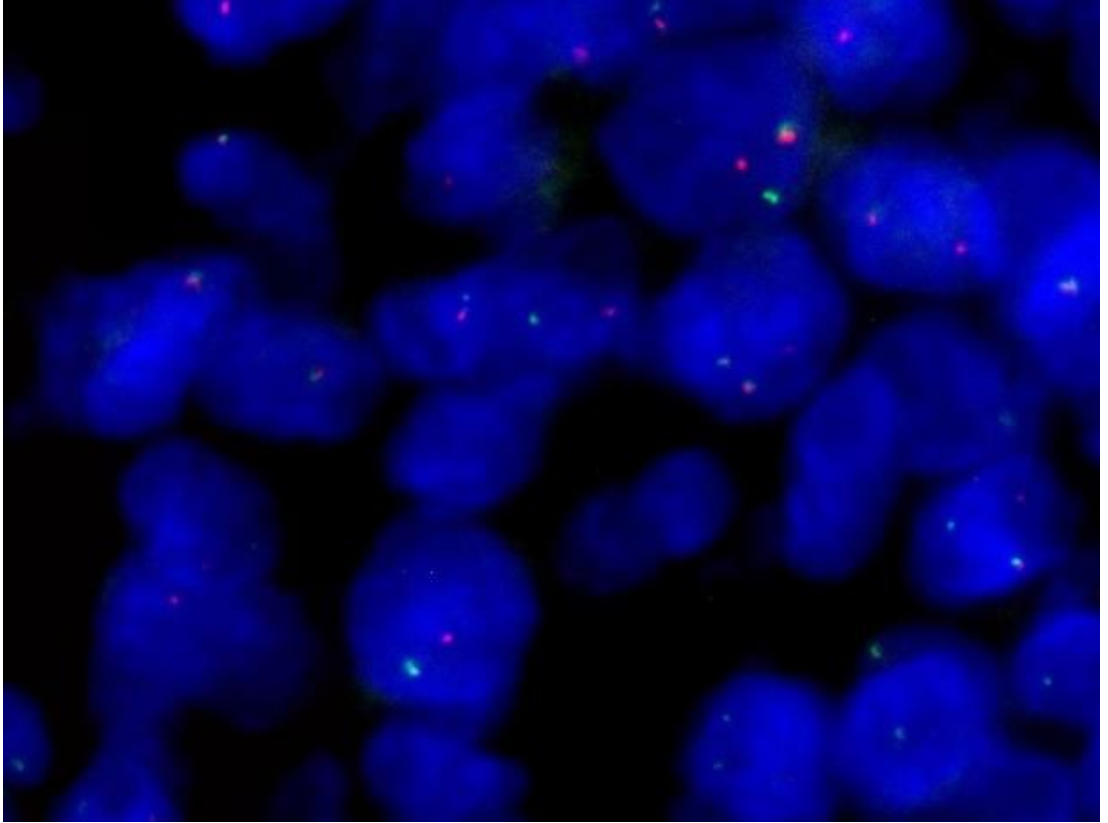
Resim 4.12. PD-L1/PD-L2 amplifikasyon probe'u ile amplifikasyon (Dijital görüntü x236)



Resim 4.13. PD-L1/PD-L2 amplifikasyon probe'u ile kopya sayısı artışı (Dijital görüntü x236)



Resim 4.14. PD-L1/PD-L2 break-apart probe'u ile normal füzyon sinyali (Dijital görüntü x100)



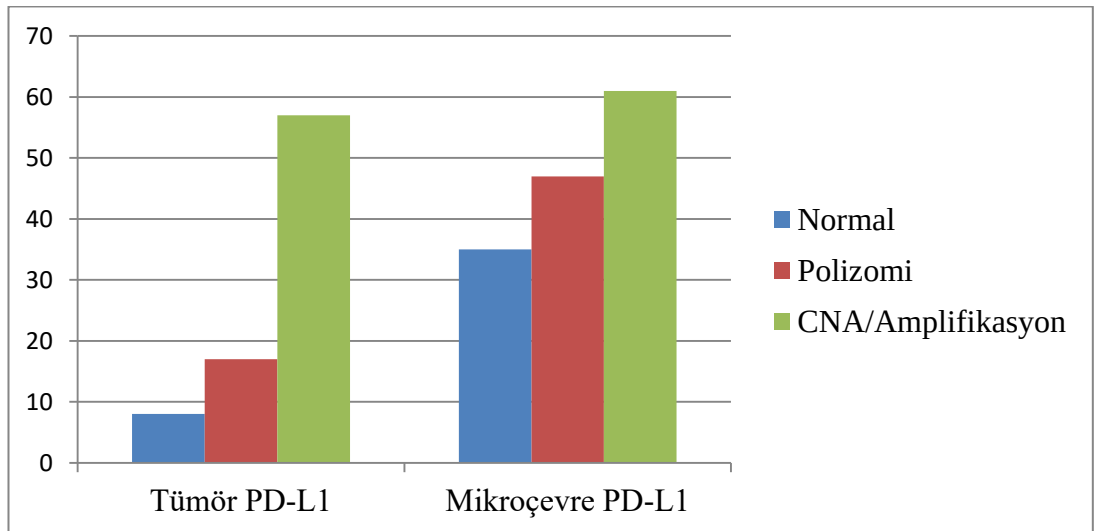
Resim 4.15. PD-L1/PD-L2 break-apart probe'u ile translokasyon varlığı (Dijital görüntü x100)

Kopya sayısı değışikliği/amplifikasyon izlenen PSSSL olguları EBV negatiftir ve 1'i dokuda tümörde ve mikroçevrede yüksek düzeyde PD-L1 ifadesi göstermektedir. Diğer olguda tümörde PD-L1 ifadesi izlenmemekle birlikte, mikroçevrede %30 oranında PD-L1 ifadesi bulunmaktadır. Polizomi gösteren PSSSL olguları EBV negatiftir ve yalnızca 1'i dokuda tümörde ve mikroçevrede yüksek PD-L1 ifadesi gösterirken, 1 olgu tümüyle PD-L1 negatiftir; diğerleri çeşitli düzeylerde pozitiflik göstermektedir.

Nodal DBBHL olgularında kopya sayısı değışikliği/amplifikasyon izlenen 5 vakanın 3'ünde dokuda tümörde ve mikroçevrede yüksek PD-L1 ifadesi izlenmiş; diğer 2 olguda çeşitli düzeylerde PD-L1 ifadesi izlenmiştir. Polizomi izlenen bir olguda tümörde PD-L1 negatifiken, mikroçevrede PD-L1 ifadesi izlenmiştir. Polizomi ve amplifikasyon izlenen vakaların hepsi EBV negatiftir.

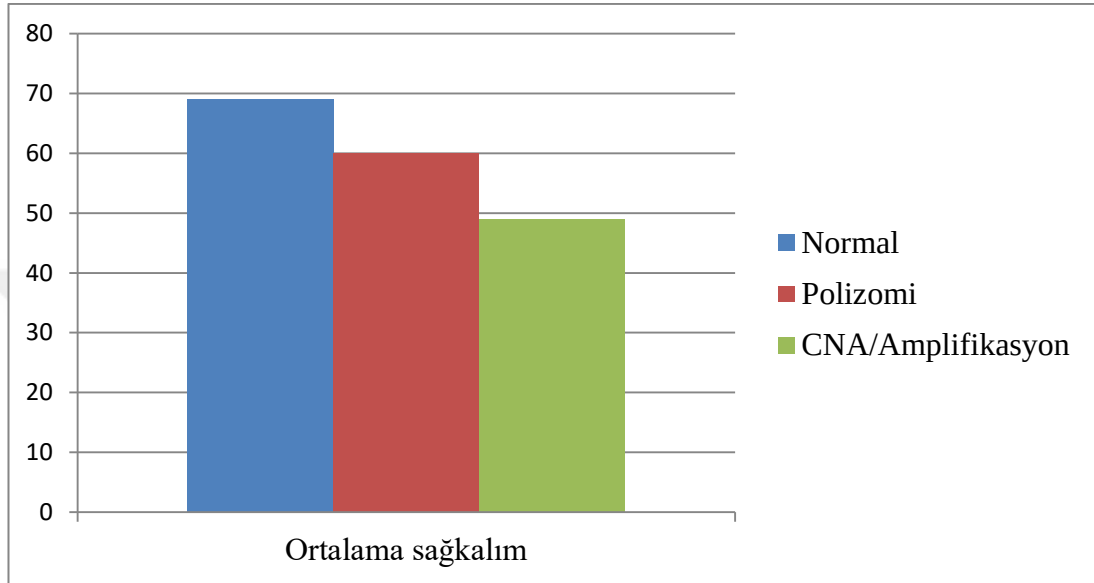
Kopya sayısı değışikliği/amplifikasyon varlığı, mikroçevredeki CD3, CD8 ve CD68 pozitif lenfosit ve histiyosit sayıları ile ilişkili bulunmamıştır ($p=0.279$, $p=0.124$, $p=0.533$).

İstatistiksel analiz sonucunda, kopya sayısı değışikliği/amplifikasyon varlığı, tümörde ya da mikroçevrede PD-L1 ifadesi ile korele bulunmamıştır ($p=0.067$, $p=0.070$). Ancak genetik değışiklik saptanan olgu sayısı düşük olduğu için istatistiksel analizin gücü düşüktür. Anlamlı olmasa da, polizomi ve amplifikasyon saptanan olgularda PD-L1 ifadesinin daha yüksek olduğu dikkat çekicidir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. PD-1/PD-L1 gen değışikliği ve ortalama PD-L1 ifade düzeyleri

Kopya sayısı değişikliği/amplifikasyon ya da polizomi varlığının sağkalım üzerinde etkisi olup olmadığı incelenmiş, anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.268$). İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, CNA/amplifikasyon varlığında ortalama sağkalımın daha kısa olduğu izlenmiştir (şekil 4.8).



şekil 4.8. PD-L1/PD-L2 gen değişikliği ve ortalama sağkalım (ay)

5. TARTIŞMA

5.1. KLİNİKOPATOLOJİK ÖZELLİKLER

Çalışmamıza dahil ettiğimiz, toplam 57 hastanın cinsiyet dağılımında saptanan erkek predominansı (E/K: 1.28) PSSSL olgularında beklenen dağılıma uygundur (33). Nodal DBBHL hasta grubunda da cinsiyet oranı beklendiği şekilde hafif erkek baskınlığı göstermektedir (E/K: 1.25) ve iki grup arasında cinsiyet dağılımı açısından fark saptanmamıştır ($p=0.953$). PSSSL grubunda ortalama yaş 56.2, ortanca yaş 59 olarak hesaplanmıştır (min: 17, max: 80). Nodal DBBHL grubunda ise ortalama yaş 59.4, ortanca yaş 59'dur (min:32, max:89) ve iki grup arasında yaş dağılımı açısından fark saptanmamıştır ($p=0.247$). Her iki grupta ortalama yaş, beklenen aralıkta saptanmıştır (33).

PSSSL olgularının tümör yerleşimleri incelendiğinde, literatür ile uyumlu olarak en sık frontal lob tutulumu gözlenmektedir (Tablo 4.2).

PSSSL olgularının klinik risk skorlamasında yer alan parametreler incelendiğinde, olguların 16'sında (%30.8) derin tümör yerleşimi (serebellum, bazal ganglia, periventriküler, beyin sapı), 19'unda ise (%42.2) multifokal tümör gelişimi saptanmıştır. Kötü prognozla ilişkili olan serum LDH yüksekliği olguların 24'ünde (%63.2) tanı anında saptanmıştır. Hastaların 24'ünün (%42.1) 60 yaş üzerinde olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.3). Olguların %74'ü operasyon öncesi steroid tedavisi almıştır.

Yaş ile kötü klinik prognostik faktörlerin birbirleri ile ilişkisi (Derin yerleşim, multifokal kitle varlığı, serum LDH yüksekliği) incelendiğinde, herhangi anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.640$, $p=0.345$, $p=0.137$).

Histopatolojik değerlendirmede olguların büyük kısmının diffüz gelişim paterni gösterdiği saptanmış (%57), kalan olguların perivasküler ve "scattered" patern bulundurduğu izlenmiştir (%38 vs. %5) (Resim 4.1).

PSSSL olgularında büyüme paterninin yaş dağılımı, multifokalite, derin yerleşim, PD-1 ve PD-L1 ifade düzeyleri ve genel sağkalım üzerinde etkisi incelenmiş, hiçbirisi ile anlamlı bir ilişki izlenmemiştir ($p>0.05$).

EBV pozitif PSSSL olgularında, büyüme paternlerinin dağılımı incelendiğinde, 2 olgunun “scattered”, 1 olgunun perivasküler, 1 olgunun ise diffüz patern gösterdiği saptanmıştır.

5.2. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ

Tümör mikroçevresi hem T lenfositler hem de histiyositler açısından kantitatif olarak değerlendirildiğinde, PSSSL olgularının nodal DBBHL’ye kıyasla belirgin şekilde daha düşük CD3, CD8+ TIL ve CD68+ histiyosit içeren bir mikroçevreye sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 4.4, 4.5, 4.7). Bu durumun, santral sinir sistemi lenfomalarında tedavide sıklıkla uygulanan preoperatif steroid tedavisine bağlı gelişebileceği düşünülerek, preoperatif steroid tedavisi alan PSSSL olguları ile almayanlar arasında CD3, CD8 ve CD68 değerleri karşılaştırılmıştır (Tablo 4.8, 4.9, 4.10).

Bu karşılaştırmalarda, preoperatif steroid tedavisinin mikroçevredeki T lenfosit ve histiyosit sayısında anlamlı fark yaratmadığı gösterilmiştir ($p>0.05$). PSSSL’de tümör mikroçevresinin sistemik DBBHL’ye kıyasla daha düşük yoğunlukta olmasının, santral sinir sisteminin sahip olduğu, çeşitli bariyerler ile korunan özel mikroanatomisi ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu sayede immün sistemden kaçış sağlayan tümör, benzer fenotipteki lenfomalara (sistemik DBBHL) kıyasla daha kötü prognoz göstermektedir.

Tümör mikroçevresini değerlendiren Sethi ve ark., 53 olgunun 16’sında düşük ($<5\%$), 17’sinde orta ($5-20\%$) ve 20’sinde yüksek şiddette ($>20\%$) CD3 pozitif T lenfosit infiltrasyonu saptamışlardır. Aynı çalışmada olguların 1’inde düşük, 23’ünde orta, 28’inde yüksek şiddette CD68 pozitif makrofaj infiltrasyonu gösterilmiştir. Tümör mikroçevresinde makrofaj yoğunluğunun T lenfositlere kıyasla daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir (45).

Alame ve ark.’nın çalışmasında CD68 değerlendirmesinde 55 olgunun sadece %6’sında mikroçevrede makrofaj saptanmazken, 25’inde düşük ($<25\%$), 19’unda orta ($25-50\%$) ve 5’inde yüksek yoğunlukta ($>50\%$) makrofaj izlenmiştir (41). Aynı çalışmada CD68+ makrofajların büyük oranda CD163 koekspresyonu gösterdiği saptanmış (%93.9), tümör mikroçevresindeki lenfositlerin M2 fenotipinde olduğu

gösterilmiştir. M1, inflamatuvar yanıt ile antitümöral savunmayı sağlayan klasik aktive makrofajları tanımlarken; M2, inflamasyonu azaltıcı, tümör destekleyici alternatif aktive makrofajları tanımlamaktadır (61). M2 makrofajların, T hücre proliferasyonunu inhibe ederek adaptif immün yanıtı baskıladığı bilinmektedir. CCL17, CCL18 ve CCL22 gibi kemokinler salgılayarak, sitotoksik özelliğe sahip olmayan T hücreleri ortama çağırarak immün yanıtı baskılamaktadırlar (62). M2 makrofajların varlığı, sistemik DBBHL’de kötü prognoz ile ilişkili olarak bildirilmiştir (63).

CD8/CD3 oranı, PSSSL olgularında anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuş olup, santral sinir sistemi lenfomalarında, sistemik DBBHL’ye kıyasla tümör mikroçevresinin sitotoksik T lenfositlerden daha zengin olduğu izlenmiştir (Tablo 4.6).

Sistemik DBBHL ile PSSSL’yi karşılaştıran bir çalışmada, PSSSL’de mikroçevrede belirgin şekilde daha fazla sitotoksik T lenfosit bulunduğu saptanmıştır (%44 vs. %22) (32). Alame ve ark.’nın çalışmasında da tümör mikroçevresinde CD8+ T lenfositlerin CD4+’lere kıyasla baskın olduğu saptanmıştır (41). PSSSL’nin moleküler patogenezinde HLA kaybı sık gözlenmektedir. Bu tümörlerde mikroçevre CD8+ sitotoksik lenfositlerden zengin olsa da, etkileşecek HLA sınıf I olmadan bu savunma mekanizması etkisiz kalacaktır. Bu durum, PSSSL olgularındaki belirgin kötü prognozun altında yatan nedenlerden biri olabilir.

Bu veriler ve bizim sonuçlarımız göz önüne alındığında, PSSSL olgularının yoğun sitotoksik T lenfosit ve histiyosit içeren bir mikroçevreye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Bizim çalışmamızda da PSSSL olgularının sistemik DBBHL olgularına kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek oranda CD8+ T lenfosit bulundurmaları, literatür verileri ile uyumludur.

Farklı kanser tiplerinde CD4/CD8 lenfosit oranlarının değişkenlik gösterebildiği bilinmektedir. Sistemik DBBHL’de mikroçevre CD8+ lenfositlerden baskındır ve CD4+ TIL oranı arttıkça sağkalımın iyileştiği gösterilmiştir (64). Klasik Hodgkin lenfomanın ise, CD4+ T lenfositlerden baskın bir mikroçevreye sahip olduğu, CD4/CD8 oranı arttıkça tedavi yanıtının azaldığı bilinmektedir (65, 66). Literatürde PSSSL olgularında sitotoksik T lenfositlerle prognoz ilişkisini araştıran

bir çalışma mevcut değildir, ancak kendi serimizde CD8/CD4 oranı ile genel sağkalım arasında, hem PSSSL hem de nodal DBBHL grubunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilememiştir ($p=0.701$, $p=0.823$).

PSSSL’de reaktif perivasküler T lenfosit infiltrasyonunu inceleyen bir çalışma, reaktif infiltrasyon varlığını daha iyi sağkalımla ilişkili bulmuştur (28). Alame ve ark. ise, PSSSL olgularında TIL ya da TAM yoğunluğunu prognoz ile ilişkisiz bulmuşlardır (41). PSSSL’de CD68+ histiyosit sayısı ile prognoz ilişkisini araştıran Cho ve ark., 76 olguluk serilerinde, yüksek CD68 ifadesini, kötü genel sağkalım ve kötü progresyonsuz sağkalımla ilişkili bulmuşlardır (67). Bizim çalışmamızda, Mann-Whitney ve Cox Regresyon analizleri ile, hem PSSSL hem de nodal DBBHL grubunda, CD3, CD8, CD68 düzeyleri ile genel sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.153$, $p=0.394$, $p=0.912$; $p=0.393$, $p=0.980$, $p=0.237$). Santral sinir sistemi lenfomaları, özel mikroanatomiyeye sahip, immün sistemden kaçışı sağlayan koruyucu bir çevrede gelişen tümörlerdir. Bizim de çalışmamızda saptadığımız gibi, immün kontrol noktası moleküllerini yüksek oranda ifade etmektedirler. İmmün sistemden kaçış mekanizmalarına sahip tümör hücreleri, mikroçevrenin hücresel yoğunluğundan bağımsız olarak hayatta kalmayı başarmaktadır. Bu nedenle mikroçevre yoğunluğu, sağkalım üzerinde belirgin etki gösterememektedir. Bu noktada, mikroçevreyi immün baskılanmadan kurtaracak, immün kontrol noktası moleküllerine yönelik inhibitörler, hedeflenmiş tedavi seçenekleri arasında daha da önem kazanmaktadır.

5.3. EBV

Çalışmamızda EBER in-situ hibridizasyon ile yapılan değerlendirme sonucunda, PSSSL grubunda 4 (%7.1), nodal DBBHL grubunda ise 3 (%6.7) olguda EBV pozitifliği saptanmış; iki grup arasında anlamlı fark izlenmemiştir ($p=1.000$) (Şekil 4.1) (Resim 4.5, 4.6).

PSSSL grubunda, beklendiği şekilde EBV ilişkili olguların yaş ortalamaları, negatif olanlara kıyasla daha düşüktür (42 vs 57.2, $p=0.052$). Nodal DBBHL hastalarında ise EBV ile yaş ortalamaları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır

ancak EBV pozitif hasta sayısının oldukça az olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (59.33 vs. 59.45, $p=0.893$).

Sethi ve ark.'nın çalışmasında, EBER ifadesi saptanan 13 hastanın 10'u HIV pozitifken, kalan 3'ü post-transplant ilişkili lenfoproliferatif hastalık tanısı bulundurmaktadır (45). Sugita ve ark.'nın çalışmasında 185 olgunun 17'si EBER pozitif bulunmuş, bunların 3'ünün immünyetmezlik ilişkili olduğu belirtilmiştir (56). Bizim çalışmamızda EBV pozitifliği gösteren olgular incelendiğinde, PSSSL tanılı 4 olgudan 2'sinin klinik bilgisine ulaşılamamış, 1'inin otoimmün hepatit nedeniyle yaklaşık 5 yıldır immün baskılayıcı tedavi aldığı öğrenilmiş, 1 olguda ise özgeçmişte özellik saptanmamıştır. Nodal DBBHL tanılı ve EBV pozitifliği izlenen 3 olgunun birinin özgeçmişinde özellik bulunmazken, 1 vakanın aktif hepatit B hastası olduğu, 1 vakanın ise Hodgkin lenfoma öyküsü bulundurduğu saptanmıştır. Sonuçta bir santral sinir sistemi lenfoması değerlendirilirken EBV pozitifliği mutlaka araştırılmalı, pozitiflik saptanırsa hastanın klinik öyküsü detaylı incelenmeli, immün sistemi baskılayan bir özellik bulunamazsa klinisyen, hastanın bu açıdan daha detaylı araştırılması amacıyla bilgilendirilmelidir.

Her iki hasta grubu ayrı ayrı, tümör mikroçevresi ve EBV ilişkisi açısından incelenmiştir. Ortalama CD3, CD8+ lenfosit, CD68+ histiyosit sayıları ve CD8/CD3 oranları EBV pozitif ve negatif olgular arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.743$, $p=0.938$, $p=0.127$, $p=0.412$; $p=0.143$, $p=0.036$, $p=0.107$) (Tablo 4.11, 4.12, 4.13). Vaka sayısının az olduğu göz önüne alındığında, EBV pozitif olgularda istatistiksel olarak anlamlı çıkmasa da, CD3, CD8+ T lenfositlerin ve CD68+ histiyositlerin ortalama değerlerinin daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu durum, EBV pozitif tümörlerde viral yüke bağlı, salınan sitokinler aracılığı ile oluşan yoğun mikroçevreyi yansıtmaktadır.

EBV pozitif olgular, negatif vakalarla PD-1 ifade düzeyleri açısından karşılaştırıldığında, PSSSL olgularında EBV negatifliği daha yüksek PD-1 ifadesi ile ilişkili bulunmuştur ($p=0.036$). Nodal DBBHL olgularında ise EBV ile PD-1 ifadesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.589$, $p=0.747$) (Tablo 4.14, 4.15). Sugita ve ark.'nın 185 olguluk serisinde EBER pozitif 17 olgu saptanmış, TIL'de PD-1 ifadesi ile ilişki bulunmamıştır (56). PSSSL grubunda saptadığımız ilişki,

EBV'nin beklendiği şekilde PD-1/PD-L1 yolağını aktive edici özelliğini yansıtmaktadır.

EBV pozitif olgularda PD-L1 ifade düzeyleri karşılaştırıldığında, PSSSL grubunda EBV pozitifliği tümörde ve mikroçevrede daha yüksek PD-L1 ifadesi ile ilişkili bulunmuştur ($p=0.056$, $p=0.051$) (**Tablo 4.16**). Nodal DBBHL grubunda bu ilişki izlenememiş olmakla birlikte ($p=0.702$, 0.078), EBV pozitif olguların ortalama PD-L1 ifadeleri daha yüksektir (**Tablo 4.17**).

Bu sonuçlar, PD-L1 yolağında aktive edici mekanizmalardan biri olduğu bilinen EBV pozitifliğinin, beklendiği şekilde PD-L1 ifadesini artırdığı gözlemini doğrulamaktadır. Çalışmamızda kantitatif bir değerlendirme yöntemi ile, tümörde ve mikroçevrede ayrı ayrı değerlendirme yapılarak bu gözlemin doğrulanmış olması mevcut bilgilere katkı sağlamaktadır. Literatürde santral sinir sistemi lenfomalarında EBV ile PD-L1 ifadesinin ilişkisini araştıran Sugita ve ark. çalışmalarında, bizim sonuçlarımızın aksine PSSSL'da tümörde ya da TAM'da PD-L1 ifadesi arasında ilişki bulmamıştır (Wilcoxon signed-rank testi) (56). Furuse ve ark.'nın çalışmasında da EBV pozitifliği ile tümörde PD-L1 ifadesi arasında korelasyon saptanmamıştır (68). Ancak bu çalışmalarda vaka sayısının oldukça düşük olduğu, kullanılan değerlendirme kriterlerinin semikantitatif olduğu ve farklı antikorların kullanıldığı göz önüne alınmalıdır.

Yine Sugita ve ark., tümör mikroçevresinde FOXP3 ve TIA1+ lenfositleri değerlendirmiş, EBV negatif olgularda belirgin şekilde daha yüksek TIA1+ lenfosit varlığını göstermişlerdir (56). Ancak bizim çalışmamızda bu sonucun aksine, istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmasa da, EBV+ olguların daha yüksek sayıda sitotoksik T lenfosit bulundurduğu gözlenmiştir (Tablo 4.13). Aynı çalışmada EBV pozitifliğinden bağımsız olarak tümörde ve mikroçevrede PD-1/PD-L1 ifadesi gösterilmiş ve bunun PSSSL'da PD-1/PD-L1 yolağının aktivasyonunun göstergesi olarak kabul edilebileceği söylenmiştir (56). Bizim çalışmamızda da EBV negatif olguların %25'inde tümörde gözlenen PD-L1 pozitifliği bu veri ile uyumludur.

Sethi ve ark.'nın çalışmasında 8 vakada tümörde PD-L1 ifadesi saptanmış ve bu vakaların hepsinin EBER pozitif olduğu bildirilmiştir. EBER negatif vakaların ise hepsinin PD-L1 negatif olduğu, ancak %18'inde tümörde PD-1 ifadesi gözlemlendiği

belirtilmiştir. Bu çalışmada, EBV latent membran protein 1'in PD-L1 promotör aktivitesine neden olduğu, bu nedenle genetik değişiklikler olmadan PD-L1 ifadesinde artış görüldüğü hipotezi desteklenmektedir (45). Bizim serimizde EBV- olgularda da PD-L1 ifadesi izlenmiş, ancak EBV+ olgularda PD-L1 ifadesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.16).

Chapuy ve ark., PSSSL olgularında PD-L1/PD-L2 gen bölgesini incelemiş, EBV pozitif PSSSL olgularında genetik değişikliklerden bağımsız şekilde dokuda yüksek PD-L1/PD-L2 ifade varlığını göstermiş; EBV'nin intrensek mekanizmalarla PD-L1 yolağını aktive ettiği görüşünü desteklemişlerdir (48). Çalışmamızda da EBV pozitif 7 olgunun 4'ünde FISH ile amplifikasyon varlığı araştırılmış; Chapuy ve ark.'nın sonuçları ile uyumlu olarak hiçbirinde amplifikasyon saptanmamıştır.

PSSSL olgularında EBV pozitif olgularda ortalama sağkalım süresi 42 ay, negatif olgularda ise 33 ay olarak bulunmuş; EBV pozitifliği ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.383$) (Şekil 4.2).

5.4. PD-1 ve PD-L1 İFADESİ

Çalışmamızda PSSSL olgularında mikroçevrede reaktif T lenfositlerde yüksek oranda PD-1 pozitifliği saptanmıştır (%89). Nodal DBBHL olgularında da benzer şekilde yüksek oranda (%75) PD-1 pozitifliği izlenmiştir (Şekil 4.3).

Tümörde PD-L1 ifadesi değerlendirildiğinde, PSSSL olgularının 17'sinde (%31), nodal DBBHL olgularının ise 11'inde (%24) PD-L1 ifadesi saptanmıştır (Şekil 4.4).

Mikroçevredeki PD-L1 ifadesi her iki grupta daha yüksek saptanmış, değerlendirilebilen 54 PSSSL olgusunun 52'sinde (%96) çeşitli düzeylerde pozitiflik saptanmıştır. Nodal DBBHL hastalarında ise değerlendirilebilen vakaların tümünde (44/44) mikroçevrede PD-L1 pozitifliği saptanmıştır (Şekil 4.4).

Literatürde PSSSL'de mikroçevrede oldukça yüksek oranlarda PD-1 ve PD-L1 pozitifliği bildirilmektedir (Tablo 5.1). Olgularımızda gözlemlediğimiz pozitiflik düzeyleri, bu verilerle uyumludur. Tümörde PD-L1 ifadesi ise, hem kullanılan antikörlerin çeşitliliği, hem değerlendirme kriterlerinin farklılığı nedeniyle

heterojenite göstermektedir. Huang ve ark.'nın sistemik DBBHL olgularında PD-L1 ifadesinin immünohistokimyasal değerlendirmesinde farklı klonları karşılaştırdıkları çalışmada, kullandığımız SP263 klonunun daha az zemin boyanması yaparak kolay değerlendirme sağladığı ve SP142 klonu ile yüksek düzeyde korele olduğu bildirilmiştir (69).

Tablo 5.1. Literatürde PSSSL’de PD-1 ve PD-L1 ifade oranları

	Vaka sayısı	Tümörde PD-L1 pozitifliği	Mikroçevrede PD-L1 pozitifliği	TIL’de PD-1 pozitifliği
Berghoff et al, 2013	20	2 (%10)	4/20 (%20)	12/20 (%60)
Four et al, 2016	32	12 (%37.5)		17/32(%53.1)
Cho et al, 2017	76	54 (%71.1)		35 (%46.1)
Hayano et al, 2017	64	2/48 (%4.1)	25/48 (%52)	
Sugita et al, 2018	39	23 (%59)	30 (%77)	
Sethi et al, 2019	53	8 (%15)	44/52 (%83)	52 (%98)
Alame et al, 2019	57	10 (%17.5)	28/49 (%57.1)	39/56(%69.6)
Villa et al, 2019	115	31/107 (%29)		
Furuse et al, 2020	70	19 (%27)	68 (%97)	
Ou et al, 2020	48	32 (%66.7)		12/14(%85.7)
Çalışmamız	57	17/55 (%31)	52/54 (%96)	49/55 (%89)

Tümörde ve mikroçevrede PD-L1 düzeyleri, hastalar 60 yaş eşik değeri konularak gruplandırıldığında, yaş ile ilişki bulunmamıştır ($p=0.253$, $p=0.052$). PD-1 ifadesi de benzer şekilde incelendiğinde yine anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlarla, PD-1 ve PD-L1 ifade düzeylerinin, yaştan bağımsız olduğu gösterilmiştir.

Nodal DBBHL ve PSSSL hastaları PD-1 ifadesi açısından karşılaştırıldığında, PSSSL olgularında daha yüksek PD-1 ifadesi saptanmıştır ($p=0.000$) (Tablo 4.19). Bu anlamın, PD-1 için %1 cut-off’u uygulandığında da devam ettiği saptanmıştır ($p=0.024$).

Santral sinir sistemi lenfomaları ve nodal DBBHL olguları arasında, tümörde PD-L1 ifade düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.487$) (Tablo 4.20).

Mikroçevrede PD-L1 ifadesi karşılaştırıldığında, nodal DBBHL grubunda mikroçevrede anlamlı şekilde daha yüksek PD-L1 ifadesi saptanmıştır ($p=0.10$) (Tablo 4.21).

Yalnızca EBV negatif olgular PD-1 ve PD-L1 ifadeleri açısından karşılaştırıldığında, tüm hasta grubu ile yapılan analizlere benzer sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 4.22, 4.23, 4.24, 4.25).

Nodal DBBHL’de mikroçevrede daha yüksek PD-L1 ifadesinin saptanması, bu olgularda saptadığımız daha yoğun mikroçevrenin sonucu olarak salınan sitokinlere bağlı olduğu düşünülmüştür.

PSSSL olguları ve aktive immünofenotip nodal DBBHL olgularında tümörde PD-L1 ifadesi benzer düzeylerde izlenmiş olması, literatürde sistemik DBBHL’de PD-L1 ifadesini araştıran çalışmalarda özellikle aktive immünofenotipe sahip olgularda saptanan yüksek ifade düzeyleri ile koreledir (47, 69, 70).

Çalışmamızda tümörde PD-L1 ifadesinin, CD3, CD8+ lenfosit sayıları, CD68+ histiyosit sayıları ve CD8/CD3 oranları ile korele olup olmadığı incelemiş, hem PSSSL hem de nodal DBBHL grubunda korelasyon saptanmamıştır ($p=0.897$, $p=0.429$, $p=0.676$, $p=0.341$; $p=0.812$, $p=0.866$, $p=0.078$, $p=0.833$). Berghoff ve ark., benzer şekilde TIL sayısı ile tümörde PD-L1 ifadesini ilişkisiz bulmuşlardır (53). Hayano ve ark. ise CD4, CD8 ve IFN-gama mRNA düzeylerini incelemiş, bunların tümörde PD-L1 ifadesi ile korele olduğunu gözlemlemişlerdir. Buradan yola çıkarak yazarlar, tümör mikroçevresinde artmış TIL ve TAM varlığının, IFN-gama salınımını artırarak PD-L1 ifadesini artırdığını öne sürmektedirler (54). Bizim sonuçlarımızın aksine, Alame ve ark., tümörde yüksek PD-L1 ifadesini daha yoğun TIL/TAM varlığı ile ilişkili bulmuşlardır ancak bu çalışmadaki değerlendirme yöntemleri semikantitatif olarak yapılmıştır (41). Bizim verilerimiz, tümörde PD-L1 ifadesinin, mikroçevre yoğunluğundan ve dolayısı ile salınan sitokinlerden bağımsız olarak, başka mekanizmalarla aktive olduğunu desteklemektedir.

PSSSL olgularında mikroçevrede PD-L1 ifadesi, CD3, CD8+ T lenfositler ve CD68+ histiyositler ile korele bulunmuştur ($p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.001$). Ancak

CD8/CD3 oranı ile bir korelasyon saptanmamıştır ($p=0.438$). Nodal DBBHL olgularında ise mikroçevrede PD-L1 ifadesi, CD3 ve CD8+ T lenfosit sayıları ile korele bulunmuştur ($p=0.022$, $p=0.020$).

Mikroçevredeki PD-L1 ifadesinin, immün hücrelerin yoğunluğu ile pozitif korelasyon göstermesi, ortama salınan sitokinlerin immün hücreler üzerindeki PD-L1 ifadesini artırdığını desteklemektedir.

PSSSL'de mm^2 'deki PD-1 pozitif lenfositlerin sayısı, CD3 ve CD8+ lenfosit sayıları ile korele bulunmuştur ($p=0.000$, $p=0.000$). CD68 pozitif hücrelerle ve CD8/CD3 oranı ile korelasyon izlenmemiştir ($p=0.097$, $p=0.340$). Nodal DBBHL grubunda mm^2 'deki PD-1 pozitif lenfositlerin sayısı sadece CD3+ lenfositlerle korele bulunmuş ($p=0.010$), diğer parametrelerle korelasyon izlenmemiştir ($p>0.05$).

PD-1 ifadesinin de mikroçevre yoğunluğu ile pozitif korelasyon göstermesi, mikroçevrenin PD-1/PD-L1 yolağının aktivasyonu üzerinde etkisi olduğunu desteklemektedir. Mikroçevrede PD-1 ifadesini inceleyen Berghoff ve ark., sadece CD8+ TIL ile ilişki araştırmış, anlamlı ilişki bulamamışlardır (53).

Literatürde PD-1 ve PD-L1 ifadeleri arasında korelasyonu inceleyen farklı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Four ve ark. PD-1 ve PD-L1 ifadelerini birbirleri ile pozitif korele bulmuşlardır (40). Cho ve ark.'nın çalışmasında da benzer şekilde PD-1 ifadesi ile PD-L1 ifadeleri pozitif korele bulunmuştur (55). Ancak PD-1 ve PD-L1 ifadelerinin birbirleri ile korelasyon göstermediğini söyleyen çalışmalar da mevcuttur (41, 51). Bizim serimizde PSSSL olgularında PD-1 ifadesi, tümörde ve mikroçevredeki PD-L1 ifadesi ile negatif korele bulunmuştur ($p=0.011$, $p=0.041$). Nodal DBBHL olgularında da benzer şekilde PD-1 ile tümörde PD-L1 ifadeleri negatif korelasyon göstermektedir ($p=0.029$). Literatür verilerindeki bu heterojenite, her çalışmada farklı antikorların ve farklı değerlendirme kriterlerinin kullanılması ile açıklanabilir. PSSSL olgularında hedefe yönelik tedaviye uygun adayları belirlerken, hem PD-1 hem de PD-L1 ifadelerinin araştırılması, tedaviden fayda görebilecek hastaları kaçırmamak açısından faydalı olacaktır.

PSSSL olgularının 47'sinin, nodal DBBHL olgularının ise 30'unun genel sağkalım bilgilerine ulaşılabilmektedir. Bu gruplarda Mann-Whitney-U ve Cox

Regresyon testleri ile PD-1 ve PD-L1 ifadelerinin sağkalım üzerindeki etkisi araştırılmış, anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0.05$).

Tedavi yanıtı bilgilerine ise çok daha az sayıda hastada ulaşılabılmış (10 PSSSL, 26 nodal DBBHL), PD-1/PD-L1 ifade düzeyleri ile anlamlı ilişki bulunmamıştır ancak, hasta sayısı çok az olduğu için istatistiksel karşılaştırmanın gücü oldukça düşüktür.

PSSSL olgularında tümörde PD-L1 ifade eden olguların ortalama sağkalımı 32 ay, PD-L1 negatif olguların ortalama sağkalımı 35 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.690$). Nodal DBBHL grubunda ise PD-L1 pozitif olguların ortalama sağkalımı 70 ay, negatif olguların 100 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.783$) (Şekil 4.5).

PD-1 ifadesi gösteren PSSSL olgularının ortalama genel sağkalımı 35 ay, negatif olanların ise 27 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.813$). Nodal DBBHL olgularında ise PD-1 pozitif olguların ortalama sağkalımı 91 ay, negatif olguların 98 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.213$) (Şekil 4.6).

Berghoff ve ark.'nın 20 olguluk, tamamı EBV negatif PSSSL serisinde, 12 vakada TIL'de PD-1 ifadesi, 2 vakada tümörde PD-L1 ifadesi saptanmış; sağkalım analizi yapılmamıştır (53).

Ou ve ark.'nın serisinde 48 olgunun 18'inde tümörde yüksek ($>5\%$) PD-L1 ifadesi saptanmış, TIL değerlendirilen 14 vakanın 12'sinde 1 BBA'da 1'den fazla pozitif hücre olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada yazarlar, sağkalım ile ilişki incelememekle birlikte, olguların büyük kısmının ya PD-1/PD-L1 ifadesi göstermeleri ya da yeni nesil dizileme sekansı tekniği ile tespit ettikleri şekilde yüksek mutasyon yükü bulundurmaları nedeniyle, immünoterapiden fayda görebileceklerini söylemektedirler (51).

Four ve ark., tümörde PD-L1 ve TIL'de PD-1 ifadelerini kötü genel sağkalımla ilişkili bulmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulmamış olmalarına rağmen, PD-L1 ifade eden olguların kemoterapiye daha iyi yanıt verdiğini gözlemlediklerini söylemektedirler. (40). Ancak bu çalışmada PD-L1 ifadesinin sadece tümör hücrelerinde değerlendirilmiş olması, hatta ifadenin sadece tümörde gözlemlendiğinin belirtilmesi kuşku uyandırmaktadır. Çiftli boyama yapılmadığı için mikroçevredeki ifade ayırt edilememiş gibi gözükmektedir.

48 olgunun 2'sinde tümörde PD-L1 ifadesi saptayan Hayano ve ark. tümörde yüksek PD-L1 ifadesini iyi prognostik faktör olarak bulunurken, mikroçevredeki PD-L1 ifadesini negatif prognostik faktör olarak saptamışlardır (54).

Alame ve ark.'nın çalışmasında, 57 PSSSL olgusunun 10'unda tümör hücrelerinde PD-L1 ifadesi saptanmış, PD-L1 pozitifliği herhangi bir klinik parametre ile ilişkili bulunmamıştır. Aynı çalışmada TIL'de yüksek oranda saptanan PD-1 ifadesinin (%69.6) daha iyi sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir. TAM'da PD-L1 ifadesi de yine daha iyi klinik sonuç ile ilişkili bulunmuştur (41).

Furuse ve ark.'nın çalışmasında 70 olgunun 19'unda tümörde PD-L1 ifadesi izlenirken, 68'inde makrofajlarda değişken derecelerde PD-L1 pozitifliği saptanmıştır. Tümörde PD-L1 ifadesi ile klinik parametreler arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde, tümörde PD-L1 ifade eden olguların ortalama genel sağkalımının, PD-L1 negatif olgulara göre daha kısa olduğu saptanmıştır (30.4 ay vs. 44 ay). İntratümöral ve peritümöral makrofajlar değerlendirildiğinde ise, yüksek PD-L1 ifadesinin ise anlamlı olarak daha uzun genel sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir (60 ay vs. 24/14 ay). Ancak peritümöral ve intratümöral PD-L1 ifadelerinin birbirleri ile korele olmaması nedeniyle, yazarlar tümör çevresinin de değerlendirilmesinin immünoterapiye aday hastaları belirlemede önemli olacağını vurgulamaktadır. (68).

Cho ve ark.'nın çalışmasında PD-1 ifadesi kötü sağkalımla ilişkili bulunmuş (10.4 ay vs. 24.7 ay), dikkat çekici olarak, yüksek PD-1 ifadesine ve kötü prognoza sahip olan olguların, klasik risk skorlama yöntemleri ile aralarında bir fark olmadığı gösterilmiştir (ILES/MSKCC) (55).

Villa ve ark., kendi serilerinde %1'den fazla PD-L1 pozitifliğini olguların %29'unda saptamış, ancak bu ifadeyi klinik sağkalımla ya da genetik değişikliklerle ilişkili bulmamışlardır (50).

Chapuy ve ark., PD-L1 ve PD-L2 ifade düzeyleri ile prognoz arasında anlamlı ilişki bulmamışlardır (48). Cho ve ark.'nın çalışmasında da PD-L1 ve PD-L2 düzeyleri ile prognoz arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir (55).

Sethi ve ark.'nın çalışmasında bizim sonuçlarımızla uyumlu şekilde tümörde ya da mikroçevrede saptanan PD-L1 ya da PD-1 ifadesi, progresyonsuz/genel

sağkalım ile ilişkili bulunmamıştır. Bu seride ortalama 10.3 aylık takipte, genel sağkalım ortalama 12.27 aydır ve immünohistokimyasal olarak PD-L1 ya da PD-1 ifadesi gösteren olgularla negatif olanlar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Aynı çalışmada immünohistokimyasal olarak tümör mikroçevresinde yüksek düzeylerde saptanan PD-L1 ve PD-1 ifadesinin (%83 vs. %98), yüksek düzeyde immün kontrol noktası moleküllerinin varlığının immün kaçışı sağlayan koruyucu bir mikroçevre oluşturduğu öne sürülmüştür (45).

Sistemik DBBHL’da yapılan çalışmalarda tümörde PD-L1 ifadesi, kötü sağkalımla ilişkili gösterilirken, Pollari ve ark.’nın çalışmasında testiküler lenfomada böyle bir ilişki izlenmemiştir. Testis lenfoması ve PSSSL, benzer biyolojik yapıya sahip, immün ayrıcalıklı bölgelerde gelişim gösteren tümörler olduğu için, yazarlar kendi sonuçlarının da benzer nedenlerden kaynaklanabileceğini öne sürmektedir (71).

Literatürde sistemik DBBHL olgularında PD-L1 ifadesi %10-30 arasında değişmektedir ve pozitifliğin sıklıkla aktive immünofenotip olgularda gözlemlendiği bildirilmektedir (72). Santral sinir sistemi lenfomalarında, PD-L1 ifadesi direkt olarak kötü prognozla ilişki bulunmasa bile, PD-L1 pozitifliğinin bu agresif seyirli lenfoma tipinde daha sık gözlenmesi, etyopatogenez ve kötü prognoz açısından anlamlı gözükmemektedir.

Sonuçta literatür verileri gözden geçirildiğinde, birbirinden farklı antikolar ve değerlendirme kriterleri eşliğinde, PD-1 ve PD-L1 ifadelerinin sağkalım üzerinde farklı sonuçları izlenmektedir (Tablo 5.2, 5.3). Bizim verilerimiz literatürdeki çalışmaların bir kısmıyla uyumludur ancak elde edilebilen klinik bilgi artırılabilirse, istatistiksel değerin kuvvetleneceği düşünülmüştür (45, 48, 50, 55).

Tablo 5.2. Literatürde PSSSL’de PD-1 değerlendirmeleri

Yazar	Değerlendirme kriteri	Klon	Sonuç
Berghoff et al, 2013	%5 cut-off Düşük, orta, yüksek şiddette	Nat ab52587	EBV-TIL’de %60 pozitiflik PD-1 ifadesi, CD8+ TIL sayısı ile ilişkili değil. PD-1/PD-L1 aksı, tedavi hedefi olarak kullanılabilir.
Four et al, 2016	%1 cut-off <%25, %25-50, %50-75, >%75	Abcam NAT105	TIL’de %53.1 pozitiflik PD-1 ifadesi kötü sağkalımla ilişkili PD-1 ve PD-L1 ifadesi korele. TAM’da PD-L1 ifadesi gözardı edilmiş.
Cho et al, 2017	6 BBA’da boyanan hücreler sayılmış.	Abcam NAT105	TIL’de %46.1 pozitiflik PD-1 ifadesi kötü sağkalımla ilişkili PD-1 ve PD-L1 ifadesi korele. TAM’da PD-L1 ifadesi gözardı edilmiş.
Sugita et al, 2018	En yoğun BBA sayılmış.	Abcam, NAT105	TIL’de %77 pozitiflik. EBV+ olgularda PD-1+ TIL sayısı daha yüksek.
Sethi et al, 2019	%5 cut-off Pozitif/negatif	Sigma Aldrich, PDCD1	TIL’de %98 pozitiflik. İmmün kaçıışı sağlayan “koruyucu” mikroçevre PD-1 ifadesi sağkalımla ilişkisiz.
Alame et al, 2019	%1 cut-off Alan sayılmış.	Abcam, NAT105	TIL’de %69.6 pozitiflik PD-1 ifadesi iyi prognostik faktör.
Ou et al, 2020	1 BBA’da 1’den fazla pozitif hücre: pozitif	MRQ-22	TIL’de %85.7 pozitiflik PD-1 ve PD-L1 ifadesi korele değil. Olguların büyük kısmı PD-1/PD-L1 ifade ettikleri için,immünoterapiden fayda görebilirler.
Çalışmamız	Mm ² ’de + TIL sayısı, PD-1+ TIL/CD3+ lenfosit oranı	Abcam, NAT105	TIL’de %89 pozitiflik EBV, PD-1 ifadesi ile ilişkili değil. PD-1 ifadesi, CD3 ve CD8+ TIL ile ilişkili. PD-1 ifadesi sağkalımla ilişkisiz. PD-1 ve PD-L1 korele değil.

Tablo 5.3. Literatürde PSSSL’de PD-L1 değerlendirmeleri

Yazar	Değerlendirme kriteri	Klon	Sonuç
Berghoff et al, 2013	%5 cut-off Düşük, orta, yüksek şiddette	5H1	EBV- Tümörde %20, TAM’da %20 pozitiflik (çiftli boyama yapılmamış) PD-L1 ifadesi, CD8+ TIL sayısı ile ilişkili değil. PD-1/PD-L1 aksı, tedavi hedefi olarak kullanılabilir.
Four et al, 2016	%1 cut-off <%25, %25-50, %50-75, >%75	Ventana SP142	Tümörde %37.5 pozitiflik PD-L1 ifadesi KT’ye iyi yanıtla ilişkili (p>0.05) TAM’da PD-L1 ifadesi gözardı edilmiş.
Cho et al, 2017	6 BBA’da boyanan hücreler sayılmış.	Abcam ab58810	Tümörde %71.1 pozitiflik PD-L1 ifadesi prognozla ilişkisiz. PD-1 ve PD-L1 ifadesi korele. TAM’da PD-L1 ifadesi gözardı edilmiş.
Hayano et al, 2017	Yok(0), zayıf (1), orta/şiddetli (2)	Cell signaling, E1L3N	Tümörde %4.1, TAM’da %52 pozitiflik (floresan immünboyama ile çiftli boyama yapılmış) PD-L1 mRNA düzeyleri ile korelasyon bakılmış. Tümörde PD-L1 ifadesi ile korele Stromada PD-L1 ifadesi ile korele değil. IFN-gama, CD4, CD8 RNA düzeyleri, tümörde PD-L1 düzeyleri ile korele Tümörde PD-L1 ifadesi, iyi prognostik faktör. Mikroçevrede PD-L1 ifadesi, kötü prognostik faktör. Artmış TIL ve TAM, IFN-gama’yı artırarak PD-L1 ifadesini artırıyor.
Sugita et al, 2018	10 BBA’da boyanan hücreler sayılmış. 0, <%30, %30-60, >%60	Abcam EPR1161	Tümörde %59, TAM’da %79 pozitiflik (Floresan immünboyama ile çiftli boyama yapılmış) Tümör/TAM’da PD-L1 ifadesi, EBV ile ilişkisiz.
Chapuy et al, 2018			PD-L1, PD-L2 düzeyleri prognoz ile ilişkisiz.
Sethi et al, 2019	%5 cut-off Pozitif/negatif	Cell signaling, CD274	Tümörde %15, TAM’da %83 pozitiflik (çiftli boyama yapılmamış) Tümörde PD-L1+ olguların hepsi EBV+ EBV- olguların hepsi PD-L1- PD-L1 ifadesi sağkalımla ilişkisiz.

Alame et al, 2019	%1 cut-off % olarak kaydedilmiş.	Cell signaling, E1L3N	Tümörde %17.5, mikroçevrede %57.1 (çiftli boyama yapılmış) PD-L1 ifadesi klinik parametrelerle ilişkisz. Tümörde PD-L1 ifadesi TIL'de PD-1 ifadesi ile korele değil. Tümörde PD-L1 ifadesi, yüksek TIL ve TAM varlığı ile ilişkili. TAM'da PD-L1 ifadesi iyi sağkalımla ilişkili. Tümörde PD-L1 ifadesi sağkalımla ilişkisz.
Villa et al, 2019	%1 cut-off Pozitif/negatif	DAKO 22C3	Tümörde %29 pozitiflik PD-L1 ifadesi, sağkalımla ilişkisz.
Furuse et al, 2020	Pozitif hücrelerin oranı	DAKO 28-8	Tümörde %27, TAM'da %97 pozitiflik (çiftli boyama yapılmamış) Tümörde PD-L1 ifadesi EBV, klinik parametrelerle ilişkisz. Tümörde PD-L1+, kısa sağkalımla ilişkili (p>0.05) TAM'da PD-L1+, uzun sağkalımla ilişkili (p<0.05)
Ou et al, 2020	Yok (%0), orta (%1-4), yüksek (>%5)	SP142	Tümörde %66.7 pozitiflik Olguların büyük kısmı PD-1/PD-L1 ifade ettikleri için,immünoterapiden fayda görebilirler.
Çalışmamız	+ tümör hücreleri/tüm tümör hücreleri, +immün hücreler/tüm immün hücreler, Mm ² 'deki + immün hücreler	Ventana SP263	Tümörde %31, mikroçevrede %96 pozitiflik Tümörde PD-L1 ifadesi, EBV ile ilişkili; mikroçevre yoğunluğu ile ilişkisz. Mikroçevrede PD-L1 ifadesi EBV ve mikroçevre yoğunluğu ile ilişkili. TIL'de PD-1 ifadesi, EBV ile ilişkisz, mikroçevre yoğunluğu ile ilişkili. PD-1 ve PD-L1 korele değil. PD-L1 ifadesi genel sağkalımla ilişkisz.

5.5. MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLER

Çalışmamızda PD-L1/PD-L2 gen bölgesinde kopya sayısı değişikliğinin değerlendirilebildiği 44 PSSSL olgusunda %11 (5) polizomi, %2.5 (1) kopya sayısı artışı, %2.5 (1) amplifikasyon varlığı ve %4.5 (2) translokasyon saptanmıştır. Villa ve ark., PSSSL serilerinde %3; Sethi ve ark. %4 oranında kopya sayısı değişikliği saptamışlardır (45, 50). Bizim sonuçlarımız da bu verilerle koreledir. Chapuy ve ark., kendi serilerinde daha yüksek oranda kopya sayısı değişikliği saptadıklarını

bildirmişlerdir, ancak FISH yerine daha sensitif RT-PCR yöntemini kullanmışlardır (48) (Tablo 5.4).

Çalışmamızda değerlendirebildiğimiz 25 aktive immünofenotip nodal DBBHL olgusunun ise %20'sinde (5) CNA, %4'ünde (1) amplifikasyon (1), %4'ünde polizomi (1) saptanmıştır. Literatürde sistemik DBBHL'de 9p24.1 gen bölgesini FISH ile inceleyen Godfrey ve ark., olguların %27'sinde genetik alterasyon saptamıştır (%16 kopya sayısı artışı, %7 amplifikasyon, %2 translokasyon, %2 polizomi); verilerimiz bu sonuçlarla koreledir (47) (Tablo 5.4). Sistemik DBBHL'de 9p24.1 gen bölgesinde mutasyon araştıran bir başka çalışma da benzer şekilde %20 oranında genetik değişiklik saptamıştır (43). Her iki çalışmada da PD-L1/PD-L2 mutasyonlarının aktive immünofenotip grupta sık olduğu belirtilmiştir.

Serimizde amplifikasyon saptadığımız olguların hepsi EBV negatiftir; bu veri Chapuy ve ark.'nın gözlemi ile uyumludur (48). Ancak Sethi ve ark.'nın çalışmasında kopya sayısı artışı ve amplifikasyon saptadıkları 2 vaka da EBV pozitifdir (45).

Çalışmamızda amplifikasyon varlığı, mikroçevrede CD3, CD8 ve CD68 pozitif lenfosit ve histiyositlerin sayısı ile ilişkili bulunmamıştır ($p=0.279$, $p=0.124$, $p=0.533$). Literatürde DBBHL'de mikroçevre ile genetik değişikliklerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, 3 BBA'da T lenfositler sayılmış, PD-L1 mutasyonu bulunduran olguların belirgin şekilde CD8+ T lenfositten zengin olduğu gösterilmiştir (47).

İstatistiksel analiz sonucunda, CNA/amplifikasyon varlığı, tümörde ya da mikroçevrede PD-L1 ifadesi ile korele bulunmamıştır ($p=0.067$, $p=0.070$). Ancak genetik değişiklik saptanan olgu sayısı düşük olduğu için istatistiksel analizin gücü düşüktür. Anlamlı olmasa da, polizomi ve CNA/amplifikasyon saptanan olgularda PD-L1 ifadesinin daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir.

Godfrey ve ark.'nın sistemik DBBHL'de yaptıkları çalışmada PD-L1 gen bölgesinde mutasyon saptanan vakaların %64'ünde immünohistokimyasal PD-L1 ifadesi saptanırken, mutasyon bulunurmayan olguların yalnızca %8'inde pozitiflik saptanmıştır (47).

Alame ve ark.'nın çalışmasında tümörde PD-L1 ifadesi saptanan 10 olgunun 8'inde break-apart probu ile translokasyon saptanmış ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Genetik alterasyon saptanmayan 2 olgu EBER ile de negatiftir ve yazarlar bu olgularda dokudaki protein ifadesinin, muhtemel MYD88 mutasyonu ile aktive olan JAK-STAT3 sinyal yolağı ile gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir. Kromozom 9 için polizomi saptanan 3 olguda ise dokuda protein ifadesinde artış izlenmemiştir (41).

48 PSSSL olgusunda 9p24.1 gen bölgesini FISH ile inceleyen bir başka çalışmada, 2 olguda mutasyon saptanmış (1 kopya sayısı değişikliği, 1 amplifikasyon), bunlarda immünohistokimyasal olarak da PD-L1 ifadesi saptanmıştır (45). Ancak bu olguların aynı zamanda EBV pozitif olması, dokuda PD-L1 ifadesinin genetik değişikliklere mi yoksa EBV varlığına mı bağlı olduğu konusunda net bir açıklama getirmeyi güçleştirmektedir.

Chapuy ve ark., 9p24.1 gen bölgesini incelemiş, PSSSL'da ilk defa PD-L2'ye spesifik bir translokasyon varlığını göstermiş; ayrıca olguların büyük kısmında (%67) PD-L1/PD-L2 kopya sayısı değişikliği varlığını saptamışlardır. Yazarlar, EBV negatif olgularda kopya sayısı artışının dokuda protein ifade düzeyiyle korele olduğunu belirtmişlerdir (48).

Villa ve ark.'nın çalışmasında ise, tümörde %29 oranında PD-L1 ifadesi saptanmasına rağmen, genetik değişikliklerin oldukça nadir olması (%1 translokasyon, %3 amplifikasyon) ve immünohistokimyasal sonuçlar ile korelasyon göstermemesi nedeniyle, yazarlar, başka mekanizmaların da PD-L1 ifadesini artırdığını söylemektedirler. Aynı çalışmada saptadıkları %12 oranındaki kopya sayısı değişikliğini ise dokuda protein ifadesi ile ilişkisiz bulmuşlardır (50).

Sonuçlarımızda, PD-L1/PD-L2 gen bölgesinde CNA/amplifikasyon bulunduran olguların istatistiksel olarak kuvvetli bir anlam bulunmasa da, ortalama PD-L1 ifade düzeylerinin daha yüksek olduğu izlenmektedir. Genetik değişiklik bulundurmasına rağmen immünohistokimyasal olarak PD-L1 negatif olan olgularda dokuda PD-L2 protein ifadesinin de değerlendirilmesi gerekmektedir.

Serimizde EBV pozitif olguların hepsi dokuda yüksek düzeyde PD-L1 ifadesi göstermektedir. 9p24.1 gen bölgesinde genetik değişiklik göstermeyen EBV negatif

olgularda da yüksek PD-L1 ifadesi bulunmaktadır. Literatüdeki çalışmalarda da 9p24.1 gen bölgesinde mutasyon olmaksızın dokuda PD-L1 ifadesinin arttığı izlenmektedir. Bu durum, PSSSL olgularında farklı yolakların devreye girerek PD-1/PD-L1 aksını aktive ettiği görüşünü desteklemektedir.

EBV dışında aktive edici yolaklardan biri, PSSSL’de %80’e varan oranda saptanabilen MYD88 nokta mutasyonları ile tetiklenen JAK/STAT3 yolağıdır. Bu yolda sürekli aktive kalan JAK2 kinaz, PD-L1/PD-L2 gen bölgesini indükleyerek protein ifadesini artırmaktadır (43).

Bir başka çalışmada, sistemik DBBHL’de, B hücre reseptör yolağının uyarılması ile PD-L1 ifadesinin mRNA düzeyinde arttığı gösterilmiştir (73). Aynı çalışmada İbrutinib ile fare modellerinde PD-L1 ifadesinin azaldığı gösterilmiş, B hücre reseptör inhibisyonunun PD-L1 aksını da bloke edeceği görüşü öne sürülmüştür. Yine bu çalışmada yazarlar artan MYC ifadesinin de PD-L1 ifade artışı ile korele olduğunu göstermişlerdir (73).

MYC, direkt olarak PD-L1 gen bölgesinde promotör bölgeye bağlanarak transkripsiyonu artırmaktadır (74). MYC inhibisyonunun in-vitro çalışmalarda PD-L1 mRNA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (73).

Aktive fenotip DBBHL’nin moleküler patogenezinde yer alan NF-KB sinyal yolağı da PD-L1 ifadesini artırması muhtemel adaylardan biridir ancak net ilişkisi henüz ortaya konmamıştır.

PSSSL olgularımızda, dokuda oldukça yüksek düzeyde PD-L1 ifadesi gösteren olguların 3’ü EBV pozitifken, 1’i PD-L1/PD-L2 gen bölgesinde amplifikasyon, 1’i ise translokasyon bulundurmaktadır. EBV negatif 3 olgudan ikisi amplifikasyon ya da translokasyon bulundurmamaktadır. 1’inde teknik nedenlerle FISH değerlendirmesi yapılamamıştır. Bu olgularda MYD88 ve MYC mutasyonlarını araştırmanın, PD-L1 ifade yüksekliğinin sebebini saptamada yardımcı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda CNA/Amplifikasyon ya da polizomi varlığının sağkalım üzerinde etkisi olup olmadığı incelenmiş, anlamlı ilişki bulunmamıştır (p=0.268). İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, CNA/amplifikasyon varlığında ortalama sağkalımın daha kısa olduğu izlenmiştir. Godfrey ve ark.’nın çalışmasında ise

genetik alterasyona sahip olguların 4.2 yıllık bir izlemde daha kötü progresyonsuz sağkalım gösterdikleri gözlenmiştir (47). Villa ve ark., genetik değişiklikler ile progresyonsuz ya da genel sağkalımı ilişkisiz bulmuştur (50). Literatürde 9p24.1 gen bölgesi değişiklikleri ile sağkalım ilişkisi açısından çok veri bulunmamakla birlikte, var olan veriler, vaka sayılarının azlığı nedeniyle kuvvetli istatistiksel anlam taşımamaktadırlar.

Tablo 5.4. Literatürde PSSSL’de FISH değerlendirmeleri

Yazar	Değerlendirme kriteri	Kullanılan probe	Sonuç
Chapuy ve ark., 2018		Kendi üretimleri	4/66 (%6) break-apart 33/63 (%52) CNA CNA, dokuda PD-L1 ifade düzeyi ile ilişkili. İlk defa translokasyon varlığı gösterildi.
Sethi ve ark., 2019	200 hücre, %5 eşik değer PD-L1/CEP9 $\geq$ 1: CNA PD-L1/CEP9 $\geq$ 2: amplifikasyon	Empire genomics	1/48 (%2) CNA 1/48 (%2) amplifikasyon Her iki olgu EBV+ Her iki olgu PD-L1+
Alame ve ark., 2019	100 hücre, %15 eşik değer	Empire genomics	8/47 (%17) break-apart 3/47 (%6) polizomi Translokasyon, PD-L1 ifadesi ile korele. Polizomik olgularda PD-L1 ifadesi ilişkisiz.
Villa ve ark., 2019	200 hücre, %5 break-apart, %20 amplifikasyon eşik değeri 3-4 füzyon sinyali: CNA >4: amplifikasyon	Kendi üretimleri	1/107 (%1) break-apart 13/101 (%12) CNA 3/101 (%3) amplifikasyon PD-L1 ifadesi ile ilişkisiz. Sağkalım ile ilişkisiz.

Godfrey ve ark., 2019 (Sistemik DBBHL)	30 hücre, %20 eşik değer PD-L1/CEP9 oranı ≥ 3 ise amplifikasyon; ≥ 1 ve ≤ 3 ise CNA, $=1$ ancak hem PD-L1 hem de CEP9 ayrı ayrı >2 ise polizomi	Empire Genomics	28/105 (%27) genetik değişiklik (17 CNA, 7 amplifikasyon, 2 translokasyon, 2 polizomi) PD-L1 ifadesi ile ilişkili Aktive fenotipte sık. Nüks/refrakter olgularda anti-PD-1 tedaviye yanıt.
Çalışmamız	200 hücre, %20 eşik değer	Zytovision amplifikasyon Diagen break-apart	5 (%11) polizomi 1 (%2.5) CNA 1 (%2.5) amplifikasyon EBV- Dokuda PD-L1 ifadesi ile ilişkisiz. Sagkalım ile ilişkisiz.

6. SONUÇLAR

- Çalışmamızda, primer santral sinir sistemi lenfomalarının kötü prognozu ile ilişkili olabileceği düşünülen, mikroçevrenin incelenmesi, bu tümörlerde immün kaçışı sağlayan PD-1 ve PD-L1 ifadelerinin belirlenmesi, PD-L1/PD-L2 gen bölgesindeki değişikliklerle ilişkinin saptanması amaçlanmıştır.
- Çalışmamıza 57 PSSSL, 45 nodal DBBHL olgusu dahil edilmiştir.
- Hastalara ait klinik parametreler (yaş, cinsiyet, tümör yerleşim yeri, multifokal kitle varlığı, serum LDH düzeyi, ECOG performans skoru, ilk tedaviye yanıt durumu, genel sağkalım süresi) kaydedilmiştir.
- Tüm olguların yaş ortalaması 57.67, PSSSL olgularının yaş ortalaması 56.26 (17-80), nodal DBBHL olgularının yaş ortalaması 59.44 (32-89) bulunmuştur. İki grubun yaş dağılımları arasında fark izlenmemiştir ($p=0.247$).
- Cinsiyet dağılımında her iki grupta beklendiği şekilde hafif erkek predominansı mevcuttur (E/K: 1.28; 1.25).
- PSSSL olgularının %42.2'sinde multifokal kitle varlığı, %30.8'inde derin tümör yerleşimi (serebellum, bazal ganglia, periventriküler, beyin sapı) saptanmış; en sık tümör yerleşim yeri literatür ile uyumlu şekilde frontal korteks olarak izlenmiştir.
- Kötü prognostik faktörlerden olan serum LDH yüksekliği PSSSL olgularının 24'ünde (%63.2), nodal DBBHL olgularının 27'sinde (%80) tanı anında saptanmıştır.
- PSSSL hastalarının 24'ü (%42.1), nodal DBBHL hastalarının 22'si (%49) 60 yaş üzerindedir.
- PSSSL olgularının 32'sinde (%57) diffüz gelişim paterni saptanırken, 21'inde (%38) perivasküler büyüme paterni, 3'ünde ise (%5) "scattered" patern izlenmiştir.
- PSSSL olgularında büyüme paterni; yaş dağılımı, multifokal kitle varlığı, derin tümör yerleşimi, PD-1 ve PD-L1 ifade düzeyleri ve genel sağkalım ile ilişkili bulunmamıştır ($p>0.05$).

- PSSSL olgularının %74'ü operasyon öncesi steroid tedavisi almıştır.
- Yaş ile kötü klinik prognostik parametreler (derin yerleşim, multifokal kitle varlığı, serum LDH yüksekliği) arasında ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$)
- Tümör mikroçevresi değerlendirilirken, milimetrekaredeki CD3, CD8 pozitif reaktif T lenfosit ve CD68 pozitif histiyosit sayıları kaydedilmiştir. CD8 pozitif T lenfositlerin CD3 pozitif T lenfositlere oranı belirlenmiştir.
- PSSSL olgularının nodal DBBHL'ye kıyasla belirgin şekilde daha düşük CD3, CD8+ TIL ve CD68+ histiyosit içeren bir mikroçevreye sahip olduğu saptanmıştır.
- Bu durumun, preoperatif steroid tedavisine bağlı olup olmadığının anlaşılması için, preoperatif steroid tedavisi alan PSSSL olguları ile almayanlar arasında CD3, CD8 ve CD68 değerleri karşılaştırılmış, anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).
- PSSSL'de tümör mikroçevresinin sistemik DBBHL'ye kıyasla daha düşük yoğunlukta olmasının, santral sinir sisteminin sahip olduğu, çeşitli bariyerler ile korunan özel mikroanatomisi ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Bu sayede immün sistemden kaçış sağlayan tümör, benzer fenotipteki lenfomalara (sistemik DBBHL) kıyasla daha kötü prognoz göstermektedir.
- CD8/CD3 oranı, PSSSL olgularında anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuş olup, santral sinir sistemi lenfomalarında, sistemik DBBHL'ye kıyasla tümör mikroçevresinin sitotoksik T lenfositlerden daha zengin olduğu izlenmiştir.
- Literatürde PSSSL olgularında sitotoksik T lenfositlerle prognoz ilişkisini araştıran bir çalışma mevcut değildir, ancak kendi serimizde CD8/CD4 oranı ile genel sağkalım arasında, hem PSSSL hem de nodal DBBHL grubunda istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilememiştir ($p=0.701$, $p=0.823$).
- Bizim çalışmamızda, hem PSSSL hem de nodal DBBHL grubunda, CD3, CD8, CD68 düzeyleri ile genel sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.153$, $p=0.394$, $p=0.912$; $p=0.393$, $p=0.980$, $p=0.237$).

- Santral sinir sistemi lenfomaları, özel mikroanatomiye sahip, immün sistemden kaçışı sağlayan koruyucu bir çevrede gelişen tümörlerdir. Bizim de çalışmamızda saptadığımız gibi, immün kontrol noktası moleküllerini yüksek oranda ifade etmektedirler. İmmün sistemden kaçış mekanizmalarına sahip tümör hücreleri, mikroçevrenin hücresel yoğunluğundan bağımsız olarak hayatta kalmayı başarmaktadır. Bu nedenle mikroçevre yoğunluğu, sağkalım üzerinde belirgin etki gösterememektedir. Bu noktada, mikroçevreyi immün baskılanmadan kurtaracak, immün kontrol noktası moleküllerine yönelik inhibitörlerin, hedeflenmiş tedavi seçenekleri arasında daha da önem kazanacağı düşünülmüştür.
- PSSSL grubunda 4 (%7.1), nodal DBBHL grubunda ise 3 (%6.7) olguda EBV pozitifliği saptanmış; iki grup arasında anlamlı fark izlenmemiştir ($p=1.000$).
- PSSSL grubunda, beklendiği şekilde EBV ilişkili olguların yaş ortalamaları, negatif olanlara kıyasla daha düşüktür (42 vs 57.2, $p=0.052$). Nodal DBBHL hastalarında ise EBV ile yaş ortalamaları arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (59.33 vs. 59.45, $p=0.893$).
- EBV pozitifliği gösteren olgularda, PSSSL tanılı 1 hastanın otoimmün hepatit nedeniyle yaklaşık 5 yıldır immün baskılayıcı tedavi aldığı öğrenilmiş, nodal DBBHL tanılı 1 vakanın aktif hepatit B hastası olduğu, 1 vakanın ise Hodgkin lenfoma öyküsü bulundurduğu saptanmıştır.
- Bir santral sinir sistemi lenfoma olgusu değerlendirilirken EBV pozitifliği sınıflama ve immün yetmezlik ilişkisi açısından araştırılmalı, pozitiflik saptanırsa hastanın klinik öyküsü detaylı incelenmeli, immün sistemi baskılayan bir özellik bulunamazsa klinisyen, hastanın bu açıdan daha detaylı araştırılması amacıyla bilgilendirilmelidir.
- Her iki hasta grubu ayrı ayrı, tümör mikroçevresi ve EBV ilişkisi açısından incelenmiştir. İstatistiksel olarak anlam saptanmasa da, EBV pozitif olgularda CD3, CD8+ T lenfositlerin ve CD68+ histiyositlerin ortalama değerlerinin daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir ($p=0.743$, $p=0.938$, $p=0.127$, $p=0.412$; $p=0.143$, $p=0.036$, $p=0.107$). Bu durumun, EBV pozitif

tümörlerde viral yüke bağlı, salınan sitokinler aracılığı ile oluşan yoğun mikroçevreyi yansıttığı düşünülmüştür.

- PSSSL olgularında EBV negatifliği daha yüksek PD-1 ifadesi ile ilişkili bulunmuştur ($p=0.036$). Nodal DBBHL olgularında ise EBV ile PD-1 ifadesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.589$, $p=0.747$). PSSSL grubunda saptadığımız ilişkinin, EBV'nin beklendiği şekilde PD-1/PD-L1 yolağını aktive edici özelliğini yansıttığı düşünülmüştür.
- PSSSL grubunda EBV pozitifliği tümörde ve mikroçevrede daha yüksek PD-L1 ifadesi ile ilişkili bulunmuştur ($p=0.056$, $p=0.051$). Nodal DBBHL grubunda bu ilişki izlenememiş olmakla birlikte ($p=0.702$, 0.078), EBV pozitif olguların ortalama PD-L1 ifadeleri daha yüksektir.
- Bu sonuçlar, PD-L1 yolağında aktive edici mekanizmalardan biri olduğu bilinen EBV pozitifliğinin, beklendiği şekilde PD-L1 ifadesini artırdığı gözlemini doğrulamaktadır.
- Çalışmamızda kantitatif bir değerlendirme yöntemi ile, tümörde ve mikroçevrede ayrı ayrı değerlendirme yapılarak bu gözlemin doğrulanmış olması mevcut bilgilere katkı sağlamaktadır.
- İstatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmasa da, EBV+ olguların daha yüksek sayıda sitotoksik T lenfosit bulundurduğu gözlenmiştir.
- Çalışmamızda EBV negatif olguların %25'inde tümörde PD-L1 pozitifliği izlenmiştir.
- Çalışmamızda EBV pozitif 7 olgunun 4'ünde FISH ile amplifikasyon varlığı araştırılmış, hiçbirinde amplifikasyon saptanmamıştır. Bu sonuçlar, EBV'nin intrensek mekanizmalarla PD-L1 yolağını aktive ettiği görüşünü desteklemektedir.
- PSSSL olgularında EBV pozitif olgularda ortalama sağkalım süresi 42 ay, negatif olgularda ise 33 ay olarak bulunmuş; EBV pozitifliği ile sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.383$).
- PSSSL ve nodal DBBHL olgularında mikroçevrede reaktif T lenfositlerde yüksek oranda PD-1 pozitifliği saptanmıştır (%89 vs. %75).
- PSSSL olgularının 17'sinde (%31), nodal DBBHL olgularının ise 11'inde (%24) tümörde PD-L1 ifadesi saptanmıştır.

- PSSSL olgularının 52'sinde (%96), nodal DBBHL olgularının tümünde (44/44) mikroçevrede PD-L1 pozitifliği saptanmıştır.
- PD-1 ve PD-L1 ifadesi yaş ile ilişkili saptanmamıştır ($p=0.253$, $p=0.052$).
- PSSSL olgularında nodal DBBHL'ye kıyasla daha yüksek PD-1 ifadesi saptanmıştır ($p=0.000$).
- Santral sinir sistemi lenfomaları ve nodal DBBHL olguları arasında, tümörde PD-L1 ifade düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.487$).
- Mikroçevrede PD-L1 ifadesi karşılaştırıldığında, nodal DBBHL grubunda mikroçevrede anlamlı şekilde daha yüksek PD-L1 ifadesi saptanmıştır ($p=0.10$). Bu sonucun nodal DBBHL'de saptadığımız daha yoğun mikroçevrenin sonucu olarak salınan sitokinlere bağlı olduğu düşünülmüştür.
- Hem PSSSL hem de nodal DBBHL grubunda tümörde PD-L1 ifadesi, CD3, CD8+ lenfosit sayıları, CD68+ histiyosit sayıları ve CD8/CD3 oranları ile korele değildir ($p=0.897$, $p=0.429$, $p=0.676$, $p=0.341$; $p=0.812$, $p=0.866$, $p=0.078$, $p=0.833$). Bu sonuçlar, tümörde PD-L1 ifadesinin, mikroçevre yoğunluğundan ve dolayısı ile salınan sitokinlerden bağımsız olarak, başka mekanizmalarla aktive olduğu şeklinde yorumlanmıştır.
- Mikroçevrede PD-L1 ifadesi, PSSSL'de CD3, CD8+ T lenfositler ve CD68+ histiyositler ile, nodal DBBHL olgularında da, CD3 ve CD8+ T lenfosit sayıları ile korele bulunmuştur ($p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.001$) ($p=0.022$, $p=0.020$).
- Mikroçevredeki PD-L1 ifadesinin, immün hücrelerin yoğunluğu ile pozitif korelasyon göstermesi, ortama salınan sitokinlerin immün hücreler üzerindeki PD-L1 ifadesini artırdığını desteklemektedir.
- PSSSL'de PD-1 ifadesi, CD3 ve CD8+ lenfosit sayıları ile korele, nodal DBBHL grubunda da CD3+ lenfositlerle korele bulunmuştur ($p=0.010$) ($p=0.000$, $p=0.000$).
- PD-1 ifadesinin de mikroçevre yoğunluğu ile pozitif korelasyon göstermesi, mikroçevrenin PD-1/PD-L1 yolağının aktivasyonu üzerinde etkisi olduğunu desteklemektedir.

- Bizim serimizde PD-1 ve PD-L1 ifadesinin negatif korele bulunmuş olması, PSSSL olgularında hedefe yönelik tedaviye uygun adayları belirlerken, hem PD-1 hem de PD-L1 ifadelerinin araştırılmasının, tedaviden fayda görebilecek hastaları kaçırmamak açısından faydalı olacağını düşündürmüştür.
- Sağkalım bilgilerine ulaşılabilen 47 PSSSL ve 30 nodal DBBHL olgusunda PD-1 ve PD-L1 ifadeleri ile sağkalım arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$).
- Tedavi yanıtı bilgilerine ise çok daha az sayıda hastada ulaşılabilmiş (10 PSSSL, 26 nodal DBBHL), PD-1/PD-L1 ifade düzeyleri ile anlamlı ilişki bulunmamıştır ancak, hasta sayısı çok az olduğu için istatistiksel karşılaştırmanın gücü oldukça düşüktür.
- PSSSL olgularında tümörde PD-L1 ifade eden olguların ortalama sağkalımı 32 ay, PD-L1 negatif olguların ortalama sağkalımı 35 ay; nodal DBBHL grubunda ise PD-L1 pozitif olguların ortalama sağkalımı 70 ay, negatif olguların 100 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.783$).
- PD-1 ifadesi gösteren PSSSL olgularının ortalama genel sağkalımı 35 ay, negatif olanların ise 27 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.813$), nodal DBBHL olgularında ise PD-1 pozitif olguların ortalama sağkalımı 91 ay, negatif olguların 98 ay olarak hesaplanmıştır ($p=0.213$).
- Santral sinir sistemi lenfomalarında, PD-L1 ifadesi direkt olarak kötü prognozla ilişki bulunmasa bile, PD-L1 pozitifliğinin bu agresif seyirli lenfoma tipinde daha sık gözlenmesi, etyopatogenez ve kötü prognoz açısından anlamlı gözükmemektedir.
- Bizim verilerimiz literatürdeki çalışmaların bir kısmıyla uyumludur ancak elde edilebilen klinik bilgi artırılabilirse, istatistiksel değerin kuvvetleneceği düşünülmüştür (45, 48, 50, 55).
- PD-L1/PD-L2 gen bölgesinde kopya sayısı değişikliğinin değerlendirilebildiği 44 PSSSL olgusunda %11 (5) polizomi, %2.5 (1) kopya sayısı artışı, %2.5 (1) amplifikasyon varlığı ve %4.5 (2) translokasyon saptanmıştır. Sonuçlarımız literatür verileri ile koreledir (45, 50). (Tablo 5.4).

- 25 aktive immüfenotip nodal DBBHL olgusunun ise %20'sinde (5) CNA, %4'ünde (1) amplifikasyon (1), %4'ünde polizomi (1) saptanmıştır.
- Amplifikasyon saptanan olguların hepsi EBV negatiftir.
- Amplifikasyon varlığı, mikroçevrede CD3, CD8 ve CD68 pozitif lenfosit ve histiyositlerin sayısı ile ilişkili bulunmamıştır ($p=0.279$, $p=0.124$, $p=0.533$).
- CNA/amplifikasyon varlığı, tümörde ya da mikroçevrede PD-L1 ifadesi ile korele bulunmamıştır ($p=0.067$, $p=0.070$).
- Sonuçlarımızda, PD-L1/PD-L2 gen bölgesinde CNA/amplifikasyon bulunduran olguların istatistiksel olarak kuvvetli bir anlam bulunmasa da, ortalama PD-L1 ifade düzeylerinin daha yüksek olduğu izlenmektedir. Genetik değişiklik bulundurmasına rağmen immünhistokimyasal olarak PD-L1 negatif olan olgularda dokuda PD-L2 protein ifadesinin de değerlendirilmesi gerekmektedir.
- 9p24.1 gen bölgesinde genetik değişiklik göstermeyen EBV negatif olgularımızda da dokuda yüksek PD-L1 ifadesi izlenmiştir. Bu durum, PSSSL olgularında farklı yolakların devreye girerek PD-1/PD-L1 aksını aktive ettiği görüşünü desteklemektedir.
- PSSSL olgularımızda, dokuda oldukça yüksek düzeyde PD-L1 ifadesi gösteren ancak hem EBV negatif hem de genetik değişiklik bulundurmayan olgularda MYD88 ve MYC mutasyonlarını araştırmanın, PD-L1 ifade yüksekliğinin sebebini saptamada yardımcı olabileceği düşünülmüştür.
- Bu sonuçlar eşliğinde, PD-1/PD-L1 aksına yönelik hedeflenmiş tedaviye uygun adayları belirlemede, 9p24.1 gen bölgesini araştırmanın, immünhistokimyasal pozitiflik gösteren vakaların hepsini saptayamaması nedeniyle, rutinde uygun bir yöntem olmayacağı sonucuna varılmıştır.
- Çalışmamızda CNA/Amplifikasyon ya da polizomi varlığı ile sağkalım arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0.268$) ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, CNA/amplifikasyon varlığında ortalama sağkalımın daha kısa olduğu izlenmiştir.

ÖZET

Beyin Lenfomalarının Moleküler Gelişimi ve Sınıflandırılması

AMAÇ: Primer santral sinir sistemi lenfoması (PSSSL), santral sinir sisteminde gelişip burada sınırlı kalan, agresif gidişli, sıklıkla DBBHL morfolojisinde bir tümördür ve tüm SSS neoplazilerinin %2-3'ünü oluşturur. Sık relapslarla seyreden kötü prognoza sahiptir ve bu duruma kendisine özgü moleküler değişikliklerin neden olduğu düşünülmektedir. Kanseri gelişimi ve ilerlemesinde immün sistem anahtar rol oynamaktadır ve kanser hücrelerinin bu sistemi alt edecek stratejiler geliştirebildiği bilinmektedir. Bu mekanizmalardan biri, PD-1/PD-L1 yolağıdır. PD-L1 ifade eden tümör hücreleri, T hücre yanıtını baskılayarak immün sistemden kaçış sağlarlar. Tanımlanan bu ilişki, PD-1/PD-L1 yolağının farklı kanser çeşitlerinde tedavi seçeneği olarak hedeflenmesine neden olmuştur. PSSSL'de literatürde çeşitli düzeylerde PD-1 ve PD-L1 ifadeleri bildirilmektedir. Bu tedavi seçeneğini araştırmayı amaçlayan yeni bir çalışma 4 nüks/refrakter primer santral sinir sistemi lenfoması hastasında anti-PD-1 tedavi ile tüm hastalarda tam ya da parsiyel klinik ve radyolojik yanıt ile, 13-17 ay arasında değişen progresyonsuz sağ kalım ortaya koymuştur. Çok merkezli bir faz 2 çalışma ile PSSSL hastalarını kapsayan tek merkezli bir çalışma da anti-PD-1 tedavi etkinliğini hali hazırda araştırmaktadır. Tedavi seçeneklerinin sınırlı, tedavi yan etkilerinin yüksek, kür oranının düşük olduğu bu lenfoma tipinde, immünoterapi hedefi olan belirteçlerin hastalık gelişimindeki rolü net olarak ortaya konmamıştır. Bu konuda yürütülmekte olan çalışmalar, sınırlı sayıda hasta grubunu içermekte ve konfirmasyona ihtiyaç duymaktadır. Yeni tedavi seçeneklerinin ve tedavide başarı için hastaların buna göre sınıflandırılmasının yerini araştıracağımız bu çalışmamızda Ankara Üniversitesi ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim dallarında PSSSL tanısı almış geniş bir hasta serisinin incelenerek, olguların retrospektif klinik analizi, tümör dokusunda PD-1 ve PD-L1 ifadesinin analizi ile bunların moleküler karşılığının in-situ hibridizasyon yöntemi ile araştırılması ve histopatolojik, prognostik parametrelerle ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Bu sayede kısa sürede ölümcül sonlanan bu hastalıkta yaşam süresinin arttırılmasında alternatif tedavilerin

belirlenmesi ve tanı anında yapılması gereken güvenilir testlerin neler olması gerektiğinin de ortaya konması hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOD: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD’nda PSSSL tanısı almış 57 vaka çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak santral sinir sistemi lenfomalarına benzer fenotipik özelliklere sahip 45 aktive immüfenotip DBBHL olgusu dahil edilmiştir. Tümör dokularında Beecher Instruments Manuel mikro-array cihazı ile seçilen alanlardan 1 mm çaplı, her hastadan 2 kor şeklinde temsil edilen örnekleme ile 3 adet doku mikro-array bloğu hazırlanmıştır. Hazırlanan bloklardan alınan kesitlerde PD-1, CD3, CD8, CD68, PD-L1 (siyah) + PAX5 (kırmızı) immühistokimyasal, EBER in-situ hibridizasyon ve PD-L1/PD-L2 gen bölgesinde amplifikasyon ve translokasyon varlığı FISH yöntemi ile incelenmiştir. Olgulara ait klinik bilgiler hastane bilgi sistemleri aracılığı ile taranarak kayıt altına alınmıştır. İstatistiksel analizlerde SPSS ver.20 ile $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

SONUÇLAR: PSSSL olgularının, nodal DBBHL’ye kıyasla belirgin şekilde daha düşük CD3, CD8+ TIL ve CD68+ histiyosit içeren bir mikroçevreye sahip olduğu, bu sonucun preoperatif steroid tedavisinden bağımsız olduğu gösterilmiştir. PSSSL olgularının, sistemik DBBHL’ye kıyasla tümör mikroçevresinde sitotoksik T lenfositlerden daha zengin olduğu gösterilmiştir. PSSSL olgularında, mikroçevredeki hücresel yoğunluğun genel sağkalım ile ilişkisiz olduğu sonucuna varılmıştır. EBV pozitif olguların mikroçevreden daha yoğun olduğu, daha yüksek sitotoksik T lenfosit bulundurduğu gösterilmiştir. EBV pozitifliği, daha yüksek PD-L1 ifadesi ile ilişkili saptanmıştır. PSSSL’de tümörde %31, mikroçevrede %96; nodal DBBHL’de tümörde %24, mikroçevrede %100 oranında PD-L1 ifadesi izlenmiştir. PSSSL’de ve nodal DBBHL’de PD-1 ifadesi yüksek oranlarda saptanmıştır (%89 vs. %75). Nodal DBBHL’de saptanan daha yoğun mikroçevre ile korele olarak, mikroçevrede PD-L1 ifadesi daha yüksek bulunmuştur. Mikroçevrede hem PD-1 hem de PD-L1 ifadesi, lenfosit ve histiyosit sayıları ile koreledir. PD-1 ve PD-L1 ifadeleri sağkalım ile ilişkili bulunmamıştır. 44 PSSSL olgusunda %11 (5) polizomi, %2.5 (1) kopya sayısı artışı, %2.5 (1) amplifikasyon varlığı ve %4.5 (2) translokasyon; 25 aktive immüfenotip nodal DBBHL olgusunun ise %20’sinde (5) CNA, %4’ünde (1) amplifikasyon (1), %4’ünde polizomi (1) saptanmıştır. Genetik değişiklikler ile PD-

L1 ifade düzeyi, mikroçevre yoğunluğu ve genel sağkalım arasında ilişki saptanmamıştır.

TARTIŞMA: PSSSL olgularında, nodal DBBHL'ye kıyasla belirgin şekilde daha düşük yoğunlukta izlenen mikroçevrenin, santral sinir sisteminin sahip olduğu, çeşitli bariyerler ile korunan özel mikroanatomisi sayesinde geliştiği ve immün sistemden kaçışa sağladığı katkı ile benzer fenotipteki lenfomalara (sistemik DBBHL) kıyasla gösterdiği kötü prognozun nedenlerinden biri olduğu düşünülmüştür. Mikroçevrenin sağkalım ile ilişkisiz olmasının, SSS'nin özel mikroanatomiyi sahip, immün sistemden kaçışı sağlayan koruyucu çevresi ve immün kontrol noktası moleküllerini yüksek oranda ifade etmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu sayede tümör, mikroçevrenin hücresel yoğunluğundan bağımsız olarak hayatta kalmayı başarmaktadır. Bu nedenle, mikroçevreyi immün baskılanmadan kurtaracak, immün kontrol noktası moleküllerine yönelik inhibitörlerin, hedeflenmiş tedavi seçenekleri arasında daha da önem kazanacağı düşünülmüştür. EBV pozitif olgularda izlenen yoğun mikroçevrenin, viral yüke bağlı salınan sitokinler ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. EBV pozitifliği, tümörde beklendiği şekilde daha yüksek PD-L1 ifadesi ile ilişkili bulunmuştur. Mikroçevrede PD-L1 ifadesinin, lenfosit ve histiyosit sayıları ile korele olması, immün hücrelerden salınan sitokinlere bağlı gelişirken, tümörde böyle bir korelasyon izlenmemesi, tümörde PD-L1 ifadesinin mikroçevreden bağımsız mekanizmalarla geliştiğini desteklemiştir. PD-L1 ifadesi direkt olarak kötü prognozla ilişki bulunmamış olsa da bu agresif seyirli lenfoma tipinde daha sık PD-L1 pozitifliği bulunması, etyopatogenez ve kötü prognoz açısından anlamlı gözükmektedir. Saptanan genetik değişikliklerin, PD-L1 ifadesi ile korelasyon göstermemesi, hedeflenmiş tedaviye uygun adayların seçiminde FISH yönteminin etkin olmadığını ortaya koymuştur. Sonuçta PSSSL, devam etmekte olan klinik çalışmalar ve literatürdeki veriler eşliğinde, PD-1/PD-L1 aksını hedefleyen tedavilere aday, agresif gidişli bir hastalıktır. İmmün kaçışı sağlayan moleküllerin ifadesi bu tümörlerde yüksek düzeylerde gözlenmektedir. Tanı esnasında bu belirteçlerin ifadesini belirlemek hastalara potansiyel tedavi seçeneği açısından yardımcı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Primer santral sinir sistemi lenfoması, PD-1, PD-L1, immün kontrol noktası, EBV

SUMMARY

Molecular Development and Classification of Brain Lymphomas

AIM: Primary central nervous system lymphoma (PCNSL) is an aggressive tumour which develops and limited inside the central nervous system. It usually has the diffuse large B cell lymphoma morphology and constitutes 2-3% of all CNS neoplasias. It has a poor prognosis with frequent relapses and this is thought to be caused from its unique molecular changes. Immune system has a critical role for cancer development and progression and it is well known that cancer cells can produce mechanisms to escape immune system. PD-1/PD-L1 axis is one of these mechanisms. Tumor cells expressing PD-L1, suppress T cell answer and escape from immune system. Defining this relationship provided a treatment alternative as targeting PD-1/PD-L1 for various cancer types. Different PD-1 and PD-L1 expression levels are reported in the literature for PCNSL. Complete or partial clinical and radiological response and 13-17 months of progression-free survival was achieved in 4 relapsed/refractory PCNSL patients with anti-PD-1 treatment in a recent study. Currently there is a multicentered phase 2 and one-centered study is investigating the anti-PD-1 treatment efficacy in PCNSL patients. PCNSL has limited treatment modalities with high frequencies of adverse affects and low cure levels and the role of immunotherapy targeted markers in development of this disease couldn't presented exactly. The studies in this subject includes limited patient numbers and needs confirmation. We aimed to investigate markers of potential alternative therapies for PCNSL patients in this study. Patients diagnosed with PCNSL in Ankara University and Hacettepe University Pathology departments were retrospectively analysed for clinical parameters, PD-1/PD-L1 expression and molecular alterations regarding to PD-L1/PD-L2 gene locus. We aimed to identify prognostic and therapeutic markers in order to enhance survival in these aggressive disease.

MATERIAL and METHOD: Total 57 patients diagnosed with PCNSL in Ankara University and Hacettepe University Pathology departments were included to the study. As the control group, 45 DLBCL (non-germinal center phenotype) were

included. 3 micro-array tissue blocks were constructed with the help of Beecher Instruments Manuel micro-array device. 2 core per patient with 1 mm diameter were sampled. PD-1, CD3, CD8, CD68, PD-L1 (brown) + PAX5 (red) immunohistochemical stainings, EBER in-situ hybridization staining and amplification/translocation conditions in PD-L1/PD-L2 gene region with FISH method were performed on the sections from constructed tissue blocks. Clinical information regarding patients were recorded using the hospital information systems. SPSS ver.20 was used for statistical analysis and $p < 0.05$ was accepted as significant.

RESULTS: PCNSL cases had a microenvironment with lower CD3, CD8+ T lymphocytes and CD68+ histiocytes compared to nodal DLBCL, independent from preoperative steroid treatment effect. Microenvironment in PCNSL cases was enriched with cytotoxic T lymphocytes compared to nodal DLBCL. The density of microenvironment was not related to overall survival in PCNSL cases. EBV positive cases had denser microenvironment that is enriched with cytotoxic T lymphocytes compared to negative ones. EBV positivity was related to higher PD-L1 expression. We found tumoral PD-L1 expression 31% and microenvironment PD-L1 expression 96% in PCNSL; while it was 24% and 100% in nodal DLBCL, respectively. PD-1 expression was high both in PCNSL and nodal DLBCL cases (89% vs. 75%). PD-L1 expression was significantly higher in nodal DLBCL, compared to PCNSL, correlated with the higher density of microenvironment. PD-L1 expression in microenvironment was correlated with both lymphocyte and histiocyte numbers. Both PD-1 and PD-L1 expression were not related with overall survival. We detected 11% (5) polysomy, 2.5% (1) copy number alteration, 2.5% (1) amplification and 4.5% (2) translocation in 45 PCNSL cases; and 20% (5) copy number alteration, 4% (1) amplification, 4% (1) polysomy in 25 DLBCL lymphomas. Genetic alterations were not correlated with tissue PD-L1 expression levels, microenvironment density or overall survival.

DISCUSSION: The lower density of microenvironment in PCNSL compared to DLBCL, was thought to be the result of special protected microanatomy of CNS. With this protection, PCNSL achieves immune evasion and has a worse prognosis compared to systemic DLBCL with similar phenotype. It is hypothesized that the escape of CNS from immune system with the help of immune checkpoint molecules

is the reason of independence of survival from microenvironment. Thus, tumor survives without the effect of density of microenvironment. For this reason, it is thought that immune checkpoint inhibitors could remove suppression of microenvironment and would benefit patients as a targeted therapy alternative. The higher density of microenvironment in EBV positive cases is thought to be the result of secreted cytokines for viral load. EBV positivity was found to be related with higher PD-L1 expression as expected. Positive correlation of microenvironment PD-L1 expression with lymphocytes and histiocytes is the result of cytokines released from immune cells. However there is no such a correlation with tumor PD-L1 expression which shows PD-L1 expression in tumor is activated with mechanisms independent from microenvironment. Although we couldn't find a direct relationship with PD-L1 expression and survival, detection of PD-L1 positivity more often in this aggressive lymphoma type supports this mechanism is important in both etiopathogenesis and prognosis. Detected genetic alterations were not correlated with tissue protein expression. FISH analysis is not the most effective test for detecting suitable candidates for targeted treatment. In conclusion, PCNSL is an aggressive disease which is suitable for PD-1/PD-L1 targeted therapies, in the light of current data and literature. The markers helping immune evasion are detected in high levels in PCNSL. To identify these biomarkers in the time of diagnosis would help the patients for alternative treatment modalities.

Keywords: Primary central nervous system lymphoma, PD-1, PD-L1, immune checkpoint, EBV

KAYNAKLAR

1. Fukumura K, Kawazu M, Kojima S, Ueno T, Sai E, Soda M, et al. Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):865-75.
2. Fraser E, Gruenberg K, Rubenstein JL. New approaches in primary central nervous system lymphoma. *Chin Clin Oncol.* 2015;4(1):11.
3. Cai Q, Fang Y, Young KH. Primary Central Nervous System Lymphoma: Molecular Pathogenesis and Advances in Treatment. *Transl Oncol.* 2019;12(3):523-38.
4. Zhou Y, Liu W, Xu Z, Zhu H, Xiao D, Su W, et al. Analysis of Genomic Alteration in Primary Central Nervous System Lymphoma and the Expression of Some Related Genes. *Neoplasia.* 2018;20(10):1059-69.
5. Low S, Han CH, Batchelor TT. Primary central nervous system lymphoma. *Ther Adv Neurol Disord.* 2018;11:1756286418793562.
6. Deckert M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, Siebert R. Systems biology of primary CNS lymphoma: from genetic aberrations to modeling in mice. *Acta Neuropathol.* 2014;127(2):175-88.
7. Negi N, Das BK. CNS: Not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *Int Rev Immunol.* 2018;37(1):57-68.
8. Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol.* 2017;18(2):123-31.
9. W.Paulus KJ. Comparison of integrin adhesion molecules expressed by primary brain lymphomas and nodal lymphomas *Acta Neuropathol.* 1993;86:360-4.
10. Yuan J, Gu K, He J, Sharma S. Preferential up-regulation of osteopontin in primary central nervous system lymphoma does not correlate with putative receptor CD44v6 or CD44H expression. *Hum Pathol.* 2013;44(4):606-11.

11. Zorofchian S, El-Achi H, Yan Y, Esquenazi Y, Ballester LY. Characterization of genomic alterations in primary central nervous system lymphomas. *J Neurooncol.* 2018;140(3):509-17.
12. Montesinos-Rongen M, Van Roost D, Schaller C, Wiestler OD, Deckert M. Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood.* 2004;103(5):1869-75.
13. Maxime Fontanilles FM, Élodie Bohers, Pierre-Julien Vially, Sydney Dubois, Philippe Bertrand. Non-invasive detection of somatic mutations using nextgeneration sequencing in primary central nervous system lymphoma *Oncotarget.* 2017;7(29):48157-68.
14. Schwindt H, Vater I, Kreuz M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, Richter J, et al. Chromosomal imbalances and partial uniparental disomies in primary central nervous system lymphoma. *Leukemia.* 2009;23(10):1875-84.
15. Richter J, Ammerpohl O, Martin-Subero JI, Montesinos-Rongen M, Bibikova M, Wickham-Garcia E, et al. Array-based DNA methylation profiling of primary lymphomas of the central nervous system. *BMC Cancer.* 2009;9:455.
16. Baraniskin A, Kuhnhen J, Schlegel U, Chan A, Deckert M, Gold R, et al. Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as marker for primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Blood.* 2011;117(11):3140-6.
17. Robertus JL, Harms G, Blokzijl T, Booman M, de Jong D, van Imhoff G, et al. Specific expression of miR-17-5p and miR-127 in testicular and central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2009;22(4):547-55.
18. Fischer L, Hummel M, Korfel A, Lenze D, Joehrens K, Thiel E. Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Neuro Oncol.* 2011;13(10):1090-8.
19. Cornelius Courts MM-R, Jose Ignacio Martin-Subero. <courts2007.pdf>. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66:230-7.
20. Vater I, Montesinos-Rongen M, Schlesner M, Haake A, Purschke F, Sprute R, et al. The mutational pattern of primary lymphoma of the central nervous system determined by whole-exome sequencing. *Leukemia.* 2015;29(3):677-85.

21. Montesinos-Rongen M, Schafer E, Siebert R, Deckert M. Genes regulating the B cell receptor pathway are recurrently mutated in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2012;124(6):905-6.
22. Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Brunn A, Gesk S, Richter J, Hong K, et al. Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF-kappaB pathway in primary CNS lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2010;120(4):529-35.
23. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Pallasch CP, Reinhardt HC. Rewired NFkappaB signaling as a potentially actionable feature of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2016;97(6):499-510.
24. Gonzalez-Aguilar A, Idbaih A, Boisselier B, Habbita N, Rossetto M, Laurence A, et al. Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2012;18(19):5203-11.
25. Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A, Wiestler OD, Siebert R, Deckert M. Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2011;122(6):791-2.
26. Zheng M, Perry AM, Bierman P, Loberiza F, Jr., Nasr MR, Szwajcer D, et al. Frequency of MYD88 and CD79B mutations, and MGMT methylation in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *Neuropathology.* 2017;37(6):509-16.
27. Brunn A, Montesinos-Rongen M, Strack A, Reifenberger G, Mawrin C, Schaller C, et al. Expression pattern and cellular sources of chemokines in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.* 2007;114(3):271-6.
28. Ponzoni M, Berger F, Chassagne-Clement C, Tinguely M, Jouvet A, Ferreri AJ, et al. Reactive perivascular T-cell infiltrate predicts survival in primary central nervous system B-cell lymphomas. *Br J Haematol.* 2007;138(3):316-23.
29. Rubenstein JL, Fridlyand J, Shen A, Aldape K, Ginzinger D, Batchelor T, et al. Gene expression and angiotropism in primary CNS lymphoma. *Blood.* 2006;107(9):3716-23.

30. Pesic M, Bartholomaeus I, Kyratsous NI, Heissmeyer V, Wekerle H, Kawakami N. 2-photon imaging of phagocyte-mediated T cell activation in the CNS. *J Clin Invest.* 2013;123(3):1192-201.
31. Montesinos-Rongen M, Purschke FG, Brunn A, May C, Nordhoff E, Marcus K, et al. Primary Central Nervous System (CNS) Lymphoma B Cell Receptors Recognize CNS Proteins. *J Immunol.* 2015;195(3):1312-9.
32. Riemersma SA, Oudejans JJ, Vonk MJ, Dreef EJ, Prins FA, Jansen PM, et al. High numbers of tumour-infiltrating activated cytotoxic T lymphocytes, and frequent loss of HLA class I and II expression, are features of aggressive B cell lymphomas of the brain and testis. *J Pathol.* 2005;206(3):328-36.
33. Steven H. Swedlow EC, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe et al. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Bosman FT, editor. Lyon, France: IARC; 2017.
34. Elaine S. Jaffe DAA, Elisa Campo, Nancy Lee Harris, Leticia Quintanilla-Martinez. Hematopathology. Philadelphia: Elsevier; 2017.
35. Inoue A. Prognostic significance of immunohistochemical subtypes based on the stage of B-cell differentiation in primary CNS lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12:1457-67.
36. G. Klein HOS, E. Klein, K. E. Hellstrom. Demonstration of Resistance against Methylcholanthreneinduced Sarcomas in the Primary Autochthonous Host. *Cancer Res.* 1960;20:1561-72.
37. Johanna A. Joyce DTF. T cell exclusion, immune privilege and the tumor microenvironment. *Cancer immunology and immunotherapy.* 2015;348(6230):74-80.
38. Mottok A, Steidl C. Genomic alterations underlying immune privilege in malignant lymphomas. *Curr Opin Hematol.* 2015;22(4):343-54.
39. Wang LL, Li ZH, Hu XH, Muyayalo KP, Zhang YH, Liao AH. The roles of the PD-1/PD-L1 pathway at immunologically privileged sites. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(2).

40. Four M, Cacheux V, Tempier A, Platero D, Fabbro M, Marin G, et al. PD1 and PDL1 expression in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma are frequent and expression of PD1 predicts poor survival. *Hematol Oncol.* 2017;35(4):487-96.
41. Alame M, Pirel M, Costes-Martineau V, Bauchet L, Fabbro M, Tournieret A, et al. Characterisation of tumour microenvironment and immune checkpoints in primary central nervous system diffuse large B cell lymphomas. *Virchows Arch.* 2019.
42. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 2007;27(1):111-22.
43. Georgiou K, Chen L, Berglund M, Ren W, de Miranda NF, Lisboa S, et al. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2016;127(24):3026-34.
44. Li L, Sun R, Miao Y, Tran T, Adams L, Roscoe N, et al. PD-1/PD-L1 expression and interaction by automated quantitative immunofluorescent analysis show adverse prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma having T-cell infiltration: a study from the International DLBCL Consortium Program. *Mod Pathol.* 2019;32(6):741-54.
45. Sethi TK, Kovach AE, Grover NS, Huang LC, Lee LA, Rubinstein SM, et al. Clinicopathologic correlates of MYD88 L265P mutation and programmed cell death (PD-1) pathway in primary central nervous system lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2019:1-10.
46. Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, Natkunam Y, Redd RA, Homer H, et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol.* 2016;34(23):2690-7.
47. Godfrey J, Tumuluru S, Bao R, Leukam M, Venkataraman G, Phillip J, et al. PD-L1 gene alterations identify a subset of diffuse large B-cell lymphoma harboring a T-cell-inflamed phenotype. *Blood.* 2019;133(21):2279-90.

48. Chapuy B, Roemer MG, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L, et al. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood*. 2016;127(7):869-81.
49. Chong LC, Twa DD, Mottok A, Ben-Neriah S, Woolcock BW, Zhao Y, et al. Comprehensive characterization of programmed death ligand structural rearrangements in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2016;128(9):1206-13.
50. Villa D, Tan KL, Steidl C, Ben-Neriah S, Al Moosawi M, Shenkier TN, et al. Molecular features of a large cohort of primary central nervous system lymphoma using tissue microarray. *Blood Adv*. 2019;3(23):3953-61.
51. Ou A, Sumrall A, Phuphanich S, Spetzler D, Gatalica Z, Xiu J, et al. Primary CNS lymphoma commonly expresses immune response biomarkers. *Neurooncol Adv*. 2020;2(1):vdaa018.
52. Cho I, Lee H, Yoon SE, Ryu KJ, Ko YH, Kim WS, et al. Serum levels of soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1) in patients with primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *BMC Cancer*. 2020;20(1):120.
53. Berghoff AS, Ricken G, Widhalm G, Rajky O, Hainfellner JA, Birner P, et al. PD1 (CD279) and PD-L1 (CD274, B7H1) expression in primary central nervous system lymphomas (PCNSL). *Clin Neuropathol*. 2014;33(1):42-9.
54. Hayano A, Komohara Y, Takashima Y, Takeya H, Homma J, Fukai J, et al. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Primary Central Nervous System Lymphomas: A Clinicopathological Study. *Anticancer Res*. 2017;37(10):5655-66.
55. Cho H, Kim SE, Kim SJ, Chang JH, Yank W. Programmed cell death 1 expression is associated with inferior survival in patients with primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*. 2017;8(50):87317-28.
56. Sugita Y, Furuta T, Ohshima K, Komaki S, Miyoshi J, Morioka M, et al. The perivascular microenvironment in Epstein-Barr virus positive primary central nervous system lymphoma: The role of programmed cell death 1 and programmed cell death ligand 1. *Neuropathology*. 2018;38(2):125-34.

57. Chan TA, Wolchok JD, Snyder A. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(20):1984.
58. Nayak L, Iwamoto FM, LaCasce A, Mukundan S, Roemer MGM, Chapuy B, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma. *Blood*. 2017;129(23):3071-3.
59. Qiu Y, Li Z, Pouzoulet F, Vishnu P, Copland JA, 3rd, Knutson KL, et al. Immune checkpoint inhibition by anti-PDCD1 (anti-PD1) monoclonal antibody has significant therapeutic activity against central nervous system lymphoma in an immunocompetent preclinical model. *Br J Haematol*. 2018;183(4):674-8.
60. Grommes C, Nayak L, Tun HW, Batchelor TT. Introduction of novel agents in the treatment of primary CNS lymphoma. *Neuro Oncol*. 2019;21(3):306-13.
61. Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim J-Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic research*. 2012;53(1-3):11-24.
62. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
63. Nam SJ, Go H, Paik JH, Kim TM, Heo DS, Kim CW, et al. An increase of M2 macrophages predicts poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *Leukemia & lymphoma*. 2014;55(11):2466-76.
64. Xu Y, Kroft SH, McKenna RW, Aquino DB. Prognostic significance of tumour-infiltrating T lymphocytes and T-cell subsets in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a multiparameter flow cytometry study. *British journal of haematology*. 2001;112(4):945-9.
65. Álvaro-naranjo T, Lejeune M, Salvadó-Usach MT, Bosch-Príncipe R, Reverter-Branchat G, Jaén-Martínez J, et al. Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. *Leukemia & lymphoma*. 2005;46(11):1581-91.
66. Alonso-Álvarez S, Vidriales MB, Caballero MD, Blanco O, Puig N, Martín A, et al. The number of tumor infiltrating T-cell subsets in lymph nodes from

- patients with Hodgkin lymphoma is associated with the outcome after first line ABVD therapy. *Leukemia & lymphoma*. 2017;58(5):1144-52.
67. Cho H, Kim SH, Kim SJ, Chang JH, Yang WI, Suh CO, et al. The prognostic role of CD68 and FoxP3 expression in patients with primary central nervous system lymphoma. *Ann Hematol*. 2017;96(7):1163-73.
 68. Furuse M, Kuwabara H, Ikeda N, Hattori Y, Ichikawa T, Kagawa N, et al. PD-L1 and PD-L2 expression in the tumor microenvironment including peritumoral tissue in primary central nervous system lymphoma. *BMC Cancer*. 2020;20(1):277.
 69. Huang S, Nong L, Liang L, Zheng Y, Wang W, Liu J, et al. Comparison of PD-L1 detection assays and corresponding significance in evaluation of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Med*. 2019;8(8):3831-45.
 70. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, Sun HH, Roemer MG, Xu ML, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3462-73.
 71. Pollari M, Bruck O, Pellinen T, Vahamurto P, Karjalainen-Lindsberg ML, Mannisto S, et al. PD-L1(+) tumor-associated macrophages and PD-1(+) tumor-infiltrating lymphocytes predict survival in primary testicular lymphoma. *Haematologica*. 2018;103(11):1908-14.
 72. Goodman A, Patel SP, Kurzrock R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(4):203-20.
 73. Wang WG, Jiang XN, Sheng D, Sun CB, Lee J, Zhou XY, et al. PD-L1 overexpression is driven by B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Lab Invest*. 2019;99(10):1418-27.
 74. Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, et al. MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1. *Science*. 2016;352(6282):227-31.